

Université Blaise Pascal
(Clermont-Ferrand II)
DU n° 1969

Institut de Radioprotection
et de Sûreté Nucléaire (IRSN)
Année 2009

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé de Clermont-Ferrand
n° 510

THESE

Pour obtenir le grade de
Docteur d'Université

**Spécialité : Physiologie et Génétique Moléculaires
(Radiotoxicologie)**

Présentée par

Radjini RACINE

**ÉTUDE DES EFFETS D'UNE INGESTION CHRONIQUE DE RADIONUCLÉIDES SUR LE
MÉTABOLISME DU CHOLESTÉROL CHEZ LE RAT :
EXEMPLES DE L'URANIUM APPAUVRI ET DU CÉSIUM 137**

Soutenue le 28 octobre 2009

Devant le jury composé de :

Pr Jean-Marc LOBACCARO, Université Clermont-Ferrand II
Dr Jean-Charles MARTIN, Universités AIX-MARSEILLE I & II
Dr Eric QUEMENEUR, CEA
Dr Jean-René JOURDAIN, IRSN
Pr Georges VEYSSIERE, Université Clermont-Ferrand II
Dr Maâmar SOUIDI, IRSN

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur, co-directeur
Examineur, co-directeur

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier sincèrement les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse : le Pr Jean-Marc Lobaccaro en tant que président du jury, les Dr Jean-Charles Martin et Eric Quéméneur en tant que rapporteurs (merci pour leur patience) et le Dr Jean-René Jourdain en tant qu'examineur.

Je remercie également le Pr Georges Veyssière pour son aide, sa disponibilité et sa gentillesse.

Enfin, mes remerciements vont naturellement au Dr Maâmar Souidi, pour avoir initié cette thèse, pour son encadrement, sa disponibilité et son soutien tout au long de ces trois ans (surtout dans les tous derniers moments !) et pour son enthousiasme, sa pédagogie et tout ce qu'il m'a apporté d'un point de vue non scientifique.

Je tiens également à remercier les Drs Patrick Gourmelon, Jocelyne Aigueperse, Philippe Voisin et Patrick Laloï pour leur accueil à l'IRSN et plus particulièrement au Service de RadioBiologie et d'Epidémiologie, ainsi qu'aux Drs François Paquet et Isabelle Dublineau pour m'avoir successivement accueillie au Laboratoire de Radiotoxicologie Expérimentale.

Mes remerciements vont également au Dr Yann Guéguen pour ses encouragements et son soutien au cours de ces trois ans, ainsi qu'aux Dr Jean-Marc Bertho et Philippe Lestavel pour leur sympathie et leur gentillesse. Merci à eux pour leur aide au cours de ces trois années.

Un grand merci à Stéphane Grison pour son aide à la paillasse et sur ordinateur, pour ses discussions ouvertes et sa bonne humeur. Merci également à Johanna Stefani pour son aide technique et à Cédric Baudelin pour sa gestion de l'élevage de souris apo E^{-/-} et les cours de dissection.

Mes remerciements s'adressent aussi à l'ensemble des thésards, stagiaires et post-doctorants que j'ai croisés et qui m'ont apporté conseils, aide, fous rires et pauses café au fil des ces trois ans : Emilie, Naya, Marie-Cécile, Fabrice, Yseult, Elodie, Sébastien, Sophie, Audrey, Patricia, Nicholas, Awatif, Hanaâ. Merci en particulier à Elise Grignard, qui m'a apporté son aide, son soutien et sa technique de Western Blot ! Vive la rédaction à 4 mains...

Je remercie également les membres du LRTOX de Pierrelatte pour leur accueil, et en particulier Carine Darolles. Merci également à Frédéric Voyer et Thierry Loizeau pour leur aide technique et le soin qu'ils ont pris des animaux.

Au-delà du LRTOX, mes remerciements reconnaissants vont à Sandrine Quernée pour son aide administrative et son efficacité redoutable. Merci également à Keltoum Mediana pour sa disponibilité et sa gentillesse. Merci enfin à Chloé pour sa rapidité et son efficacité face aux petits tubes marrons !

Je remercie également les membres autres laboratoires du SRBE pour leur sympathie et leur disponibilité. Merci en particulier à Fabien Milliat, Alain Chapel et Georges Tarlet pour leur aide précieuse lors de mes nombreux blocages techniques... Merci aussi à Fabienne, Rym, Karl et Marco pour nos discussions, pour leur amitié et pour leur joie de vivre.

Enfin, *last but not least* (mon fameux amour de la litote), j'adresse ma reconnaissance et mes remerciements éternels à Hélène Bensoussan, Line Grandcolas et Caroline Rouas pour tout ce qu'elles m'ont apporté et pour tout ce qu'elles ont supporté au cours de ma thèse qui n'aurait pas été ce qu'elle est sans elles (et je fais des phrases de quatre lignes si je veux !). Par leur aide et leur soutien constants à tous les niveaux, elles m'ont permis de m'améliorer et de ne jamais renoncer (même avec deux mètres de bois dans les jambes). Merci beaucoup pour votre bonne humeur (meur, meur, meur-meur), notre amitié, votre capacité à éponger la déprime (ou à la noyer), nos délires, nos grandes discussions d'avenir et nos à-côtés fantastiques. Je vous dois beaucoup !

Toujours pour vous trois, un grand merci de la part du manuscrit, qui vous est extrêmement reconnaissant d'avoir grandement contribué à sa libération. Figures, tableaux, références, corrections et mise en page vous remercient toutes les trois, ainsi que Lubo pour son intervention décisive dans les prolongations.

Dans la vraie vie, je remercie également mes amis (les autres) d'avoir fait abstraction de l'état d'esprit particulier du thésard face au monde extérieur, et d'avoir accepté sans râler le blackout de quatre mois. Merci aux potes Duruy et consorts, ainsi qu'à Claire-Marie et Nicolas (qui ont accepté d'être amputés d'un demi-témoin), Emilie et sa pause japonaise bienvenue, et tous les autres...

Enfin, merci à ma famille pour son soutien constant et sa bonne humeur, les boîtes-repas et les ampoules, les relectures à l'arrache, les fournitures informatiques, le vécu par procuration de la rédaction, et tout le reste !

Kavi : ça y est, je suis de l'autre côté...

VALORISATION

Publications et revue

1. Racine R, Grandcolas L, Dublineau I, Gourmelon P, Veyssière G, Souidi M. Cholesterol Hepatic Metabolism Following a Chronic Internal Contamination with ¹³⁷Cesium Starting at Foetal Stage in Rats. Journal of Radiation Research, *sous presse*
2. Racine R, Grandcolas L, Grison S, Gourmelon P, Gueguen Y, Veyssière G, Souidi M. Molecular modifications of cholesterol metabolism in the liver and the brain after chronic contamination with cesium 137. Food Chem Toxicol 2009; 47(7):1654-59
3. Racine R, Gueguen Y, Gourmelon P, Veyssière G, Souidi M. Modifications of the Expression of Genes Involved in Cerebral Cholesterol Metabolism in the Rat Following Chronic Ingestion of Depleted Uranium. J Mol Neurosci. 2009;38(2):159-165 doi: 10.1007/s12031-008-9145-8

Publications et revues en collaboration

4. Lestaevel P, Racine R; Bensoussan H, Rouas C, Gueguen Y, Dublineau I, Bertho JM, Gourmelon P, Jourdain JR, Souidi M. Césium 137: propriétés et effets biologiques après contamination interne. Médecine nucléaire, *sous presse*
5. Souidi M, Tissandie E, Racine R, Bensoussan H, Rouas C, Lestaevel P, Grignard E, Gourmelon G and Gueguen Y. [Uranium: properties and biological effects after internal contamination.] Ann Biol Clin (Paris). 2009 Jan-Feb;67(1):23-38. French.
6. Bertho JM, Roy L, Souidi M, Benderitter M, Bey E, Racine R, Fagot T, Gourmelon P. Initial evaluation and follow-up of acute radiation syndrome in two patients from the Dakar accident. Biomarkers 2009;14(2):94-102

Publications en cours de rédaction

7. Racine R, Grandcolas L, Grison S, Stefani J, Delissen O, Gourmelon P, Veyssière G, Souidi M. Cholesterol 7 -hydroxylase (CYP7A1) activity is modified after chronic ingestion of depleted uranium in the rat. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, *  soumettre*
8. Bensoussan H, Racine R, Airault F, Dublineau I, Gourmelon P, Souidi M, Lestaevel P. Effect on gene expression of acetylcholine and cholesterol metabolisms after exposure to depleted uranium in Alzheimer's disease model. J Mol Neurosci, *  soumettre*
9. Racine R, Grandcolas L, Grison S, Stefani J, Gourmelon P, Veyssière G, Souidi M. Influence of chronically ingested depleted uranium on hepatic cholesterol metabolism in ApoE-deficient mice. Toxicology, *en préparation*

Communications orales

Racine R, Gueguen Y, Gourmelon P, Souidi M

Modifications of cerebral cholesterol metabolism in rats following internal contamination by depleted uranium.

36th annual meeting of the European Radiation Research Society (ERR), 2008

Racine R, Gueguen Y, Gourmelon P, Souidi M

Modifications of cholesterol metabolism in brain following uranium contamination.

4^{ème} Congrès de Lipidomique du GERLI, Toulouse (France), 2007

Proceedings

Racine R, Grandcolas L, Veysière G, Gourmelon P, Souidi M

Gene expression study of cholesterol hepatic metabolism after chronic internal contamination with depleted uranium in rats. Proceedings of the 16th Intl. Conf. on Cytochromes P450, *sous presse*

Racine RA, Guéguen Y, Veysière G, Grandcolas L, Grison S, Aigueperse J, Souidi M

Gene expression of cholesterol-metabolizing cyps after chronic ingestion of 137-caesium

In: Medimond IP., ISBN 978-88-7587-361-5 (ed) Proceedings of the 15th Intl. Conf. on Cytochromes P450, 2007, pp.123-128.

Communications affichées

Racine R, Grandcolas L, Grison S, Stefani J, Gourmelon P, Souidi M

Chronic ingestion of depleted uranium modulates cholesterol-catabolizing CYPs in rat liver

16th International Conference on Cytochromes P450, Okinawa (Japan), 2009

Racine R, Grandcolas L, Grison S, Guéguen Y, Gourmelon P, Veysière G, Souidi M

Effects on cholesterol metabolism after chronic contamination with cesium 137 in rats

49th International Conference on the Bioscience of Lipids, Maastricht (Netherlands), 2008

Racine R, Grandcolas L, Grison S, Aigueperse J, Gourmelon P, Guéguen Y, Souidi M

Hepatic cholesterol metabolism displays molecular modifications after chronic contamination with 137cesium

4^{ème} Congrès de Lipidomique du GERLI, Toulouse (France), 2007

Racine R, Guéguen Y, Veysière G, Grandcolas L, Grison S, Aigueperse J, Souidi M

Effects of 137Cs chronic contamination on hepatic cholesterol metabolism in rats

15th International Conference on Cytochromes P450, Bled (Slovenia), 2007

Communications en collaboration

Tissandié E, Racine R, Grignard E, Guéguen Y, Souidi M

Effets in vivo d'une contamination chronique au césium 137 sur le métabolisme de la vitamine D3, du cholestérol et de l'œstradiol

8^{ème} Colloque International de Radiobiologie Fondamentale et Appliquée (SIRLAF), La Londe Les Maures (France), 2007 *Communication orale*

Grison S, Grandcolas L, Guéguen Y, Racine R, Gourmelon P, Souidi M

¹³⁷Cs chronic toxicity: comparison between long-term contamination from adult or birth age in rat

44th Congress of the European Societies of Toxicology (Eurotox), Amsterdam (Netherlands), 2007 *Communication affichée*

ABREVIATIONS

¹³⁷ Cs	césium-137	HMG-CoA R	HMG-CoA Réductase
9-CRA	acide 9- <i>cis</i> -rétinoïque	HMG-CoA S	HMG-CoA Synthase
γGT	gamma-glutamyltranspeptidase	HNF 4α/1α	hepatocyte nuclear factor 4α/1α
Aβ	peptide amyloïde β	I-BABP	intestinal bile acid binding protein
ABC	ATP binding cassette transporter	INSIG	insulin-induced gene
ACAT	acyl Coenzyme A:cholesterol acyltransférase	JNK	c-JUN kinase
Acétyl CoA	acétyl Coenzyme A	kDa	kilo-dalton
ALAT	alanine aminotransférase	LCAT	lecithin:cholesterol acyltransferase
APP	amyloid precursor protein	LDL	lipoprotéine de faible densité
Apo	apolipoprotéine	LDL-r	récepteur aux LDL
ATP	adenosine triphosphate	LRH-1	liver receptor homolog 1
ASAT	aspartate aminotransférase	LRP	LDL-r related protein
BARE	bile acids response element	LXRα/β	liver-X-receptor α/β
Bq	becquerel	LXRE	LXR response element
BSEP	bile salt export pump	MAPK	mitogen activated protein kinase
CETP	cholesteryl ester transfer protein	M-BAR	membrane bile acid receptor
Ci	curie	MDR1a/2	multidrug resistance 1a/2
CRE	cAMP responsive element	MRP 2	multidrug resistance associated protein 2
CYP	cytochrome P450	MTP	microsomal triglycerides transporter protein
CYP27A1	stérol 27-hydroxylase	nCEH	neutral cholesteryl ester
CYP46A1	cholestérol 24-hydroxylase	NCoR	nuclear receptor corepressor
CYP51	lanostérol 14-déméthylase	NPC1L1	Niemann-Pick C1-like 1
CYP7A1	cholestérol-7α-hydroxylase	OATP 2	organic anion transporting polypeptide 2
CYP7B1	oxystérol 7α-hydroxylase	PCSK9	proprotein convertase subtilisin kexin type 9
CYP8B1	stérol 12α-hydroxylase	PGC-1α	ppar γ co-activator 1α
DHEA	déhydroépiandrostérone	PKA/PKC	protéine kinase A/C
FGF	fibroblast growth factor	PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
FTF	α-fetoprotein transcription factor	PXR	pregnane-X-receptor
FXR	farnesoid-X-receptor	RAR	retinoic acid receptors
FXRE	FXR response element	RE	reticulum endoplasmique
GRIP1	glucocorticoid receptor interacting protein 1	ROR	retinoid-related orphan receptor
HDL	lipoprotéine de haute densité	RXR	retinoid-X-receptor
HH	hedgehog		
HMG-CoA	3-hydroxy-3-méthylglutaryl Coenzyme A		

S1P/S2P	site 1 protease/site 2 protease	SRE	sterol regulatory element
SCAP	SREBP cleavage activating protein	SREBP	sterol regulatory element binding protein
SCP-2	sterol carrier protein 2		
SHH	sonic hedgehog	StAR	steroidogenic acute regulatory protein
SHP	small heterodimer partner	TAU	tubular associated unit
SLOS	syndrome de Smith-Lemli-Opitz	TNFα	tumor necrosis factor α
SMRT	silencing mediator for retinoid and thyroid receptors	TR	thyroid hormone receptor
		UA	uranium appauvri
SR-A	scavenger receptor class A	VDR	vitamin D receptor
SR-B1	scavenger receptor class B type 1	VLDL	lipoprotéine de très faible densité

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS	15
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	19
CHAPITRE 1 : LES RADIONUCLEIDES	21
I. L'URANIUM APPAUVRI	23
A. Généralités sur l'uranium.....	23
1. Origine et distribution	23
2. Propriétés physico-chimiques.....	23
3. Propriétés radiologiques et utilisation	23
B. L'uranium appauvri	25
1. Origine et propriétés.....	25
2. Utilisations.....	25
3. Dispersion dans l'environnement.....	26
4. Voies d'exposition	27
C. Biocinétique	28
1. Absorption	28
2. Distribution et rétention.....	29
3. Élimination.....	29
D. Toxicité et effets biologiques.....	31
1. Toxicité générale	31
2. Effets sur les organes d'étude : le foie et le cerveau	32
a. Effets sur le foie	32
b. Effets sur le cerveau	34
3. Effets sur d'autres organes et fonctions	37
a. Effets sur le rein	38
b. Effets sur l'os.....	40
c. Effets sur la reproduction et le développement.....	41
d. Génotoxicité, mutagénicité et cancérogénèse.....	43
e. Autres effets.....	43
II. LE CESIUM-137	46
A. Généralités sur le césium	46
1. Origine et distribution	46
2. Propriétés physico-chimiques.....	46
3. Propriétés radiologiques.....	46
4. Utilisations.....	47
B. Le césium-137.....	47
1. Origine et propriétés.....	47
2. Utilisations.....	48

3.	Dispersion dans l'environnement.....	48
4.	Voies d'exposition	50
C.	<i>Biocinétique</i>	50
1.	Absorption	50
2.	Distribution et rétention.....	51
3.	Élimination.....	51
D.	<i>Toxicité et effets biologiques</i>	52
a.	¹³⁷ Cs seul	53
b.	Les conséquences de l'accident de Tchernobyl.....	55
CHAPITRE 2 : LE METABOLISME DU CHOLESTEROL.....		63
I.	LE CHOLESTEROL	65
A.	<i>Caractéristiques biochimiques</i>	65
B.	<i>Rôles physiologiques du cholestérol</i>	66
1.	Rôles structuraux	66
2.	Rôles fonctionnels	67
II.	LE METABOLISME DU CHOLESTEROL DANS LE FOIE	68
A.	<i>Le foie</i>	68
1.	Rappels anatomiques.....	68
2.	Principales fonctions biologiques	70
B.	<i>Métabolisme hépatique du cholestérol chez le rat</i>	71
1.	Sources	72
a.	Synthèse endogène	72
b.	Apport alimentaire	76
2.	Trafic du cholestérol hépatique.....	78
a.	Captation hépatique du cholestérol	79
b.	Efflux de l'hépatocyte	84
3.	Utilisation cellulaire et stockage.....	88
a.	Utilisation cellulaire.....	88
b.	Stockage.....	89
4.	Catabolisme.....	91
a.	La biosynthèse des acides biliaires	91
b.	Devenir et rôles des acides biliaires.....	101
c.	Rôles des oxystérols	102
C.	<i>Régulation transcriptionnelle : principaux facteurs de transcription et mécanismes d'action</i>	104
1.	Un facteur de transcription : SREBP 2.....	104
2.	Les récepteurs nucléaires	107
a.	Exemple de régulation positive : l'activation de la transcription de la CYP7A1 par LXRα-RXR et LRH-1	107
b.	Exemple de rétrocontrôle négatif : la répression de la transcription du gène de la CYP7A1 par la cascade FXR-SHP-LRH-1	113
c.	Autres récepteurs nucléaires : HNFs et PPARs	117

III. LE METABOLISME DU CHOLESTEROL DANS LE CERVEAU.....	122
A. Brefs rappels sur l'organisation cérébrale	122
B. Rôles spécifiques du cholestérol dans le cerveau.....	124
C. Particularités du métabolisme du cholestérol cérébral	124
1. L'absence d'échange de cholestérol avec la circulation générale.....	124
2. Localisation de la synthèse endogène de cholestérol.....	124
3. La proportion de cholestérol estérifié.....	125
4. Les lipoprotéines cérébrales	125
5. L'élimination du cholestérol	126
6. La formation de dérivés 27-hydroxylés.....	128
7. La régulation transcriptionnelle.....	128
D. Pathologies neurologiques liées au métabolisme du cholestérol.....	129
1. Pathologies diverses.....	129
2. Implication du cholestérol dans la maladie d'Alzheimer	129
a. Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer.....	130
b. Rôle du cholestérol	131
c. Rôles du 24(S)-hydroxycholestérol et de la CYP46A1	131
d. Rôles de l'apo E.....	132
PROBLEMATIQUE ET PROTOCOLE	137
RESULTATS	145
CHAPITRE 1 : EFFETS DE L'URANIUM APPAUVRI SUR LE METABOLISME DU CHOLESTEROL	147
Article 1 : Cholesterol 7 α -hydroxylase (cyp7a1) activity is modified after chronic ingestion of depleted uranium in the rat.....	149
Article 2 : Modifications of the gene expression involved in cerebral cholesterol metabolism in the rat following chronic ingestion of depleted uranium.....	171
Article 3 : Influence of chronically ingested depleted uranium on hepatic cholesterol metabolism in apo E-deficient mice	185
CHAPITRE 2 : EFFETS DU CESIUM-137 SUR LE METABOLISME DU CHOLESTEROL	203
Article 4 : Molecular modifications of cholesterol metabolism in the liver and the brain after chronic contamination with cesium-137	205
Article 5 : Hepatic cholesterol metabolism following a chronic ingestion of cesium-137 starting at fetal stage in rats	217
DISCUSSION	233
I. EFFETS DE L'UA SUR LE METABOLISME DU CHOLESTEROL	235
A. Le modèle de référence : le rat contaminé depuis l'âge adulte	235
1. Paramètres généraux.....	235

2.	Paramètres tissulaires et moléculaires.....	237
a.	Accumulation de l'UA dans les organes	237
b.	Effets tissulaires et moléculaires dans le foie	237
c.	Effets moléculaires dans le cerveau	238
B.	<i>Comparaison entre le modèle de référence et le modèle pathologique (souris apo E-déficientes)</i>	239
1.	Paramètres généraux.....	240
2.	Paramètres tissulaires et moléculaires.....	240
a.	Effets tissulaires et moléculaires dans le foie	240
b.	Effets tissulaires et moléculaires dans le cerveau.....	241
II.	EFFETS DU CESIUM-137 SUR LE METABOLISME DU CHOLESTEROL	242
A.	<i>Le modèle de référence : le rat contaminé depuis l'âge adulte</i>	242
1.	Paramètres généraux.....	242
2.	Paramètres tissulaires et moléculaires.....	243
a.	Accumulation du Cs dans le foie	243
b.	Effets tissulaires et moléculaires dans le foie	243
c.	Effets tissulaires et moléculaires dans le cerveau.....	244
B.	<i>Le modèle en croissance : le rat contaminé depuis la vie fœtale</i>	245
1.	Paramètres généraux.....	245
2.	Paramètres tissulaires et moléculaires dans le foie.....	245
a.	Accumulation du Cs dans le foie	245
b.	Effets tissulaires et moléculaires dans le foie	245
	CONCLUSION GENERALE	247
	PERSPECTIVES.....	251
	BIBLIOGRAPHIE.....	255
	ANNEXES	283
	Annexe 1 : Revue générale sur l'uranium	285
	Annexe 2 : Revue générale sur le césium-137	303
	Annexe 3 : Utilisation des oxystérols en tant que biomarqueurs d'atteinte tissulaire après irradiation accidentelle	325
	Annexe 4 : Effet d'une contamination interne chronique par l'UA sur un modèle de souris prédisposées à la maladie d'Alzheimer.....	337

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Chaînes de décroissance de l'Uranium-238 (et de l'Uranium-234) et de l'Uranium-235	24
Figure 2 : Carte des cibles d'armes à l'UA au Kosovo lors du conflit en ex-Yougoslavie en 1999	26
Figure 3 : Répartition des centrales nucléaires en France et dans le monde.....	26
Figure 4 : Les différents rayonnements ionisants et leur pouvoir pénétrant dans les tissus biologiques ...	27
Figure 5 : Principales données biocinétiques de l'UA après ingestion chez l'Homme.....	30
Figure 6 : Schéma du rein et du néphron.....	38
Figure 7 : Aiguilles de phosphate d'uranyle dans le lysosome d'une cellule tubulaire proximale de rein ..	38
Figure 8 : Schéma de désintégration du ¹³⁷ Cs.....	47
Figure 9 : Cartes de la déposition au sol en Europe du ¹³⁷ Cs rejeté lors de l'accident de Tchernobyl	49
Figure 10 : Principales données biocinétiques du ¹³⁷ Cs après ingestion chez l'Homme.....	52
Figure 11 : Structure chimique du cholestérol	65
Figure 12 : Le cholestérol dans les membranes	66
Figure 13 : Structure fine du foie et organisation d'un lobule hépatique.....	69
Figure 14 : Les principales étapes de la synthèse du cholestérol et leur localisation intracellulaire	73
Figure 15 : Mécanisme de la déméthylation du lanostérol par la CYP51	75
Figure 16 : Schéma de l'absorption intestinale du cholestérol	77
Figure 17 : Structure, classes et propriétés physiques des lipoprotéines	78
Figure 18 : Métabolisme des lipoprotéines à l'échelle de l'organisme	79
Figure 19 : Captation du cholestérol d'une LDL par le LDL-r et recyclage du LDL-r	81
Figure 20 : Mécanisme de synthèse d'une HDL discoïde (naissante)	86
Figure 21 : Les deux voies de biosynthèse des acides biliaires	92
Figure 22 : Principales voies de régulation transcriptionnelle de la CYP7A1	96
Figure 23 : Structure des principaux acides biliaires	101
Figure 24 : Schéma du mécanisme d'activation de la transcription par SREBP et du mécanisme d'inhibition par les oxystérols	106
Figure 25 : Schéma du mécanisme d'activation de la transcription du gène de la CYP7A1 par les récepteurs nucléaires LXRα-RXR et LXRβ.....	112
Figure 26 : Schéma du mécanisme répression de la transcription du gène de la CYP7A1 par les acides biliaires <i>via</i> FXR et SHP	116
Figure 27 : Schéma de la structure de barrière hémato-encéphalique	122
Figure 28 : Structure d'un neurone et d'une synapse	123
Figure 29 : Les différents types cellulaires du système nerveux central et la formation de la gaine de myéline.....	123
Figure 30 : Modélisation du passage rapide du 24(S)-hydroxycholestérol à travers une membrane	126
Figure 31 : Résumé des principales voies du métabolisme du cholestérol dans le cerveau	127
Figure 32 : Les deux voies de clivage de l'APP	130
Figure 33 : Rôles de l'apo E dans le cerveau et efficacité relative des différentes isoformes	132
Figure 34 : Schéma récapitulatif du métabolisme du cholestérol dans le foie et dans le cerveau	134
Figure 35 : Problématique de la thèse.....	140

Figure 36 : Protocoles utilisés au cours de la thèse	142
Figure 37 : Dosage de l'UA dans le foie des rats à l'issue de la contamination	168
Figure 38 : Dosage du cholestérol dans le foie des souris sauvages et apo E ^{-/-} à l'issue de la contamination	200
Figure 39 : Dosage des activités enzymatiques de la CYP7A1, de la CYP27A1 et de la CYP7B1 dans le foie des souris sauvages et apo E ^{-/-} à l'issue de la contamination	200
Figure 40 : Effet de la mutation homozygote <i>ApoE^{tm1Unc}</i> sur le profil d'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol dans le foie des souris sauvages et apo E ^{-/-} à l'issue de la contamination.....	200
Figure 41 : Dosage de l'UA dans le foie des souris apo E ^{-/-} à l'issue de la contamination	201
Figure 42 : Effet d'une contamination interne chronique au ¹³⁷ Cs sur l'expression protéique de LXRα, RXR et apo E dans le foie de rat	215
Figure 43 : Effet d'une contamination interne chronique au ¹³⁷ Cs sur l'activité spécifique de la CYP7A1 et de la CYP27A1 dans le foie de rat.....	215

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Composition isotopique et propriétés radioactives de l'uranium naturel et de l'uranium appauvri.....	25
Tableau 2 : Principales modifications du bilan hépatique et syndromes associés	33
Tableau 3 : Principaux effets biologiques induits par l'UA après ingestion chronique.....	45
Tableau 4 : Propriétés radioactives des trois principaux isotopes du césium (¹³⁴ Cs, ¹³⁵ Cs et ¹³⁷ Cs).....	47
Tableau 5 : Principaux effets biologiques observés après exposition chronique au ¹³⁷ Cs.....	61
Tableau 6 : Effet de la mutation homozygote <i>ApoE^{tm1Unc}</i> sur le profil plasmatique à 4,5 mois.....	200

AVANT-PROPOS

A l'heure du développement durable et de la protection de l'environnement, la pollution de celui-ci est un phénomène qui a pris une place importante dans les préoccupations de la société civile. Cette pollution de l'environnement provient en partie de causes naturelles (volcanisme, catastrophes naturelles...). Cependant, elle découle en majorité des activités humaines et elle s'est intensifiée avec le développement de l'industrialisation.

De nombreux composés chimiques (engrais, pesticides, polychlorobiphényles (PCBs), dioxines, métaux lourds, hydrocarbures, etc.) sont déjà stigmatisés pour leurs conséquences délétères sur l'environnement, mais également sur la santé humaine après leur absorption *via* l'alimentation. Outre ces polluants "classiques", les radionucléides apparaissent depuis peu aux yeux de la société comme une autre source de pollution. Celle-ci a été largement médiatisée par les retombées de l'accident de Tchernobyl, mais elle découle également des nombreux essais nucléaires conduits depuis 1945 et des rejets de routine de l'industrie nucléaire. L'inquiétude générée par cette prise de conscience est d'autant plus forte que la contamination par ces éléments est souvent pérenne et ne nécessite pas un contact direct avec la source de contamination pour que celle-ci exerce ses effets néfastes.

Les radionucléides sont des éléments radioactifs d'origine naturelle (uranium) ou artificielle (césium-137). Ces atomes possèdent un noyau instable qui tend vers la stabilité. Pour l'atteindre, ils se désintègrent et émettent un rayonnement de type α (émission d'un noyau d'hélium), β (émission d'un électron) ou γ (onde électromagnétique). Ces rayonnements possèdent des énergies (et donc un impact) et des pouvoirs pénétrants spécifiques dans les différents milieux (air, eau, sol, tissus biologiques). Les radionucléides sont ainsi susceptibles d'entrer en interaction avec la matière vivante, qu'ils se trouvent à son contact direct ou qu'ils en soient relativement éloignés. Cette interaction se traduit le plus souvent par des échanges d'électrons (phénomène d'ionisation). Ces rayonnements ionisants peuvent toucher toutes les molécules des tissus biologiques, altérer leur structure et/ou leurs fonctions et produire ainsi des effets néfastes sur la santé.

Ainsi, la pollution de l'environnement par les radionucléides génère une inquiétude légitime quant aux répercussions sanitaires qu'elle pourrait avoir. Si la dangerosité d'une exposition externe à de fortes doses de radiations ionisantes sur un temps court est une évidence (comme le montrent les conséquences immédiates des bombardements nucléaires sur Hiroshima et Nagasaki ou celles de l'accident de Tchernobyl), les effets d'une exposition interne (par ingestion) à long terme à des niveaux plus faibles souffrent d'un déficit de connaissances.

Pour combler cette lacune, l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN) a lancé le programme ENVIRHOM en 2001. Ce programme de recherche a pour objectif de décrire les effets biologiques d'une contamination interne chronique à de faibles doses de radionucléides. La partie du programme ENVIRHOM consacrée aux conséquences sanitaires d'une telle exposition se décline en deux volets.

Le premier volet est axé sur l'uranium. L'uranium est une source d'exposition potentielle pour différentes populations telles que les habitants de régions naturellement riches en uranium (Finlande, Canada, Nouveau-Mexique...), les travailleurs du cycle du nucléaire où il sert de combustible dans les réacteurs, ou encore les civils et les militaires présents dans les zones de conflits utilisant des armes à l'uranium appauvri (ex-Yougoslavie, Afghanistan, Irak...).

Le second volet est centré sur le césium-137. Celui-ci constitue à l'heure actuelle la principale source de rayonnements ionisants dans les territoires contaminés par les retombées radioactives de l'accident de Tchernobyl en 1986. Les populations vivant sur ces zones sont ainsi soumises depuis plus de vingt ans à une exposition continue *via* les produits alimentaires provenant de ces terres contaminées.

Depuis le lancement du programme ENVIRHOM, les travaux du Laboratoire de Radiotoxicologie Expérimentale de l'IRSN ont mis en évidence des perturbations d'amplitude plus ou moins forte de différents systèmes physiologiques chez le rat après contamination interne chronique par de faibles concentrations d'uranium ou de césium 137. Ces études ont porté sur certains processus cognitifs, sur le système immunitaire et le système cardio-vasculaire ainsi que sur différents métabolismes, comme celui des xénobiotiques ou du fer. Les métabolismes de composés dérivés du cholestérol comme la vitamine D et les hormones stéroïdiennes sont également modifiés dans ces conditions d'expositions. Le choix du métabolisme du cholestérol comme sujet d'étude découle de ces observations.

Le travail de thèse présenté ci-après est donc un projet exploratoire, qui s'inscrit dans la démarche d'acquisition de nouvelles connaissances en radiobiologie promue par le programme ENVIRHOM. Nous nous sommes attachés à évaluer et à décrire les effets biologiques induits par une ingestion chronique de faibles concentrations de radionucléides (l'uranium appauvri ou le césium-137) sur le métabolisme du cholestérol chez le rat. Différentes modalités de contamination ont été utilisées pour estimer l'impact d'une telle exposition sur une large population.

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1

Les radionucléides

I. L'uranium appauvri

A. Généralités sur l'uranium

1. Origine et distribution

L'uranium est un métal lourd d'aspect argenté et lustré, naturellement présent dans la croûte terrestre à raison de 2 à 4 mg/kg (ATSDR 1999). Il est déposé dans les roches sous forme de minerais comme la pechblende, la carnotite ou l'uraninite. L'uranium est également présent naturellement dans l'air et les eaux souterraines et de surface. La concentration moyenne d'uranium dans l'eau de mer est estimée à 3 mg/m³ (Donnars 2002). Sa répartition géographique est inégale, tant dans le sol que dans les eaux (WHO 2001). Dans la nature, l'uranium ne se trouve pas sous forme métallique mais complexé avec divers éléments, les composés les plus courants étant l'oxyde uraneux (UO₂) et trioxyde d'uranium (UO₃).

L'uranium participe à la radioactivité naturelle. On considère que l'Homme possède naturellement une charge moyenne de 90 µg d'uranium, et que l'apport journalier est de 2 à 3 µg, répartis également entre l'alimentation et l'eau de boisson (ATSDR 1999).

2. Propriétés physico-chimiques

L'uranium se définit comme l'élément chimique de symbole U, de numéro atomique 92 et de masse atomique 238 g/mol. Il présente une densité de 19 g/cm³, ce qui équivaut à 1,7 fois la densité du plomb¹.

L'uranium possède six électrons périphériques et peut se présenter aux valences III, IV, V et VI. Les valences IV et VI sont les plus stables et permettent à l'uranium de former des complexes de solubilités variables avec différents éléments. Par exemple, le trioxyde d'uranium (UO₃), le chlorure d'uranyle et le nitrate d'uranyle sont relativement solubles dans l'eau.

Enfin, l'uranium est pyrophorique, c'est-à-dire qu'il s'enflamme spontanément lorsqu'il est dispersé très finement dans l'air.

3. Propriétés radiologiques et utilisation

L'uranium est un élément radioactif de la famille des actinides. C'est principalement un émetteur de particules alpha (α), mais il émet également un rayonnement bêta (β) du fait de ses descendants radioactifs. Le produit final de sa chaîne de désintégration est le plomb (cf. Figure 1). Il est composé de trois isotopes naturels : l'²³⁸U (99,27 % en masse), l'²³⁵U (0,72 %) et l'²³⁴U (0,0055 %). Ceux-ci ont des activités spécifiques (et donc des demi-vies) différentes, l'²³⁴U étant le plus radioactif (cf. Tableau 1). L'activité spécifique globale de l'uranium naturel est d'environ 25 Bq/mg (WHO 2001).

¹ A titre d'exemple, un cube d'uranium de 10 cm de côté pèse 19 kg.

L'Agence Internationale pour l'Energie Atomique (AIEA) classe l'uranium parmi les substances à faible activité spécifique (IAEA 2006).

Seul l'isotope 235 est fissile, ce qui explique la nécessité d'enrichir l'uranium naturel en ^{235}U pour produire plus d'énergie. Cet enrichissement se fait à des degrés divers en fonction de son utilisation finale : avec 2 à 4 % d'isotope 235, l'uranium est utilisé dans les centrales nucléaires civiles pour la production d'électricité, mais il peut être enrichi jusqu'à plus de 90 % pour les utilisations militaires (armes nucléaires, réacteurs de sous-marins...).

	Série Uranium-238 et Uranium-234					Série Uranium-235					
Np											
U	^{238}U 4.5E9		^{234}U 2.5E5y			^{235}U 7.1E8 y					
Pa	↓	^{234}Pa 1.2 m	↓			↓	^{231}Pa 3.3E4 y				
Th	^{234}Th 24 d		^{230}Th 8E4y			^{231}Th 25.5 h	↓	^{227}Th 18.7 d			
Ac			↓				^{227}Ac 21.8 y	↓			
Ra			^{226}Ra 1600 y				↓	^{223}Ra 11.4 d			
Fr			↓				^{223}Fr 21.8 m	↓			
Rn			^{222}Rn 3.82 d					^{219}Rn 4.0 s			
At			↓	^{218}At 2s				↓	^{215}At 1E-4s		
Po			^{218}Po 3.05 m	↓	^{214}Po 1.6E-4s	^{210}Po 138 d		^{215}Po 1.8E-5	↓	^{211}Po 0.5 s	
Bi			↓	^{214}Bi 19.7 m	↓	^{210}Bi 5.0 d	↓	↓	^{211}Bi 2.15 m	↓	
Pb			^{214}Pb 26.8 m	↓	^{210}Pb 22.3y	↓	^{206}Pb stable		^{211}Pb 36.1 m	↓	^{207}Pb stable
Tl				^{210}Tl 1.3 m		^{206}Tl 4.2 m			^{207}Tl 4.79 m		

↓ désintégration alpha, ↗ désintégration beta, demi-vie (d=jours, m=minutes, y=années)

Figure 1 : Chaînes de décroissance de l'Uranium-238 (et de l'Uranium-234) et de l'Uranium-235 (d'après Galle 1997)

B. L'uranium appauvri

1. Origine et propriétés

A l'issue du processus d'enrichissement, on obtient d'une part de l'uranium enrichi en isotope ^{235}U et donc fortement radioactif, et d'autre part un résidu d'uranium contenant moins d' ^{235}U que le minerai naturel : l'uranium appauvri (UA). C'est donc un composé artificiel, apparu dans les années 1940 avec la maîtrise de l'énergie atomique. Son appauvrissement en ^{235}U (cf. [Tableau 1](#)) le rend donc moins radioactif que l'uranium naturel d'environ 40 % (15 Bq/mg). Toutefois, si l'on prend en compte la radioactivité due aux descendants de l'uranium, l'activité spécifique de l'UA correspond à environ 80 % de celle de l'uranium naturel ([Cantaluppi 2000](#)). Etant composé des mêmes isotopes que l'uranium naturel, il possède les mêmes propriétés physico-chimiques que celui-ci, et présente le même comportement dans l'environnement et les milieux biologiques.

Isotope	Demi-vie (année)	Activité spécifique (Bq/mg)	Uranium naturel (25 Bq/mg)		Uranium appauvri (15 Bq/mg)	
			% massique	% activité	% massique	% activité
^{238}U	$4,5 \cdot 10^9$	12,4	99,27	48,8	99,8	83,7
^{235}U	$0,7 \cdot 10^9$	80	0,72	2,4	0,2	1,1
^{234}U	$2,5 \cdot 10^5$	231 000	0,0055	48,8	0,001	15,2

Tableau 1: Composition isotopique et propriétés radioactives de l'uranium naturel et de l'uranium appauvri

(d'après IAEA 2003)

2. Utilisations

Sa grande densité est la raison principale de la valorisation de l'UA. En effet, il sert de contrepoids dans les avions de ligne et les chariots élévateurs. Il est également employé comme lest dans les sous-marins, dans la quille des bateaux ou pour les forages dans l'industrie pétrolière. Il est par ailleurs utilisé comme protection contre les radiations : il sert aussi bien d'écran pour le personnel hospitalier lors de radiothérapies que de conteneur pour le confinement ou le transport de sources radioactives (hôpitaux, industries, etc.). Au-delà de ces utilisations civiles, l'UA a également de nombreuses applications militaires. Il sert notamment à renforcer le blindage des tanks et des avions. Il entre également dans la composition de divers types de munitions, comme les balles anti-blindage et les missiles, dans lesquels son caractère pyrophorique revêt une importance particulière.

3. Dispersion dans l'environnement

Du fait de ses multiples applications, l'UA peut se retrouver dans l'environnement de plusieurs façons.

D'une part, l'utilisation d'armes contenant de l'uranium appauvri peut conduire à une contamination de l'environnement dans les zones de conflit. Les principales régions concernées par ce mode de dispersion sont l'Irak, le Koweït, la Bosnie-Herzégovine et le Kosovo (cf. Figure 2). Une mission du Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE) dans les Balkans a mesuré la présence d'UA jusqu'à une centaine de mètres autour du point d'impact d'obus perforants (UNEP 2003) et a également relevé de faibles niveaux de contamination du sol et de certaines eaux de boisson en ex-Yougoslavie (UNEP 2002; UNEP 2003).



Figure 2: Carte des cibles d'armes à l'UA au Kosovo lors du conflit en ex-Yougoslavie en 1999

(Source : NATO, Balkan unit - UNEP, Geneva, 2000)

● Cible d'un tir de missile à l'UA

Figure 3 : Répartition des centrales nucléaires en France et dans le monde

(Source : Brunet R, Centrales nucléaires et uranium dans le monde, Mappemonde, 2000)



L'autre risque principal concernant la dispersion de l'UA dans l'environnement provient des installations nucléaires (cf. Figure 3). En effet, c'est dans ces installations que l'UA est produit et donc manipulé à grande échelle. Une faille dans le système de récupération ou de stockage des déchets nucléaires peut conduire à des fuites de matériel radioactif dans l'environnement. L'incident survenu en juillet 2008 sur le site nucléaire français du Tricastin illustre ce risque. En effet, le débordement

d'une cuve contenant des effluents uranifères dans un bac de rétention fissuré a laissé échapper 76 kilos d'uranium (naturel) dans les sols et les eaux, contaminant ainsi certaines sources d'eau potable.

Quelle que soit l'origine de la contamination, le risque principal consiste en l'infiltration des sols et des eaux profondes et de surface. L'ampleur de ce phénomène dépend de multiples facteurs, comme la forme chimique de l'UA, sa solubilité dans l'eau ou encore du type de sol. Néanmoins, si une contamination environnementale est avérée, elle conduit à l'exposition des êtres vivants à l'UA.

4. Voies d'exposition

L'exposition à l'UA peut être soit externe (c'est-à-dire sans contact direct entre l'individu et la source), soit interne (lorsque le radionucléide pénètre dans l'organisme).

En cas d'exposition externe, la toxicité chimique de l'UA n'intervient pas et seul l'aspect radiologique entre en jeu. L'UA étant principalement un émetteur α , les radiations émises possèdent une forte énergie (environ 4,5 MeV/Bq) mais un faible pouvoir de pénétration. Concrètement, elles ne se transmettent qu'à quelques centimètres dans l'air et quelques centièmes de millimètre dans le corps (cf. Figure 4). Elles sont arrêtées par la couche externe de l'épiderme protégeant l'organisme. Les effets biologiques liés à l'exposition externe sont donc négligeables dans le cas de l'UA.

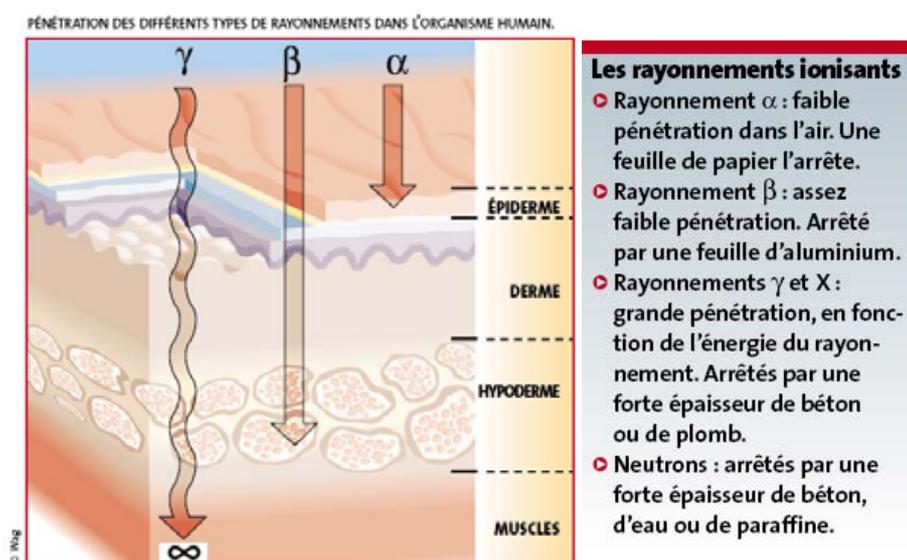


Figure 4: Les différents rayonnements ionisants et leur pouvoir pénétrant dans les tissus biologiques (Source : IRSN)

Les effets liés à l'exposition interne sont beaucoup plus importants. En effet, l'UA étant au contact direct des cellules, il peut agir à la fois en tant que métal lourd et toxique chimique, mais également en tant que radionucléide. Il y a trois voies de contamination interne : l'ingestion, l'inhalation et la blessure (coupure, incrustation).

➤ L'**ingestion** d'aliments contaminés est la voie d'exposition principale du grand public. Elle peut se faire directement comme dans le cas de l'eau, ou via la chaîne alimentaire à différents niveaux : par les végétaux, la viande, le lait, les œufs, etc.

➤ L'**inhalation** de particules radioactives est traditionnellement liée aux travailleurs de l'uranium, comme par exemple les mineurs qui extraient l'uranium naturel des carrières. Une augmentation du risque de cancer du poumon a été démontrée chez cette population (Vacquier 2009). Le radon, un gaz produit lors de la désintégration de l'uranium, est également une source de contamination par inhalation. Concernant l'UA *stricto sensu*, son inhalation a le plus souvent lieu lors d'impacts violents de munitions provoquant la formation de poussières et d'aérosols.

➤ La **contamination par blessure** en tant que telle concerne majoritairement les soldats ou les civils pris dans les tirs ou les bombardements lors de conflits. Le cas le plus fréquent est l'incrustation de fragments de munitions ou de blindage dans le corps. Ces fragments peuvent rester en place si leur position rend l'extraction chirurgicale très risquée, ce qui induit alors une situation de contamination à très long terme. Par ailleurs, le contact direct de l'UA avec une peau lésée (sans plaie ouverte) entre également dans cette catégorie et peut concerner aussi bien les travailleurs du nucléaire que les civils après un conflit.

C. Biocinétique

Comme mentionné précédemment, l'UA et l'uranium naturel ont le même comportement chimique. De ce fait, les études faites sur la biocinétique de l'uranium quelle que soit sa forme ont été prises en compte pour les paragraphes suivants.

1. Absorption

Le taux d'absorption de l'uranium dépend de plusieurs facteurs, comme sa forme chimique (et donc son hydrosolubilité), la voie d'exposition ou encore l'espèce considérée. D'une manière générale, on considère que les formes hydrosolubles (UO₃, nitrate d'uranyle, acétate d'uranyle...) ont un coefficient d'absorption plus élevé que les formes insolubles.

L'absorption intestinale de l'uranium s'effectue au niveau de l'intestin grêle (Dublineau 2005). Elle est estimée à 1-2 % chez l'Homme (Leggett 1994; Limson Zamora 2003; Wrenn 1985) et descend jusqu'à 0,2 % pour les formes insolubles (ICRP 1995a). Chez le rat, le coefficient d'absorption intestinale de l'uranium serait plutôt de 0,06 % (Tracy 1992; Uelmen 1995). Ce taux est augmenté par le jeûne (Uelmen 1995), jusqu'à obtenir des valeurs entre 0,6 à 1,8 % chez le rat (La Touche 1987).

Concernant l'absorption pulmonaire, elle dépend de la taille et de la solubilité des particules d'uranium. On considère que les particules de diamètre inférieur à 10 µm passent facilement à travers la paroi des alvéoles pulmonaires vers le sang. Il n'y a pas de coefficient de transfert défini pour l'absorption pulmonaire à cause de la multiplicité des combinaisons de facteurs : la Commission Internationale pour la Protection Radiologique (CIPR) classe ainsi les composés uranifères en trois catégories selon leur solubilité indépendamment de leur diamètre (ICRP 1995b). A titre indicatif, on peut citer l'étude de Wrenn *et al* qui évalue le coefficient d'absorption pulmonaire à 0,76 % chez des

mineurs d'uranium (Wrenn 1985) et celle de Leach *et al* chez le rat (Leach 1984), qui donne une fourchette de 18-40 % d'hexafluorure d'uranium passant du poumon dans le sang.

2. Distribution et rétention

Dans le sang, l'uranium est sous sa forme ionique la plus biodisponible, l'ion uranyle UO_2^{2+} . Il forme des complexes avec des protéines (principalement la transferrine et éventuellement l'albumine), du citrate ou du bicarbonate (Cooper 1982). Une fois dans la circulation sanguine, une partie de l'uranium est excrétée dans les urines, et le reste se distribue dans les différents tissus de l'organisme.

L'uranium a une distribution inégale dans l'organisme. Une étude cinétique de Pellmar *et al* montre que l'os et le rein sont les deux organes où l'uranium s'accumule dès le premier jour (Pellmar 1999a). Il est ensuite détecté dans d'autres tissus mous.

D'un point de vue quantitatif, l'os est l'organe contenant la plus grande fraction d'uranium car il constitue le site de rétention à long terme. La quantité d'uranium stockée à long terme dans l'os représente de 66 % à 85 % de la charge corporelle selon les études (ATSDR 1999; Craft 2004; Sztajnkrzyca 2004).

Le deuxième organe de rétention est le rein. En effet, il constitue la première cible de toxicité de l'uranium car celui-ci est réabsorbé au niveau du tubule contourné proximal et s'accumule dans les cellules rénales avant d'être éliminé dans les urines. Ainsi, le temps moyen de rétention rénale est inférieur à celui de l'os, mais l'exposition du rein à l'uranium est continue. On estime en moyenne que 8 à 15 % de la charge corporelle en uranium se situe dans le rein (ATSDR 1999; Craft 2004).

Enfin, le reste de l'uranium retenu dans le corps se distribue dans d'autres tissus mous tels que le foie, le muscle, le cerveau, le poumon, la rate, les gonades, le sang et l'urine (Mitchel 2004; Pellmar 1999a). Parmi ceux-ci, le foie est le seul organe parfois décrit comme présentant une charge en uranium plus importante que celle du rein (Kathren 1986; Li 2005b). Par exemple, le rapport de l'Agence américaine des Substances Toxiques et de Veille Sanitaire (ATSDR) estime la charge rénale à 8 % et la charge hépatique à 16 % de l'uranium corporel.

3. Elimination

La majorité de la dose d'uranium ingérée est éliminée très rapidement par l'organisme. En effet, environ 98 % de la dose ingérée d'uranium est éliminée directement dans les fèces et ne pénètre pas dans la circulation sanguine. 70 à 80 % de la fraction absorbée est ensuite éliminée *via* les urines au bout de 24 heures. La quantité éliminée se monte à 90 % au bout de quelques jours (Priest 2001; WHO 2001).

Chez le rat, la fraction d'uranium retenue dans l'os a une demi-vie biologique de 40 à 180 jours (Tracy 1992). Chez l'Homme, elle se divise en deux sous-fractions avec chacune leur demi-vie : la composante "court terme" a une demi-vie de 20 jours, alors que celle de la composante "long terme" est de 5000 jours (Tracy 1992; WHO 2001).

De même, la demi-vie rénale est unique chez le rat (5-9 jours) et double chez l'Homme (6 et 1500 jours) (Tracy 1992). Il n'y a pas de valeurs clairement définies pour les autres tissus.

En ce qui concerne l'exposition par inhalation, quelle que soit la quantité effectivement absorbée par les voies aériennes, la majorité de la dose d'exposition est rejetée par expiration. Les particules supérieures à 10 microns sont captées par les cellules ciliaires et éliminées *via* les fèces très rapidement (Ballou 1958). Chez le rat, la fraction absorbée par les poumons a une demi-vie biologique comprise entre 1 à 5 jours pour les particules solubles et 4 à 9 mois pour les composés peu solubles (ATSDR 1999).

Un résumé des principales données biocinétiques de l'UA chez l'Homme après ingestion est présenté ci-dessous (cf. Figure 5).

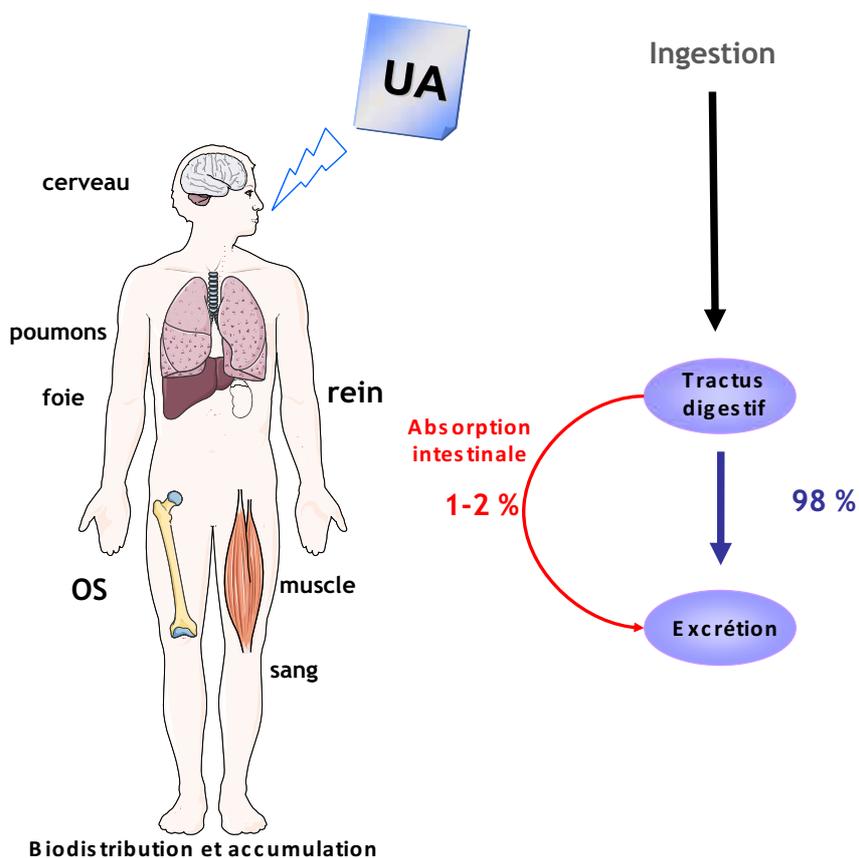


Figure 5 : Principales données biocinétiques de l'UA après ingestion chez l'Homme

Seulement 1 à 2 % de la quantité d'UA ingérée est absorbée au niveau intestinal. Cette fraction est ensuite distribuée dans les tissus où elle s'accumule plus ou moins longtemps. Les deux principaux organes d'accumulation de l'UA sont le rein et l'os. L'UA se retrouve en plus faibles quantités dans d'autres tissus mous comme le foie, le cerveau ou le muscle.

D. Toxicité et effets biologiques

L'UA, comme l'uranium naturel, possède un double potentiel toxique. D'une part, il possède une toxicité chimique due à sa nature de métal lourd, au même titre que le cadmium, le plomb ou le mercure. D'autre part, il possède également une toxicité radiologique liée à sa radioactivité et donc dépendante de sa composition isotopique et de son degré d'enrichissement.

La différence d'impact de ces deux formes de toxicité est matérialisée par les deux valeurs-guides recommandées par l'OMS concernant le taux d'uranium dans l'eau de boisson (WHO 2008). En effet, l'OMS recommande de ne pas dépasser une concentration de 15 µg/l si l'on ne prend en compte que les effets chimiques. D'autres concentrations-guides basées sur l'aspect radiologique sont données par l'OMS : 10 Bq/l pour l'isotope 238 (qui représente plus de 99 % de la composition massique, cf. Tableau 1) et 1 Bq/l pour l'isotope 235. La conversion de ces valeurs en concentration massique produit une valeur-guide de 660 µg/l pour l'UA et de 400 µg/l pour l'uranium naturel (d'activité spécifique respective 15 Bq/mg et 25 Bq/mg). Ainsi, on considère généralement que la toxicité radiologique de l'UA, bien que présente, est inférieure à sa toxicité chimique.

1. Toxicité générale

Lors de l'étude d'une substance, deux composantes de sa toxicité sont évaluées : sa toxicité aiguë et sa toxicité chronique.

La toxicité aiguë est évaluée après une exposition unique, le plus souvent ponctuelle. Les effets sont généralement observés sur une durée comprise entre 24 heures et 14 jours. Ainsi, la dose létale 50 à 14 jours de l'UA (DL₅₀, dose provoquant la mort de la moitié des animaux sur 14 jours après une exposition unique) a été évaluée chez des rongeurs après injection sous-cutanée ou gavage d'acétate d'uranyle (Domingo 1987). Selon cette étude, la DL₅₀ après gavage est de 204 mg/kg chez le rat, et de 242 mg/kg chez la souris. La DL₅₀ après injection sous-cutanée d'acétate d'uranyle est de 8,3 mg/kg chez le rat, et de 20,4 mg/kg chez la souris. L'intoxication aiguë à l'UA se traduit par une altération de l'état général de l'animal, avec notamment une perte de poids, une augmentation de la prise alimentaire et du volume urinaire, une hypothermie, des tremblements, une hémorragie oculaire, nasale et au niveau des pattes, etc. (Domingo 1987).

La toxicité chronique résulte d'une exposition répétée et/ou prolongée, le plus souvent à faible dose. Les effets sont habituellement observés sur une durée supérieure ou égale à 10 % de l'espérance de vie. La dose sans effets nocifs (ou NOAEL, pour *no adverse effect level*) chez le rat après ingestion d'acétate d'uranyle dans l'eau de boisson pendant 4 semaines est de 2 mg/kg/j dans ces conditions (Ortega 1989). Dans une autre étude, Gilman *et al* indiquent que la NOAEL chez des rats exposés à du nitrate d'uranyle dans leur eau de boisson pendant 91 jours est inférieure à 0,06 mg/kg car ils observent des lésions rénales à cette dose. La différence dans les niveaux rapportés dans ces deux études peut s'expliquer par la différence de durée de contamination ou la forme chimique du composé uranifère.

D'un point de vue chronotoxicologique, l'atteinte rénale est le premier signe d'intoxication à l'uranium. Les effets plus tardifs concernent l'os, le système nerveux central, le système reproducteur ainsi que d'autres tissus comme le foie, les poumons, *etc.*

Dans la suite de cet exposé, les effets toxiques de l'UA sur le foie et le cerveau décrits dans la littérature seront particulièrement détaillés puisqu'il s'agit des deux organes sur lesquels porte ce travail. Les effets de l'UA sur les autres organes seront évoqués plus brièvement. Pour une revue générale sur les effets de l'uranium, voir l'[Annexe 1](#).

2. Effets sur les organes d'étude : le foie et le cerveau

a. Effets sur le foie

❖ Accumulation

De nombreuses études rapportent l'accumulation d'uranium dans le foie, indépendamment de sa forme chimique, de la voie d'exposition et de l'espèce étudiée. Ainsi, on relève de l'UA dans le foie de rats après ingestion chronique de nitrate d'uranyle ([Gilman 1998](#); [Ortega 1989](#); [Paquet 2006](#)), suite à l'implantation de pastilles d'uranium ([Pellmar 1999a](#)), après injection de citrate d'uranyle ([Bulman 1980](#)), mais également après inhalation chronique de poussière de minerai uranifère chez le Hamster Syrien ([Cross 1981](#)), ou encore chez le poisson après exposition *via* l'alimentation ([Cooley 2000b](#)) ou *via* l'eau environnante ([Barillet 2007](#)). Au niveau quantitatif, un modèle biocinétique d'ingestion chronique d'UA chez l'Homme montre que la quantité hépatique d'UA pourrait être supérieure à la quantité rénale au-delà de 1000 jours ([Li 2005b](#)). De même, *Kathren et al* décrivent un ratio d'uranium de 63:2,8:1 dans le squelette, le foie et le rein chez un homme exposé lors de son activité professionnelle pendant 26 ans ([Kathren 1986](#)). Cependant, dans les études expérimentales de contamination interne chronique la quantité d'uranium retenue dans le foie apparaît le plus souvent comme bien inférieure à celle retenue dans le rein ou l'os ([Pellmar 1999a](#)), voire comme négligeable ([La Touche 1987](#)). Cet état de fait dans les modèles animaux explique sans doute la très faible quantité de travaux étudiant le foie après contamination interne chronique par l'UA. Parmi les études disponibles dans la littérature, les effets décrits peuvent se classer en trois catégories : l'évaluation de la fonction hépatique par le dosage de marqueurs plasmatiques, les observations histologiques et les modifications au niveau moléculaire.

❖ **Bilan hépatique**

L'utilisation de paramètres sanguins pour réaliser un bilan hépatique est un outil classique d'évaluation clinique. Ce bilan hépatique comprend plusieurs marqueurs, parmi lesquels on compte les transaminases ALAT (alanine aminotransférase) et ASAT (aspartate aminotransférase), la γ GT (gamma glutamyl-transpeptidase) et la bilirubine. Les principales modifications de ces paramètres en cas de pathologie hépatique sont indiquées dans le [Tableau 2](#).

Syndrome	Bilan hépatique
Cytolyse hépatique	Elévation importante d'ALAT et ASAT, élévation modérée de la γ GT Si ASAT/ALAT > 1, hépatite alcoolique, cirrhose ou cytolysse musculaire
Cholestase (atteinte des mécanismes d'excrétion biliaire)	Augmentation de la γ GT et de la bilirubine conjuguée Augmentation des phosphatases alcalines et de la 5' nucléotidase
Insuffisance hépato-cellulaire	Augmentation de la bilirubine conjuguée et non-conjuguée Diminution du taux sérique des molécules à synthèse hépatique (cholestérol, urée, albumine)

Tableau 2 : Principales modifications du bilan hépatique et syndromes associés

ALAT = Alanine Aminotransférase, ASAT = Aspartate Aminotransférase, γ GT = gamma glutamyl-transpeptidase

Le bilan hépatique est rarement effectué lors des études sur la toxicité de l'UA. Deux études rapportent une diminution d'ALAT et d'ASAT après ingestion chronique d'UA à 8 et 16 mg/kg/j pendant 4 semaines ([Ortega 1989](#)) et à 2 mg/kg/j pendant 9 mois ([Souidi 2005](#)) chez le rat. En revanche, la toxicité aiguë de l'uranium semble provoquer une augmentation de ces transaminases. Une injection sous-cutanée de 11,5 mg/kg induit une élévation d'ALAT et d'ASAT après 3 jours ([Gueguen 2006b](#)), tandis qu'une insuffisance rénale aiguë provoquée chez des rats par injection intraveineuse de 5 mg/kg de nitrate d'uranyle induit une augmentation d'ASAT après 5 jours ([Moon 2003](#)).

❖ **Histologie**

Certaines modifications histologiques du foie ont été décrites après contamination chronique, le plus souvent accompagnées de phénomènes de type inflammatoire. Dans l'ensemble, ces modifications sont mineures et ne remettent pas en cause la fonction hépatique. Après ingestion chronique de nitrate d'uranyle (dès 0,96 mg/l) pendant 3 mois chez le rat, *Gilman et al* décrivent principalement une augmentation de la vésiculation du noyau des hépatocytes et des modifications de la zone périveineuse du cytoplasme ([Gilman 1998](#)). Chez le poisson *Coregonus clupeaformis*, une ingestion chronique d'acétate d'UA (jusqu'à 10 mg/kg d'aliment) pendant 10 à 100 jours induit une nécrose focale hépatocytaire et une altération de l'épithélium des canaux biliaires ([Cooley 2000a](#)). *Cross et al* décrivent également une nécrose focale dans le foie de hamsters exposés pendant 2 ans à de la poussière de minerai d'uranium ([Cross 1981](#)).

❖ Modifications moléculaires

A un niveau d'étude plus précis, différents effets portant sur l'expression génique, le taux protéique ou l'activité de certaines molécules ont été décrits après exposition à l'UA. Tout d'abord, une étude *in vitro* menée sur la lignée d'hépatocytes humains HepG2 a démontré la capacité de l'UA à induire l'expression de différents gènes de stress proportionnellement à la concentration d'UA (5-50 µg/ml) (Miller 2004). Ces gènes activent différentes voies de transduction du signal, démultipliant ainsi les répercussions de l'exposition à l'UA.

Par ailleurs, plusieurs études ont relevé une influence de l'UA sur certaines enzymes de la superfamille des cytochromes P450 (CYPs) impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques. Suite à une ingestion chronique de nitrate d'UA à une dose de 2 mg/kg/jour pendant 9 mois chez le rat, ces enzymes sont modifiées au niveau de l'expression génique, de l'expression protéique ou de l'activité spécifique après contamination seule (Souidi 2005) ou combinée à une injection unique de paracétamol en fin d'expérimentation (Gueguen 2007; Rouas 2009). Il ressort de ces études que la famille CYP3A est la principale cible de cette contamination. Cette famille ainsi que les enzymes CYP2A1 et CYP2A2 sont modifiées par l'UA lors de contaminations aiguës à fortes doses par injection sous-cutanée (Gueguen 2006b) ou instillation intra-trachéale (Pasanen 1995). Par ailleurs, Moon *et al* ont observé une modification du métabolisme global de la chlorzoxasone (y compris au niveau des CYPs) après induction d'une insuffisance rénale aiguë par injection d'UA chez le rat (Moon 2003).

Enfin, Guéguen *et al* ont montré qu'un jour après l'injection sous-cutanée de 11,5 mg/kg de nitrate d'UA chez le rat, l'activité de la CYP27A1, un CYP impliqué dans le métabolisme de la vitamine D et du cholestérol, était multipliée par 6 dans le foie (Gueguen 2006b). Dans cette étude, l'expression génique des récepteurs nucléaires FXR et LXR α , qui régulent la CYP27A1, est également augmentée.

b. Effets sur le cerveau

(1) Accumulation

Il est communément admis qu'il existe un transfert de l'uranium à travers la barrière hémato-encéphalique (Lemercier 2003) bien que le détail du mécanisme ne soit pas encore connu. En effet, une accumulation d'uranium dans le cerveau a été mise en évidence suite à de nombreuses modalités d'exposition : injection intrapéritonéale (Barber 2005), ingestion via l'eau de boisson (Bussy 2006; Houpert 2007c) inhalation répétée ou unique (Monleau 2005; Tournier 2009) ou encore après implantation intramusculaire (Fitsanakis 2006; Pellmar 1999a). Quelle que soit la voie d'exposition, la quantité d'uranium retenue dans le cerveau est faible (Houpert 2007c; Pellmar 1999a). D'une manière générale, la répartition de l'uranium dans les différentes structures cérébrales est assez hétérogène et varie selon la voie d'exposition. Après ingestion ou injection, on relève un taux d'uranium plus élevé dans le striatum (impliqué dans la coordination motrice) et l'hippocampe (impliqué dans la mémoire) que dans les autres structures (Barber 2005; Houpert 2007c). En revanche, après inhalation unique (Tournier 2009) ou répétée, l'UA s'accumule clairement selon un gradient de concentration antéro-postérieur. Par ailleurs, une étude récente a démontré l'existence d'un passage direct de l'uranium

des cavités nasales vers le cerveau s'ajoutant au transfert depuis la circulation sanguine (Tournier 2009).

(2) Effets neurologiques chez l'Homme

Il y a peu d'effets neurologiques dus à l'UA décrits chez l'Homme. Deux types de troubles neurologiques sont rapportés dans la littérature, systématiquement après exposition chronique. D'une part une atteinte de la motricité (troubles de la marche, tendance à la chute en arrière...) est rapportée par Goasguen *et al* chez un homme ayant manipulé quotidiennement un presse-papier en UA pendant 3 ans (Goasguen 1982). Il est à noter que ces effets persistent et s'aggravent après la fin de l'exposition. D'autre part, des travaux réalisés sur une cohorte de vétérans de la première Guerre du Golfe ayant reçu des éclats d'armes à l'UA ont mis en évidence des troubles cognitifs. En effet, une corrélation entre des niveaux élevés d'UA dans les urines et une difficulté à réaliser des tests évaluant la précision et l'efficacité a été déterminée 7 ans après l'incrustation des éclats d'obus contenant de l'UA (McDiarmid 2000). Cependant, un suivi à plus long terme de cette cohorte a montré que ces effets neurocognitifs ne perduraient pas lors de nouvelles évaluations 3, 6 et 9 ans plus tard (McDiarmid 2004; McDiarmid 2009; McDiarmid 2007).

(3) Données expérimentales

Concernant les données expérimentales, trois thèmes sont prépondérants dans la littérature : les effets comportementaux, les modulations du métabolisme ou du taux de neurotransmetteurs et l'influence sur le stress oxydant. Toutes les études citées ci-dessous sont menées chez le rat sauf indication contraire.

❖ Effets sur le comportement

Plusieurs études ont évalué les effets d'une contamination à l'UA sur différents aspects du comportement. Il ressort de ces travaux que l'UA ne modifie pas le comportement d'une manière qui lui soit caractéristique. Après ingestion d'acétate d'uranyle à 10, 20 ou 40 mg/kg/jour pendant 3 mois, de faibles modulations de l'activité locomotrice et de la mémoire spatiale de travail sont rapportés chez les animaux contaminés, mais le développement neurologique de leurs petits est normal (Albina 2005; Belles 2005; Sanchez 2006). Cependant, d'autres travaux rapportent des effets de plus grande amplitude. Ainsi, Briner *et al* montrent une augmentation de l'activité locomotrice chez des rats ingérant quotidiennement de l'UA à 150 mg/L pendant 2 semaines (Briner 2005). Cette perturbation est également observée après 6 mois de contamination. Par ailleurs, des effets comportementaux tardifs sont également décrits : 30 jours après l'injection d'acétate d'uranyle (0,3 et 1 mg/kg/j), les rats présentent une augmentation de l'activité ambulatoire et une faible diminution de la mémoire spatiale de travail (Barber 2007). Dans une expérience similaire avec un traitement de 7 jours par injection, Abou-Donia *et al* rapportent des déficits sensorimoteurs mesurés par la diminution du temps d'agrippement du rat sur un plan incliné (proportionnel à la dose) et sur une tige horizontale (Abou-Donia 2002). Après une exposition chronique par inhalation répétée pendant 3 semaines, Monleau *et al* rapportent une augmentation de l'activité locomotrice 1 jour après la fin de l'exposition, et une faible

diminution de la mémoire spatiale de travail 6 jours après (Monleau 2005). Par ailleurs, deux études concluent à l'absence d'effet de l'UA sur le comportement après ingestion de 40 mg/l pendant 1,5 mois (Houpert 2005) et 150 jours après implantation intramusculaire de pellets d'UA (Arfsten 2007).

Plusieurs études se sont intéressées à l'influence du stress sur le comportement après contamination à l'UA, car le stress est connu pour interférer sur certains processus neurologiques. Une des hypothèses émises, bien que controversée, porte sur sa capacité à augmenter la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique, et donc la toxicité potentielle d'une substance donnée (Friedman 1996). Des mesures réalisées 30 jours après une injection intrapéritonéale d'UA (1 mg/kg) indiquent que l'application d'un stress extérieur n'influe pas sur la distribution régionale de l'UA dans le cerveau (Barber 2007), mais augmente sa clairance cérébrale (Barber 2005). Par ailleurs, après contamination par ingestion, l'ajout de stress ne produit que de très faibles modulations sur les quelques effets comportementaux provoqués par l'UA (Albina 2005; Barber 2007; Belles 2005; Sanchez 2006).

❖ Effets sur la neurotransmission

De multiples travaux se sont penchés sur l'étude des neurotransmetteurs et de leur métabolisme après exposition à l'UA. Ainsi, Barber *et al* décrivent une diminution transitoire du taux de dopamine dans le striatum après injection unique d'acétate d'uranyle à 0,3 et 1 mg/kg, avec un retour à un taux normal 7 jours après l'injection (Barber 2007). A plus long terme, une ingestion chronique de 40 mg/l de nitrate d'uranyle pendant 1,5 mois provoque également une diminution de la dopamine, et une diminution de ses métabolites est également observée après 6 et 9 mois de contamination (Bussy 2006). Il est à noter que ces diminutions interviennent dans des structures cérébrales différentes à chaque temps. La même étude relève également une diminution de la sérotonine à tous les temps de contamination, qui s'étend à ses métabolites à 9 mois. *Ex vivo*, une perfusion de synaptosomes de rat pendant 30 à 45 minutes avec une solution contenant des ions uranyles induit également une diminution de la libération d'un autre neurotransmetteur, le glutamate (Vietti 2007). Enfin, plusieurs études rapportent une influence de l'exposition à l'UA sur un troisième neurotransmetteur, l'acétylcholine. Bensoussan *et al* décrivent de multiples modulations au niveau de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme de l'acétylcholine après ingestion chronique d'UA à 40 mg/l pendant 1,5 ou 9 mois, ainsi qu'une diminution du taux d'acétylcholine après 9 mois (Bensoussan 2009). Une diminution de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase (qui dégrade l'acétylcholine) est également décrite dans ces conditions à 1,5, 6 et 9 mois (Bensoussan 2009; Bussy 2006). En revanche, une augmentation de cette activité enzymatique est décrite après exposition par injection chez le rat (Abou-Donia 2002) et par l'eau chez le poisson (Barillet 2007).

Bien que dénotant une grande variabilité dans les effets observés sur les neurotransmetteurs, l'ensemble de ces travaux laisse néanmoins entrevoir une action de l'UA sur la neurotransmission. En effet, ces résultats sont à mettre en perspective avec les études décrivant des changements électrophysiologiques *ex vivo* (Pellmar 1999b) et une augmentation de la conductivité membranaire (Reader 1979) après exposition à l'UA. De plus, des observations *ex vivo* chez la souris et le poulet montrant que l'exposition à l'UA augmente la contraction musculaire et donc la libération d'acétylcholine incitent Lin-Shiau *et al* à formuler l'hypothèse que ions uranyles UO_2^{2+} entreraient en

compétition avec les ions calcium Ca^{2+} qui provoquent l'exocytose de l'acétylcholine dans les conditions physiologiques (Lin-Shiau 1986; Lin-Shiau 1979).

❖ Effets sur le stress oxydant

Plusieurs études ont également observé un lien entre une exposition à l'uranium appauvri et une perturbation de l'équilibre rédox dans le cerveau. Une injection intrapéritonéale unique de nitrate d'uranyle à une dose néphrotoxique (576 $\mu\text{g}/\text{kg}$) produit une augmentation du stress oxydant via des phénomènes de peroxydation lipidique, qui n'apparaissent pas à la dose "subnéphrotoxique" de 144 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Ghosh 2007). Trente jours après une injection intramusculaire d'acétate d'UA (traitement quotidien pendant 7 jours), Abou-Donia *et al* décrivent une augmentation du taux de monoxyde d'azote à une dose de 0,1 $\text{mg}/\text{kg}/\text{j}$, mais une diminution à 1 $\text{mg}/\text{kg}/\text{j}$ (Abou-Donia 2002). Cette variation est dépendante de la structure cérébrale observée. Une augmentation de la peroxydation lipidique est également décrite après ingestion de 150 mg/l pendant 2 semaines ou 6 mois (Briner 2005). Linares *et al* décrivent également une augmentation de la peroxydation lipidique après ingestion de 10, 20 ou 40 $\text{mg}/\text{kg}/\text{j}$ d'acétate d'UA pendant 3 mois (Linares 2007). Ces différents travaux concluent donc à une augmentation globale du stress oxydant après exposition à l'UA, contrairement à une étude récente montrant une faible peroxydation lipidique et une activation des enzymes antioxydantes dans le cerveau de rat après ingestion chronique de 2 $\text{mg}/\text{kg}/\text{j}$ de nitrate d'uranyle pendant 9 mois (Lestaevel 2009).

❖ Autres effets : métabolisme de la vitamine D et des xénobiotiques

Outre les effets directement liés aux processus neurologiques et cognitifs, des modifications affectant le métabolisme cérébral de la vitamine D et des xénobiotiques ont été décrites au sein du programme ENVIRHOM de l'IRSN. Ainsi, l'ingestion de nitrate d'uranyle à 40 mg/l pendant 9 mois induit une augmentation de l'expression génique de la CYP3A1 (x2), une enzyme impliquée dans la détoxification des xénobiotiques (Souidi 2005). Le récepteur nucléaire PXR, qui régule cette enzyme, subit une augmentation parallèle de son niveau d'ARNm (x2). Par ailleurs, l'étude du métabolisme de la vitamine D après le même schéma d'exposition révèle que l'expression génique de VDR et LXR β , deux récepteurs nucléaires-clés de ce métabolisme, diminue de 50 %, tandis que celle de HNF 4 α (un autre facteur de transcription) est multipliée par 3 (Tissandie 2007). Ces deux études indiquent une sollicitation des facteurs de transcription et des CYPs qui est également retrouvée dans d'autres tissus que le cerveau (foie, rein).

3. Effets sur d'autres organes et fonctions

Outre le foie et le cerveau qui constituent les organes d'étude de ce travail, l'uranium provoque des effets bien décrits sur d'autres organes, notamment le rein et l'os qui sont les organes de rétention de l'uranium à court et long terme respectivement.

a. Effets sur le rein

La néphrotoxicité est le premier symptôme d'une intoxication à l'uranium. Après une exposition à forte dose, la mort de l'animal est d'ailleurs provoquée par une néphrite tubulaire aiguë (Domingo 1987).

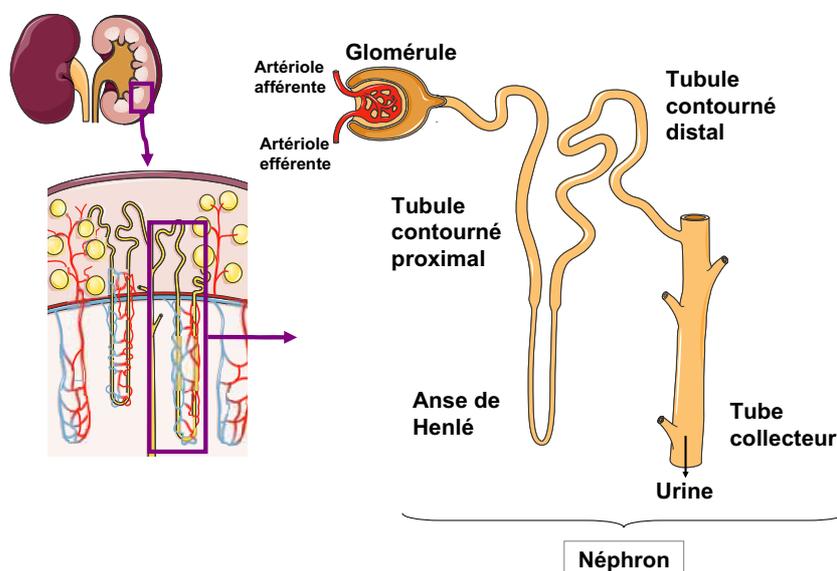


Figure 6 : Schéma du rein et du néphron

❖ Mécanisme

Du fait de son rôle de filtre de l'organisme, le rein est continuellement exposé à l'uranium. En effet, les ions uranyles circulant dans le sang sous forme de complexes de faible poids moléculaire (carbonate, citrate...) sont filtrés au niveau du glomérule rénal et passent dans le tubule contourné proximal (cf. Figure 6). Le long du tubule contourné proximal, un gradient de pH provoque la dissociation du complexe et libère les ions uranyles qui sont alors réabsorbés au niveau de la bordure en brosse des cellules épithéliales, en particulier dans les deux tiers les plus distaux du tubule. Une fois dans la cellule, l'uranium est concentré dans les lysosomes sous forme d'aiguilles de phosphate d'uranyle (cf. Figure 7). A forte concentration, la membrane des lysosomes est détruite, conduisant à la dispersion des aiguilles d'uranium dans le cytoplasme, puis à leur évacuation dans la lumière du tubule (Galle 1997; Leggett 2003).

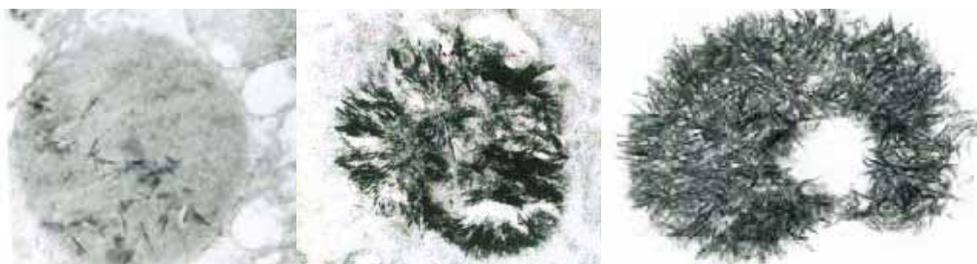


Figure 7 : Aiguilles de phosphate d'uranyle dans le lysosome d'une cellule tubulaire proximale de rein. Les images représentent l'évolution de la concentration d'uranium dans les lysosomes d'une cellule de rein 12, 24 et 48 heures après une injection de nitrate d'uranyle chez le rat (0,4 mg). Le paquet d'aiguilles de la figure centrale mesure 2 µm de longueur (source : Galle 1997)

❖ Histologie

La néphrotoxicité de l'uranium se traduit avant tout par des modifications histologiques au niveau des cellules de la partie distale du tubule contourné proximal. Après contamination interne chronique (injections répétées ou ingestion) chez le rat, les modifications les plus observées sont une dilatation tubulaire et une atteinte cellulaire (vacuolisation et dégranulation cytoplasmique, vésiculation nucléaire, nécrose) (Diamond 1989; Gilman 1998; Ortega 1989). Si l'atteinte n'est pas trop importante, l'effet de l'UA est réversible et les cellules tubulaires se régénèrent (Diamond 1989), bien que pas exactement à l'identique (Wrenn 1985). Deux équipes décrivent également des modifications morphologiques des glomérules après contamination chronique chez le rat (ingestion et implantation) : adhésions, sclérose des capsules glomérulaires, épaississement de la membrane basale du glomérule, réduction de la cavité de la capsule de Bowman, etc (Altmann 2004; Gilman 1998). Chez l'Homme, après ingestion chronique *via* l'eau de boisson, les modifications morphologiques du tubule contourné proximal sont également observées, mais il ne semble pas y avoir d'atteinte glomérulaire (Kurttio 2002; Zamora 1998).

Après contamination aiguë à forte dose (injection de 2,5-25 mg/kg) chez le rat, les mêmes modifications de la partie distale du tubule contourné proximal sont observées : vacuoles cytoplasmiques, dilatation tubulaire, nécrose (Blantz 1975; Domingo 1987; Haley 1982a; Sanchez 2001), laissant place à une régénération à long terme des segments touchés. Cependant, des marques de fibrose interstitielle et une infiltration de monocytes indiquent une atteinte chronique du rein (Haley 1982b). L'atteinte morphologique du glomérule apparaît plus nettement qu'après contamination chronique (Domingo 1987; Haley 1982a; Kobayashi 2006).

❖ Atteinte fonctionnelle

Outre les modifications histologiques, la néphrotoxicité de l'uranium se traduit également par une atteinte fonctionnelle. Celle-ci est révélée par le dosage de certains paramètres biochimiques. Ainsi, après contamination chronique chez l'Homme, une protéinurie, une microalbuminurie (Mao 1995), une glycosurie (Kurttio 2006; Zamora 1998), une augmentation de l'excrétion urinaire du calcium et du phosphate (Kurttio 2002), ainsi que de la phosphatase alcaline et de la β_2 -microglobulinurie (Zamora 1998) sont relevées. Chez le rat, une protéinurie, une glycosurie ainsi que des concentrations urinaires élevées de lactate déshydrogénase, d'ASAT et de γ GT ont été observées après injections répétées de fluorure d'uranyle (Diamond 1989) tandis que l'implantation de pastilles d'UA induit une augmentation des taux plasmatiques d'urée et de créatinine et une augmentation des taux urinaires de β_2 -microglobuline et d'albumine (Altmann 2004).

Après contamination aiguë, diverses études relèvent une protéinurie (Domingo 1987; Leach 1984), une glycosurie ainsi que des concentrations urinaires excessives de catalase et de lactate déshydrogénase (Leggett 2003) et une augmentation des concentrations plasmatiques d'urée et de créatinine (Fukuda 2006). Par ailleurs, une étude chez le rat a montré une diminution du taux de filtration glomérulaire pendant 1 à 2 semaines après l'injection de 10 mg/kg de nitrate d'uranyle avant de revenir à la normale au bout de 4 semaines (Haley 1982b). Cette diminution est également observée 2 heures après l'injection de 15 ou 25 mg/kg chez le rat (Blantz 1975). Ceux-ci proposent deux

mécanismes possibles pour expliquer ce phénomène : d'une part une "fuite" des solutés absorbés à travers la membrane endommagée des cellules épithéliales, et d'autre part les modifications structurales du glomérule observées en histologie.

Par ailleurs, divers effets moléculaires de l'UA ont été décrits. Après ingestion chronique de 40 mg/l d'UA chez le rat, une augmentation du stockage de granules de fer dans le cytoplasme des cellules du tubule contourné proximal a été observée (Monleau 2006). Ce résultat est à relier à l'anémie rénale observée dans les mêmes conditions (Berradi 2008). A cette même dose de 40 mg/l, une diminution de l'expression génique de la CYP24A1, l'enzyme de désactivation de la vitamine D, ainsi que de ses récepteurs nucléaires associés VDR et RXR est observée dans le rein (Tissandie 2007). Toujours chez le rat, une ingestion chronique de 80-160 mg/l de nitrate d'UA induit l'activation de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant, la transduction du signal, la synthèse de protéines ou encore le métabolisme cellulaire (Taulan 2004). *In vitro*, l'UA induit une toxicité génomique qui conduit à l'apoptose des cellules NRK-52^E par la voie des caspases (Thiebault 2007). Enfin, une étude *ex vivo* a mis en évidence une diminution du transport de glucose dans la bordure en brosse des cellules épithéliales tubulaires. Cette modification est d'autant plus faible que le pH est acide (Goldman 2006).

Le seuil de toxicité rénale de l'uranium est actuellement de 3 µg/g de rein (CIPR 1959), mais il semblerait qu'il doive être réévalué car des modifications histologiques ont été observées à des concentrations entre 0,7 et 1,4 µg/g (Diamond 1989).

b. Effets sur l'os

L'os est l'organe de rétention à long terme de l'uranium, il est donc particulièrement exposé lors de contaminations chroniques. L'uranium semble avoir le même comportement que le calcium dans l'os et sa distribution initiale dans le squelette après contamination est similaire à celle du calcium (Leggett 1994). Par exemple, les ions uranyles UO_2^{2+} s'échangent avec les ions calcium Ca^{2+} présents dans les cristaux d'hydroxyapatite à la surface osseuse, bien qu'ils ne participent pas à la formation du cristal (Leggett 1994; Wrenn 1985). Après une exposition aiguë, l'UA est retrouvé principalement à la surface de l'os, puis il diffuse jusqu'à se répartir uniformément dans l'os (Wrenn 1985). Selon une étude menée sur deux populations au Canada, la déposition d'uranium dans les os dépend de l'âge (Lariviere 2007). La résorption osseuse participe à l'élimination de l'uranium fixé en surface de l'os et à sa remise en circulation dans le sang (Priest 1982).

❖ Réduction de la formation osseuse

Quel que soit le temps de contamination, le principal effet toxique de l'UA sur l'os est une diminution de la formation osseuse, et donc de la croissance osseuse. Cette réduction a été décrite chez le rat après contamination chronique (après implantation sous-cutanée de poudre d' UO_2 (Diaz Sylvester 2002) ou absorption percutanée pendant 30 jours (Ubios 1994)), mais également après contamination aiguë (injection de 2 mg/kg de nitrate d'uranyle (Fukuda 2006; Guglielmotti 1985; Ubios 1991; Ubios 1994)). Parallèlement à cette diminution de la formation osseuse, une augmentation de la résorption osseuse est décrite après contamination aiguë chez le rat (Fukuda 2006; Ubios 1991). Ainsi, l'uranium altère le modelage du tissu osseux. Chez l'Homme, une forte tendance de corrélation entre

la concentration d'uranium dans l'eau de boisson et l'augmentation du taux du carboxy-terminal télopeptide (CTx, un marqueur de la résorption osseuse) a été observée dans une cohorte finlandaise ingérant de l'eau contenant 6-116 $\mu\text{g/l}$ d'uranium pendant 13 ans en moyenne (Kurttio 2005).

Enfin, il est à noter qu'après contamination interne chronique chez le rat (40 mg/l), on observe une diminution de moitié du taux de la $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamine D_3 plasmatique, qui module la formation osseuse (Tissandie 2007). Cette hormone pourrait être le chaînon manquant entre les perturbations induite par l'uranium au niveau rénal, où elle activée, et celles intervenant dans le tissu osseux, sur lequel elle agit.

❖ Effets au niveau cellulaire

L'accumulation de l'uranium dans les cellules dépend de sa spéciation. Il s'accumule dans les ostéoblastes de la même façon que dans les cellules rénales : sous forme d'aiguilles de phosphate d'uranyle dans les lysosomes (Milgram 2008a).

L'étude *in vitro* de la toxicité de l'uranium sur le tissu osseux révèle une augmentation des marqueurs de la formation osseuse à faible dose, mais cet effet est inhibé à dose toxique (Milgram 2008b). Ce résultat est à opposer aux données animales et humaines citées ci-dessus où une diminution de la formation osseuse est observée à forte comme à faible dose.

L'uranium induit également du stress oxydant dans le tissu osseux, comme le prouvent l'augmentation de la peroxydation lipidique observée *in vivo* (après injection de 576 $\mu\text{g/kg}$ de nitrate d'uranyle chez le rat (Ghosh 2007)) et l'augmentation des espèces réactives à l'oxygène mesurée *in vitro* sur des ostéoblastes (1-100 μM de nitrate d'uranyle (Tasat 2007)). Cette dernière étude sur des ostéoblastes fœtaux humains (lignée cellulaire hFOB 1.19) relève également une diminution de l'activité de la phosphatase alcaline et une modification morphologique des cellules (reticulum endoplasmique granuleux fragmenté et gonflé, absence de Golgi et de membrane plasmique, noyau boursouflé)   des concentrations qui n'affectent pas la viabilité cellulaire.

Enfin, les travaux de Miller *et al* ont démontré la génotoxicité de l'uranium *in vitro* (Miller 1998; Miller 2001; Miller 2002) : l'exposition d'ostéoblastes humains (lignée HOS) au chlorure d'uranyle (10-250 μM) induit leur transformation en phénotype tumorigène. Ce phénomène peut être inhibé en contrôlant la protéine RAS impliquée dans une voie de transduction du signal.

c. Effets sur la reproduction et le développement

❖ Effets sur la reproduction

La toxicité de l'UA sur la reproduction se traduit principalement par une dégradation de la qualité des ovocytes. Une modification de la maturation des ovocytes a été décrite *in vivo* chez la rate après ingestion de 20 ou 40 mg/l de nitrate d'uranyle pendant 49 jours (Feugier 2008) ainsi que chez la souris après ingestion chronique de 2,5 à 10 mg/kg/j (Kundt 2009). *In vitro*, Arnault *et al* constatent également une altération de la maturation des ovocytes de la souris 72 heures après l'ajout d'1 mM d'acétate uranyle dans le milieu (Arnault 2008). De plus, les études de Kundt et Arnault décrivent une altération de la chromatine en métaphase pendant la méiose. Enfin, toujours chez la femelle après

ingestion chronique, l'UA induit une modification de la folliculogénèse *in vivo* (Arnault 2008) et semble agir comme un perturbateur endocrinien de type oestrogénique (Raymond-Whish 2007).

En revanche, l'UA ne semble avoir que peu d'effets chez les mâles. D'une manière générale, la fonction testiculaire est préservée et seules de légères atteintes structurelles des tubules séminifères, des cellules de Leydig ou du tissu interstitiel sont relevées après ingestion chronique de 10-80 mg/kg/j d'acétate d'uranyle (Linares 2005; Llobet 1991). Malenchenko *et al* relèvent également des altérations histologiques qu'ils relient à la détection d'anticorps auto-immuns dans le testicule après exposition à l'uranium (Malenchenko 1978). Enfin, l'implantation de pastilles d'UA dans des souris ne produit pas d'effet néfaste sur le taux de reproduction, la taille des portées, le nombre et la motilité des spermatozoïdes de la génération implantée, et ne provoque aucun signe anormal sur les deux générations suivantes (Arfsten 2005; Arfsten 2006; Arfsten 2009). Par ailleurs, l'ingestion de 40 mg/l d'UA pendant 9 mois ne produit pas de perturbation du métabolisme des hormones stéroïdiennes chez le rat mâle, contrairement à l'uranium enrichi à 4 % administré dans les mêmes conditions (Grignard 2008a).

Ces résultats expérimentaux appuient la conclusion d'absence de toxicité de l'uranium sur la fonction de reproduction chez des mineurs d'uranium en Namibie, bien qu'ils présentent une diminution du taux de testostérone (Zaire 1997).

❖ Effets sur le développement

Une seule étude indique que l'ingestion chronique d'acétate d'uranyle à 25 mg/kg/j provoque une embryolétalité (Paternain 1989). Cependant, ceci demande à être vérifié car une étude de la même équipe à une dose similaire ou doublée ne constate pas d'embryolétalité (Domingo 1989). En revanche, les deux études relèvent une diminution de la taille et du poids des embryons à 18 jours de gestation, ainsi que des malformations comme une fissure de la voûte palatine. *In vitro*, l'exposition d'embryons de souris au stade préimplantatoire induit un retard de développement de l'embryon ainsi qu'une altération de la prolifération du blastomère (Kundt 2000). L'injection sous-cutanée de 0,5-2 mg/kg/j pendant les jours 6 à 15 de la gestation chez la souris provoque une augmentation du nombre d'implantations non viables et du nombre de pertes post-implantatoires ainsi que des anomalies du développement du fœtus, comme des malformations, un poids réduit et des anomalies du squelette (Bosque 1993). Il est à noter qu'une ossification réduite ou anormale est également observée après contamination interne chronique (Domingo 1989). Enfin, le développement et le comportement des portées issues de rates ingérant 40 ou 80 mg/kg/j d'acétate d'uranyle avant, pendant et après la gestation sont normaux (Sanchez 2006).

d. Génotoxicité, mutagénicité et cancérogénèse

Comme d'autres radionucléides, l'uranium est connu pour provoquer une certaine instabilité génomique, qui se manifeste par des dommages à l'ADN. Les anomalies les plus fréquentes sont les cassures double-brin de l'ADN, la formation de micronoyaux et les aberrations chromosomiques comme les chromosomes di-centriques et la translocation chromosomique. La fréquence des chromosomes di-centriques est par exemple liée à la dose de rayonnement reçue et est utilisée en dosimétrie interne pour effectuer le tri des populations et pour estimer la dose reçue par les individus lors d'une exposition aux radionucléides.

L'augmentation des aberrations chromosomiques et notamment de la formation de micronoyaux a été décrite par de nombreuses études *in vitro*. Ainsi, une exposition d'ostéoblastes humains immortalisés à 50 μM d'UA pendant 24 h augmente le nombre des micronoyaux (Miller 2003; Miller 2002). La génotoxicité de l'UA à 24 h a également été observée sur des cellules ovariennes de hamster à 200 μM , sur des cellules rénales de rat de la lignée NRK-52^E à 300 μM et sur des cellules de colon humain à 500 μM (Knobel 2006; Stearns 2005; Thiebault 2007). *In vivo*, une augmentation des cassures double-brin a été observée sur des cellules pulmonaires de rat après inhalation chronique ou aiguë d' UO_2 (Monleau 2006). Chez l'Homme, une augmentation des aberrations chromosomiques a été décrite chez des mineurs d'uranium en Namibie (Zaire 1997), mais elle a été remise en question dans une étude ultérieure (Lloyd 2001). Une augmentation non significative de la fréquence des mutations géniques dans une cohorte de vétérans de la Guerre du Golfe a également été rapportée (McDiarmid 2006; Squibb 2006). Enfin, une augmentation de la fréquence des micronoyaux a été relevée chez des populations de l'ex-Yougoslavie résidant sur des zones contaminées à l'UA (Ibrulj 2004; Krunic 2005).

Le mécanisme de la génotoxicité de l'uranium n'est pas bien connu. Il pourrait découler de sa radioactivité (Kovalchuk 2008) mais également de sa nature de métal lourd (Lin 1994). Une modification de la méthylation de l'ADN pourrait être en cause (Miller 2009).

La génotoxicité de l'UA peut expliquer la propension de l'UA à induire des cancers, comme cela a été montré chez le rat et la souris (Miller 2005; Miller 2009). La transformation cancéreuse de cellules ostéoblastiques humaines a également été induite *in vitro* après 24 h d'exposition à 10 μM d'UA. Chez l'Homme, peu de liens entre l'uranium et l'induction de cancers sont clairement établis. L'augmentation du risque de cancer du poumon chez les mineurs d'uranium est avérée (Vacquier 2009), mais elle est liée à l'exposition au radon (un gaz radioactif provenant de la désintégration de l'uranium) plutôt qu'à l'uranium lui-même. Une augmentation du risque de cancers du foie, de la vésicule biliaire et de myélomes chez cette population demande à être confirmée (Tomasek 1993).

e. Autres effets

Des études sur les effets de l'uranium sur le poumon et sur l'intestin (deux voies d'entrée de l'uranium dans l'organisme) ont également été menées, bien qu'en petit nombre. Dans les deux cas, il y a peu d'effets spécifiques.

Dans le poumon, des fibroses voire des nécroses cellulaires sont relevées après exposition aiguë comme après exposition chronique (Cross 1981; Leach 1973). Ces observations macroscopiques sont probablement dues au stress oxydant (Periyakaruppan 2007) et/ou à des réactions inflammatoires rapportées dans d'autres études (Monleau 2006; Pasanen 1995). Chez l'Homme, une prévalence de fibroses pulmonaires a également été décrite chez des mineurs d'uranium (Archer 1998), ainsi qu'une augmentation du risque de cancer du poumon suite à une exposition au radon (Vacquier 2009).

Dans l'intestin, les effets de l'uranium sont faibles et concernent également l'immunité : on observe une modification de l'expression génique et/ou de la production de certaines cytokines chez le rat après ingestion aiguë (Dublineau 2006b). Après ingestion chronique, l'uranium s'accumule principalement dans les plaques de Peyer et entraîne une augmentation de la densité des neutrophiles et une diminution des mastocytes et des macrophages intestinaux sans modifier leur localisation (Dublineau 2007b; Dublineau 2006a).

Après cette vue d'ensemble des effets biologiques de l'uranium, il ressort que la toxicité de l'UA s'exerce en premier lieu au niveau rénal. Cependant, le cerveau, l'os et le foie sont également le siège d'effets biologiques d'amplitude variable. La plupart des travaux étant consacrés aux conséquences d'une contamination aiguë par l'UA, les effets d'une contamination chronique restent un champ d'étude important à explorer. Un récapitulatif des principaux effets de l'UA décrits après contamination chronique est présenté dans le [Tableau 3](#).

Tableau 3 : Principaux effets biologiques induits par l'UA après ingestion chronique

Système ou organe cible	Espèce	Dose	Durée d'exposition	Effets biologiques	Références
Foie	rat	8-16 mg/kg/j, nitrate d'UA 2 mg/kg/j, nitrate d'UA	4 semaines 9 mois	Diminution du taux plasmatique d'ALAT et ASAT	Ortega 1989 Souidi 2005
	rat	4,8-600 mg/l, nitrate d'UA	1-3 mois	Modifications histologiques modérées	Gilman 1998 rat Souidi 2005
	rat	40 mg/l, nitrate d'UA	9 mois	Modifications moléculaires du métabolisme hépatique des xénobiotiques	Guéguen 2006 Arch Tox Guéguen 2007 Tox Rouas 2009
Système nerveux central	rat	10-20-40 mg/kg/j acétate d'UA 40 mg/l, nitrate d'UA	3 mois 9 mois	Augmentation de la peroxydation lipidique Augmentation du stress oxydant, activation des enzymes antioxydantes	Linares 2007 Lestaevel 2009
	rat	150 mg/l, acétate d'UA	6 mois	Augmentation de l'oxydation lipidique (mâles et femelles) Augmentation de l'activité locomotrice chez les mâles	Briner 2005
	rat	10-20-40 mg/kg/j, acétate d'UA	3 mois	Faibles modulations de l'activité locomotrice et de la mémoire spatiale de travail	Alina 2005 Belles 2005 Sanchez 2006
	Homme	gamme de concentration d'uranium de 2 à 781 µg/l	de 1 à 59 ans	Atteinte de la fonction rénale (excrétion urinaire de calcium et du phosphate, glycosurie...)	Kurttio 2002, 2006 Limson-Zamora 1998
Rein	rat	8-16 mg/kg/j, nitrate d'UA 4,8-600 mg/l, nitrate d'UA	4 semaines 1-3 mois	Dilatation des tubules contournés proximaux et atteinte des cellules tubulaires	Ortega 1989 Gilman 1998
	rat	40 mg/l, nitrate d'UA	6- 9-12-18 mois	Accumulation de granules de fer dans les cellules tubulaires proximales Modifications moléculaires du métabolisme de la vitamine D	Donnadieu-Claraz 2007 Tissandier 2007 BBA
	Homme	6-116 µg/l	13 ans	Augmentation du CTx, marqueur de la résorption osseuse	Kurttio 2005
Os	rat	20-40 mg/l, nitrate d'UA 2,5-10 mg/kg/j	49 jours 40 j	Modification de la maturation des ovocytes	Feugier 2009 Kundt 2009
Reproduction	rat	10-80 mg/l	3 mois 64 j	Légères altération histologiques des tubules séminifères, des cellules de Leydig et du tissu interstitiel des testicules	Linares 2007 Llobet 1991
Développement	rat	25-50 mg/kg/j, acétate d'UA	60 j	Portée: malformations et diminution de la taille et du poids à 18 j de gestation, ossification réduite ou anormale	Paternain 1989 Domingo 1989

II. Le césium-137

A. Généralités sur le césium

1. Origine et distribution

Le césium est un élément naturel de couleur argentée, présent dans la croûte terrestre à raison de 1-4 mg/kg (ATSDR 2004a).

Dans la nature, le césium ne se trouve pas à l'état métallique. Il se dépose sous forme de d'oxyde de césium (Cs_2O) dans le minéral de pollucite, dont les principaux gisements se trouvent au Canada. Il peut également exister sous forme d'hydroxyde de césium CsOH dans l'eau.

Le césium possède une faible mobilité dans les sols. Il s'adsorbe principalement dans les zones argileuses et les sols riches en potassium échangeable (ATSDR 2004a). La dispersion du césium naturel dans l'environnement est essentiellement due à l'érosion des sols.

On considère que suite à l'exposition naturelle au césium, un homme de 70 kg possède 1,5 mg de césium dans le corps et est soumis à un apport quotidien de 10 μg (Métivier 2000).

2. Propriétés physico-chimiques

Le césium est un élément chimique de symbole Cs, de numéro atomique 55 et de masse atomique 133 g/mol. Son point de fusion est de $28,4^\circ\text{C}$, il peut donc se présenter sous forme liquide ou solide.

Le césium fait partie de la famille chimique des métaux alcalins, tout comme le sodium et le potassium. Il présente un seul degré d'oxydation, et sa forme ionique est donc Cs^+ . Outre ses formes oxydée et hydroxydée mentionnées précédemment, le césium peut également se trouver sous forme de carbonate, (Cs_2CO_3) de nitrate (CsNO_3) et de chlorure (CsCl). La plupart des composés formés à partir du césium sont très solubles dans l'eau (ATSDR 2004a).

3. Propriétés radiologiques

Le césium est un élément radioactif possédant de nombreux isotopes allant du césium-114 au césium-146 (Métivier 2000). L'isotope 133 est le seul isotope stable et le seul présent à l'état naturel. Parmi les isotopes radioactifs, la plupart ont des demi-vies très courtes, de l'ordre de la seconde ou de la minute. Seuls trois isotopes ont une période radioactive supérieure à un an : le césium-134, le césium-135 et le césium-137 (^{137}Cs). Leurs principales caractéristiques radiologiques sont données dans le [Tableau 4](#). Le produit de désintégration du césium est le baryum.

Isotope	Demi-vie (année)	Rayonnement émis (issu des descendants)	Activité spécifique (Bq/mg)
^{134}Cs	2,06	β (γ , X)	$4,78 \cdot 10^{16}$
^{135}Cs	$2,3 \cdot 10^6$	β (γ)	$4,26 \cdot 10^{10}$
^{137}Cs	30,2	β (γ)	$3,22 \cdot 10^{15}$

Tableau 4 : Propriétés radioactives des trois principaux isotopes du césium (^{134}Cs , ^{135}Cs et ^{137}Cs) (d'après Métivier 2000)

4. Utilisations

A l'heure actuelle, le césium naturel (^{133}Cs) n'est presque plus utilisé de façon industrielle. Il était utilisé dans les cellules photoélectriques et les écrans de télévision pour sa facilité à s'ioniser par la lumière visible ou les rayons ultraviolets. Il était également employé dans le revêtement des filaments de tungstène dans les lampes. De nos jours, il est encore utilisé en laboratoire, où il peut servir de catalyseur ou encore pour isoler l'ADN des cellules par centrifugation isopycnotique dans un gradient de CsCl.

Enfin, plusieurs études humaines et animales font état d'une utilisation du CsCl en médecine alternative pour lutter contre le cancer (Bayazit 2004; Low 2007; Sartori 1984).

B. Le césium-137

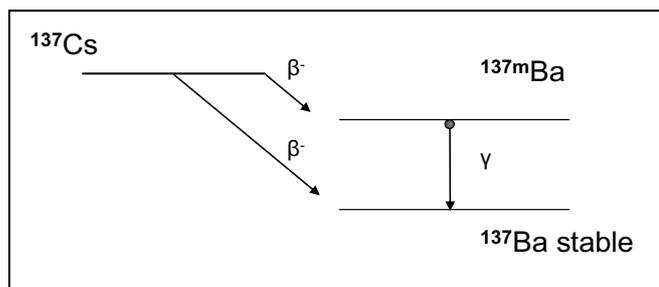
1. Origine et propriétés

Le ^{137}Cs est donc un des isotopes radioactifs du césium. D'origine artificielle, c'est un des produits de fission secondaires créés dans les réacteurs nucléaires.

Le ^{137}Cs a une demi-vie radioactive de 30 ans et une activité spécifique de $3,2 \cdot 10^{12}$ Bq/g (cf. Tableau 4), ce qui en fait une source de radioactivité à long terme. Il se désintègre par émission d'un rayonnement β^- pour donner à 5 % du baryum-137 stable et à 95 % du baryum-137 métastable (cf. Figure 8). Celui-ci a une période radioactive de 2 minutes et passe à l'état stable en émettant un rayonnement γ (WHO 1983). Le ^{137}Cs est donc généralement considéré comme un émetteur β/γ .

Figure 8 : Schéma de désintégration du ^{137}Cs

^{137}Ba = baryum-137, ^{137m}Ba = baryum-137 métastable, β^- = rayonnement bêta mou, γ = rayonnement gamma (d'après ATSDR 2004)



2. Utilisations

Le ^{137}Cs est bien plus utilisé que son homologue stable car sa radioactivité a de multiples applications. Dans tous les cas, il est utilisé en tant que source scellée, c'est-à-dire enfermée dans une gaine protectrice qui stoppe le rayonnement en dehors des périodes d'utilisation.

Dans l'industrie, le ^{137}Cs est utilisé comme source dans les instruments de gammagraphie (mesures de densité, d'épaisseur...), pour l'élimination d'électricité statique, dans les irradiateurs de laboratoire, pour la stérilisation des aliments ou encore comme étalon pour certains compteurs de radioactivité.

Le ^{137}Cs est également utilisé dans le secteur médical : il est utilisé comme source en radiothérapie par contact à la tumeur (de type brachythérapie) et pour l'inactivation de produits biologiques (en particulier des produits sanguins).

3. Dispersion dans l'environnement

Le ^{137}Cs est présent dans l'atmosphère sous forme d'aérosols qui peuvent être dispersés sur de très grandes zones du fait des vents et des pluies. Il se dépose dans les eaux, les couches supérieures des sols et les végétaux. Dans la flore, il est absorbé principalement au niveau des feuilles. La décomposition végétale participe à la contamination des sols. Un territoire est considéré comme contaminé à partir de 37 kBq/km^2 (IAEA 2006).

Étant d'origine artificielle, le ^{137}Cs présent dans l'environnement est entièrement issu des activités humaines. La dispersion environnementale du ^{137}Cs provient principalement de trois "sources" : les essais nucléaires, les accidents, et les rejets dits "de routine".

❖ Les essais nucléaires

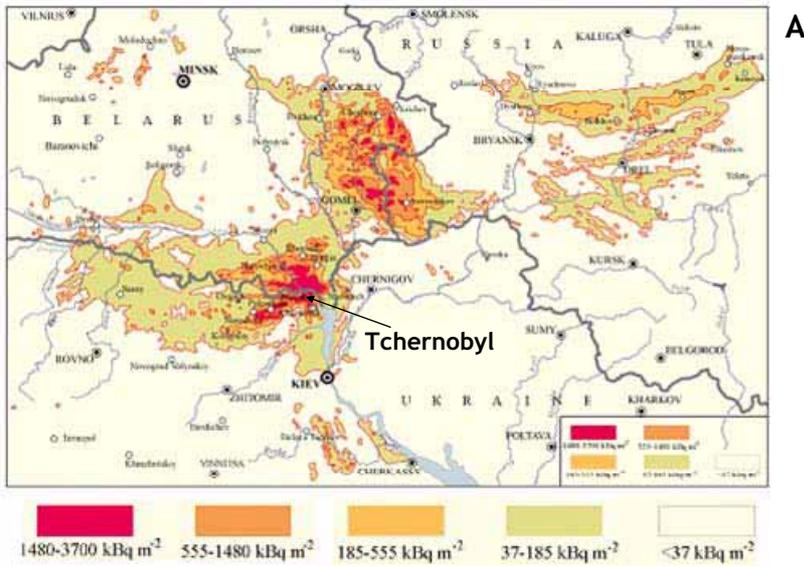
Depuis 1945, les pays ayant développé un programme nucléaire militaire (Etats-Unis, ex-URSS, Chine, France, Royaume-Uni, et plus récemment Inde, Pakistan et Corée du Nord) ont mené des essais nucléaires atmosphériques, souterrains ou sous-marins. Ces essais sont considérés comme la principale source de dispersion du ^{137}Cs dans l'environnement. En effet, les essais atmosphériques sont à l'origine d'environ 900.10^{15} Bq de ^{137}Cs , et les essais souterrains et sous-marins ont rejeté environ 200.10^{15} Bq de ^{137}Cs (Agalesdes 2000). Les retombées radioactives de ces essais se sont peu à peu dispersées sur l'ensemble de la planète.

❖ Les accidents : l'exemple de Tchernobyl

Les accidents survenus sur des centrales nucléaires civiles sont à l'origine de la deuxième source des rejets environnementaux de ^{137}Cs . Le plus emblématique et le plus médiatique est l'accident de Tchernobyl.

Le 26 avril 1986, le réacteur numéro 4 de la centrale nucléaire de Tchernobyl (Biélorussie) explose. Suite à cette explosion, le cœur du réacteur, entré en fusion, est fracturé par la retombée des dalles de béton qui l'entouraient. Les radionucléides sont projetés sous forme de débris, de gaz

et d'aérosols. Ceux-ci se retrouvent dans le panache formé immédiatement après l'explosion et dans les fumées qui s'échappent en continu du cœur en fusion, jusqu'à son extinction 10 jours plus tard. Sur l'activité totale rejetée de $12,5 \cdot 10^{18}$ Bq, $85 \cdot 10^{15}$ Bq sont dus au seul ^{137}Cs . Environ 45 % se sont déposés sur le territoire de l'ex-URSS, 39 % dans le reste de l'Europe et 14 % sur les autres continents et les océans (Robeau 2000). La contamination des sols par les radionucléides en Europe suite à l'accident de Tchernobyl est indiquée sur la Figure 9.

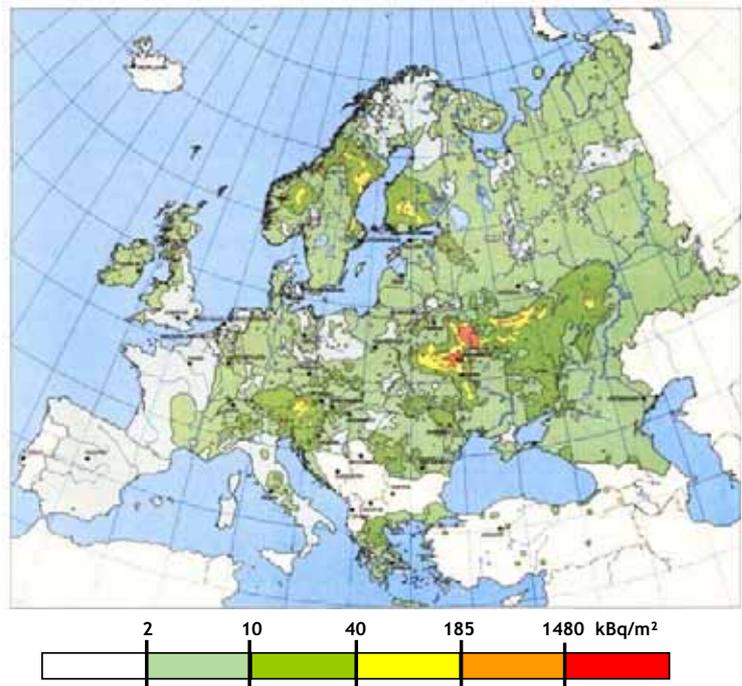


B

Figure 9 : Cartes de la déposition au sol en Europe du ^{137}Cs rejeté lors de l'accident de Tchernobyl

A: Biélorussie, Russie, Ukraine (source : UNSCEAR 2000)

B: Déposition du ^{137}Cs en Europe au 10 Mai 1986 (source : IAEA bulletin 3/96)



De par son importance en terme d'échelle et son impact sur l'environnement et la santé des populations touchées, l'accident de Tchernobyl demeure le symbole des catastrophes nucléaires. Cependant, de multiples accidents se sont produits au cours des années, dont certains avec des rejets radioactifs importants comme les accidents survenus sur les centrales nucléaires de Mayak (Russie) ou de Windscale (Royaume-Uni) en 1957.

❖ Les rejets "de routine"

Les rejets "de routine" sont les émissions de ^{137}Cs des installations nucléaires en fonctionnement normal. Ils représentent une faible proportion du ^{137}Cs généré lors du cycle de combustion. Ils interviennent soit lors du changement de combustible, soit lors du retraitement des déchets. Ils sont en majorité sous forme d'effluents liquides. Bien qu'ils soient émis de façon régulière, ils sont considérés comme une faible source de contamination environnementale en comparaison des essais nucléaires et des accidents. A titre d'exemple, dans sa "fiche radionucléide" de 2001 consacrée au ^{137}Cs , l'Institut de Protection et de Sûreté Nucléaire (IPSN) indique une estimation de rejet annuel de $1,3 \cdot 10^8$ Bq de ^{137}Cs pour un réacteur nucléaire de 1300 mégawatts électriques et de $1,3 \cdot 10^{12}$ Bq pour l'usine de retraitement de la Hague en 1999.

4. Voies d'exposition

Comme pour l'UA, les voies d'exposition interne au ^{137}Cs sont l'ingestion, l'inhalation et la contamination par blessure. Cependant, l'ingestion d'eau et d'aliments contaminés est la voie majeure d'exposition d'un point de vue quantitatif. En effet, elle touche l'ensemble des populations vivant sur des zones contaminées au ^{137}Cs , alors que l'inhalation ou la contamination par blessure ne concernent que les travailleurs du nucléaire, en nombre relativement restreint. Il y a d'ailleurs très peu de travaux sur ces deux modes de contamination.

Outre la contamination interne, l'exposition externe tient une part importante dans la toxicité du ^{137}Cs . En effet, la dispersion du ^{137}Cs dans l'environnement et sa demi-vie longue (30 ans) en font un polluant pérenne. Pour rappel, le rayonnement γ est très pénétrant et n'est arrêté que par une épaisseur non-négligeable de béton. Ainsi, les populations des territoires contaminés au ^{137}Cs sont de fait soumises à une part d'irradiation externe.

C. Biocinétique

1. Absorption

Le ^{137}Cs passe facilement la barrière intestinale, et son taux de transfert dans le modèle biocinétique de référence est de 1 (ICRP 1990). Les études expérimentales donnent des valeurs proches (Raaf 2004) ou légèrement inférieures : une étude sur 10 volontaires rapporte une absorption moyenne par ingestion de 78 % (Henrichs 1989), tandis qu'une étude chez le rat indique

que l'absorption intestinale est de 92 % à 24 h à jeun, et de 80 % dans le cas contraire (Moore 1962). L'absorption se fait principalement au niveau de l'intestin grêle, quelque soit le segment.

En ce qui concerne les autres voies d'absorption, le ^{137}Cs passe facilement dans le sang après inhalation de composés solubles, mais une très faible proportion est absorbée par voie cutanée (ATSDR 2004a).

2. Distribution et rétention

Une fois absorbé, le ^{137}Cs se distribue dans le corps de façon homogène (ICRP 1990). Cependant, quelques temps après l'exposition au ^{137}Cs , le muscle squelettique retient une proportion relativement élevée de ^{137}Cs par rapport aux autres organes (Gorzowski 1991; Leggett 2003; Raaf 2004).

Après absorption, 90 % du ^{137}Cs absorbé passe dans le milieu extracellulaire. Il rentre ensuite dans les cellules par compétition avec le potassium pour les canaux potassium ou les pompes Na^+/K^+ (Leggett 2003). De ce fait, la quantité de potassium de l'individu est un facteur qui influe sur la rétention du ^{137}Cs (Wasserman 1961).

Le ^{137}Cs passe librement à travers la barrière placentaire, et il se répartit de façon uniforme entre la mère et le fœtus (von Zallinger 1998). De même, il existe un transfert de la mère à l'enfant via le lait maternel, bien qu'il soit faible (ATSDR 2004a; ICRP 2004; Sundberg 1991). Chez l'enfant, l'accumulation de ^{137}Cs semble plus grande que chez l'adulte, avec des niveaux élevés dans les glandes endocrines (thyroïde, surrénales, pancréas) puis dans le cœur, le muscle, la rate et le thymus (Bandazhevsky 2003).

Par ailleurs, la distribution du ^{137}Cs dans l'organisme du rat après contamination chronique ou après contamination aiguë (étude à long terme) est similaire (Ballou 1958).

3. Élimination

La voie principale d'excrétion du ^{137}Cs est l'urine. Immédiatement après son passage dans sang, 10 % de la fraction totale absorbée est éliminée dans les urines avec une période de 2-3 jours (Henrichs 1989; ICRP 1990; Raaf 2004). Sur les 90 % incorporés dans les tissus, 14 % sont éliminés dans les fèces et 86 % dans les urines (Leggett 2003). Cette seconde fraction a une période biologique de 85 à 110 jours selon les sources (ATSDR 2004a; ICRP 1990; Ruhm 1999). La demi-vie biologique du ^{137}Cs est plus courte chez la femme que chez l'homme, en particulier pendant la grossesse (ATSDR 2004a; Caywood 1997). Chez l'enfant, l'élimination du ^{137}Cs est plus rapide, avec une demi-vie biologique de l'ordre du mois (Melo 1994).

Un résumé des principales données biocinétiques de l'UA chez l'Homme après ingestion est présenté ci-après (cf. Figure 10).

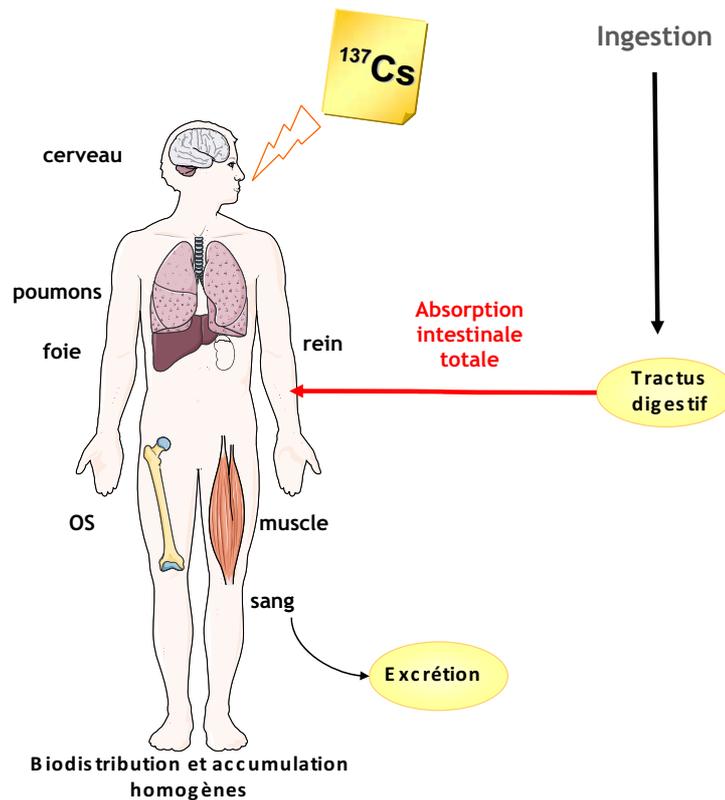


Figure 10 : Principales données biocinétiques du ^{137}Cs après ingestion chez l'Homme

La totalité du ^{137}Cs ingéré est absorbée au niveau intestinal. Le ^{137}Cs est ensuite distribué de façon homogène dans l'organisme.

D. Toxicité et effets biologiques

Contrairement à l'UA, la toxicité chimique du ^{137}Cs est négligeable : il rentre principalement en compétition avec les ions potassium pour les voies de transport actif vers la cellule, mais celles-ci conservent néanmoins une affinité plus forte pour le potassium. La toxicité du ^{137}Cs vient donc principalement de son caractère radioactif. Par ailleurs, la répartition quasi-homogène du ^{137}Cs dans l'organisme ne désigne pas *a priori* de cible particulière de sa toxicité.

Trois éléments sont à prendre en compte concernant la littérature sur la toxicité du ^{137}Cs . D'une part, il y a relativement peu d'études sur les effets toxiques du ^{137}Cs seul (c'est-à-dire hors Tchernobyl). En effet, la plupart des travaux centrés sur le ^{137}Cs ont trait à sa biocinétique. D'autre part, l'immense majorité des publications étudient les conséquences de l'accident de Tchernobyl, en utilisant le ^{137}Cs comme moyen d'estimer la dose reçue ou la contamination des sols. Or, si le ^{137}Cs est la source principale de radiations ionisantes à long terme, une éventuelle exposition lors de l'accident ou peu après peut influencer sur les effets observés. Par ailleurs, les groupes d'étude sont souvent formés par rapport à l'estimation de la dose reçue, mais de nombreux facteurs comme l'âge ou le temps d'exposition peuvent y introduire une grande hétérogénéité. Enfin, une grande

partie de la littérature consacrée aux conséquences sanitaires de l'accident de Tchernobyl est en langue russe, ce qui limite considérablement l'accès à l'information pour un projet comme le nôtre.

En tenant compte de tous ces éléments, les données (non-exhaustives) de la littérature sur la toxicité et les effets biologiques du ^{137}Cs sont présentées ci-dessous, avec dans un premier temps les effets observés après exposition au ^{137}Cs exclusivement, puis dans un deuxième temps les conséquences biologiques observées après l'accident de Tchernobyl. Une présentation des effets du ^{137}Cs après contamination interne à forte dose puis à faible dose est disponible dans l'[Annexe 2](#).

a. ^{137}Cs seul

Chez le rat, l'injection intra-péritonéale de 27 mCi de ^{137}Cs seul (ce qui équivaut à 41 Gy en tenant compte de l'irradiation externe mutuelle des rats d'une même cage) provoque la mort de 50 % des effectifs au bout de 30 jours ([Thomas 1970](#)). Chez le chien de race Beagle, l'injection intraveineuse de $^{137}\text{CsCl}$ à des doses de 36 à 141 mBq/kg provoque la mort de tous les animaux injectés à la plus forte dose au bout de 81 jours, et induit des modifications de l'épithélium des tubules séminifères et une azoospermie pour les survivants ([Nikula 1995](#); [Nikula 1996](#)). Par ailleurs, la même étude relève une augmentation des tumeurs malignes et bénignes, en particulier des tumeurs malignes du foie et des cavités nasales.

Plusieurs études ont mis en évidence des modifications hépatiques et/ou lipidiques après contamination par une forte dose de ^{137}Cs . Ainsi, après une irradiation du foie à 15 Gy, une diminution du poids de l'organe est observée, mais il ne semble pas y avoir d'atteinte fonctionnelle ([Geraci 1991](#)). Après irradiation à 25 ou 75 Gy, une nécrose cellulaire et des lésions des veines hépatiques sont visibles, et une atteinte fonctionnelle est mise en évidence par une augmentation du temps de rétention hépatique du rose Bengale. Par ailleurs, après une irradiation externe à 12 Gy, les auteurs constatent une augmentation du transfert du cholestérol dans le cytoplasme d'hépatocytes de rat ([Kolomiitseva 1985](#)). Après une irradiation externe de l'abdomen du rat à 3, 6 ou 9 Gy, Thomson *et al* observent une modification de l'absorption intestinale des acides biliaires, avec des effets différents selon la nature de l'acide biliaire, la dose d'irradiation et le segment intestinal ([Thomson 1984](#)). Enfin, 2 jours après un gavage par du $^{137}\text{CsCl}$ à 0,16 μCi , une augmentation de 87 % du taux plasmatique d'ALAT est observée chez le rat ([Stojadinovic 1966](#)).

L'exposition chronique au seul ^{137}Cs à des doses 200, 9 000 ou 40 000 fois supérieures au niveau de radioactivité ambiant pendant un an et demi ne semble pas affecter une population de campagnols terrestres sur 3 générations (5,7 Gy de dose cumulée) ([Mihok 2004](#)). En revanche, des souris contaminées au ^{137}Cs par l'eau de boisson tout au long de leur vie à 14,8 kBq/ml deviennent stériles dès la deuxième génération ([Nishio 1968](#)). A une dose dix fois plus faible, on note une altération de la croissance et des fonctions de reproduction (en particulier une atrophie testiculaire), mais les souris se reproduisent néanmoins sur 4 générations. Ramaia *et al* indiquent par ailleurs que les cellules germinales des souris mâles ont la même sensibilité à l'irradiation externe ou interne par le ^{137}Cs s'il y a égalité de dose à l'organe et de temps d'exposition ([Ramaia](#)

1993). Par ailleurs, une diminution du nombre de spermatozoïdes voire une azoospermie a également été observée chez des hommes contaminés par de fortes doses de ¹³⁷Cs (externe et interne) pendant 17 jours suite à l'accident de Goiânia en 1987 (Brandao-Mello 1991). Cet accident a exposé 249 personnes à une source de ¹³⁷Cs de 50,9.10¹² Bq. 14 personnes ont développé une anémie sévère, et chez 8 d'entre elles une hypocholestérolémie, une hyper-urémie, ainsi qu'une élévation transitoire des transaminases plasmatiques ont également été observées.

Le programme ENVIRHOM de l'IRSN est à l'origine de plusieurs études sur les effets d'une contamination au ¹³⁷CsCl par l'eau de boisson à 6 500 Bq/l (environ 300 Bq/kg/j) chez le rat. En ce qui concerne les effets neurologiques, une modification du cycle veille-sommeil est observée après 1 mois de contamination, mais elle disparaît après 3 mois de contamination (Lestavel 2006). En revanche, un dérèglement de la balance pro/anti-inflammatoire est observé après 3 mois de contamination dans l'hippocampe, où l'expression génique des enzymes de la voie du monoxyde d'azote est également modulée (Lestavel 2008). Le comportement des animaux n'est néanmoins pas modifié par la contamination, ni après 3 mois ni après 9 mois d'exposition (Houpert 2007a). Après 3 mois d'ingestion quotidienne de ¹³⁷Cs, la barrière intestinale ne semble pas affectée (Dublineau 2007a), pas plus que la morphologie cardiaque. Cependant, une augmentation de 50 % du taux plasmatique des créatines kinases (CK et CK-MB, utilisées pour évaluer l'atteinte cardiaque), et une légère diminution de la pression artérielle avec disparition de son cycle circadien sont observées (Gueguen 2008). Enfin, l'étude du métabolisme de plusieurs dérivés du cholestérol (les hormones stéroïdiennes et la vitamine D) a été menée après contamination interne au ¹³⁷Cs pendant 9 mois. Une diminution du taux plasmatique du 17β-estradiol et une augmentation de celui de la corticostérone sont observées, associées à des modifications de l'expression génique des récepteurs nucléaires LXRα (+20 %), LXRβ (x2) et FXR (-26 %) dans le testicule (Grignard 2008b). Par ailleurs, une diminution de l'expression génique de la CYP11A1 (-15 %) intervenant dans la synthèse des hormones stéroïdiennes est relevée dans les glandes surrénales. En ce qui concerne le métabolisme de la vitamine D, après 3 mois de contamination le niveau plasmatique de la vitamine D active est diminué de moitié (Tissandie 2006a), tandis que l'expression génique d'une enzyme de synthèse (CYP2R1) et d'une enzyme d'inactivation (CYP27B1) est augmentée dans le foie et le rein respectivement. Ces deux enzymes sont également affectées chez des rats contaminés dès la naissance pendant 3 semaines (Tissandie 2009). Par ailleurs, les taux plasmatiques de la vitamine D, de l'ostéocalcine et du phosphate sont également modifiés chez des animaux (+25 %, -25 % et +80 % respectivement).

Enfin, deux cas d'exposition chronique humaine (accidentelle) au ¹³⁷Cs sont rapportés dans la littérature. Un homme ayant reçu une dose cumulée de 8 Gy a développé une leucémie suite à une atteinte de l'hématopoïèse (Baranov 2004). D'autre part, l'analyse d'une lésion de la peau suite à l'exposition accidentelle d'un homme au ¹³⁷Cs pendant plusieurs mois a montré une hypertrophie de l'épiderme, une inflammation hétérogène du derme associée à une prolifération de fibroblastes dans les zones nécrotiques. L'implication du *tumor growth factor β1* et du *tumor necrosis factor α* est également observée (Vozenin-Brotons 1999).

b. Les conséquences de l'accident de Tchernobyl

(1) La contamination

À l'heure actuelle, le ^{137}Cs représente la source majeure de rayonnements ionisants suite à l'accident de Tchernobyl de par la conjugaison de sa longue demi-vie radiologique (30 ans) et de la quantité de ^{137}Cs rejetée lors de l'accident (85.10^{15} Bq). La principale source d'exposition au ^{137}Cs suite à l'accident de Tchernobyl est l'ingestion d'aliments contaminés. En effet, le transfert du ^{137}Cs du sol à travers la chaîne alimentaire (cultures, bétail, aliments) a été montré (Coulon 1994; Handl 2003; Takatsuji 2000). A titre d'exemple, l'Annexe 2 indique les valeurs de concentration de ^{137}Cs dans différents éléments de l'alimentation sur les territoires contaminés.

Ce mode d'exposition concerne les habitants des territoires contaminés, soit plus de 5 millions de personnes réparties sur 190 000 km² (dont 75 % en Biélorussie, Russie et Ukraine) avec une concentration en ^{137}Cs supérieure ou égale à 37 kBq/m² (Anspaugh 2007; IAEA 2006). Ces populations sont donc soumises à une contamination interne chronique. Cependant, les conséquences sanitaires mesurées de nos jours découlent non seulement de cette ingestion, mais également d'une éventuelle exposition des individus à une plus forte dose lors de l'accident (lors de la décontamination du site, avant l'évacuation ou lors du retour de ces populations sur les zones initialement évacuées).

En vue de situer le contexte global d'exposition des différentes populations (humaines et animales) suite à l'accident de Tchernobyl, il est important d'identifier les modalités de contamination auxquelles elles ont été soumises.

❖ Les liquidateurs

Le terme "liquidateurs" désigne l'ensemble des personnes qui sont intervenues sur le site pendant l'accident et/ou qui ont participé à la décontamination et au nettoyage du site dans les jours et les mois qui ont suivi. La majorité des décès liés à l'accident de Tchernobyl sont dus au syndrome d'irradiation aiguë développé par certains liquidateurs.

Les nombreuses études menées sur les liquidateurs à partir des années 1990 évaluent donc les effets provoqués à la fois par une irradiation externe aiguë par de multiples radionucléides et par une contamination interne chronique par le ^{137}Cs .

❖ Les adultes des territoires contaminés

Les habitants des zones contaminées d'âge adulte en 1986 ont été évacués plus ou moins rapidement après l'explosion et sont revenus s'installer dans certaines zones à des temps variables. Ainsi, on ne peut exclure l'influence d'une exposition externe sur les effets décrits dans cette population, sans pour autant pouvoir la quantifier. La contamination interne est cependant une composante majeure, sinon la principale, de l'exposition au ^{137}Cs chez ces individus.

❖ Les enfants des territoires contaminés

Selon leur âge, deux schémas d'exposition sont possibles chez ceux que l'on a appelé "les enfants de Tchernobyl". D'une part, les enfants nés avant l'accident ont une exposition similaire à celle des adultes (leurs parents), bien que les répercussions soient différentes étant donné leur état "en croissance". D'autre part, les enfants nés après l'accident, qui eux ont essentiellement été contaminés de façon interne chronique, d'abord *in utero*, puis par le lait maternel et/ou l'alimentation.

❖ Les animaux

Enfin, un certain nombre de travaux est consacré à l'étude des animaux vivant sur les territoires contaminés. Deux types de travaux sont prépondérants : soit la mesure du ¹³⁷Cs dans les animaux domestiques ou d'élevage, soit l'analyse des effets biologiques sur les animaux sauvages. Pour les premiers, l'exposition est principalement interne. En revanche, pour les seconds l'exposition est à la fois interne et externe, d'autant plus que ce sont des petits animaux vivant à proximité immédiate des sols, plantes et feuillages où le ¹³⁷Cs est piégé.

NB : *Chaque individu ayant un "historique d'exposition" propre, les grandes classes définies ci-dessus sont par nature sujettes à une variabilité interne non-négligeable.*

(2) Les cancers

L'apparition d'un nombre élevé de cancers est la conséquence la plus connue de l'accident de Tchernobyl et celle qui a longtemps focalisé les études. L'augmentation largement documentée des cancers de la thyroïde, notamment chez les enfants, ne sera pas développée ici puisqu'elle est due aux isotopes radioactifs de l'iode et non au ¹³⁷Cs.

Un risque élevé de leucémie est associé aux radiations ionisantes, comme dans le cas de survivants aux bombes atomiques d'Hiroshima et Nagasaki (Preston 1994). De multiples études épidémiologiques ont donc été entreprises pour évaluer l'incidence des leucémies chez les victimes de Tchernobyl. Aucun lien statistiquement significatif entre la dose estimée, la contamination du sol et le risque de leucémie n'a été mis en évidence (WHO 2006). Cependant, ce résultat est à nuancer par la faible puissance statistique des études en question, qui est un problème récurrent dans les études épidémiologiques sur les conséquences sanitaires de l'accident de Tchernobyl. L'absence de relation semble récurrente chez les enfants (contaminés *in utero* ou non) et chez les adultes des territoires contaminés (Howe 2007; Ivanov 1997; Noshchenko 2002). Chez les liquidateurs, plusieurs études sont contradictoires (Ivanov 2007; Kesminiene 2007; Romanenko 2008) mais l'une d'entre elle met en évidence une incidence de leucémies deux fois plus grande chez les liquidateurs que chez les contrôles appariés (Konogorov 2000).

En ce qui concerne les autres cancers, une augmentation des cancers du rein chez les femmes (Romanenko 2004) et des voies urinaires chez les hommes (Romanenko 2000; Romanenko

2003) des territoires contaminés est décrite. Une incidence supérieure du cancer du sein corrélée au niveau de contamination des sols est également rapportée chez les femmes de la population générale (Pukkala 2006; WHO 2006). Enfin, Ivanov *et al* montrent une augmentation significative du risque de décès par cancer chez les liquidateurs (Ivanov 2007).

(3) Les effets non cancéreux

❖ Cataractes et problèmes oculaires

Le développement de cataractes (opacification du cristallin) est un effet connu des rayonnements ionisants et une des affections persistantes des individus ayant subi un syndrome d'irradiation aiguë (UNSCEAR 2000). De fait, une augmentation de l'incidence des cataractes chez les liquidateurs est avérée (Worgul 2007). Cependant, des modifications du cristallin ont également été observées chez les enfants des territoires contaminés (Day 1995). Le temps de latence étant inversement proportionnel à la dose reçue, de nouvelles études dans les années à venir permettront de suivre l'évolution du nombre de cataractes liées à une exposition interne chronique au ¹³⁷Cs.

❖ Reproduction et développement

Il n'y a pas de baisse de la fécondité en lien avec la dose de ¹³⁷Cs (WHO 2006).

Une étude rapporte une augmentation du nombre de malformations congénitales et d'anomalies du développement dans les zones les plus contaminées de Biélorussie (Feshchenko 2002), mais ces résultats sont en contradiction avec d'autres travaux (Lazjuk 1997). Un pic du nombre de cas de syndrome de Down congénital (trisomie 21) a été enregistré en janvier 1987, soit 9 mois après le mois d'avril 1986, date de l'accident (Zatsepin 2007). La mortalité infantile en Ukraine a diminué après 1986, quelque soit le niveau de contamination des régions étudiées (WHO 2006). En outre, une étude très récente rapporte une augmentation de l'instabilité génomique chez des enfants nés après l'accident de parents irradiés (Aghajanyan 2009).

En ce qui concerne les études sur l'animal, une augmentation de l'embryolétalité dépendante du niveau de contamination des sols a été observée sur 22 générations de campagnols dans différentes régions de Biélorussie (Ryabokon 2006).

❖ Foie

Une augmentation de l'incidence des hépatites persistantes et des cholécystites chroniques a été observée chez les liquidateurs (Komarenko 1999; Shkala 1998; Tribat 1999). Chez des enfants exposés *in utero* puis élevés dans des territoires contaminés (<15 Ci/km², soit < 5,5.10⁸ kBq/km²), une diminution des taux plasmatiques d'ALAT, d'ASAT et de la bilirubine totale est corrélée à une augmentation de la dose absorbée (Sychik 1999). Au contraire, chez les liquidateurs, une élévation des taux plasmatique d'ALAT, d'ASAT, de la γ GT, de la phosphatase alcaline et de la lactico-déshydrogénase est relevée (Shkala 1998).

Au-delà des études humaines, de nombreuses altérations structurales et/ou fonctionnelles du foie ont été observées sur des rongeurs (rats, souris, campagnols) exposés ou capturés dans la

zone d'exclusion, c'est-à-dire dans un rayon de 30 km autour de la centrale nucléaire de Tchernobyl. Ces études ont été faites à des dates différentes et donnent ainsi un bon aperçu des effets d'une exposition chronique au ¹³⁷Cs.

Plusieurs études rapportent des modifications morphologiques et structurales du foie (Pinchuk 1991; Shishkina 1992), notamment de nombreux changements non-spécifiques (nécrose hépatocytaire, dégénération vacuolaire et parenchymateuse), une nécrose touchant tous les types cellulaires du foie et le développement tardif de cholangiomes (tumeurs bénignes des canalicules biliaires). Outre ces modifications, des effets au niveau moléculaire ont également été décrits : une altération des structures primaire et secondaire de l'ADN dans l'hépatocyte (Semenov 1994), une diminution des phospholipides associée à une modification du ratio des différents types de phospholipides (Kudiasheva 2000; Shishkina 1992), ainsi qu'une diminution de la concentration hépatique en cytochromes P450 (Glushakova 2000).

Par ailleurs, une perturbation de la transduction du signal du récepteur à l'insuline sur la membrane plasmique des hépatocytes de rats vivant dans la zone d'exclusion pendant 3 générations a également été rapportée (Bozhok 1994).

❖ Stress oxydant

La perturbation du statut redox résultant de l'exposition aux radiations ionisantes est relativement bien établie.

Chez les liquidateurs, une corrélation entre la dose reçue et l'augmentation des marqueurs de stress oxydant a été relevée (Souchevitch 1997). En outre, deux études menées sur des enfants exposés *in utero* et vivant sur des territoires contaminés ont mis en évidence une carence en vitamines A et E et une augmentation du stress oxydant (peroxydation lipidique) en corrélation à la fois avec la dose estimée chez l'enfant et celle de sa mère (Neyfakh 1998a; Neyfakh 1998b).

Chez les rongeurs ou le bétail des territoires contaminés, une augmentation des radicaux libres (Chobot'ko 1999; Mirzoev 1999) et une diminution de l'activité anti-oxydante (Kudiasheva 1996) sont les principales modifications observées.

❖ Système cardio-vasculaire

Les fortes doses de rayonnements ionisants sont connues pour provoquer des complications cardio-vasculaires, y compris de l'athérosclérose (Trivedi 2004). De fait, le lien entre l'exposition et la prévalence des maladies cardio-vasculaires semble établi chez les liquidateurs (Ivanov 2001; Ivanov 2000; Ivanov 2006). Une augmentation de la cholestérolémie, de la triglycéridémie et une hyperlipoprotéïnémie de type athérogène ont d'ailleurs été observées chez des liquidateurs (Chaialo 1991), bien qu'une autre étude relève une hypotriglycéridémie à forte dose (Chernyshov 2007).

En ce qui concerne les faibles doses, l'existence d'un tel lien est à l'étude. Chez les survivants des bombes atomiques d'Hiroshima et Nagasaki, une augmentation du risque de maladies cardio-vasculaires a été mise en évidence (Preston 2003; Yamada 2004). Une publication récente recense les différentes études épidémiologiques menées sur l'éventuelle relation entre les faibles doses de rayonnements ionisants et les maladies cardiovasculaires (Metz-Flamant 2009). Concernant

les populations de Tchernobyl, des études épidémiologiques de grande envergure sont en cours. Cependant, des symptômes cardio-vasculaires anormaux tels qu'une hypertension artérielle ou des anomalies de l'électrocardiogramme ont été rapportés chez des enfants des territoires contaminés (Bandazhevskaya 2004).

❖ Systeme nerveux central

Des possibilités de lésions de la région subcorticale du cerveau et une augmentation du risque d'accident vasculaire cérébral corrélée à la dose moyenne journalière ont également été observées chez les liquidateurs (Ivanov 2007; Zhavoronkova 1996). En outre, des troubles cognitifs ont été observés chez des liquidateurs et chez des personnes particulièrement exposées comme des agents forestiers et des agriculteurs (Gamache 2005). *A contrario*, il ne semble pas y avoir de différence de performances neuropsychologiques entre les enfants exposés *in utero* et les non-exposés (Bar Joseph 2004; Litcher 2000).

❖ Systeme immunitaire

De multiples études se sont focalisées sur l'étude du système immunitaire après l'accident de Tchernobyl, avec des résultats contradictoires. Ainsi, divers travaux rapportent des variations opposées des populations de lymphocytes T CD4+, CD8+ et CD3+ chez les liquidateurs (Chumak 2001; Kurjane 2001; Titova 1996). Une diminution mineure du ratio CD4/CD8 a été relevée chez 24 enfants évacués de la ville la plus proche de la centrale, Pripyat (DeVita 2000). Des modifications des taux des différentes immunoglobulines ont été mises en évidence chez des enfants des zones contaminées de Biélorussie à court terme (Titov 1995) et à long terme (Mel'nichenko 1999). Une diminution du nombre de lymphocytes B a également été observée chez ces enfants (Titov 1995), tandis que des variations dans les sous-populations de lymphocytes T et NK demandent à être confirmées (Chernyshov 1997; Vykhovanets 2000).

Malgré ces changements, aucune incidence particulière de maladies auto-immunes n'a été rapportée dans ces différentes populations.

❖ Autres effets

Chez les liquidateurs, une diminution de la densité osseuse se traduisant par une augmentation de l'incidence de l'ostéopénie (Rozhinskaia 1994) et une augmentation du risque d'ostéoporose (Kharchenko 2001) a été rapportée. Par ailleurs, des cystites chroniques prolifératives et des lésions des voies urinaires et de la vessie sont décrites chez les adultes des territoires contaminés (Romanenko 2003).

Ainsi donc, il ressort de cette revue de la littérature que les effets d'une contamination par le ^{137}Cs sont diversement documentés. En ce qui concerne le ^{137}Cs seul, la plupart des études traitent de l'exposition aiguë, le plus souvent externe. Outre les suites du syndrome d'irradiation aiguë (brûlure radiologique, nécrose, perturbation de l'hématopoïèse), les principaux effets décrits touchent la reproduction et le foie. Les travaux de l'IRSN sur la contamination interne chronique par le ^{137}Cs relèvent de légers effets comportementaux et des modulations du stress oxydant, de la pression artérielle et des métabolismes de stéroïdes (vitamine D, hormones stéroïdiennes).

L'accident de Tchernobyl induit une exposition interne à très long terme par le ^{137}Cs pour les populations des territoires contaminés. Les principaux effets biologiques observés sont l'augmentation de certains cancers, l'apparition de cataractes, l'augmentation de stress oxydant et des modifications lipidiques et/ou hépatiques. Cependant, les conséquences biologiques relevées ne peuvent que très rarement être reliées au ^{137}Cs de façon certaine (hormis les cataractes) du fait de nombreux facteurs comme la faible puissance statistique de nombreuses études, la forte variabilité des doses individuelles et la présence de biais éventuels (meilleure surveillance sanitaire, habitudes alimentaires, cigarettes, stress et anxiété...). Ainsi, l'étude expérimentale des effets d'une contamination interne chronique à des doses connues de ^{137}Cs s'avèrerait utile pour déterminer la part du ^{137}Cs dans les conséquences sanitaires à long terme de l'accident de Tchernobyl.

Un récapitulatif des principaux effets après contamination chronique par le ^{137}Cs (seul ou post-accidentel) est présenté dans le [Tableau 5](#).

Tableau 5 : Principaux effets biologiques observés après exposition chronique au ¹³⁷Cs

Type d'exposition	Population	Dose	Durée d'exposition	Effets biologiques	Références
Ingestion de ¹³⁷ Cs seul	souris	1,48 kBq/ml 14,8 kBq/ml	à vie	Altération de la croissance et de la reproduction Stérilité dès la deuxième génération	Nishio 1968
	rat	6 500 Bq/l	1-3 mois	Activation de la voie du monoxyde d'azote	Lestaevel 2006
	rat	6 500 Bq/l	3 mois	Modifications moléculaires du métabolisme de la vitamine D	Lestaevel 2008
	rat	6 500 Bq/l	3 mois	Modifications moléculaires de la stéroïdogénèse dans le testicule et la glande	Tissandré 2006
	rat	6 500 Bq/l	9 mois	Diminution de moitié des taux plasmatiques de Ck et CK-MB	Grignard 2007
	rat	6 500 Bq/l	9 mois		Guéguen 2008
Exposition accidentelle à du ¹³⁷ Cs seul	Homme	? Source de 50,9. 10 ¹² Bq	17 j	Diminution du nombre de spermatozoïdes, allant jusqu'à l'azoospermie	Brandao-Mello 1991
				Augmentation de l'incidence des leucémies	Konogorov 2000
Conséquences à long terme de l'accident de Tchernobyl		liquideurs		Troubles cognitifs et augmentation du risque d'accident vasculaire cérébral	Ivanov 2007, Gamache 2005
				Augmentation de l'incidence des cataractes	Worgul 2007
				Hépatites persistantes, cholécystites chroniques, augmentation des taux plasmatiques des transaminases et de γ-GT	Shkala 1998, Tribat 1999, Komarenko 1999
				Diminution de la densité osseuse	Kharchenko 2001, Rhozhinskaia 1994
		adultes des territoires contaminés		Augmentation de l'incidence du cancer du rein et des voies urinaires	Romanenko 2000, 2003
				Augmentation de l'incidence du cancer du sein	Pukkala 2006
				Modifications du cristallin	Day 1995
		enfants des territoires contaminés		Malformations congénitales et anomalies du développement	Feshchenko 2002
				Hypertension artérielle et anomalies de l'électrocardiogramme	Bandazheskaya 2004
				Diminution des transaminases plasmatiques	Sychik 1999
		rongeurs sauvages des territoires contaminés		Modifications morphologiques et structurales du foie	Pinchuk 1991, Shishkina 1992
				Altération qualitative et diminution du taux de phospholipides	Shishkina 1992, Kudiasheva 2000
			Diminution de la concentration hépatique en CYPs	Glushakova 2000	

CONCLUSION DU CHAPITRE 1:

A l'issue de cette synthèse sur l'UA et le ^{137}Cs , il ressort que ces deux radionucléides ont des caractéristiques physico-chimiques et des effets biologiques globalement très différents. De par sa qualité d'émetteur de rayonnement α , l'UA exerce plutôt une toxicité lors de contaminations internes, avec une action prépondérante au niveau du rein, de l'os et du système nerveux central. Au contraire, le ^{137}Cs induit des effets néfastes dus aux rayonnements β et γ aussi bien après exposition externe qu'interne, et son action est plus diffuse dans l'organisme, avec en particulier des effets au niveau oculaire et sur la reproduction.

Cependant, l'étude des effets de ces radionucléides après contamination interne chronique à faible niveau chez le rat a montré que plusieurs systèmes physiologiques sont perturbés par ces deux radionucléides. Ainsi, le métabolisme de la vitamine D dans le foie et le rein et celui des hormones stéroïdiennes dans le testicule et les glandes surrénales subissent des modifications de certains paramètres au niveau génique, protéique et plasmatique. Ces métabolismes ont deux choses en commun. D'une part, ils dépendent en grande partie de l'activité d'enzymes de type CYP et sont finement régulés par des récepteurs nucléaires. D'autre part, la vitamine D comme les hormones stéroïdiennes dérivent du cholestérol. Le rôle central du cholestérol dans l'organisme et le fait que son métabolisme dépend également des CYPs et des récepteurs nucléaires en fait un sujet d'étude particulièrement pertinent dans le contexte d'une contamination interne aux radionucléides.

Pour mieux appréhender les enjeux de cette thèse, une présentation du métabolisme du cholestérol chez le rat fait suite à cette première partie. Elle se focalise sur le foie et le cerveau, deux organes importants dans l'homéostasie du cholestérol au niveau de l'organisme.

CHAPITRE 2

Le métabolisme du cholestérol

I. Le cholestérol

A. Caractéristiques biochimiques

Le cholestérol est une molécule lipidique de la classe des stérols. Il est constitué d'un noyau cyclopentanophénanthrène (caractéristique des stérols) et d'une chaîne aliphatique. Il possède notamment une double liaison en position 5-6 ainsi qu'un groupement hydroxyle en position 3 (cf. [Figure 11](#)). De formule brute $C_{27}H_{46}O$, son nom systématique est "cholest-5-en-3 β -ol" et sa masse molaire est de 386,35 g/mol.

La molécule de cholestérol peut être divisée en trois régions :

- ✓ la tête polaire, constituée par le groupement hydroxyle en position 3
- ✓ la structure cyclique rigide
- ✓ la queue aliphatique apolaire.

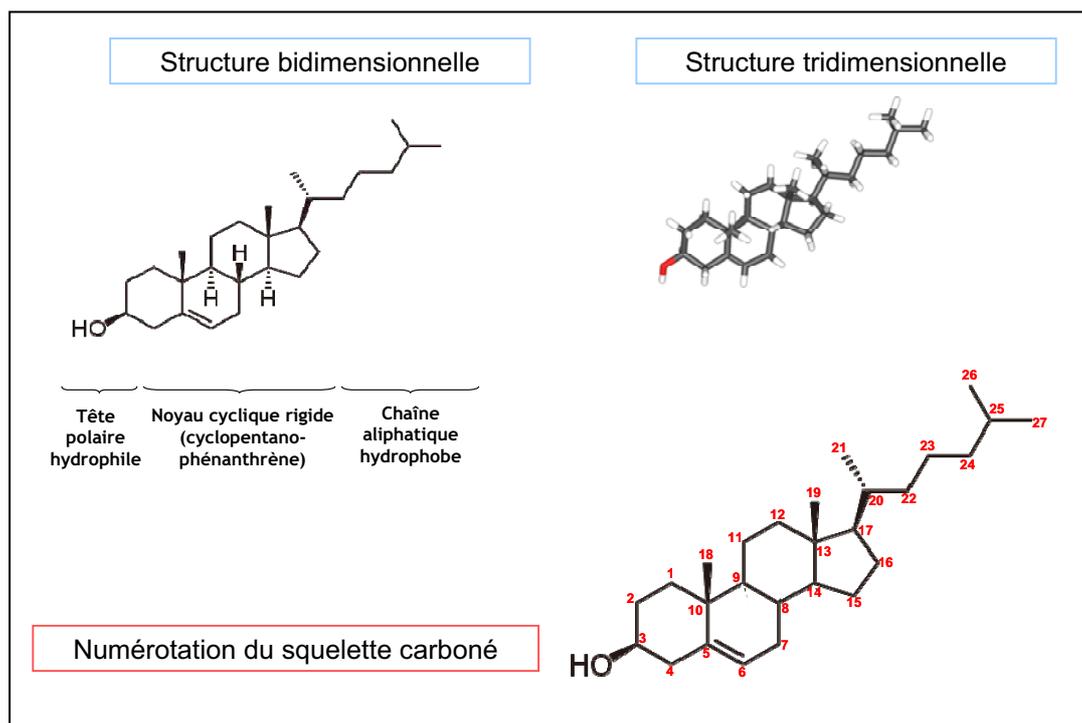


Figure 11 : Structure chimique du cholestérol

Cette structure fait du cholestérol une molécule relativement amphiphile, grâce à sa tête hydrophile et à sa queue hydrophobe. L'estérification du cholestérol par les acides gras qui se fait au niveau du groupement hydroxyle efface ses propriétés hydrophiles. Les cholestéryl esters ainsi formés sont la forme de stockage du cholestérol. En ce qui concerne sa structure tridimensionnelle, le cholestérol est une molécule relativement plane (cf. [Figure 11](#)).

B. Rôles physiologiques du cholestérol

Le cholestérol est le stérol le plus abondant chez les vertébrés. Chez le rat, il représente 82 % des stérols totaux. C'est une molécule cruciale pour l'organisme de par ses divers rôles biologiques, à la fois d'ordre structural et d'ordre fonctionnel.

1. Rôles structuraux

Le premier rôle du cholestérol est structural, car c'est un composant des membranes biologiques. A ce titre, il intervient dans l'architecture de la cellule et de ses organites, et c'est un élément indispensable à la division cellulaire.

Dans les membranes, le cholestérol s'insère aux côtés des phospholipides, dans la même orientation : la tête polaire à l'extérieur (cf. Figure 12). Il permet de "fixer" dans une certaine mesure les premiers groupements carbonés des phospholipides et de rigidifier ainsi la membrane. Ainsi, la concentration membranaire en cholestérol influe sur la fluidité et la perméabilité des membranes aux molécules hydrophiles.

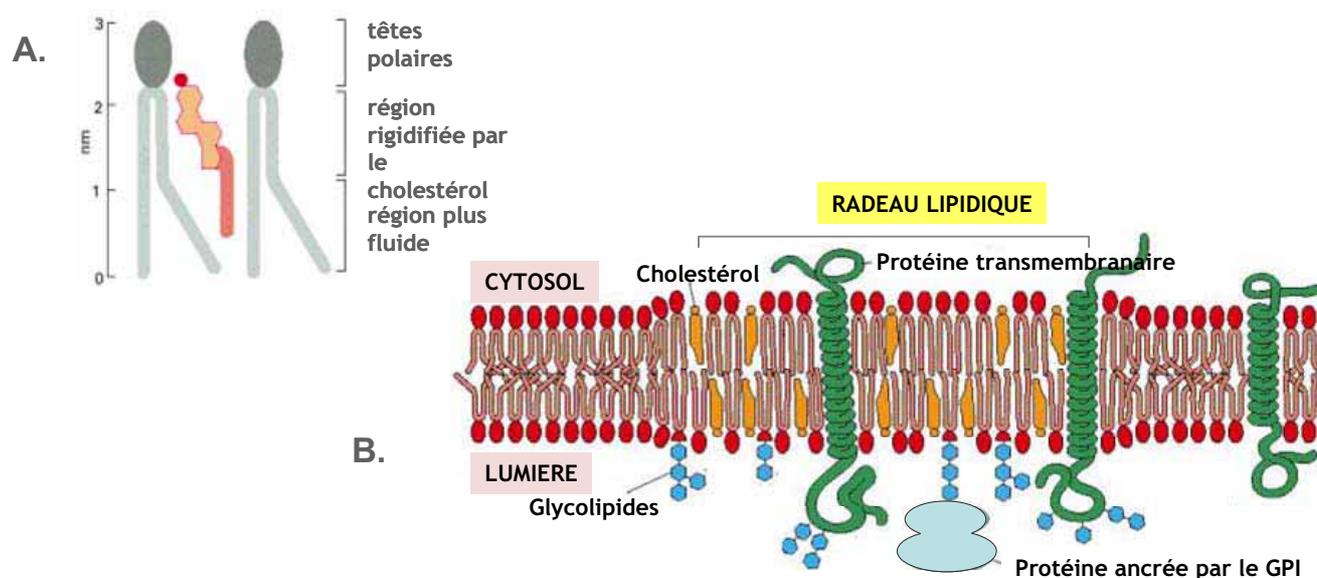


Figure 12 : Le cholestérol dans les membranes

A. Schéma de l'insertion du cholestérol dans une membrane classique. B. Schéma d'un radeau lipidique. L'augmentation de la concentration en cholestérol rend le radeau plus ordonné que les régions attenantes et permet l'ancrage spécifique de protéines à longs domaines transmembranaires. GPI : glycosyl phosphatidyl inositol. (modifié d'après *Molecular biology of the cell*, 4th edition, © 2002 by Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter)

Certaines régions membranaires peuvent être transitoirement enrichies en cholestérol pour former deux structures particulières : les radeaux lipidiques et les cavéoles (Fielding 2004). Les radeaux lipidiques permettent une forte concentration de certaines protéines à la membrane en vue par exemple de capter une substance (lipoprotéine, neurotransmetteur...) du milieu extra cellulaire.

Ainsi, par le biais d'interactions protéines-lipides, le cholestérol sert notamment de point d'ancrage à certaines protéines qui ne sont pas en interaction directe avec la membrane : c'est par exemple le cas des protéines G impliquées dans la transduction du signal. Les cavéoles sont également impliquées dans la transduction du signal et permettent également l'endocytose de diverses molécules (Brown 1998). Au niveau structural, ces domaines membranaires sont plus "ordonnés" que le reste de la bicouche lipidique, car la forte concentration en cholestérol permet une meilleure rigidité (cf. Figure 12).

Enfin, en tant que composant membranaire, le cholestérol joue un rôle essentiel dans la formation de la myéline et donc dans la neurotransmission (Saher 2005). En effet, la myéline est constituée par des extensions membranaires des cellules gliales qui s'enroulent autour de l'axone.

2. Rôles fonctionnels

Le cholestérol a de nombreux rôles fonctionnels dans les divers types cellulaires. Certains découlent de son rôle structural, d'autres sont associés à des fonctions biologiques particulières.

Dans l'ensemble des cellules, l'implication du cholestérol dans les membranes biologiques et en particulier sa forte concentration dans les radeaux lipidiques et les cavéoles en font un élément important de l'activité membranaire, notamment la transduction du signal (Fielding 2004).

Un exemple de cette importance dans la transduction du signal est donné par le rôle du cholestérol dans la voie de signalisation Hedgehog (HH), qui intervient dans le développement, la croissance et la migration cellulaires. En effet, la molécule HH mature est liée de façon covalente au cholestérol et s'insère dans les radeaux lipidiques (Breitling 2007; Eaton 2008). Le cholestérol intervient de la même façon dans la maturation de la protéine Sonic hedgehog (Shh), qui joue un rôle important dans l'embryogénèse, notamment au niveau cérébral (Woollett 2008).

Toujours dans le cerveau, le cholestérol est un acteur primordial de la neurotransmission (et donc des activités motrice et cérébrale) de par son incorporation dans la gaine de myéline.

Par ailleurs, le cholestérol joue également un rôle biologique essentiel par les diverses molécules qui en dérivent. En effet, c'est le précurseur de différents composés biochimiques :

- ✓ les hormones stéroïdiennes
- ✓ la vitamine D
- ✓ les acides biliaires
- ✓ les oxystérols...

Le terme "stéroïdes" recouvre différentes catégories de molécules qui partagent une structure axée autour du noyau cyclopentanophénanthrène. Ce sont essentiellement des hormones ou des molécules-signal. On retrouve parmi les stéroïdes les hormones stéroïdiennes (oestrogènes, progestérone, testostérone...), les neurostéroïdes (dihydroépiandrosterone (DHEA), prégnénolone), ou encore la vitamine D₃.

Les acides biliaires sont les produits de la dégradation du cholestérol. Leur rôle principal est l'émulsion des graisses alimentaires et des vitamines liposolubles dans la lumière intestinale, ce qui a pour but de faciliter leur absorption. Plus récemment, une autre fonction des acides biliaires a été découverte : ils agissent en tant que ligands d'un récepteur nucléaire impliqué dans la régulation de leur propre synthèse ainsi que dans le métabolisme glucidique (*cf.* paragraphe sur les acides biliaires).

Les oxystérols sont les dérivés hydroxylés du cholestérol, ils possèdent donc une structure très proche de la sienne. Ce sont les intermédiaires de la synthèse des acides biliaires, mais certains d'entre eux ont également un rôle propre sur le métabolisme cellulaire. En effet, ce sont des ligands d'un récepteur nucléaire régulant les métabolismes lipidique et glucidique (*cf.* paragraphe sur LXR).

Ainsi, par ses différentes fonctions le cholestérol apparaît comme une molécule ayant une importance biologique primordiale. Le maintien de son homéostasie à l'échelle de l'organisme comme à l'échelle cellulaire est donc essentiel. Cette homéostasie est préservée par l'équilibre entre les différentes voies de son métabolisme.

II. Le métabolisme du cholestérol dans le foie

Le foie joue un rôle central dans l'homéostasie du cholestérol à l'échelle de l'organisme. Gros producteur de cholestérol, c'est aussi le seul organe capable d'éliminer le cholestérol en grande quantité en le transformant en acides biliaires. *Via* le métabolisme des lipoprotéines, il assure également la distribution du cholestérol aux autres organes ainsi que sa récupération en vue de son élimination.

A. Le foie

1. Rappels anatomiques

Le foie est l'une des glandes annexes de l'intestin. C'est un organe multilobé (5 lobes principaux chez le rat et la souris, 2 chez l'Homme), entouré d'une capsule conjonctive innervée par le système nerveux sensitif, ce qui le rend sensible à la douleur.

Le foie est un organe richement vascularisé. L'apport en sang oxygéné se fait par l'artère hépatique. D'autre part, le sang provenant de l'intestin (porteur des nutriments, des produits de dégradation de la rate, etc.) arrive au foie par la veine porte, tandis que le sang hépatique sort par la veine hépatique qui se jette dans la veine cave inférieure et rejoint le cœur. Un réseau dense de capillaires sinusoides permet le passage du sang à l'intérieur du foie et l'absorption des diverses molécules par les hépatocytes. Le foie est également traversé par des canalicules biliaires, qui se rejoignent et forment des canaux biliaires. Ceux-ci se jettent dans le canal cholédoque qui rejoint la lumière intestinale. Du fait de l'absence de vésicule biliaire chez le rat, la bile s'écoule en

continu sous forme native (Kararli 1995). Chez la souris et l'Homme, elle est stockée et concentrée dans la vésicule biliaire, qui est vidangée lors des repas.

Le foie a une structure glandulaire qui facilite la sécrétion de bile (cf. Figure 13). Les hépatocytes sont organisés en travées, elles-mêmes constituées en lobules (en forme de prismes polygonaux). Entre les travées se trouvent les capillaires sinusoides où se mélangent le sang artériel et le sang veineux. Ces capillaires sanguins se jettent dans la veine centrolobulaire, qui elle-même rejoint les veines sus-hépatiques, la veine hépatique puis la veine cave inférieure.

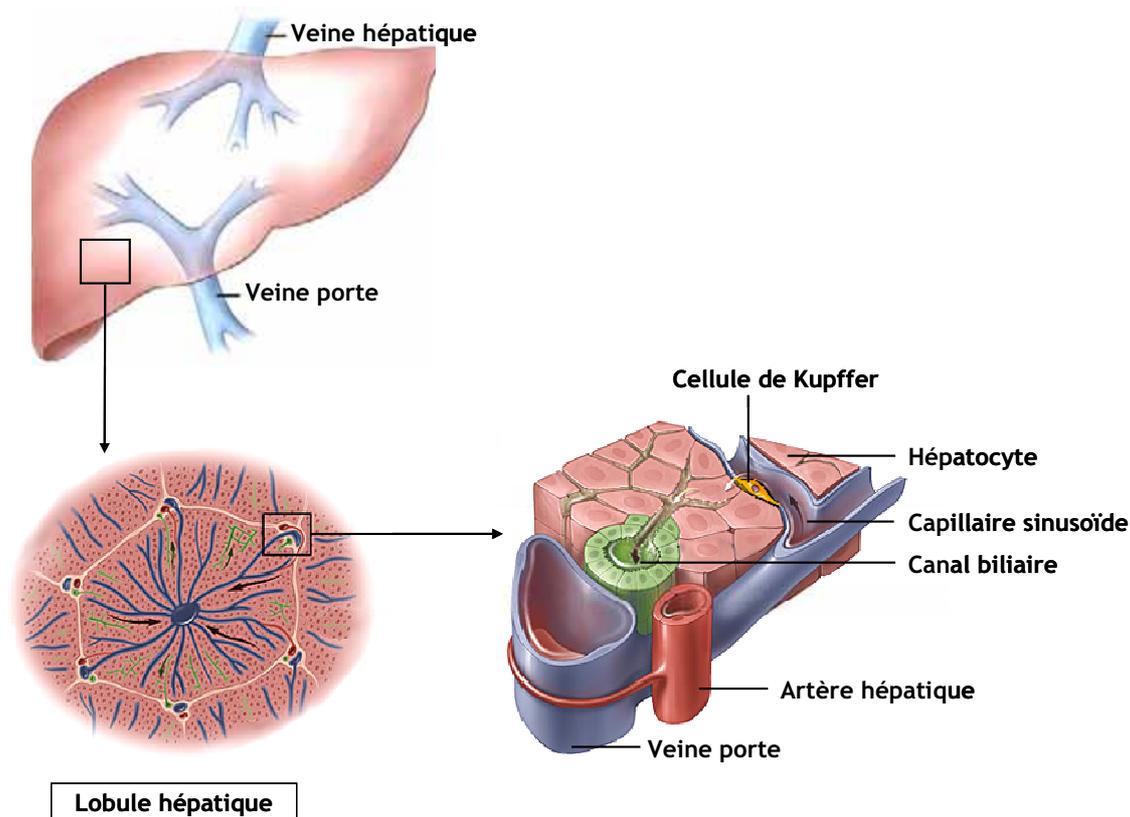


Figure 13 : Structure fine du foie et organisation d'un lobule hépatique

Un autre système de capillaires indépendants des capillaires sanguins existe dans le foie, il s'agit du réseau des voies biliaires. Les canalicules biliaires sont des canaux formés entre deux hépatocytes voisins. Ils n'ont pas de membrane propre et sont délimités par la région hépatobiliaire de la membrane plasmique des hépatocytes. Le flux biliaire est opposé au flux sanguin : il part du centre des lobules et rejoint de plus gros canaux collecteurs entre les lobules, et qui se rejoignent eux-mêmes pour former le canal hépatique puis le canal cholédoque.

Le foie contient trois types principaux de cellules : les hépatocytes, les cellules endothéliales des capillaires sinusoides et les cellules de Kupffer (macrophages hépatiques). Les hépatocytes représentent 60 % des cellules du foie. Ce sont des cellules polyédriques multifacettées, dans lesquelles on peut définir 3 zones : la surface basolatérale (longeant les capillaires sanguins et

les hépatocytes contigus) présentant de nombreuses microvillosités, le corps de l'hépatocyte (avec notamment des granules de glycogène dans le cytoplasme) et la membrane canaliculaire, qui forme la paroi du canalicule biliaire jouxtant l'hépatocyte.

2. Principales fonctions biologiques

Le foie exerce de nombreuses fonctions biologiques dont les principales sont décrites ci-dessous.

❖ Filtration et détoxification

Du fait de sa position entre l'intestin et le cœur, le foie joue un rôle de filtre sur le sang portal chargé des molécules absorbées au niveau intestinal. Une partie des molécules toxiques (alcool, médicaments...) est notamment piégée dans les hépatocytes avant d'être transformée et éliminée. C'est l'effet de premier passage hépatique.

Le foie transforme et élimine également les molécules à potentiel toxique rejetées dans le sang par les autres organes, que ce soit des xénobiotiques (provenant d'un apport extérieur) ou des endobiotiques (synthétisés par l'organisme). Par exemple, lors de la dégradation des érythrocytes, l'hème est transformé en bilirubine, qui est conjuguée dans le foie puis exportée dans la bile à qui elle donne sa couleur. Une concentration trop élevée de bilirubine dans le sang provoque un ictère (jaunisse). Les composés hydrophobes ou peu hydrosolubles sont déversés dans la bile (élimination par les selles), alors que les composés hydrosolubles sont éliminés par voie sanguine (puis urinaire).

❖ Régulation des réserves énergétiques

Le foie est le lieu de stockage des molécules utilisables pour la production énergétique. Ainsi, le stockage du glucose sous forme de glycogène est une fonction spécifiquement hépatique. Les acides gras, qui fournissent une grande quantité d'énergie lors de leur dégradation β -oxydation, sont stockés sous forme de triglycérides. En cas de pic de la consommation énergétique, le foie régénère glucose et acides gras pour répondre aux besoins. Si nécessaire, le foie peut également produire du glucose à partir d'acides aminés par la néoglucogénèse.

❖ Métabolisme protéique

Le foie tient une place centrale dans le métabolisme protéique. Ainsi, c'est le lieu de synthèse de nombreuses protéines impliquées notamment dans le transport sanguin de molécules (albumine, globulines) ou la coagulation (facteurs de coagulation). Par ailleurs, le catabolisme protéique est très élevé dans le foie, ce qui génère de l'ammoniaque. L'ammoniaque étant très toxique, il est immédiatement transformé en urée, qui est ensuite éliminée par le rein.

❖ Synthèse et distribution du cholestérol

Contrairement à la majorité des tissus, le foie synthétise le cholestérol en grande quantité. Par ailleurs, c'est également le centre névralgique du métabolisme des lipoprotéines qui transportent le cholestérol dans le sang (*cf.* partie sur le transport du cholestérol). La distribution

du cholestérol se fait selon deux directions : d'une part il existe un transport du foie vers les autres organes et d'autre part vers le foie. Le transport vers le foie a deux composantes : il y a tout d'abord un flux de cholestérol provenant de l'alimentation pour être redistribué par le foie aux autres tissus, mais il existe également un flux du cholestérol excédentaire des tissus extrahépatiques vers le foie pour y être catabolisé en acides biliaires.

❖ Synthèse des acides biliaires et sécrétion de la bile

Une des fonctions majeures du foie consiste à éliminer le cholestérol excédentaire de l'organisme. Ce catabolisme du cholestérol donne lieu à la synthèse des acides biliaires, les composants essentiels de la bile (cf. partie sur le catabolisme). La sécrétion de la bile par le foie justifie sa qualification de "glande annexe de l'intestin". En effet, après un éventuel stockage dans la vésicule biliaire (comme chez la souris ou l'Homme, mais pas chez le rat), la bile est déversée dans le duodénum (la partie initiale de l'intestin grêle) via le canal cholédoque. De par leur structure, les acides biliaires ont des propriétés détergentes. Ils permettent ainsi d'émulsionner les vitamines liposolubles et les lipides du bol alimentaire, ce qui facilite leur absorption intestinale. Les molécules toxiques contenues dans la bile sont quant à elles éliminées par voie fécale.

Ainsi, parmi toutes ces fonctions, il ressort que le foie joue un rôle central dans le métabolisme lipidique, et en particulier en ce qui concerne le cholestérol. En effet, il en est à la fois une source, un centre d'échange, un régulateur et son unique lieu de dégradation. Du fait de cette particularité, le foie contrôle non seulement l'homéostasie du cholestérol au niveau de l'organe, mais également au niveau de l'organisme entier. L'étude du métabolisme du cholestérol paraît donc particulièrement indiquée dans cet organe.

NB : Du fait de son importance dans le maintien de l'homéostasie générale du cholestérol, le foie est considéré dans la suite de ces travaux comme étant l'organe central. Le terme "organes périphériques" désignera donc les organes extrahépatiques.

B. Métabolisme hépatique du cholestérol chez le rat

Outre son utilisation par les cellules, le métabolisme du cholestérol comprend quatre voies principales :

- ✓ la synthèse
- ✓ le trafic, comprenant la captation du cholestérol par la cellule et son efflux
- ✓ le stockage
- ✓ la dégradation.

Ces quatre voies sont soumises à une régulation complexe visant à maintenir la concentration hépatique en cholestérol à un niveau physiologique.

NB : dans cette introduction nous nous efforcerons de donner une vision claire et concise des différentes voies métaboliques citées ci-dessus. En outre, une présentation un peu plus détaillée sera faite pour les différents acteurs étudiés dans la partie expérimentale de ce travail.

1. Sources

Comme l'intestin, le cerveau et les tissus stéroïdogènes, le foie synthétise le cholestérol *de novo* en quantité importante. Le pool de cholestérol hépatique provient donc de deux sources: la synthèse endogène et le cholestérol alimentaire qui transite par l'intestin et le sang.

a. Synthèse endogène

La synthèse *de novo* de cholestérol dans le foie est très élevée par rapport à la majorité des organes, cependant il existe de grandes variations inter-espèce. Ainsi, chez le rat, le taux de synthèse endogène du cholestérol est estimé à 118 mg/kg/j, alors que la valeur de 9 mg/kg/j est généralement rapportée chez l'Homme (Mathe 1984).

La synthèse du cholestérol est une voie métabolique grandement conservée parmi les différentes espèces, ce qui souligne son importance biologique. Elle se fait principalement dans le cytosol de l'hépatocyte, mais elle peut également avoir lieu dans les peroxysomes qui contiennent presque toute la machinerie enzymatique nécessaire (Krisans 1996). Parmi les enzymes impliquées dans cette voie de biosynthèse, certaines sont entièrement cytosoliques, tandis que d'autres sont des protéines membranaires du réticulum endoplasmique (RE) (Krisans 1996).

Le précurseur initial du cholestérol est l'acétyl Coenzyme A (acétyl CoA) produit en quantité par la β -oxydation des acides gras. Il est soumis à une cascade enzymatique qui peut se diviser schématiquement en cinq grandes étapes (cf. Figure 14) :

- la synthèse du 3-hydroxy-3-méthylglutaryl Coenzyme A (HMG-CoA) à partir de 3 molécules d'acétyl CoA
- la conversion de l'HMG-CoA en mévalonate
- la transformation du mévalonate en isopentényl pyrophosphate, un isoprène actif
- la condensation de 6 isoprènes actifs en squalène
- la cyclisation du squalène en lanostérol et sa transformation en cholestérol.

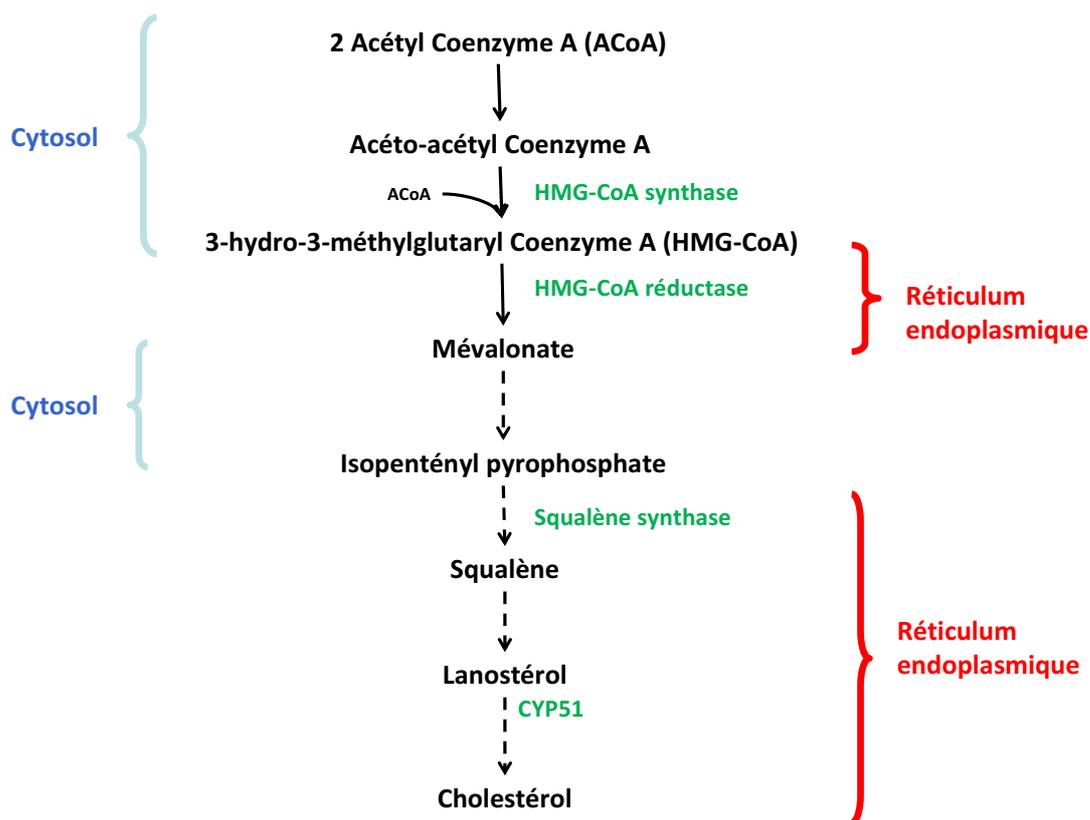


Figure 14 : Les principales étapes de la synthèse du cholestérol et leur localisation intracellulaire

Pour notre étude, nous avons choisi trois enzymes pour évaluer les effets d'une contamination interne chronique par les radionucléides sur la biosynthèse du cholestérol :

- ✓ **L'HMG-CoA synthase**, qui engage l'acétoacétyl coenzyme A vers la synthèse du cholestérol en le transformant en HMG-CoA
- ✓ **L'HMG-CoA réductase**, l'enzyme limitante de cette voie de biosynthèse, qui convertit l'HMG-CoA en mévalonate
- ✓ **la CYP51**, qui initie la dernière étape en déméthylant le lanostérol pour former le cholestérol. Cette enzyme de type cytochrome P450 est l'un des CYPs les mieux conservés dans l'évolution, ce qui souligne son importance.

❖ **L'HMG-CoA synthase**

L'HMG-CoA synthase (EC 2.3.3.10) fait partie de la phase initiale de la biosynthèse du cholestérol puisqu'elle catalyse la deuxième étape de la cascade enzymatique (cf. Figure 14). A ce titre, elle précède immédiatement l'étape limitante de cette voie métabolique. Il existe deux HMG-CoA synthases ; l'une est cytosolique et l'autre mitochondriale. Seule l'HMG-CoA synthase cytosolique intervient dans la synthèse du cholestérol, l'autre étant impliquée dans la cétogénèse. L'indépendance entre ces deux isoenzymes est révélée par leur répartition sur deux gènes différents et par la différence entre leurs régulations transcriptionnelles (Hegardt 1999).

Bien que peu d'études soient consacrées à la régulation de l'HMG-CoA synthase, certains éléments sont bien connus. Ainsi, l'activité de l'HMG-CoA synthase est soumise à un rétrocontrôle par le produit. En réalité, ce rétrocontrôle peut être exercé à la fois par son produit direct (l'HMG-CoA), mais également par son produit final (le cholestérol) et même par les acides biliaires hydrophobes provenant de la dégradation de celui-ci (Honda 1998).

A *contrario*, une déprivation en cholestérol par l'action de statines provoque une activation de la transcription de l'HMG-CoA synthase (Mascaro 2000). Cette activation de la transcription du gène de l'HMG-CoA synthase se fait par l'action de la *sterol regulatory element binding protein 2* (SREBP 2). En effet, le promoteur de ce gène contient la séquence *sterol regulatory element 1* (SRE 1) à laquelle peuvent se lier les trois isoformes de SREBPs, mais il a été démontré que SREBP 2 régulait préférentiellement la cholestérogénèse (Edwards 2000).

❖ L'HMG-CoA réductase

L'HMG-CoA réductase (EC 1.1.1.34) est l'enzyme-clé de la biosynthèse du cholestérol. En effet, elle catalyse la transformation de l'HMG-CoA en mévalonate, ce qui représente la première réaction irréversible de cette voie métabolique. L'HMG-CoA réductase est une enzyme transmembranaire du RE (mais elle existe également dans les peroxysomes) (Keller 1985). Son domaine catalytique est dans le cytosol (Liscum 1985). Sa régulation est particulièrement complexe et s'effectue à 4 niveaux différents :

* au niveau transcriptionnel : SREBP 2 active la transcription du gène de l'HMG-CoA réductase (Osborne 1988; Osborne 1985). Cette transcription est inhibée par le cholestérol et ses dérivés, les oxystérols (Saucier 1989) qui empêchent l'activation de SREBP 2 au niveau protéique (cf. paragraphe sur SREBP).

* au niveau traductionnel : la traduction de l'ARNm de l'HMG-CoA réductase est inhibée par le cholestérol alimentaire et par des dérivés du mévalonate, son produit direct (Nakanishi 1988; Panini 1989).

* au niveau de l'activité : l'HMG-CoA réductase est soumise à une régulation par la phosphorylation (Sato, 1993). Elle doit être phosphorylée pour être active.

* au niveau de sa dégradation : l'accumulation cellulaire d'oxystérols provoque leur liaison à l'*insulin-induced gene* (INSIG), une protéine membranaire du RE. Ceci entraîne un changement de conformation du domaine transmembranaire "*sterol-sensor*" de l'HMG-CoA réductase et induit la liaison de celle-ci à INSIG (Sever 2003b), ce qui permet l'ubiquitinylation et la dégradation de l'HMG-CoA réductase par le protéasome 26S (DeBose-Boyd 2008; Sever 2003a).

Enfin, la spécificité de l'HMG-CoA réductase réside dans son statut de cible thérapeutique. En effet, c'est à son niveau qu'agissent les traitements contre l'hypercholestérolémie. Ces traitements utilisent une classe de molécules appelées "statines" qui agissent en tant qu'inhibiteurs compétitifs de l'HMG-CoA (Istvan 2002). Elles permettent de bloquer la biosynthèse du cholestérol à une étape ne générant pas d'accumulation toxique de métabolites puisque l'HMG-CoA peut être engagé dans d'autres voies métaboliques (Russell 1992).

❖ La CYP51

La CYP51 (EC 1.14.13.70) est une enzyme de la famille des cytochromes P450. Elle possède donc un noyau hème et catalyse des réactions d'oxydations, en "binôme" avec la NADPH cytochrome réductase. C'est un des CYPs les mieux conservés à travers l'évolution (Debeljak 2003), ce qui tendrait à prouver son importance.

La CYP51, ou lanostérol-14 α -déméthylase, est une enzyme membranaire du RE dans la plupart des tissus, bien qu'on la retrouve également dans l'appareil de Golgi et l'acrosome des spermatozoïdes où elle est surexprimée (Seliskar 2007). Son substrat est le lanostérol, le dernier intermédiaire important de la synthèse du cholestérol, qui provient de la cyclisation du squalène. La CYP51 enlève un groupement méthyle du lanostérol par la succession de trois étapes d'oxydation (Figure 15). Par ailleurs, il semblerait qu'elle joue un rôle particulier dans les cellules germinales, où des produits intermédiaires qu'elle forme agissent comme des activateurs de méiose (Byskov 1995; Stromstedt 1998).

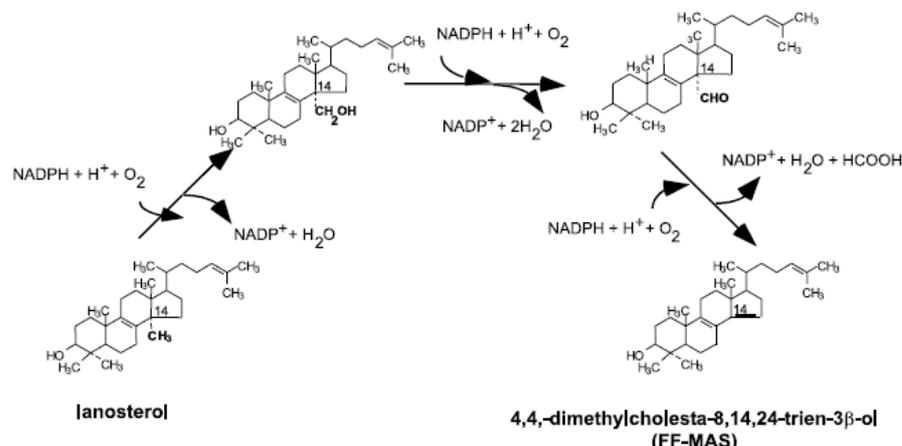


Figure 15 : Mécanisme de la déméthylation du lanostérol par la CYP51

La déméthylation du lanostérol par la CYP51 est une succession de trois étapes d'hydroxylation (source : Debeljak et al, 2003)

A l'heure actuelle, seuls deux mécanismes de régulation de la CYP51 sont décrits, tous les deux au niveau transcriptionnel. Le premier est l'activation de la transcription par SREBP 2 et le rétrocontrôle négatif du cholestérol, comme pour d'autres gènes de cette voie de biosynthèse (Ness 2001). Le second mécanisme met en jeu la voie de signalisation AMPc-dépendante (Debeljak 2003). En effet, le promoteur du gène de la CYP51 présente un domaine *cAMP responsive element* (CRE) permettant l'action de cette voie.

❖ Défaut de la synthèse du cholestérol : le syndrome de Smith-Lemli-Opitz

Parmi les pathologies liées à un défaut dans la synthèse du cholestérol (Hennekam 2005; Waterham 2006), la plus connue est le syndrome de Smith-Lemli-Opitz (SLOS). Cette affection autosomale récessive est due à une déficience de la β 3-hydroxystérol Δ^7 -réductase, ce qui conduit à une accumulation plasmatique et tissulaire de 7-déhydrocholestérol. Les enfants atteints du SLOS présentent un large spectre d'anomalies congénitales et de malformations (microencéphalie,

affection des membres, du squelette, des organes génitaux, des organes internes) ainsi qu'un retard de croissance et un retard mental (Porter 2008). Les signes cliniques s'atténuent suite à l'ajout de cholestérol dans l'alimentation des malades.

Ainsi, la biosynthèse du cholestérol est une voie métabolique de grande importance et conservée à travers les espèces. Elle est soumise à une régulation intervenant à différents niveaux de la cascade enzymatique. Cette régulation est basée sur la capacité de certaines molécules à réagir à la concentration de stérols dans la cellule : en cas de déplétion, la synthèse est activée au niveau transcriptionnel par SREBP 2, alors qu'en cas d'accumulation le cholestérol et ses dérivés exercent un rétrocontrôle négatif en inhibant l'action de SREBP 2. Du fait de son rôle-clé, l'HMG-CoA réductase est soumise non seulement à cette régulation transcriptionnelle, mais également à plusieurs mécanismes de régulation post-transcriptionnelle. Ceci permet d'équilibrer la concentration interne de cholestérol en adaptant la production endogène aux apports exogènes fournis par l'alimentation.

b. Apport alimentaire

L'alimentation est l'autre source de cholestérol pour l'organisme. L'apport de cholestérol exogène varie d'une espèce à l'autre. Ainsi, la souris absorbe 30 mg/kg/j de cholestérol *via* l'alimentation, alors que l'homme n'en absorbe que 5 mg/kg/j (Dietschy 2002). Selon les espèces, de 30 à 50 % du cholestérol présent dans la lumière intestinale est effectivement absorbé par les entérocytes (Dietschy 2002; Field 1990; Lammert 2005; Wang 2001).

L'absorption intestinale du cholestérol (*cf.* Figure 16) a lieu majoritairement au niveau du jéjunum, le segment intermédiaire de l'intestin grêle (Field 1990; Lammert 2005). A ce stade, les lipides ingérés ont été préalablement émulsifiés dans l'estomac et le duodénum, les triglycérides et le cholestérol estérifié ont été hydrolysés et intégrés dans des micelles mixtes formés de lipides, de vitamines liposolubles, et d'acides biliaires. Le rôle des acides biliaires (issus de la dégradation hépatique du cholestérol) est déterminant car une diminution de la quantité d'acides biliaires entraîne une réduction de l'absorption intestinale du cholestérol (Altmann 2004). Le ratio entre acides biliaires hydrophobes et hydrophiles semble particulièrement important (Wang 1999; Wang 2003). L'incorporation du cholestérol peu soluble dans les micelles lui permet d'atteindre les entérocytes. Le pH acide (environ 4) de la couche d'eau non-agitée qui tapisse la face luminale de la bordure en brosse des cellules induit la désagrégation des micelles et la libération de leurs différents constituants. Le cholestérol est ensuite pris en charge par le transporteur Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) situé sur la bordure en brosse des entérocytes (Altmann 2004; Iyer 2005) et pourvu comme l'HMG-CoA réductase d'un domaine "*sterol-sensor*" (Iqbal 2009). Le rôle éventuel dans la captation du cholestérol alimentaire de deux autres transporteurs membranaires situés sur la bordure en brosse est actuellement débattu : il s'agit du *scavenger receptor class B type 1* (SR-BI) et de la translocase d'acides gras CD 36 (Iqbal 2009). En cas d'absorption excessive, le cholestérol excédentaire peut être éliminé de deux façons : il peut être expulsé dans la lumière intestinale par

les transporteurs *ATP-binding cassette* (ABC) G5 et G8, ou bien transféré à des lipoprotéines de haute densité (HDL) naissantes par ABC A1 pour être éliminé dans le foie (Hui 2005).

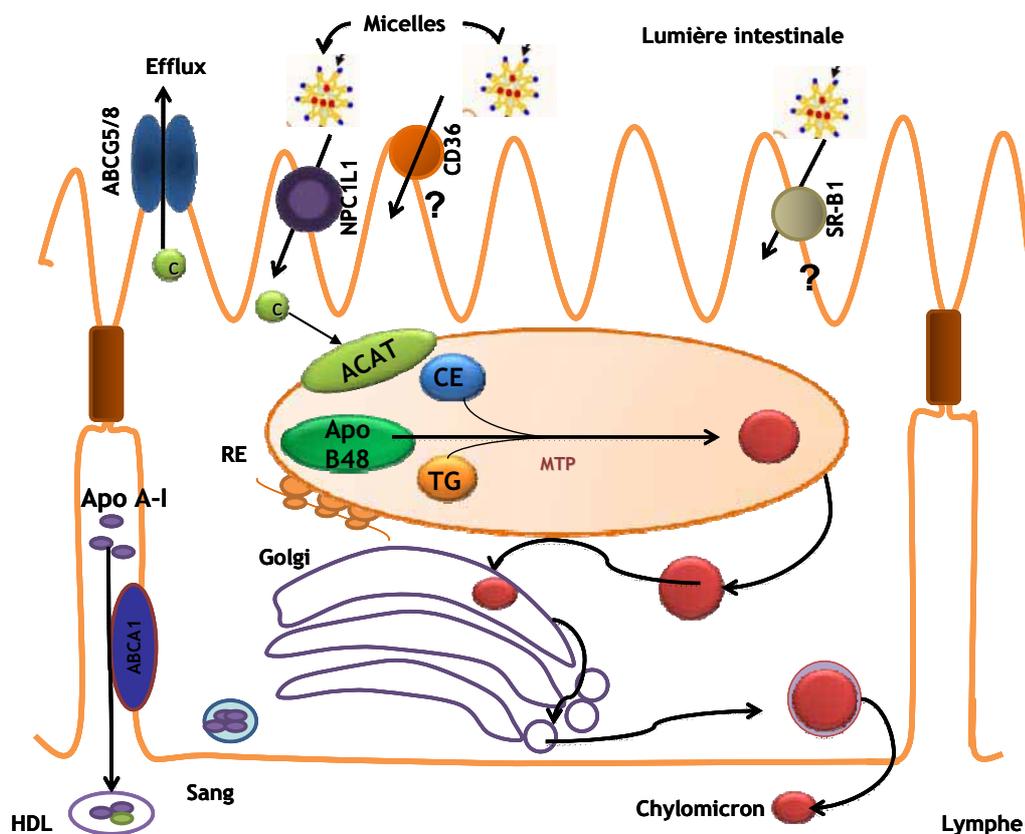


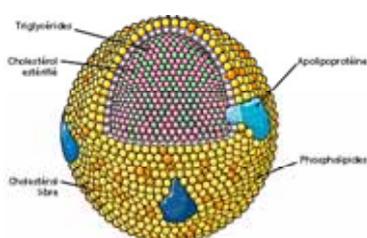
Figure 16 : Schéma de l'absorption intestinale du cholestérol

Le cholestérol alimentaire est solubilisé dans la lumière intestinale sous forme de micelles qui se présentent devant la membrane apicale de l'entérocyte. Le cholestérol est capté par des transporteurs membranaires comme NPC1L1. Le rôle de CD-36 et SR-B1 dans ce type de transport est à l'étude. Le cholestérol est ensuite estérifié par l'ACAT dans le RE où il forme une lipoprotéine naissante avec l'apo B-48 et des triglycérides. Après maturation, celle-ci est excrétée sous forme de chylomicron. Le cholestérol excédentaire peut être évacué dans la lumière intestinale via ABC G5/ABC G8 ou former des HDL naissantes avec l'apo A-I grâce à ABC A1. C : cholestérol libre, CR : cholestéryl esters, TG : triglycérides, MTP : microsomal triglycerides transporter protein. (d'après Iqbal 2009)

Dans l'entérocyte, le cholestérol est estérifié par l'acylCoenzymeA:cholestérol acyltransférase 2 (ACAT 2) dans le RE (Repa 2004). Cette étape est nécessaire pour l'inclure dans les lipoprotéines naissantes qui se forment dans le RE. Celles-ci contiennent également l'apolipoprotéine B-48, des triglycérides, ainsi que la *microsomal triglycerides transporter protein* (MTP) (Field 2007; Hussain 2005). Cette MTP conduit la lipoprotéine naissante du RE vers le Golgi, où se fait sa maturation, puis sa sécrétion dans une vésicule de la membrane golgienne qui fusionne avec la membrane basolatérale de l'entérocyte. Le cholestérol quitte donc l'entérocyte dans cette lipoprotéine qui devient un chylomicron, passe dans la lymphe puis dans la circulation sanguine.

Les chylomicrons sont des lipoprotéines de grande taille et de faible densité (cf. Figure 17). Dans les vaisseaux sanguins, la lipoprotéine lipase hydrolyse les triglycérides qui sont alors distribués dans les tissus périphériques (Kotlar 1979). Cette opération diminue leur taille et les rend instables, ce qui provoque des échanges de leurs lipides de surface (cholestérol libre, phospholipides) avec les HDL circulantes (Redgrave 1979). Les particules résiduelles, constituée en grande partie de cholestéryl esters d'origine alimentaire, sont appelées "remnants". Ceux-ci sont transportés jusqu'au foie où ils sont catabolisés, constituant ainsi la dernière étape de l'apport du cholestérol exogène au foie.

A. Structure d'une lipoprotéine



B. Les différentes classes de lipoprotéines

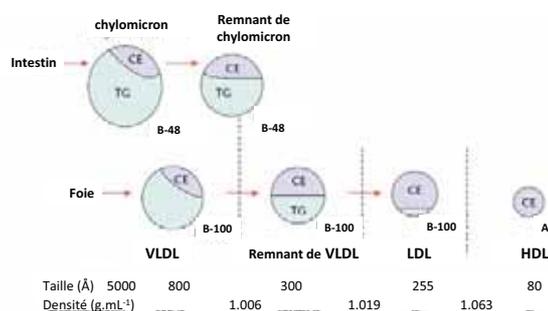


Figure 17 : Structure, classes et propriétés physiques des lipoprotéines

B. d'après Brunzell 2002. CE : cholestérol esterifié, HDL : lipoprotéine de haute densité LDL : lipoprotéine de faible densité, TG : triglycéride, VLDL : lipoprotéine de faible densité

2. Trafic du cholestérol hépatique

Avant de rentrer dans le détail des flux de cholestérol au niveau de l'hépatocyte, un bref rappel sur le métabolisme des lipoprotéines à l'échelle de l'organisme est nécessaire (cf. Figure 18). Il est à noter que le cerveau est à l'exclusion de tout ce qui suit car il ne participe pas aux échanges systémiques de cholestérol (cf. partie sur le métabolisme cérébral du cholestérol).

Il y a schématiquement trois grands flux de lipoprotéines dans l'organisme :

✓ **de l'intestin vers le foie**, effectué par les chylomicrons puis les remnants qui en dérivent. Ils transportent essentiellement le cholestérol et les triglycérides d'origine alimentaire.

✓ **du foie vers les organes**, effectué par les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) sécrétées par le foie. Celles-ci se transforment en lipoprotéines de faible densité (LDL) pendant leur transport plasmatique en échangeant des lipides avec d'autres lipoprotéines.

✓ **des organes vers le foie**, effectué par les HDL qui ramènent le cholestérol excédentaire au foie pour l'éliminer sous forme d'acides biliaires. Les HDL naissantes sont synthétisées par l'intestin et le foie, et se chargent ensuite des cholestéryl esters des tissus périphériques pour les ramener vers le foie. C'est le "transport reverse".

En réalité, ces trois flux sont interconnectés et les échanges de lipides et d'apolipoprotéines sont indispensables à la maturation de chaque classe de lipoprotéines. Si celles-ci sont les vecteurs de l'homéostasie du cholestérol dans l'organisme, le foie en est la plaque tournante. Le trafic intracellulaire (c'est-à-dire l'ensemble des voies d'entrée et de sortie) du cholestérol traduit ce rôle central à l'échelle de l'hépatocyte.

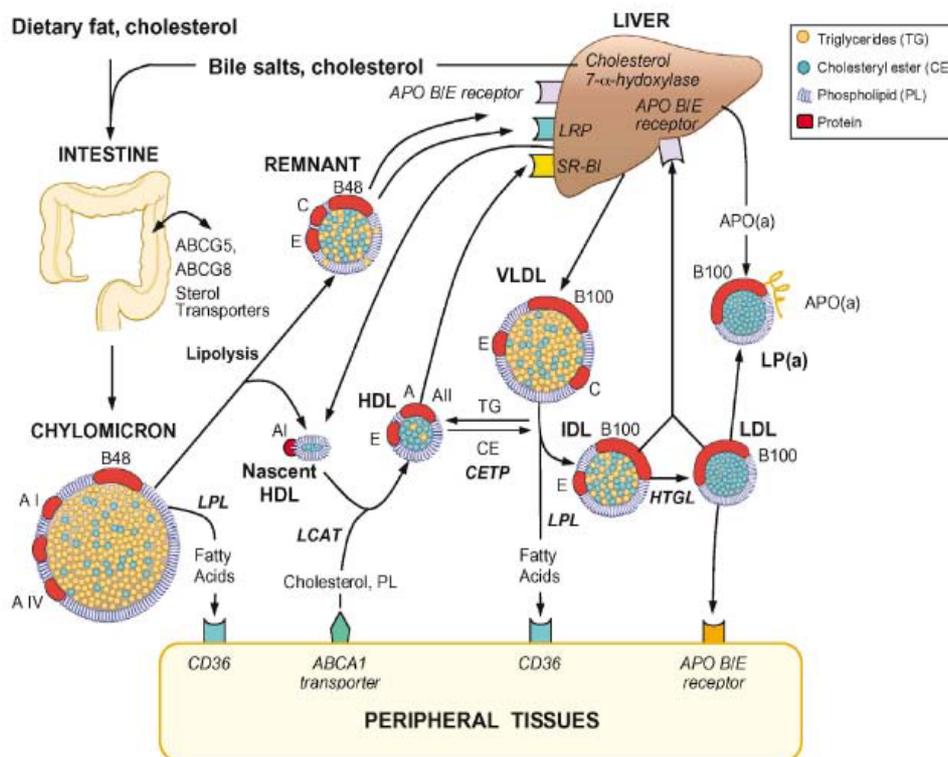


Figure 18 : Métabolisme des lipoprotéines à l'échelle de l'organisme

Pour les détails voir le texte

(source : A J Lusis Annu Rev Genom Human genet 2004 5:189-218)

a. Captation hépatique du cholestérol

(1) Cholestérol exogène

Le cholestérol exogène arrive au foie dans les remnants des chylomicrons. Au cours de leur transport plasmatique, ceux-ci se sont enrichis d'une apo E provenant d'une HDL. C'est la reconnaissance de cette apo E par un récepteur spécifique sur la membrane hépatocytaire, le récepteur aux LDL (LDL-r, voir paragraphe suivant), qui va permettre l'entrée du cholestérol dans la cellule (Brown 1986). D'autres récepteurs de la même famille peuvent également prendre en charge les remnants, comme la *LDL-r related protein* (LRP), s'ils présentent plusieurs molécules d'apo E (Cooper 1997).

❖ Apo E

L'apo E est un élément des chylomicrons, des VLDL et de certaines classes d'HDL (Zannis 1982). Elle fait d'ailleurs l'objet d'un échange entre les HDL d'un côté et les VLDL et les chylomicrons de l'autre, ce qui constitue une étape de la maturation de ces deux classes de lipoprotéines.

L'apo E est synthétisée en majorité dans le foie, mais également dans de nombreux autres tissus comme le cerveau (où elle a une importance particulière, cf. III), les macrophages ou les tissus stéroïdogènes (Leininger-Muller 1996). Elle possède des sites de liaison au LDL-r et à la LRP (Weisgraber 1994) ainsi qu'au SR-BI (Li 2002). Une fois internalisée dans les cellules, l'apo E peut être recyclée (Fazio 1999), dégradée par le protéasome (Wenner 2001) ou dans les lysosomes des macrophages (Deng 1995).

Dans les lipoprotéines, l'apo E joue à la fois un rôle structural et un rôle d'activateur des enzymes de transfert de lipides comme la *lecithin:cholesterol acyltransferase* (LCAT) (Zhao 2005). Au niveau de l'organisme, l'apo E a une action anti-athérogène (Greenow 2005) qui se traduit entre autres par une promotion du transport reverse et de la redistribution intercellulaire du cholestérol, une action éventuelle sur la régulation du trafic et de l'utilisation intracellulaires du cholestérol (Hamilton 1990), ainsi qu'une action anti-inflammatoire et anti-mitotique. Enfin, il semblerait que l'apo E, comme les apo B et A-I, ait une action sur l'activité transcriptionnelle au niveau de la chromatine (Panin 2000).

Les mécanismes de régulation de l'apo E sont relativement peu décrits. Cette régulation peut être transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle, et elle est dépendante de l'espèce et du tissu. Ainsi, l'apo E est régulée positivement par le liver-X-receptor α (LXR α) dans les macrophages de souris, mais pas dans les hépatocytes (Laffitte 2001b; Tontonoz 2003). De nombreux paramètres alimentaires influent sur le taux plasmatique et la synthèse de l'apo E, comme le glucose (Staels 1989) et le cholestérol (Serougne 1984) qui l'augmentent, ou les acides gras oméga-3 (Ribeiro 1991) qui l'inhibent. Par ailleurs, le glucagon a un rôle activateur (Mangeny 1989) et les fibrates agissent sur l'apo E hépatique de manière différente selon leur classe (Staels 1992).

(2) Cholestérol des VLDL et LDL

Les LDL sont issues de la maturation plasmatique des VLDL et distribuent le cholestérol aux différents organes, y compris au foie lui-même. Contrairement aux VLDL, la seule apolipoprotéine des LDL est l'apo B. C'est sa liaison au LDL-r qui déclenche la captation de la LDL par l'hépatocyte (cf. Figure 19).

A l'état basal, le LDL-r est situé sur une zone membranaire tapissée de clathrine du côté intracellulaire. Une fois que la LDL est liée par l'apo B au LDL-r, la membrane plasmique s'invagine et forme une vésicule autour de la LDL. Cette vésicule perd sa clathrine extérieure et se transforme en endosome, puis fusionne avec un lysosome. Durant cette phase, le pH diminue, ce qui provoque l'hydrolyse de la LDL. Le cholestérol est alors libéré dans le cytoplasme et le LDL-r recyclé vers la membrane plasmique pour un nouveau cycle (Jeon 2005).

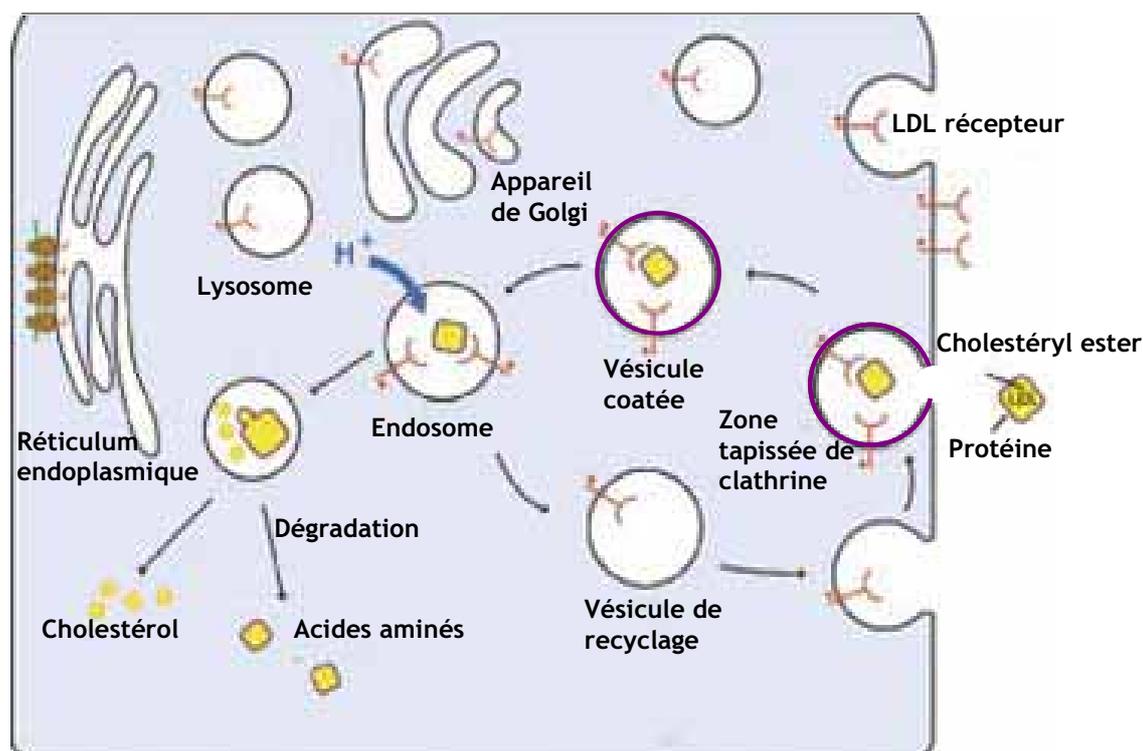


Figure 19 : Captation du cholestérol d'une LDL par le LDL-r et recyclage du LDL-r

L'endocytose du complexe LDL-LDL récepteur se produit dans des zones tapissées de clathrine (coated pits). La vésicule d'endocytose couverte de clathrine (vésicule coatée) fusionne avec un endosome dont le pH acide dissocie le complexe. Le récepteur est ensuite recyclé à la surface cellulaire et la LDL dégradée, libérant ainsi son cholestérol dans la cellule. (d'après Jeon 2005)

Dans ce cycle, deux éléments jouent un rôle fondamental : l'apo B et le LDL-r.

❖ Apo B

L'apo B est l'apolipoprotéine majeure des VLDL et des LDL. A ce titre, c'est une molécule considérée comme pro-athérogène. On la trouve également en moindre proportion dans les chylomicrons. A partir de l'ARNm de l'apo B, deux isoformes peuvent être synthétisés : l'apo B-48 et l'apo B-100 (Chen 1987). Chez l'Homme, l'apo B-48 est distribuée dans les chylomicrons et l'apo B-100 dans les VLDL et LDL, tandis que chez le rat les deux isoformes sont distribués dans les différentes classes de lipoprotéines, avec une majorité d'apo B-100 dans les VLDL et une majorité d'apo B-48 dans les LDL (Brodsky 2008).

L'apo B est synthétisée par une enzyme membranaire du RE du côté cytosolique, et elle est transloquée dans la lumière du RE pour être lipidée par la MTP et constituer le coeur de la VLDL (Hussain 2005). Celle-ci est ensuite transportée dans le Golgi puis vers la membrane plasmique pour être sécrétée (Brodsky 2008). Dans les LDL, l'apo B est impliquée dans la captation cellulaire de la lipoprotéine en se liant au LDL-r.

La régulation de l'apo B ne se fait pas au niveau transcriptionnel mais par sa dégradation au niveau traductionnel ou post-traductionnel (Avramoglu 2004; Brodsky 2008; Ginsberg 2009). En cas de mauvaise conformation, l'apo B thine (peut se voir adjoindre un signal de dégradation dans la

lumière du RE, ce qui entraîne sa digestion par le protéasome. Elle est également dégradée s'il n'y a pas assez de lipides pour initier la lipoprotéine naissante. Enfin, un apport alimentaire en acides gras oméga-3 induit la dégradation de l'apo B dans le cytoplasme par un autophagosome (Pan 2004), tandis que l'insuline active une autre voie de dégradation faisant intervenir la voie des *mitogen activated protein kinases* (MAPK) (Phung 1997; Sparks 1990).

❖ LDL-r

Le LDL-r est une protéine synthétisée sous forme d'un précurseur de 120 kDa qui est ensuite glycosylé. Il est transporté dans des vésicules golgiennes jusqu'à la membrane plasmique où il se concentre dans les *coated pits*, ces zones tapissées de clathrine (cf. Figure 19). Le LDL-r possède un seul domaine transmembranaire. Sa terminaison extracellulaire reconnaît aussi bien l'apo B que l'apo E, ce qui lui permet de se lier aux LDL (avec la plus grande affinité), mais aussi aux VLDL et à certaines HDL. Sa partie cytosolique contient un motif NPxY (avec X représentant n'importe quel acide aminé) qui sert de signal d'endocytose clathrine-dépendante (Chen 1990; Jeon 2005).

Outre la synthèse endogène, la captation de lipoprotéines par le LDL-r représente la deuxième voie d'apport de cholestérol à l'hépatocyte. Le LDL-r est donc soumis à une régulation coordonnée à la voie de biosynthèse. Ainsi, il est régulé positivement par **SREBP 2** et sa transcription est inhibée par une concentration élevée en cholestérol (Horton 2002). En revanche, alors que les statines ont un effet inhibiteur sur la biosynthèse du cholestérol, elles activent la transcription du LDL-r (Mascaro 2000) par la diminution de la concentration de cholestérol cellulaire qu'elles entraînent. Au niveau post-traductionnel, le LDL-r est inhibé par la *proprotein convertase subtilisin kexin type 9* (PCSK9). Celle-ci se lie au LDL-r sur la membrane plasmique et induit sa dégradation dans les lysosomes, réduisant ainsi sa concentration membranaire (Costet 2008).

Ces voies d'entrée du cholestérol dans l'hépatocyte sont primordiales car elles permettent d'éviter l'augmentation de la cholestérolémie. Ainsi, l'oxydation des LDL lors de l'athérosclérose empêche leur liaison au LDL-r qui ne les reconnaît plus, ce qui entraîne leur accumulation à long terme dans les vaisseaux sanguins. De même, une mutation du LDL-r, de l'apo B ou de PCSK9 entraîne une hypercholestérolémie familiale de type autosomal dominant (Soutar 2007), qui est un facteur de risque pour l'athérosclérose et les maladies cardiovasculaires. Cependant, la captation des LDL n'est qu'un des mécanismes indispensables au maintien de la cholestérolémie. Le transport reverse du cholestérol est l'autre pilier de cette homéostasie et il constitue la troisième et dernière source de cholestérol exogène pour l'hépatocyte.

(3) Cholestérol provenant du transport reverse

Le transport reverse est la voie qui permet d'éliminer le cholestérol excédentaire des tissus périphériques en le ramenant au foie, où il sera essentiellement catabolisé en acides biliaires. Ce transport s'effectue par le biais des HDL. Celles-ci sont synthétisées en grande majorité dans le foie, ainsi que dans l'intestin en proportion plus faible. Cette synthèse donne lieu à des HDL dites "naissantes" (cf. paragraphe sur la synthèse des HDL naissantes). Elles se transforment en

différentes classes de HDL matures en se chargeant en cholestéryl esters dans le plasma et au contact des tissus périphériques. Elles sont alors redirigées vers le foie où elles se délestent de leur cholestéryl esters. Contrairement aux LDL, les HDL ne sont pas endocytées ; elles déchargent leur cholestérol dans l'hépatocyte selon un mécanisme de "captation sélective" grâce à leur récepteur SR-BI.

❖ SR-BI

Le SR-BI appartient à la famille des récepteurs "éboueurs" (*scavenger receptors*) qui compte entre autres la translocase d'acides gras CD36 et le *scavenger receptor type A* (SR-A). C'est une protéine glycosylée de 82 kDa qui possède deux domaines transmembranaires et un large domaine extracellulaire (Krieger 1999). Il est exprimé dans tout l'organisme, avec une concentration importante dans le foie et les tissus stéroïdogènes. Dans le foie, il est plus exprimé dans les cellules endothéliales que dans les hépatocytes, et beaucoup plus faiblement encore dans les cellules de Kupffer (Rhains 2004).

Du fait de sa nature de récepteur "éboueur", SR-BI a beaucoup de ligands potentiels. Son rôle le plus étudié est celui de récepteur aux HDL, *via* une interaction avec l'apo A-I. Cependant, il peut également servir de récepteur aux lipoprotéines contenant l'apo B (Brodeur 2005; Rhains 2004), quoiqu'avec moins d'affinité et sur des sites différents (Gu 2000). Ainsi, contrairement à SR-A et CD 36, SR-BI a un rôle anti-athérogène de par sa capacité à lier les LDL oxydées.

SR-BI effectue deux types de transfert de lipides avec les HDL. D'une part, la captation sélective de cholestéryl esters et de phospholipides qui a lieu principalement dans le foie (Krieger 2001), et d'autre part un transfert bidirectionnel de cholestérol libre dans les tissus périphériques (Yancey 2000; Zannis 2006). La captation sélective a pour but de décharger les HDL totalement lipidées pour éliminer le cholestérol provenant des tissus périphériques ; c'est l'aboutissement du transport reverse. Le transfert bidirectionnel est un des mécanismes de transfert du cholestérol périphérique vers une HDL en cours de maturation.

Quel que soit le type d'échange considéré, il se fait sans consommation d'énergie. En revanche, plusieurs théories sont actuellement émises sur la nécessité d'une liaison directe entre SR-BI et l'apo A-I. D'un côté, Zannis et Krieger sont en faveur de la thèse d'une liaison directe, arguant de la précision d'alignement nécessaire entre la lipoprotéine et le récepteur pour la captation sélective (Zannis 2006). D'autre part, Llera-Moya *et al* soutiennent l'hypothèse selon laquelle le transfert de lipides se ferait par diffusion passive suivant un gradient de concentration entre la membrane plasmique et la lipoprotéine. Le rôle de SR-BI dans ce cas de figure serait de modifier la composition lipidique de la membrane plasmique autour de son point d'insertion pour créer le gradient en question (de la Llera-Moya 1999). Enfin, Rhains *et al* n'excluent aucune des deux possibilités et penchent pour une répartition spécifique de ces mécanismes en fonction du type de transfert : il y aurait ainsi une liaison directe pour la captation sélective, et une diffusion passive pour le transfert bidirectionnel (Rhains 2004). Des données expérimentales supplémentaires sont nécessaires pour déterminer la réalité biologique de ces mécanismes. Indépendamment de la liaison éventuelle entre SR-BI et apo A-I, plusieurs études *in vitro* ont

montré que la captation sélective mettait en jeu un phénomène de rétroendocytose (DeLamatre 1990; Pagler 2006; Rhainds 2004) : la HDL subit une endocytose, puis la captation sélective a lieu. Contrairement à l'endocytose classique, la vésicule ne fusionne pas avec un lysosome mais est ensuite directement recyclée vers la membrane plasmique, avec l'apo A-I et le SR-BI intacts.

La régulation de SR-BI diffère totalement d'une espèce à l'autre, comme l'exposent Rhainds *et al* (Rhainds 2004). Ainsi, chez l'Homme, la transcription de SR-BI est régulée positivement par LXR α et le *liver receptor homolog 1* (LRH-1) (Malerod 2002; Schoonjans 2002), tandis que chez le rat elle est activée par SREBP 1a (Lopez 1999). Au niveau post-transcriptionnel, une action inhibitrice du *peroxisome proliferator-activated receptor α* (PPAR α) est rapportée, tandis qu'un apport en acides gras polyinsaturés (ligands de PPAR γ) augmenterait l'expression de SR-BI (Spady 1999). Les oestrogènes et le cholestérol alimentaire ont également un rôle inhibiteur sur l'expression protéique de SR-BI (Fluiter 1998). Enfin, la vitamine E exerce une régulation négative sur SR-BI, probablement *via* son inhibition de la protéine kinase C (PKC) qui serait impliquée dans l'activation par phosphorylation de SR-BI (Witt 2000).

Ainsi, le cholestérol est apporté à l'hépatocyte *via* les lipoprotéines par de multiples voies : très schématiquement, les remnants des chylomicrons apportent le cholestérol alimentaire, les LDL distribuent le cholestérol aux tissus (y compris le foie), et les HDL ramènent au foie le cholestérol issu du transport reverse. Pour autant, le foie n'est pas uniquement receveur dans ce trafic, puisqu'il est à l'origine des VLDL, qui initient la redistribution aux tissus avant de devenir des LDL, et des HDL qui effectuent donc un parcours cyclique, partant du foie pour y revenir une fois chargées en cholestérol périphérique. La sécrétion de lipoprotéines est l'une des deux voies hépatiques d'efflux du cholestérol sous forme native, la deuxième étant un processus d'élimination directe dans la bile.

b. Efflux de l'hépatocyte

(1) Sécrétion de lipoprotéines

❖ Synthèse de VLDL

Le foie sécrète les VLDL à partir des constituants lipidiques communs à toutes les lipoprotéines (phospholipides, cholestérol libre et estérifié, triglycérides) et de l'apo B-100. Celle-ci est synthétisée dans le RE puis est transférée dans le Golgi où le cœur lipidique lui est adjoint. Les VLDL dites "naissantes" sont alors transportées jusqu'à la membrane plasmique où elles sont sécrétées. A leur sortie de l'hépatocyte, elles sont riches en triglycérides et contiennent relativement peu de cholestéryl esters. Suite à l'acquisition d'une apo E et d'une apo C-II provenant d'une HDL, les triglycérides de la VLDL sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase plasmatique. Ceci conduit à la formation de remnants de VLDL qui sont ensuite métabolisés en LDL, plus riches en cholestérol et absorbés par les différents tissus.

❖ Synthèse de HDL naissantes

Les HDL naissantes sont synthétisées par le foie et l'intestin. Des phospholipides et du cholestérol libre sont transférés par le transporteur membranaire ABC A1 à l'apo A-I (Zannis 2006). Les HDL naissantes ainsi formées ont la forme de particules discoïdes et sont riches en phospholipides, avec quelques molécules de cholestérol libre mais sans cœur de cholestéryl esters. Le cholestérol libre des tissus est transféré aux HDL naissantes par ABC G1 et/ou SR-BI et il est ensuite estérifié dans la circulation sanguine par la LCAT.

Les HDL sont au cœur d'interactions avec les autres types de lipoprotéines : d'un côté les chylomicrons et les remnants de VLDL leur transfèrent des apolipoprotéines et des lipides de surface (phospholipides, cholestérol libre), et de l'autre côté les HDL fournissent des apolipoprotéines et du cholestéryl ester aux VLDL et aux LDL via la *cholesteryl ester transfer protein* (CETP). Suite à ces échanges, les HDL sont finalement captées par SR-BI au niveau du foie pour libérer leur charge de cholestérol dans les hépatocytes. L'étape cruciale de la synthèse des HDL naissantes met en jeu l'apo A-I et ABC A1.

❖ Apo A-I

L'apo A-I est synthétisée en majorité dans le foie et l'intestin. C'est le principal constituant protéique des HDL. Elle joue 3 rôles majeurs dans leur métabolisme. Tout d'abord, elle sert d'ossature lors de la synthèse des HDL naissantes et de structure aux HDL matures. Ensuite, une fois la HDL libérée dans le sang, l'apo A-I active la LCAT plasmatique qui va estérifier le cholestérol libre de la HDL naissante qui se densifie. Enfin, l'apo A-I sert de lien avec le SR-B1 lors du transfert des cholestéryl esters périphériques à la HDL et lors de la captation sélective dans le foie. Dans les tissus périphériques, et en particulier les macrophages, les HDL se lient également par l'intermédiaire de l'apo A-I au transporteur ABC G1 qui leur transfère le cholestérol excédentaire (Wang 2004).

La transcription de l'apo A-I est inhibée par les fibrates chez le rat, probablement par action du récepteur nucléaire **Rev-erb α** , tandis que chez l'Homme les mêmes fibrates activent la transcription de l'apo A-I via **PPAR α** (Vu-Dac 1998). Par ailleurs, chez le rat, l'insuline et le glucose activent la transcription de l'apo A-I (Murao 1998).

❖ ABC A1

ABC A1 est un membre de la famille des transporteurs ABC, qui ont pour fonction de transférer des molécules à travers la membrane plasmique grâce à l'énergie fournie par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP (Baldan 2009). ABC A1 est un transporteur dit "complet", c'est-à-dire qu'il fonctionne en monomère. Il est constitué d'un ensemble de 6 domaines transmembranaires et d'un motif "signature" des ABCs, le tout répété deux fois (Baldan 2009). ABC A1 est exprimé dans tout l'organisme. Dans le foie, il est localisé sur la membrane basolatérale (Neufeld 2002) et dans des vésicules intracellulaires, où il faciliterait le transport de lipides et de l'apo A-I à la membrane (Schmitz 2005).

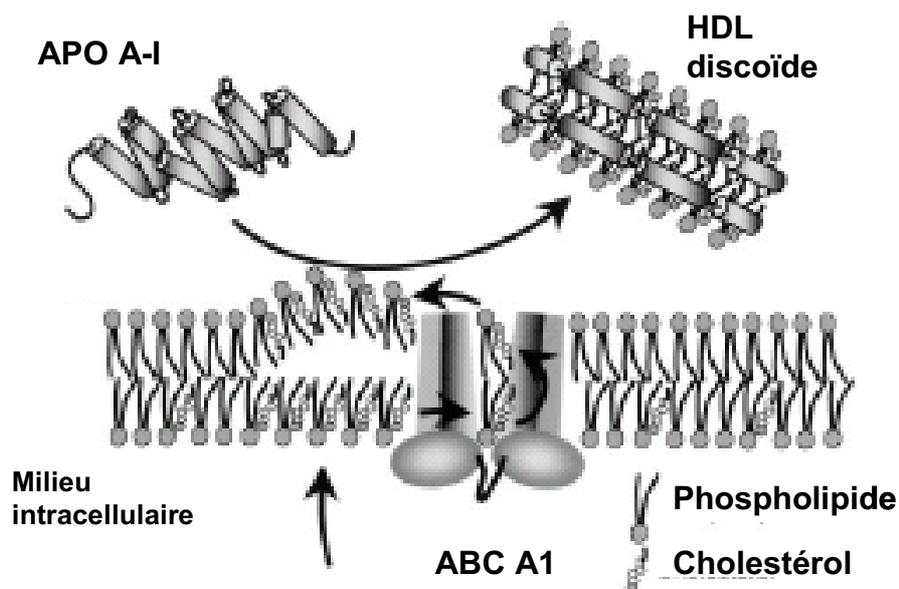


Figure 20 : Mécanisme de synthèse d'une HDL discoïde (naissante)

Le cholestérol excédentaire est transloqué du feuillet interne au feuillet externe de la membrane par ABC A1. Puis il lipide l'apo A-I en diffusant suivant un gradient de concentration. L'apo A-I passe alors d'une structure « désorganisée » à une structure discoïdale, ce qui donne la HDL naissante. (d'après Oram 2003)

Le rôle principal d'ABC A1 est la synthèse des HDL naissantes dans le foie et l'intestin. A ce titre, il se lie à l'apo A-I et lui transfère des phospholipides et du cholestérol libre. ABC A1 transloque les lipides du feuillet interne au feuillet externe de la membrane plasmique par un mécanisme de flippase. Les lipides ainsi transloqués passent ensuite sur l'apo A-I pour former une HDL naissante discoïde (cf Figure 20) (Oram 2003). Ainsi, dans l'hépatocyte, la synthèse des HDL naissantes (pauvres en cholestérol) constitue néanmoins une voie d'efflux du cholestérol. Il est à noter qu'ABC A1 peut transférer du cholestérol à la fois sur une apo A-I délipidée pour créer une nouvelle HDL, mais également sur des HDL peu lipidées, toujours par interaction avec l'apo A-I (Wang 2000).

Chez le rat, la régulation transcriptionnelle d'ABC A1 dans l'hépatocyte est contrôlée majoritairement par SREBP 2, et dans une moindre mesure par LXR α (Tamehiro 2007). Tous les deux activent la transcription d'ABC A1. Dans la même étude, les auteurs décrivent une diminution de l'expression hépatique d'ABC A1 après un apport en stérols, et une absence d'effet global des statines. En dehors de l'hépatocyte, la régulation transcriptionnelle d'ABC A1 peut se faire par le seul LXR α (ou LXR β). Ce mécanisme est en particulier largement décrit dans les macrophages. Au niveau post-traductionnel, la stabilité d'ABC A1 est contrôlée par son statut de phosphorylation. La liaison des apo A-I, E ou A-II diminue la dégradation d'ABC A1 en augmentant son taux de phosphorylation par la PKC (Yamauchi 2003; Zannis 2006).

Une mutation du gène d'ABC A1 est à l'origine de la maladie de Tangier, caractérisée par une accumulation cellulaire de lipides, en particulier de cholestéryl esters (Remaley 1999).

❖ ABC G1

Au-delà de la première étape de la synthèse des HDL naissantes, le transporteur ABC G1 joue un rôle complémentaire à ABC A1. En effet, il transfère du cholestérol libre aux HDL naissantes, et non à l'apo A-I délipidée. Contrairement à ABC A1, il ne transfère pas de phospholipides et ses "receveurs" sont aussi bien les HDL que les LDL ou des vésicules de phospholipides (Baldan 2009). Il est exprimé sur la membrane plasmique (Kobayashi 2006) des cellules endothéliales du foie et des cellules de Kupffer (mais pas des hépatocytes) et dans les tissus périphériques (Gelissen 2006). Dans les macrophages, il est régulé positivement par LXR α et par une augmentation de la concentration cellulaire en cholestérol (Venkateswaran 2000). Contrairement à ABC A1, c'est un demi-transporteur, ce qui signifie qu'il doit s'homodimériser pour être fonctionnel. Dans le cerveau, il pourrait également s'hétérodimériser avec ABC G4, un autre transporteur aux fonctions similaires.

Ainsi, la synthèse de lipoprotéines (VLDL, HDL) constitue une voie d'efflux du cholestérol de l'hépatocyte. Cependant, ce n'est pas la seule voie de sortie du cholestérol : en effet, le cholestérol libre peut également être pris en charge par d'autres membres de la famille ABC et être évacué directement dans la bile.

(2) *Élimination dans la bile*

L'élimination du cholestérol sous forme native dans la bile est un phénomène quantitativement limité. Elle se fait par le biais des transporteurs ABC G5 et ABC G8 (Sabeva 2009). Ceux-ci sont situés sur la membrane apicale de l'hépatocyte c'est-à-dire sur la membrane formant la paroi des canalicules biliaires. L'hétérodimère ABC G5/G8 constitue la principale voie d'élimination du cholestérol libre hépatique dans la bile, mais il semblerait que ce ne soit pas la seule. En effet, une étude menée sur des souris transgéniques a démontré que le transporteur ABC B4 (MDR2) joue également un rôle (encore méconnu) dans le transport hépatobiliaire du cholestérol (Langheim 2005).

❖ ABC G5 et ABC G8

ABC G5 et ABC G8 (aussi appelés *sterolin-1* et 2) sont deux autres membres de la sous-famille G des transporteurs membranaires ABC. Ce sont des "demi"-transporteurs, et ils doivent former un hétérodimère pour être fonctionnels (Graf 2002; Graf 2003). Ils sont exprimés dans le foie et l'intestin (Dieter 2004; Langheim 2005). Dans ces deux organes, ABC G5 et ABC G8 ont pour rôle d'évacuer les stérols neutres (cholestérol et phytostérols) des cellules.

L'excrétion du cholestérol *via* ABC G5/G8 se fait par un mécanisme de flippase (Kosters 2006). Le cholestérol serait ensuite pris en charge par des micelles d'acides biliaires (Vrins 2007).

La transcription simultanée d'ABC G5 et d'ABC G8 est nécessaire pour que le dimère soit fonctionnel. Au niveau du foie, elle est activée par l'*hepatocyte nuclear factor 4a* (HNF 4 α) (Sumi 2007). En revanche, une étude *in vitro* montre que l'insuline réprime l'expression génique d'ABC G5

et d'ABC G8 (Biddinger 2008). D'autres facteurs de régulation ont été identifiés, bien que les mécanismes mis en jeu ne soient pas encore élucidés. On peut citer une régulation positive par LXR α chez la souris, bien qu'aucun élément de réponse à LXR n'ait été identifié sur le promoteur intergénique (Repa 2002; Yu 2005), mais pas chez le rat (Dieter 2004). Ce rôle de LXR α est déduit de l'effet d'un apport de cholestérol alimentaire sur l'expression des deux ABCs : leur transcription est augmentée chez la souris, alors qu'elle est diminuée chez le rat. Concernant le *farnesoid-X-receptor* (FXR), Repa *et al* décrivent une régulation positive de la transcription d'ABC G5 et ABC G8 *in vivo* chez la souris et *in vitro* sur des hépatocytes de rat (Repa 2002). Ces résultats sont confirmés *in vivo* chez la souris (Dieter 2004; Yu 2005), mais pas chez le rat (Dieter 2004). Enfin, d'autres récepteurs nucléaires sont évoqués sans que leurs effets soient clairement établis, notamment le *pregnane-X-receptor* (PXR) (Dieter 2004; Yu 2005) et PPAR α (Dieter 2004; Repa 2002).

Une mutation génique d'ABC G5 ou d'ABC G8 entraîne une pathologie appelée sitostérolémie ou phytostérolémie (Patel 2006). Elle est caractérisée par une accumulation de stérols végétaux (sitostérol et campostérol) dans le sang et les tissus, due à une absorption anormalement élevée de ces stérols dans l'intestin et à une diminution de leur élimination. Les autres symptômes incluent l'apparition de xanthes et une athérosclérose précoce.

En définitive, cette vue d'ensemble du trafic intracellulaire du cholestérol hépatique permet de réaliser la place centrale de l'hépatocyte et donc du foie dans le métabolisme du cholestérol à l'échelle de l'organisme. En effet, les différentes classes de lipoprotéines et leur charge de cholestérol circulent vers le foie et/ou en partent. Les cellules hépatiques sont donc au centre de flux continus de cholestérol libre ou estérifié, à charge pour elles de réguler la concentration cellulaire en cholestérol. Outre la dégradation, deux voies permettent de gérer l'afflux de cholestérol : son utilisation par la cellule ou bien son stockage sous forme estérifiée.

3. Utilisation cellulaire et stockage

a. Utilisation cellulaire

Le devenir du cholestérol nouvellement arrivé dans l'hépatocyte dépend en grande partie de son origine (Chang 2006):

- le cholestérol endogène, synthétisé par l'hépatocyte, est presque entièrement inclus dans la membrane plasmique (soit pour le renouvellement de la membrane existante, soit pour la synthèse de nouvelles membranes lors de la division cellulaire),
- le cholestérol issu des LDL et des remnants est dirigé soit vers la membrane plasmique, soit vers le RE pour y être estérifié,
- le cholestérol des HDL est essentiellement catabolisé en acides biliaires.

En outre, le cholestérol libéré par l'hydrolyse des cholestéryl esters hépatiques est utilisé préférentiellement pour la synthèse des lipoprotéines partant du foie (VLDL et HDL).

Les déplacements du cholestérol à l'intérieur de la cellule peuvent suivre deux modalités (Chang 2006; Soccio 2004).

La première modalité est le transport vésiculaire ; elle concerne par exemple le cholestérol issu des LDL. Celui-ci quitte l'endosome tardif vers le RE dans des vésicules contenant deux protéines particulières, *Niemann Pick type C1* (NPC1, dans la membrane de la vésicule), et NPC2 (dans la lumière vésiculaire). Une mutation de NPC1 est à l'origine de la maladie de Niemann Pick de type C, caractérisée par une accumulation de cholestérol dans les endosomes tardifs et les lysosomes, à l'origine de troubles neurologiques.

La seconde modalité est un transport non-vésiculaire, par l'intermédiaire de transporteurs protéiques. Il en existe de plusieurs types, en fonction du flux considéré. Ainsi, la cavéoline-1 et la *sterol carrier protein 2* (SCP-2) sont impliqués dans le transport du RE vers la membrane plasmique. En outre, l'action concertée d'une protéine possédant un domaine de type START (*StAR*-related lipid transfer*) et du *peripheral-type benzodiazepine receptor* (PRB) permet le transfert du cholestérol dans la lumière de la mitochondrie, où il est oxydé en 27-hydroxycholestérol par la CYP27A1.

Le cholestérol intracellulaire peut donc suivre différentes voies conduisant à son utilisation par l'hépatocyte. Cependant, une autre voie est également d'importance pour la gestion de l'homéostasie du cholestérol cellulaire : le stockage sous forme de cholestéryl esters.

b. Stockage

Dans le foie de rat, la quantité de cholestérol "stocké" sous forme d'esters varie grandement en fonction de la charge cellulaire en cholestérol. Alors que le taux de cholestérol libre est relativement constant (autour de 2 mg/g de foie), la concentration en cholestéryl esters peut aller de 0,1 mg/g si la cellule est déplétée en cholestérol à 25-30 mg/g si du cholestérol est fourni par voie alimentaire (Mathe 1984). Le cholestérol estérifié est déposé dans le cytoplasme, sous forme de grosses gouttelettes lipidiques. Les principaux acides gras utilisés pour l'estérification du cholestérol sont l'acide oléique (45%), puis les acides linoléique (≈19%) et palmitique (≈15%) (Mathe 1984). Le pool de cholestéryl esters hépatiques est principalement alimenté par les LDL et utilisé pour synthétiser les VLDL et les HDL naissantes partant du foie (Chang 2006).

Deux enzymes interviennent dans le mécanisme de stockage du cholestérol hépatique : l'ACAT 2, qui effectue l'estérification, et la *neutral cholesteryl ester hydrolase* (nCEH) cytosolique, qui catalyse la réaction inverse.

* Star=steroidogenic acute regulatory protein

❖ ACAT 2

L'ACAT (EC 2.3.1.26) est une enzyme présente dans de nombreux tissus, en particulier les tissus stéroïdogènes, le foie et l'intestin. Chez la plupart des mammifères, elle présente deux isoformes, ACAT 1 et ACAT 2. L'ACAT 1 est distribuée dans la plupart des tissus, alors que l'ACAT 2 est en général prédominante dans le foie et l'intestin (Cases 1998; Hori 2004; Matsuda 1998), mais pas chez l'Homme où les deux isoformes coexistent (Rudel 2001).

L'ACAT 2 est une enzyme membranaire située dans le RE, avec son site catalytique du côté luminal (Chang 2009; Erickson 1980). Son substrat de prédilection est le cholestérol, mais elle peut également utiliser d'autres composés comme certains oxystérols ou des stérols végétaux.

Le cholestérol n'est pas seulement le substrat de l'ACAT 2. En effet, il participe à sa régulation post-traductionnelle. De nombreuses études ont établi qu'un apport en cholestérol alimentaire provoquait une augmentation de l'activité de l'ACAT 2 dans le foie (Erickson 1980; Pramfalk 2007; Uelmen 1995). Il a été démontré par la suite que le cholestérol libre servait d'activateur de l'ACAT 2 par une interaction allostérique (Chang 2006). Ceci explique que l'ACAT 2 soit parfois considérée comme un senseur de cholestérol, alors qu'elle est dépourvue du domaine "*sterol sensor*". Par ailleurs, d'autres stérols ont également une influence sur l'activité de l'ACAT 2. Ainsi, un apport de 25-hydroxycholestérol provoque à la fois une augmentation de la quantité de cholestéryl esters, mais également une production de 25-hydroxycholestéryl esters (Lichtenstein 1983). En outre, la progestérone a un effet inhibiteur sur l'ACAT 2 (Erickson 1980). Ces facteurs de régulation non-transcriptionnelle sont les seuls décrits chez le rat. En revanche, HNF 1 α active la transcription hépatique de l'ACAT chez l'Homme (Pramfalk 2005).

Enfin, l'inhibition de l'ACAT par l'avasimibe induit une augmentation de l'activité de la CYP7A1 et de la production d'acides biliaires chez le rat (Post 1999).

Comme toutes les voies métaboliques, le stockage du cholestérol intracellulaire est réversible. Les esters sont alors hydrolysés par la nCEH cytosolique.

❖ nCEH

Il existe plusieurs cholestéryl esters hydrolases dans le foie : l'une d'elles est lysosomale et elle fonctionne à pH acide, deux autres sont actives à pH neutre et sont soit cytosolique, soit sur le RE granuleux (Deykin 1962; Fresnedo 2001; Ghosh 1995; Mathe 1984). La nCEH cytosolique (EC 3.1.1.13) est spécifique du foie (Deykin 1962). Elle est essentiellement impliquée dans l'hydrolyse du cholestérol estérifié d'origine cellulaire pour synthétiser des lipoprotéines, et du cholestérol provenant des HDL pour le diriger vers son catabolisme (Giraud-D'Hollander 1976; Shimada 1994). Elle représente 78 % de l'activité d'hydrolyse des cholestéryl esters hépatiques (Ghosh 1992). Dans le foie, elle est située préférentiellement dans la zone périveineuse des acini (Romero 1999). Enfin, elle a une forte affinité pour les esters formés par l'acide oléique et l'acide linoléique, qui sont également les substrats préférentiels de l'ACAT 2 (Deykin 1962).

La nCEH cytosolique hépatique est principalement régulée par la charge en stérols de la cellule. Son activité et sa transcription diminuent après un apport exogène ou endogène en

cholestérol tandis qu'elles augmentent si la concentration cellulaire en cholestérol diminue (Ghosh 1998). Un apport en cholestyramine ou en fibrates augmente également son activité (Ghosh 1990; Shand 1994). Par ailleurs, la nCEH est soumise à une régulation par son statut de phosphorylation : la PKA et la PKC augmentent son activité, tandis que la phosphatase alcaline l'inhibe (Ghosh 1990; Ghosh 1998; Natarajan 1996). Enfin, la transcription de la nCEH cytosolique est activée par SREBP 2 (Natarajan 1998; Natarajan 1999).

Après une vue d'ensemble des différents mécanismes qui constituent le trafic cholestérol dans l'hépatocyte (synthèse endogène, captation de cholestérol exogène, utilisation et stockage cellulaires, efflux sous forme native ou estérifiée), une dernière composante de l'homéostasie (cellulaire et de l'organisme) du cholestérol demeure : le catabolisme du cholestérol en acides biliaires.

4. Catabolisme

a. La biosynthèse des acides biliaires

La biosynthèse des acides biliaires constitue la voie majeure d'élimination du cholestérol au niveau de l'organisme. Quantitativement, elle utilise 80 % des entrées de cholestérol chez le rat et 90 % chez l'Homme (Mathe 1984; Russell 2003). Elle est exclusivement hépatique et aboutit aux acides biliaires primaires, qui sont déversés dans les canalicules biliaires. Chez l'Homme et la souris, la bile est stockée et concentrée dans la vésicule biliaire. Le rat en étant dépourvu, il sécrète continuellement une bile non-concentrée par les canalicules et les canaux biliaires.

(1) La voie classique et la voie alternative

La biosynthèse des acides biliaires peut se faire soit à partir de cholestérol, soit à partir d'oxystérols. Trois grandes étapes sont nécessaires pour produire les acides biliaires primaires (non-conjugués) :

- l'initiation, c'est-à-dire une hydroxylation en position 7 α
- la modification du noyau stérol (noyau cyclopentanophénanthrène)
- l'oxydation et le clivage de la chaîne latérale.

Il existe deux voies de biosynthèse, la voie classique (ou neutre) et la voie alternative (ou acide), découverte plus récemment (cf. Figure 21). La biosynthèse des acides biliaires mobilise 17 enzymes, dont la plupart interviennent dans les deux voies. La biosynthèse des acides biliaires a fait l'objet de nombreuses revues. On peut notamment se référer à celles de Russell, Chiang, Souidi et Norlin (Chiang 2004; Norlin 2007; Russell 2003; Souidi 2004).

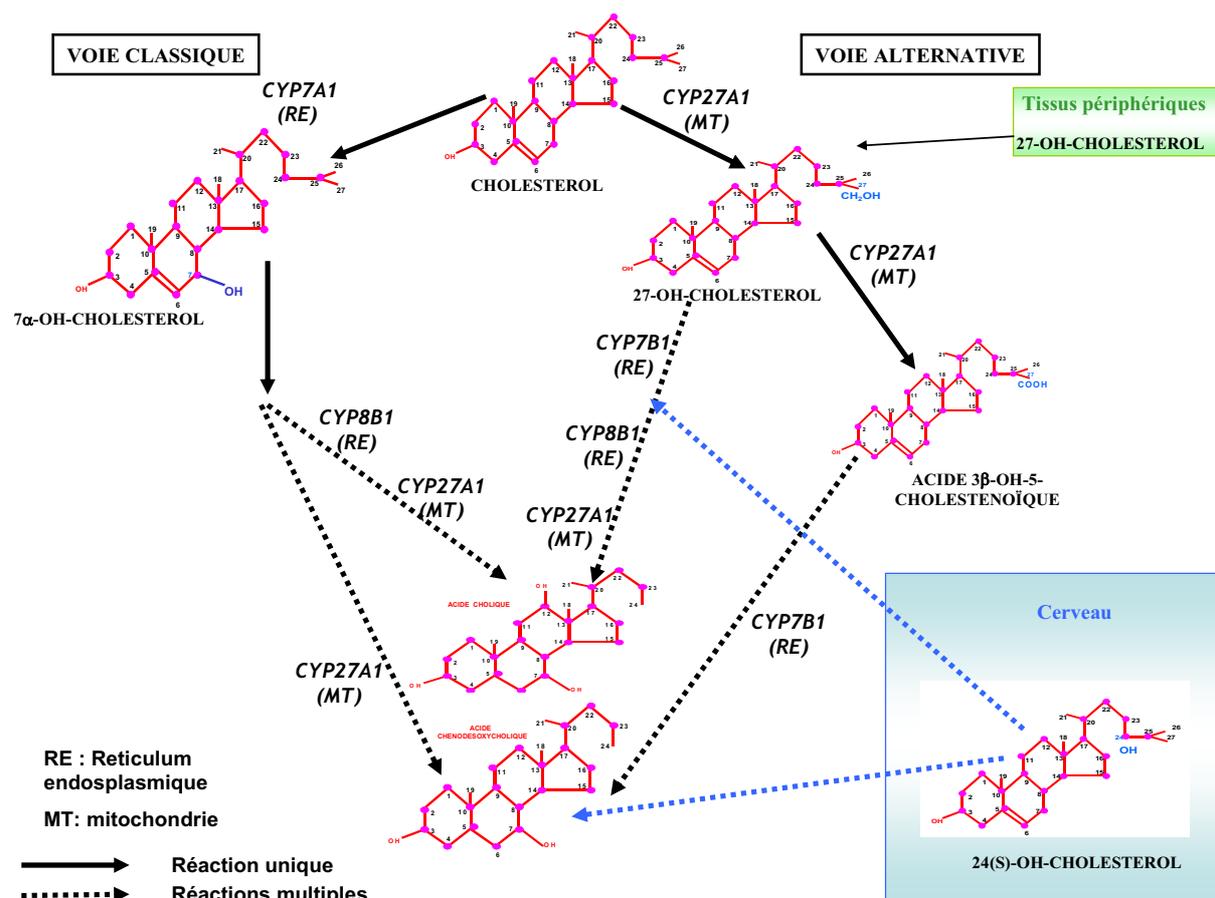


Figure 21 : Les deux voies de biosynthèse des acides biliaires

Dans le foie, la biosynthèse des acides biliaires peut suivre la voie classique, initiée par la CYP7A1, ou la voie alternative initiée par la CYP27A1. La voie classique est exclusivement hépatique tandis que la voie alternative peut être initiée dans les tissus périphériques et se poursuivre dans le foie. Deux origines extra-hépatiques sont représentées : l'une à partir de la synthèse du 27-hydroxycholestérol dans les tissus périphériques, et l'autre à partir de la synthèse du 24(S)-hydroxycholestérol dans le cerveau. Chacune des voies peut produire des acides biliaires hydrophiles ou hydrophobes, selon l'action de la CYP8B1.

La voie classique débute par la 7 α -hydroxylation du cholestérol par le biais de cholestérol-7 α -hydroxylase (CYP7A1). Celle-ci est exprimée uniquement dans le foie. Elle catalyse la réaction limitante de la voie classique et fait donc l'objet d'une régulation importante. Le 7 α -hydroxycholestérol subit ensuite 13 réactions conduisant à une modification du noyau stérol, puis à une oxydation et un clivage de la chaîne latérale. L'action de la stérol-12 α -hydroxylase (CYP8B1) oriente la voie métabolique vers la synthèse de l'acide cholique, tandis que son absence produit l'acide chénodésoxycholique plus hydrophobe. L'oxydation de la chaîne latérale précédant son clivage est initiée par la stérol-27-hydroxylase (CYP27A1).

Dans la voie alternative, la 7 α -hydroxylation ne se fait pas d'entrée : le cholestérol est d'abord hydroxylé sur sa chaîne latérale. Cette étape est réalisée par la CYP27A1, qui hydroxyle le cholestérol en position 27. Contrairement à la CYP7A1, la CYP27A1 est exprimée dans de nombreux

tissus, en particulier le poumon et les macrophages. Dans ces tissus extra-hépatiques, l'action de la CYP27A1 permet d'excréter rapidement le cholestérol excédentaire dans la circulation sanguine sous forme de 27-hydroxycholestérol. Celui-ci est ensuite capté par le foie où il s'intègre à la suite de la voie alternative. Il existe deux variantes minoritaires de cette voie, dans lesquelles la première hydroxylation du cholestérol se fait soit par la cholestérol-24-hydroxylase (CYP46A1), soit par la cholestérol-25-hydroxylase (qui n'est pas un CYP). Celle-ci est exprimée dans de nombreux tissus, comme la CYP27A1. En revanche, la CYP46A1 est majoritairement exprimée dans le cerveau et la rétine, bien que de faibles quantités soient retrouvées dans le foie chez l'Homme et la souris (Lund 1999; Russell 2009a). Ces deux voies participent également à l'élimination rapide du cholestérol excédentaire des organes périphériques.

Pour compléter l'étape d'initiation, les oxystérols ainsi formés (27-hydroxycholestérol, 24(S)-hydroxycholestérol et 25-hydroxycholestérol) doivent ensuite être hydroxylés en position 7 α . Cette réaction est effectuée par l'oxystérol-7 α -hydroxylase (CYP7B1). Celle-ci peut hydroxyler facilement le 27-hydroxycholestérol et le 25-hydroxycholestérol, ainsi que d'autres dérivés et neurostéroïdes, mais elle n'a qu'une faible affinité pour le 24(S)-hydroxycholestérol et aucune pour le cholestérol (Norlin 2007). Chez l'Homme et la souris, une autre enzyme peut effectuer cette opération : la CYP39A1. Elle a une affinité particulière pour le 24(S)-hydroxycholestérol, mais elle peut aussi hydroxyler le 24,25-époxycholestérol, ainsi que les 25-, 27- et 22-hydroxycholestérol (Li-Hawkins 2000a; Li-Hawkins 2000b). Il ne semble pas y avoir de CYP39 chez le rat (il n'y en a aucune mention dans Medline), ce qui suppose soit une gamme de substrats plus large pour la CYP7B1 dans cette espèce, soit une autre enzyme encore non-identifiée.

Une fois l'initiation achevée avec la 7 α -hydroxylation des oxystérols préalablement formés, la voie alternative reprend les mêmes grandes étapes que la voie classique : modification du noyau stérol puis oxydation supplémentaire et clivage de la chaîne latérale, pour donner les mêmes acides biliaires primaires : l'acide cholique, l'acide chénodésoxycholique, et chez les rongeurs l'acide muricholique. Comme dans la voie classique, l'action de la CYP8B1 détermine la formation d'acide cholique, et donc l'hydrophobicité du pool d'acides biliaires.

Qu'ils soient synthétisés par l'une ou l'autre des deux voies, l'acide cholique et l'acide chénodésoxycholique sont les acides biliaires majoritaires chez le rat et l'Homme, tandis que chez la souris, ce sont l'acide cholique et l'acide muricholique (Russell 2003). Ces acides biliaires primaires sont ensuite transportés dans les peroxysomes où ils sont conjugués à la taurine ou à la glycine. Ils sont enfin déversés dans les canalicules biliaires *via* des transporteurs membranaires : ce transport est nécessairement un transport actif pour lutter contre le gradient de concentration en acides biliaires défavorable.

(2) Importance relative des deux voies

L'importance relative des deux voies chez les différentes espèces est difficile à mesurer dans des conditions physiologiques du fait de l'interconnexion des substrats des différentes enzymes. Cependant, des estimations ont été réalisées, révélant des différences importantes entre le rat, la souris et l'Homme.

Chez le rat, une inhibition de la CYP7A1 pendant 24 heures provoque une diminution de 50 % du taux d'acides biliaires (Vlahcevic 1997). Ainsi, la voie alternative peut compter jusqu'à 50 % chez le rat, tandis qu'elle est estimée à 25 % chez la souris (Russell 2003; Schwarz 1996). Chez l'Homme, la voie classique est très largement majoritaire, puisqu'elle compterait pour 90 à 95 % (Duane 1999; Pullinger 2002). Cependant, l'importance de la voie alternative augmente en cas de répression de la voie classique (Axelson 1990; Schwarz 1996; Vlahcevic 1997).

Parmi les différentes variantes de la voie alternative, celle impliquant l'initiation par la CYP27A1 est majoritaire quelque soit l'espèce. La voie de la cholestérol-25-hydroxylase est à l'origine de 5 % du total des acides biliaires chez l'Homme sain, tandis que la voie du 24(S)-hydroxycholestérol compte pour moins de 1 % (Norlin 2007; Russell 2003).

(3) Les principales enzymes

Parmi toutes les enzymes qui composent les voies de biosynthèse des acides biliaires au niveau hépatique, nous avons choisi d'en étudier quatre jouant des rôles importants :

- ✳ la CYP7A1, l'enzyme initiatrice et limitante de la voie classique
- ✳ la CYP27A1, l'enzyme initiatrice de la voie alternative
- ✳ la CYP7B1, qui produit la 7 α -hydroxylation de la voie alternative chez le rat
- ✳ la CYP8B1, qui détermine la production d'acide cholique et régule ainsi l'hydrophobicité du pool d'acides biliaires.

Le point commun de toutes ces enzymes est leur appartenance à la famille des CYPs. A ce titre, elles possèdent un groupement hème et une absorption caractéristique à 450 nm lorsque celui-ci est réduit et complexé avec du monoxyde de carbone (Pikuleva 2006). Ce sont des monooxygénases membranaires qui nécessitent un cofacteur : le NADPH. Les CYPs catalysent le transfert d'un atome d'oxygène à leur substrat à partir du dioxygène ambiant. Pour ce faire, un transfert d'électrons est nécessaire pour activer le dioxygène. Ces électrons sont fournis par une protéine associée au CYP : la NADP cytochrome P450 réductase si le CYP est ancré à la membrane du RE, ou la ferredoxine s'il est situé sur la membrane interne de mitochondrie (Gueguen 2006a). D'un point de vue structural, seule une petite portion est commune à tous les CYPs : celle comprenant la liaison de l'hème à la protéine et permettant la liaison du substrat. Les sites de

liaison à la membrane, d'interaction avec le partenaire rédox et la forme du site catalytique (qui définit la gamme de substrats possibles) sont très variables (Gueguen 2006a; Pikuleva 2006).

Parmi les CYPs des mammifères, un intervient dans la synthèse du cholestérol (CYP51) et sept dans sa dégradation en acides biliaires (CYP7A1, CYP27A1, CYP7B1, CYP8B1, CYP39A1, CYP46A1 et CYP3A4). La plupart d'entre eux catalysent des réactions-clés de leur voie métabolique, comme les quatre CYPs présentés plus en détail ci-dessous : CYP7A1, CYP27A1, CYP7B1 et CYP8B1.

NB : Pour chaque enzyme présentée ci-dessous, ses fonctions seront présentées en premier lieu, puis les principaux mécanismes de régulation transcriptionnelle (limités au rat, à la souris et à l'Homme) et enfin les données disponibles sur les éventuelles maladies causées par une mutation génique ou les modèles transgéniques appropriés.

❖ CYP7A1

La CYP7A1 (EC 1.14.13.17) est une enzyme microsomale, exclusivement hépatique (Ogishima 1987). Elle initie la voie classique en hydroxylant le cholestérol en position 7 α et c'est l'enzyme limitante de cette voie. Elle est responsable de la formation de 50 % des acides biliaires chez le rat, 75 % chez la souris et 95 % chez l'Homme (Pullinger 2002; Schwarz 1996; Vlahcevic 1997). Ses substrats "classiques" sont le cholestérol et le cholestanol. Cependant, le 20(S)-hydroxycholestérol, le 25-hydroxycholestérol et le 27-hydroxycholestérol ont été décrits comme étant d'autres substrats possibles *in vitro* chez l'Homme et le rat (Norlin 2000), bien que cela n'ait pas été rapporté *in vivo*.

Du fait de son rôle crucial, la CYP7A1 est modulée et régulée à différents niveaux par de très nombreux paramètres. Nous donnons ici les principales voies de régulation et non un compte-rendu exhaustif.

Tout d'abord, l'apport de cholestérol alimentaire active la transcription et l'activité de la CYP7A1 chez le rat (Horton 1995; Nguyen 1999; Vlahcevic 2000) et la souris (Schwarz 2001). La cholestyramine (un séquestrant des acides biliaires) active également la transcription de la CYP7A1 chez le rat (Brown 1974; Nguyen 1999; Shibata 2007) et la souris (Schwarz 2001; Wolters 2002). Au contraire, un apport en acides biliaires inhibe la CYP7A1 (Shefer 1970).

Le clonage du gène de la CYP7A1 de différentes espèces dans les années 1990 a permis de découvrir l'influence de plusieurs récepteurs nucléaires sur sa régulation transcriptionnelle. L'analyse du promoteur a permis d'identifier deux zones nommées *bile acids response element-I* (BARE-I) et BARE-II (Chiang 2000; Stroup 1997). Ces zones contiennent des sites de fixation pour de multiples récepteurs nucléaires, dont LXR α (Chiang 2001), FXR (Chiang 2000), HNF 4 α (Crestani 1998) et LRH-1 (Lu 2000).

Chez le rat et la souris, LXR α active la transcription de la CYP7A1 (Chiang 2000; Goodwin 2003; Menke 2002). Il agit pour cela en interaction avec LRH-1. Le détail de cette régulation est donné dans la partie sur la régulation. En revanche, chez l'Homme, l'effet est contraire (Goodwin 2003; Menke 2002). En effet, il n'y a pas de *LXR response element* (LXRE) sur le promoteur de la CYP7A1 humaine, donc LXR α ne peut agir directement. Il interagit avec un autre récepteur

nucléaire, le *small heterodimer partner* (SHP), qui inhibe la transcription du gène (Goodwin 2003). HNF 4 α active également la transcription du gène de la CYP7A1 chez le rat (Crestani 1998; Stroup 2000).

Comme mentionné précédemment, les acides biliaires exercent un rétrocontrôle négatif sur leur biosynthèse, et ce *via* une inhibition de la transcription du gène de la CYP7A1. En effet, les acides biliaires hydrophobes (en particulier l'acide chénodésoxycholique) sont les ligands du récepteur nucléaire FXR, qui agit selon une cascade bien décrite. La liaison du ligand sur FXR va activer SHP, qui va inhiber l'action positive de LRH-1 et donc la transcription du gène (Chiang 2002; Goodwin 2003; Lu 2000). Ce mécanisme est commun au rat, à la souris et à l'Homme. En outre, il existe d'autres mécanismes de répression indépendants de SHP. L'un d'entre eux fait intervenir le récepteur nucléaire PXR qui inhibe la transcription du gène de la CYP7A1 chez le rat, la souris et dans des hépatocytes humains (Li 2005a; Shibata 2007; Staudinger 2001). Son action passerait par une inhibition de HNF 4 α (Shibata 2007). Les autres mécanismes par lesquels les acides biliaires exercent leur action répressive ne mettent pas en jeu d'autres récepteurs nucléaires mais jouent sur l'activité de HNF 4 α . En effet, chez le rat et la souris, les acides biliaires peuvent déclencher l'activation de cytokines inflammatoires (*tumor necrosis factor* α (TNF α), interleukine 1 β) qui par la voie *c-JUN kinase* (JNK) vont réprimer HNF 4 α en le phosphorylant (Gupta 2001; Kerr 2002; Wang 2002). Par ailleurs, des études *in vitro* chez le rat et la souris ont montré que les fibrates, les ligands de PPAR α inhibaient la CYP7A1 (Post 2001) de façon indirecte, par une éventuelle répression de HNF 4 α (Marrapodi 2000; Patel 2000), mais les mécanismes sont encore à l'étude *in vivo*. Un récapitulatif des principales voies de régulation transcriptionnelle de la CYP7A1 est présenté dans la Figure 22.

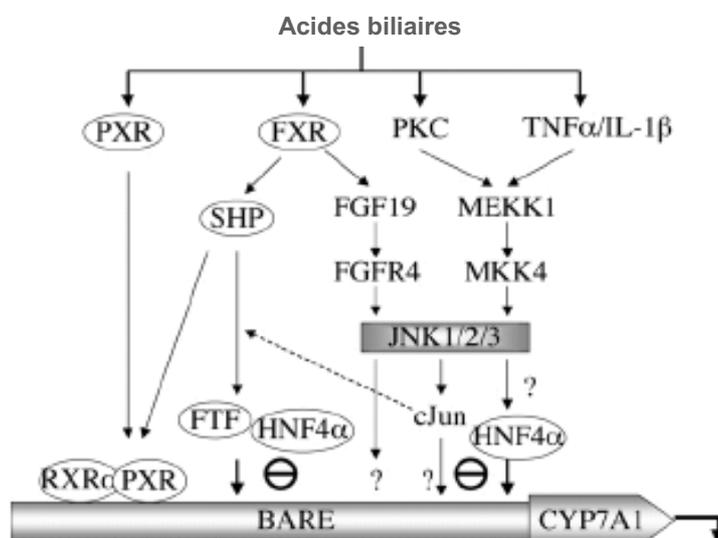


Figure 22 : Principales voies de régulation transcriptionnelle de la CYP7A1

Pour les détails voir le texte. (source : Chang 2004)

Enfin, les acides biliaires peuvent également activer la PKC, qui exerce une action répressive sur la CYP7A1. Celle-ci peut se faire par la voie JNK mentionnée précédemment (Chiang 2004) ou de façon indirecte par une modification du taux intracellulaire de calcium (Stravitz 1996a). Par ailleurs, la CYP7A1 peut être inactivée par déphosphorylation (Aguiar 2005; Tang 1986), ce qui est également un moyen de régulation post-transcriptionnelle.

La suppression de l'activité de la CYP7A1 a relativement peu d'effet chez le rat : en effet, après 24 h d'inhibition, le taux d'acides biliaires est à 50 % du taux normal chez le rat, et il remonte à 80 % après 48 h d'inhibition (Vlahcevic 1997). Le cholestérol ne s'accumule donc pas, ce qui explique le caractère peu porté à l'athérosclérose du rat. Au contraire, chez la souris, une déficience génétique en CYP7A1 provoque une forte mortalité post-natale (environ 90 %). Chez les animaux qui survivent, une diminution de 75 % du taux d'acides biliaires est observée, de même qu'une déficience en vitamines et une malabsorption des lipides au niveau intestinal. Le cholestérol, en particulier, n'est plus absorbé qu'à 5 % de sa valeur normale (Ishibashi 1996; Schwarz 1996; Schwarz 1998; Schwarz 2001). Chez l'Homme, une mutation dans le gène de la CYP7A1 conduit à un phénotype hypercholestérolémique, avec notamment une augmentation du LDL-cholestérol, un cholestérol hépatique deux fois plus élevé, une hypertriglycéridémie, une diminution de l'excrétion des acides biliaires malgré une augmentation de la voie alternative et des calculs biliaires précoces (Pullinger 2002).

❖ CYP27A1

La CYP27A1 (EC 1.14.13.15) est une enzyme ancrée dans la membrane interne de la mitochondrie (Okuda 1988; Pandak 2002b). Elle est exprimée dans de nombreux tissus, dont le cerveau, les poumons et les macrophages (Andersson 1989; Babiker 1999; Souidi 2001). Elle intervient dans le déroulement des deux voies de biosynthèse des acides biliaires pour oxyder la chaîne latérale de façon à en faciliter le clivage. Elle initie également la voie alternative en hydroxylant le cholestérol en position 27 (ou 26, d'où sa dénomination inusitée de stérol-26-hydroxylase). Contrairement à la CYP7A1 qui initie la voie classique, la CYP27A1 n'est pas l'enzyme limitante de la voie alternative. Le transport du cholestérol à l'intérieur de la mitochondrie semblerait être le facteur critique (Pandak 2002b; Ren 2004). Ce rôle d'initiation de la voie alternative confère à la CYP27A1 une importance capitale, d'une part à cause de la voie elle-même, et d'autre part parce que les molécules formées à ce niveau (27-hydroxycholestérol, acide 3 β -hydroxy-5-cholesténoïque) sont de puissants ligands pour LXR (Norlin 2007).

La synthèse de 27-hydroxycholestérol dans les tissus périphériques, et notamment dans les macrophages, participe au processus de détoxification de ces tissus par la diminution de la charge en cholestérol cellulaire et par la stimulation du transport reverse du cholestérol. En effet, les oxystérols sont une des formes de transport du cholestérol dans le plasma, et parmi eux le 27-hydroxycholestérol est le plus abondant chez l'Homme (Babiker 1998) et la souris (Li-Hawkins 2000a). Nos observations indiquent que c'est également le cas chez le rat.

Du fait de son action à deux niveaux dans la biosynthèse des acides biliaires, les substrats de la CYP27A1 sont multiples : cholestérol, cholestanol, 27-hydroxycholestérol ainsi que de multiples précurseurs des acides biliaires. En outre, la CYP27A1 peut hydroxyler certains de ses substrats sur une autre position que le carbone 27. Ainsi, chez le porc, elle peut synthétiser du 24(S)-hydroxycholestérol et du 25-hydroxycholestérol (Lund 1993). *A priori*, cette capacité n'a pas été démontrée chez le rat.

Outre la biosynthèse des acides biliaires, la CYP27A1 intervient également dans le métabolisme de la vitamine D : elle catalyse la première étape d'activation de la vitamine D en l'hydroxylant en position 25 (Okuda 1994; Theodoropoulos 2003; Tissandie 2006b).

La régulation de la CYP27A1 n'est pas encore bien connue mais s'annonce d'ores et déjà complexe, à la fois du fait des différentes voies dans lesquelles elle intervient, mais également par les variations qui existent d'un tissu à l'autre. Ainsi, l'apport de cholestérol active la transcription de la CYP27A1 hépatique chez le rat mais pas chez la souris (Chen 2005; Nguyen 1999). Les acides biliaires (acides chénodésoxycholique, désoxycholique...) n'ont pas d'effet sur la transcription et l'activité de la CYP27A1 hépatique chez la souris (Norlin 2007) ni chez l'Homme, (Bjorkhem 2002) mais les inhibent chez le rat (Stravitz 1996b; Twisk 1995; Vlahcevic 1996). Le mécanisme de cette inhibition est encore inconnu, mais il pourrait s'effectuer *via* une diminution de la liaison de HNF 1 α sur le promoteur de la CYP27A1 (Rao 1999). Cette action positive de HNF 1 α sur la transcription du gène de la CYP27A1 hépatique est également présente chez l'Homme (Memon 2001) et chez la souris (Cheung 2003). Des études *in vitro* ont montré une action positive de HNF 4 α sur la CYP27A1 hépatique chez l'Homme (Chen 2003; Garuti 2002), mais il n'y a pas d'études équivalentes chez le rongeur. De même, les rôles de LXR, PXR, PPAR α et PPAR γ ont été démontrés dans des conditions précises de tissu et d'espèce, mais ne sont pas généralisés. Ainsi, LXR β active la transcription du gène de la CYP27A1 dans le cerveau de rat (Gilardi 2009) et les macrophages humains (Crestani 2004), mais aucune étude ne rapporte cette même action dans le foie de ces deux espèces. PXR active également la transcription de la CYP27A1 dans l'intestin de l'Homme, mais pas dans son foie (Li 2007). PPAR γ a une action inhibitrice envers la CYP27A1 dans les macrophages humains (Quinn 2005; Szanto 2004), mais celle-ci n'est décrite dans aucun autre tissu ni espèce. En revanche, l'action inhibitrice de PPAR α sur la CYP27A1 hépatique a été décrite chez le rat et la souris (Post 2001).

Enfin, outre ces mécanismes de régulation transcriptionnelle, il est à noter que l'activité de la CYP27A1 est soumise à une boucle de rétrocontrôle négatif par la 1,25-dihydroxyvitamine D dans l'intestin, le rein et dans une moindre mesure dans le foie de rat (Axen 1995; Theodoropoulos 2003). Enfin, la phosphorylation de la CYP27A1 pourrait également être un facteur de modulation de son activité. Contrairement à la CYP51 et à la CYP7A1, le caractère phosphorylé de la CYP27A1 n'a pas été mis en évidence dans les mitochondries de foie de rat, mais il l'a été dans les mitochondries de rein chez le poulet (Aguar 2005).

L'inactivation totale du gène de la CYP27A1 chez l'Homme conduit à une pathologie appelée xanthomatose cérébro-tendineuse. Celle-ci se caractérise par une accumulation de cholestérol et de cholestanol dans les tissus, notamment les tendons et le cerveau. Les conséquences de cette accumulation sont multiples : troubles neurologiques, calculs biliaires, athérosclérose, ostéoporose, etc. (Bhattacharyya 2007; Bjorkhem 2000; Verrips 2000). En revanche, chez la souris *cyp27a1^{-/-}*, il n'y a pas d'accumulation de cholestérol, mais une augmentation de sa synthèse et une diminution de la synthèse des acides biliaires (Honda 2001). Par ailleurs, une hépatomégalie et une hypertriglycéridémie sont également observées chez ces animaux (Repa 2000b; Rosen 1998).

❖ CYP7B1

La CYP7B1 (EC 1.14.13.100) est l'enzyme responsable de la 7 α -hydroxylation des oxystérols dans la voie alternative, dont elle est spécifique. C'est une enzyme microsomale (Pandak 2002a), bien qu'une activité oxystérol-7 α -hydroxylase ait également été décrite dans les mitochondries de foie chez le rat (Ren 2004) et l'Homme (Shoda 1993). Elle est distribuée dans de nombreux tissus, notamment dans les tissus impliqués dans le métabolisme des acides biliaires, des hormones stéroïdiennes et des neurostéroïdes (Wu 1999). Elle a une large gamme de substrats, en particulier le 27-hydroxycholestérol, le 25-hydroxycholestérol, la déhydroépiandrostérone (DHEA) et la prégnénolone (Rose 1997). En revanche, elle n'agit pas sur le cholestérol et elle a une faible affinité pour le 24(S)-hydroxycholestérol, à tout le moins dans les espèces exprimant la CYP39A1 (Norlin 1998; Ren 2004).

Les acides biliaires (acides chénodésoxycholique, désoxycholique et cholique) inhibent la transcription du gène de la CYP7B1 chez le rat et la souris (Pandak 2002a; Ren 2003). Le cholestérol active (plus ou moins faiblement selon les études) la transcription de la CYP7B1 chez le rat (Ren 2003) mais l'inhibe chez la souris (Schwarz 1996).

La régulation de la CYP7B1 par les récepteurs nucléaires est très peu documentée : la littérature mentionne l'activation de la transcription du gène de la CYP7B1 par HNF 1 α (Cheung 2003) et par le *retinoid-related orphan receptor* α (ROR α) (Wada 2008) chez la souris. Cette dernière publication indique que LXR α pourrait jouer un rôle indirect *via* une interaction négative avec ROR α . Chez l'Homme, SREBP 1 aurait une action inhibitrice sur l'expression génique de la CYP7B1 (Norlin 2004). Celle-ci est également régulée par les hormones androgènes et les œstrogènes dans les tissus stéroïdogéniques chez l'Homme (Wang 2006).

Une mutation du gène de la CYP7B1 chez l'Homme provoque de graves conséquences, notamment une cholestase néonatale sévère (rétention de la bile dans les voies hépatobiliaires) et une insuffisance hépatique, accompagnées d'une forte augmentation des taux de 24(S)-hydroxycholestérol, de 25-hydroxycholestérol et de 27-hydroxycholestérol (Setchell 1998). Chez les souris invalidées pour ce gène, les effets sont beaucoup moins graves : les taux plasmatiques élevés de 25-hydroxycholestérol et de 27-hydroxycholestérol ne semblent pas avoir de conséquences sur le métabolisme lipidique de l'animal (Li-Hawkins 2000b).

❖ CYP8B1

LA CYP8B1 (EC 1.14.13.95) joue un rôle crucial dans la biosynthèse des acides biliaires, car c'est son action (une hydroxylation en position 12) qui détermine la synthèse des acides biliaires hydrophiles comme l'acide cholique. Elle influe donc sur le ratio hydrophobicité/hydrophilie du pool général des acides biliaires (Pandak 2001), et par conséquent sur leur capacité à favoriser l'absorption des lipides au niveau intestinal. Elle intervient à la fois dans la voie classique et dans la voie alternative.

La CYP8B1 est exprimée exclusivement au niveau du foie (Eggertsen 1996; Ishida 1999), et son gène a la particularité de ne pas avoir d'introns, au moins chez l'Homme et la souris (Gafvels 1999).

Comme pour les autres enzymes de la biosynthèse des acides biliaires, ceux-ci régulent négativement la transcription de la CYP8B1 (Vlahcevic 2000). Cette action peut se faire par l'activation de cytokines et de la voie MAPK comme cela a été démontré chez l'Homme (Jahan 2005). Elle peut également se traduire par une action sur les récepteurs nucléaires SHP et HNF 4 α chez l'Homme (Zhang 2001a) ou par SHP et LRH-1 chez le rat (del Castillo-Olivares 2001). Une autre étude soulève la possibilité que les acides biliaires agissent directement sur LRH-1 et HNF 4 α sans passer par SHP chez le rat (Yang 2002). Les auteurs proposent un modèle dans lequel les acides biliaires inhiberaient l'action positive de HNF 4 α et activeraient LRH-1 qui aurait une action inhibitrice. Cette dernière hypothèse va à l'encontre du rôle habituellement positif de LRH-1 sur la transcription de ses gènes cibles, mais elle pourrait s'expliquer par le fait que les sites de liaison de LRH-1 et de HNF 4 α se chevauchent sur la région BARE du promoteur de la CYP8B1 (Yang 2002). Chez le rat, les facteurs de transcription SREBP régulent également la CYP8B1, mais de façon spécifique selon l'isoforme : SREBP 1 active directement sa transcription par liaison à un SRE du promoteur, tandis que SREBP 2 exerce une action inhibitrice indirecte (del Castillo-Olivares 2002; Yang 2004). Enfin, une régulation positive par PPAR α a été mise en évidence chez la souris (Hunt 2000). Ce mécanisme serait mis en jeu lors du jeûne, qui provoque une augmentation de la CYP8B1. Le cholestérol (Vlahcevic 2000) et l'insuline (Ishida 2000) ont quant à eux une action inhibitrice chez le rat.

Il n'y a *a priori* pas de cas rapporté de mutation de la CYP8B1 chez l'Homme (Chiang 2004). Chez les souris invalidées pour ce gène, l'absence de synthèse de l'acide cholique entraîne un déséquilibre de la composition du pool d'acides biliaires. De plus, ce pool n'est pas réduit mais au contraire plus important que chez les souris sauvages. Ceci découle de la perte du rétrocontrôle négatif sur la CYP7A1, qui est manifestement inhibée par l'acide cholique (Li-Hawkins 2002). Les autres perturbations majeures du métabolisme du cholestérol et des acides biliaires sont une diminution de l'absorption du cholestérol intestinal, une augmentation de la synthèse du cholestérol hépatique (qui se résorbe en cas d'apport de alimentaire cholestérol ou d'acide cholique) et une prédisposition à l'hypercholestérolémie et à la formation de calculs biliaires (Murphy 2005; Wang 2006).

Les quatre CYPs présentés ci-dessus sont donc des enzymes-clés de la biosynthèse des acides biliaires, qu'elles soient spécifiques d'une voie (CYP7A1, CYP7B1) ou qu'elles soient communes aux deux voies (CYP27A1, CYP8B1). Leur bon fonctionnement et leur régulation sont donc des éléments fondamentaux de l'homéostasie du cholestérol, d'autant plus que les acides biliaires produits par cette voie métabolique, mais également les oxystérols qui en sont les intermédiaires, jouent des rôles importants dans l'organisme.

b. Devenir et rôles des acides biliaires

Les acides biliaires hépatiques sont appelés acides biliaires primaires. Chez le rat et la souris, ce sont principalement l'acide cholique, l'acide chénodésoxycholique et son dérivé, l'acide muricholique (cf. Figure 23). Ce dernier est spécifique des rongeurs et n'existe donc pas chez l'Homme.

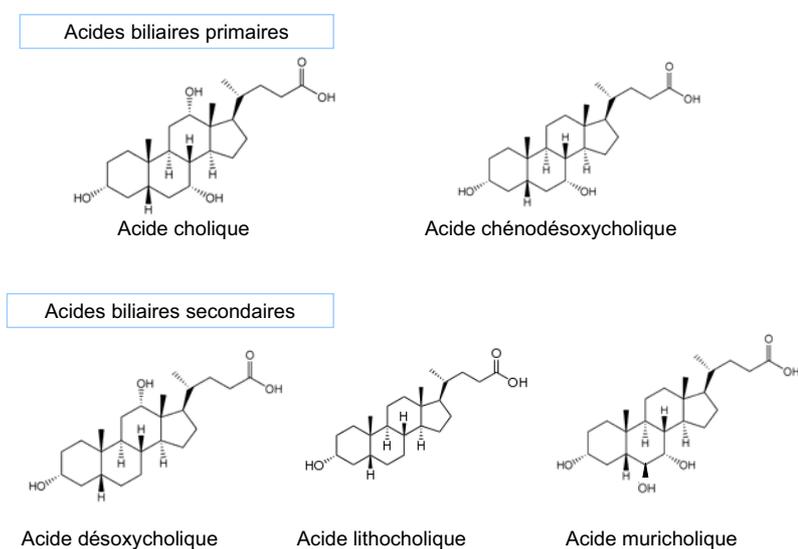


Figure 23: Structure des principaux acides biliaires

Une fois synthétisés, la majorité des acides biliaires sont conjugués au niveau de la chaîne latérale soit à la taurine, soit à la glycine. Cette conjugaison les rend plus amphiphiles. Ils sont ensuite excrétés dans la bile par l'hépatocyte. Ce phénomène se fait par un transport actif *via* trois transporteurs membranaires : la *bile salt export pump* (BSEP, ABC B11), le *multidrug resistance 1a* (MDR1a, ABC B1a) et la *multidrug resistance associated protein 2* (MRP 2, ABC C2). Ils sont ensuite déversés avec la bile dans la lumière intestinale. A ce niveau, ils subissent différentes étapes de "maturation" (déconjugaison, 7 α -déhydroxylation) par la flore intestinale et sont transformés en acides biliaires secondaires (par exemple l'acide désoxycholique ou l'acide lithocholique). Dans l'intestin, les acides biliaires primaires et secondaires forment des micelles avec les lipides et les vitamines liposolubles apportés par l'alimentation et favorisent ainsi leur absorption intestinale. Environ 90 % des acides biliaires sont également réabsorbés au niveau de l'iléon (Shefer 1969), les 10 % restants étant éliminés par voie fécale.

Outre le rôle physiologique d'aide à l'**absorption des molécules lipophiles** de l'alimentation, la réabsorption intestinale des acides biliaires permet également leur **recyclage**, car ils sont ensuite excrétés par l'entérocyte dans le sang porte, et ils reviennent au foie où ils sont de nouveau hydroxylés en position 7 α , conjugués et sécrétés dans la bile. Ce cycle entéro-hépatique des acides biliaires est d'une grande importance biologique car il permet de modérer le recours à une biosynthèse représentant une forte demande énergétique. D'autre part, le caractère partiel de ce recyclage permet le **catabolisme à grande échelle du cholestérol excédentaire**.

Le troisième rôle des acides biliaires est apparu plus récemment mais n'en est pas moins fondamental : celui de **ligands de certains récepteurs nucléaires**. Ainsi, certains acides biliaires généralement hydrophobes (acides chénodésoxycholique, désoxycholique, lithocholique etc.) exercent un rétrocontrôle négatif sur leur biosynthèse en agissant comme ligands de FXR ([Makishima 1999](#)). L'interconnexion des voies métaboliques en fait également des modulateurs du métabolisme des triglycérides et du glucose (cf. paragraphe sur FXR). L'acide lithocholique peut également servir de ligand à PXR et VDR ([Chiang 2003](#)), qui sont impliqués respectivement dans le métabolisme des xénobiotiques et de la vitamine D.

Enfin, l'**activation de molécules autres que des récepteurs nucléaires** par les acides biliaires a également été mise en évidence. Ainsi, les acides biliaires se lient à des récepteurs membranaires couplés aux **protéines G** ([Kawamata 2003](#); [Maruyama 2002](#)), activent la voie des **MAPK**, la voie **JNK** et augmentent la production d'AMP cyclique ([Gupta 2001](#); [Thomas 2008](#)).

Ainsi, le champ d'action des acides biliaires s'étend au métabolisme énergétique, au métabolisme du glucose, à l'apoptose, à la prolifération cellulaire et à la régénération hépatique ([Houten 2006](#); [Keitel 2008](#)). Plusieurs revues récentes permettent une approche plus détaillée des acides biliaires, de leur métabolisme et de leurs rôles ([Lefebvre 2009](#); [Monte 2009](#); [Russell 2009a](#)).

c. Rôles des oxystérols

Les acides biliaires ne sont pas les seules molécules biologiquement importantes provenant du catabolisme hépatique du cholestérol. Certains oxystérols servant d'intermédiaires à cette voie métaboliques sont tout aussi déterminants (pour des revues générales sur les oxystérols, voir ([Schroepfer 2000](#); [Souidi 2004](#))).

Le terme "oxystérols" désigne les dérivés mono- ou di-hydroxylés (voire oxydés) du cholestérol. Les oxystérols sont soit formés par auto-oxydation (7 β -hydroxycholestérol, 7cétol-hydroxycholestérol), soit synthétisés par une enzyme, presque systématiquement un CYP (7 α -hydroxycholestérol, 24(S)-hydroxycholestérol, 27-hydroxycholestérol). Les oxystérols font l'objet d'études approfondies depuis une vingtaine d'année, et ils semblent influencer sur de multiples processus biologiques. Leur principal champ d'action est le métabolisme des stérols. Ainsi, ils contrôlent la stéroïdogénèse dans les organes reproducteurs et les glandes surrénales ([Cummins](#)

2006; Mouzat 2009a) et interviennent à plusieurs niveaux dans le métabolisme du cholestérol (Brown 2009b; Gill 2008; Javitt 2008).

A l'heure actuelle, on dénombre 4 actions majeures des oxystérols sur l'homéostasie du cholestérol :

➤ **l'inhibition de SREBP 2** en empêchant le clivage qui permet son activation (Chiang 2002; Radhakrishnan 2007). Cette répression se fait de manière indépendante du rétrocontrôle par le cholestérol. En effet, comme mentionné précédemment, le cholestérol se lie à la *SREBP cleavage activating protein* (SCAP, la protéine chaperon de SREBP dans la membrane de RE) et empêche la translocation du complexe SCAP-SREBP vers le Golgi pour le clivage et l'activation de SREBP. En revanche, les oxystérols (25-, 22(R)-, 27-, 24(S)-hydroxycholestérols et 24,25-époxycholestérol) se lient à INSIG, une autre protéine membranaire qui retient le complexe dans la membrane du RE en se liant à SCAP (*cf.* paragraphe sur SREBP).

➤ **l'activation de la dégradation de l'HMG-CoA réductase** par le protéasome (Goldstein 2006; Sever 2003a; Sever 2003b). C'est le second effet de la liaison des oxystérols sur INSIG déjà mentionné dans le paragraphe sur la synthèse du cholestérol. Le 27-hydroxycholestérol a été identifié comme un effecteur de ce processus (Lange 2008).

➤ **l'augmentation de l'estérification du cholestérol** (Brown 1975; Du 2004). Cet effet a été mis en évidence sur des cellules ovariennes de hamster auxquelles a été ajouté du 25-hydroxycholestérol. Bien qu'il n'y ait pas de démonstration de ce phénomène *in vivo* à notre connaissance, il rentrerait dans le cadre d'une réduction du pool de cholestérol libre, en synergie avec les autres effets décrits.

➤ **l'activation de LXR α et de LXR β** (Chen 2007; Willy 1997). C'est leur rôle le plus connu et le plus étudié : les oxystérols ont été identifiés comme les ligands endogènes des deux isoformes du LXR. Les ligands les plus puissants sont les 22(R)-, 20(S)- et 24(S)-hydroxycholestérols et le 24(S),25-époxycholestérol (Baranowski 2008). Les rôles des LXRs sont multiples, mais ils ont principalement une action hypocholestérolémique et hypertriglycéridémique (voir le paragraphe sur LXR pour plus de détails).

Au-delà de ces actions sur l'homéostasie du cholestérol, les oxystérols sont également impliqués dans d'autres phénomènes comme la transduction du signal par la voie SHH lors de la morphogénèse ou l'interaction avec d'autres récepteurs nucléaires, notamment le récepteur aux œstrogènes (Gill 2008; Javitt 2008). Ils servent également de moyen d'élimination du cholestérol dans les tissus périphériques, comme le 24(S)-hydroxycholestérol dans le cerveau, ou le 27-hydroxycholestérol dans les macrophages (Bjorkhem 1994; Norlin 2000). Cependant, ils peuvent également devenir toxiques pour les cellules. C'est notamment le cas des 7 β - et 7cétol-hydroxycholestérols, qui sont des composants majeurs des LDL oxydées et donc des molécules pro-athérogènes (Brown 1999). Ils sont également liés à des phénomènes de cytotoxicité, d'inflammation, de stress oxydant et d'apoptose (Vejuj 2008). Un des moyens de contrôle de la cellule pour éviter leur caractère délétère est de les inactiver, soit par estérification, soit par

sulfonation (Gill 2008). Leur dégradation se fait par leur intégration dans la biosynthèse des acides biliaires.

En définitive, le catabolisme du cholestérol hépatique en acides biliaires est une voie métabolique de la plus grande importance au niveau de la cellule, de l'organe ou de l'organisme. En effet, ce catabolisme constitue la principale voie d'élimination du cholestérol excédentaire, à partir du cholestérol hépatique sous forme native ou à partir des oxystérols formés dans les tissus périphériques et captés par le foie. Outre cette fonction d'élimination et de régulation de l'homéostasie générale du cholestérol, cette voie métabolique génère de nombreuses molécules-signal, que ce soit ses produits finaux (les acides biliaires) ou ses intermédiaires (les oxystérols). Ceux-ci participent à la régulation complexe du métabolisme du cholestérol et des acides biliaires via les récepteurs nucléaires FXR et LXR, dont ils sont les ligands respectifs.

Cette régulation du métabolisme du cholestérol par différents facteurs de transcription a déjà été quelque peu évoquée au cours de cet exposé. La partie suivante s'attachera à présenter les principaux acteurs de cette régulation transcriptionnelle et à illustrer les mécanismes majeurs mis en œuvre pour préserver l'équilibre entre les différentes voies de ce métabolisme.

C. Régulation transcriptionnelle : principaux facteurs de transcription et mécanismes d'action

La régulation de toute voie métabolique peut se faire à plusieurs niveaux : transcriptionnel, post-transcriptionnel, post-traductionnel... Divers mécanismes post-transcriptionnels ont été évoqués précédemment, comme le statut de phosphorylation des enzymes, le taux de dégradation, l'acquisition de l'activité, etc. Ces mécanismes sont en général ciblés et ne concernent qu'une enzyme spécifique, dans une configuration métabolique donnée. Au contraire, la régulation transcriptionnelle des voies métaboliques met en jeu divers mécanismes en équilibre permanent, touchant plusieurs cibles (enzymes, transporteurs, récepteurs...) et profondément interconnectés. Pour tenter de clarifier la régulation transcriptionnelle du métabolisme hépatique du cholestérol, les principaux facteurs de transcription et récepteurs nucléaires impliqués dans ce métabolisme ainsi que deux de leurs mécanismes emblématiques sont présentés ci-dessous.

1. Un facteur de transcription : SREBP 2

SREBP 2 appartient à la famille des *sterol regulatory element binding proteins*, elle-même comprise dans la super-famille des facteurs de transcription. Outre SREBP 2, la famille des SREBPs comporte 2 autres isoformes : SREBP 1a et SREBP 1c. Les 3 isoformes de SREBPs fonctionnent selon les mêmes modalités mais ont des champs d'action différents : alors que SREBP 2 contrôle principalement la synthèse et la captation cellulaire du cholestérol, SREBP 1a et 1c agissent sur la lipogénèse, le métabolisme des acides gras et celui du glucose (Horton 2002).

SREBP 2 appartient à la classe des facteurs de transcription dits "*basic-helix-loop-helix-leucine zipper (bHLH-ZIP)*". Ce nom correspond à la description de la structure de leur domaine de liaison à l'ADN. Ce domaine, situé à l'extrémité N-terminale, permet à SREBP 2 de se lier à la séquence d'ADN nommée SRE sur le promoteur du gène-cible.

SREBP 2 est une protéine possédant deux domaines transmembranaires, avec ses extrémités N-terminale et C-terminale dans le cytosol. Elle est synthétisée et ancrée dans le RE sous forme inactive et nécessite un clivage pour pouvoir migrer vers le noyau et activer la transcription de ses gènes-cibles (Brown 2009a). Elle est exprimée dans de nombreux tissus, notamment le rein, le foie, le cœur, le cerveau, etc (Hua 1993). En tant que facteur de transcription, SREBP 2 n'a pas de ligand. Son activation dépend de l'action de protéines adjacentes en réponse à un stimulus.

❖ Mécanisme d'action de SREBP 2

Le mécanisme d'action de SREBP 2 est illustré par la Figure 24. Il a été identifié par l'équipe de Brown et Goldstein (Brown 1997; Brown 2009b; Goldstein 2006).

A l'état basal, le SREBP 2 inactif (125 kDa) est ancré dans la membrane du RE, où il est lié par son extrémité C-terminale à la protéine SCAP. Celle-ci possède un domaine "*sterol sensor*", à l'image d'autres protéines comme l'HMGCoA Réductase (Chang 2006). Lorsque la concentration en stérol diminue, la conformation de SCAP change de façon à permettre la migration vésiculaire du complexe SCAP-SREBP 2 de la membrane du RE vers celle du Golgi. Dans la membrane du Golgi, SREBP 2 est d'abord clivé une première fois au niveau de la boucle luminale par la *site 1 protease* (S1P). La partie N-terminale est ensuite de nouveau clivée par la *site 2 protease* (S2P), ce qui a pour effet de libérer l'extrémité cytosolique contenant le domaine de liaison à l'ADN. Le fragment restant constitue le SREBP 2 actif (60-70 kDa), qui se dimérise et migre alors dans le noyau où il va activer la transcription d'un gène-cible (Lee 2003; Nagoshi 2001). Cette activation nécessite l'intervention d'autres facteurs de transcription pour potentialiser l'effet de SREBP 2 (Weber 2004).

Lorsque la concentration cellulaire en stérols augmente, le transport de SCAP-SREBP 2 vers le Golgi est inhibé. Le mécanisme mis en jeu est différent selon que le stérol accumulé est le cholestérol ou un oxystérol. Lorsque la concentration en cholestérol augmente dans la cellule, celui-ci s'accumule dans la membrane du RE et se lie à SCAP. Cette liaison provoque un changement de conformation de SCAP qui se lie alors à une autre protéine membranaire du RE, INSIG, qui de fait retient le complexe SCAP-SREBP 2 au RE (Goldstein 2006). Lorsque c'est le taux d'oxystérols qui augmente, ceux-ci sont incapables de se lier à SCAP. En revanche, ils se lient à INSIG, induisent un changement conformationnel de celle-ci et empêchent sa liaison à SCAP-SREBP 2 (Brown 2009a).

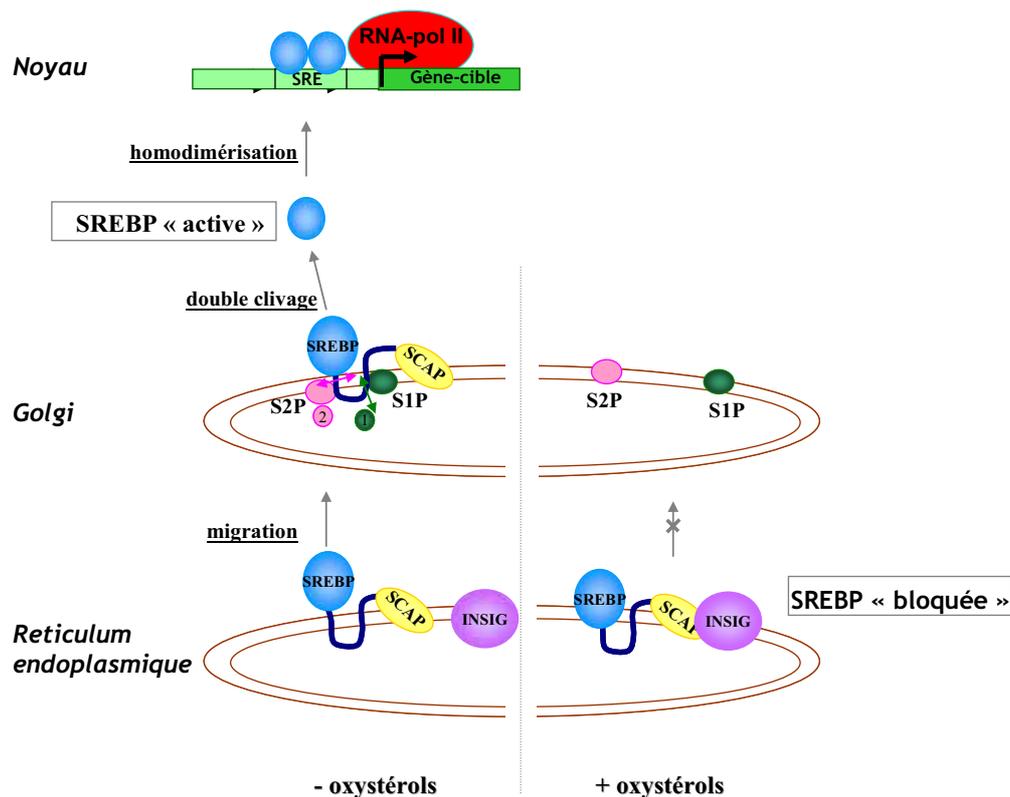


Figure 24 : Schéma du mécanisme d'activation de la transcription par SREBP et du mécanisme d'inhibition par les oxystérols

A l'état basal, SREBP immature est liée à la protéine SCAP dans la membrane du RE. Lors d'une déplétion en stérols cellulaires, SREBP et SCAP migrent vers le Golgi où SREBP subit un double clivage par S1P et S2P, ce qui le libère de son attache membranaire. SREBP s'homodimérise et migre vers le noyau où il se lie à son élément de réponse SRE sur le promoteur de son gène-cible, ce qui active la transcription. En cas d'une trop forte augmentation de la concentration en oxystérols, ceux-ci induisent un changement conformationnel de la protéine INSIG située dans la membrane du RE. INSIG se lie alors à SCAP et retient le complexe SCAP-SREBP dans la membrane du RE. Cela diminue la quantité de forme mature de SREBP, et donc la transcription de ces gènes cibles. (d'après Souidi 2004).

❖ Cibles de SREBP 2

SREBP 2 active la transcription de la majorité des enzymes impliquées dans la biosynthèse du cholestérol, notamment l'HMG-CoA Synthase, l'HMG-CoA Reductase, la squalène synthase et la CYP51, ainsi que celle du LDL-r (Edwards 2000; Horton 2002). En outre, c'est aussi un activateur de la transcription de la nCEH (Natarajan 1998) et d'ABC A1 dans le foie de rat (Tamehiro 2007).

2. Les récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires forment un sous-ensemble des facteurs de transcription. Ils sont caractérisés par la nécessité de lier leur ligand pour être actifs. Ils sont en général transloqués dans le noyau après leur synthèse et agissent souvent sous forme de dimères. La plupart des récepteurs nucléaires intervenant dans la régulation du métabolisme du cholestérol ont longtemps été considérés comme "orphelins", c'est-à-dire sans ligands connus, mais l'identification de ceux-ci a grandement avancé depuis les années 1990.

Les récepteurs nucléaires sont à l'origine du maintien de l'homéostasie métabolique en général, et de celle du cholestérol en particulier. Cet équilibre est obtenu par la conjugaison de leurs influences sur les divers acteurs de ce métabolisme et entre eux. Ainsi, il est rare qu'un seul récepteur nucléaire régule la transcription d'un gène, comme nous avons pu le voir précédemment.

Dans un souci de clarté et de concision, une brève synthèse des caractéristiques majeures des principaux récepteurs nucléaires impliqués dans le métabolisme du cholestérol sera donnée. Par ailleurs, deux des mécanismes les plus importants mis en jeu dans la régulation transcriptionnelle du catabolisme du cholestérol seront détaillés.

a. Exemple de régulation positive : l'activation de la transcription de la CYP7A1 par LXR α -RXR et LRH-1

(1) LXR α

Il existe deux isoformes du récepteur nucléaire LXR : LXR β (NR1H2), qui est ubiquitaire, et LXR α (NR1H3), qui est principalement exprimé dans le foie ainsi que dans le rein, le tissu adipeux, le testicule, les glandes surrénales, la rate et le poumon. Ainsi, les deux isoformes coexistent dans le foie et fonctionnent de la même façon, mais LXR α est le plus actif.

LXR α forme un hétérodimère obligatoire avec RXR. La présence d'un seul ligand (celui de LXR α ou celui de RXR) suffit à potentialiser le dimère et à activer la transcription du gène-cible. Le dimère LXR α -RXR se lie à une séquence d'ADN spécifique nommée *LXR response element* (LXRE) située dans le promoteur du gène-cible (Willy 1997). Comme la plupart des récepteurs nucléaires, LXR α possède plusieurs régions spécifiques, notamment le domaine de liaison à l'ADN (comportant deux "doigts de zinc") qui reconnaît et se lie à la séquence LXRE et le domaine de liaison du ligand en C-terminal.

Il est traditionnellement admis que les ligands naturels de LXR α et LXR β sont les oxystérols. En réalité, seuls certains oxystérols sont de puissants activateurs des LXRs, et d'autres molécules qui ne sont pas chimiquement parlant des oxystérols sont également des ligands de ces récepteurs

nucléaires. Les principaux agonistes endogènes des LXRs sont donnés ci-dessous ([Baranowski 2008](#); [Souidi 2004](#)) :

- ✱ le 20(S)-hydroxycholestérol
- ✱ le 22(R)-hydroxycholestérol
- ✱ le 24(S)-hydroxycholestérol
- ✱ le 25-hydroxycholestérol
- ✱ le 27-hydroxycholestérol
- ✱ le 24(S),25-époxycholestérol
- ✱ l'acide cholesténoïque

L'hétérodimère LXR α -RXR peut suffire à activer l'expression de certains gènes-cibles (par exemple ABC A1), mais dans d'autres cas, l'interaction avec LRH-1 permet de potentialiser l'action de LXR α -RXR (comme pour la CYP7A1 ou la CETP).

❖ Rôles physiologiques et cibles

L'utilisation de souris invalidées pour le gène de LXR α a mis en évidence son implication dans la régulation transcriptionnelle de plusieurs fonctions physiologiques dans divers tissus. Trois des actions principales de LXR α concernent le métabolisme du cholestérol, celui des triglycérides et des acides gras et le maintien de la glycémie. Des revues récentes sont disponibles pour plus de détails sur les actions de LXR α sur les différents métabolismes ([Baranowski 2008](#)) et sur les autres processus biologiques ([Jamroz-Wisniewska 2007](#); [Mouzat 2009a](#)).

En ce qui concerne le **métabolisme du cholestérol**, il a été mentionné précédemment que LXR α activait le catabolisme du cholestérol en augmentant la transcription de la CYP7A1. Chez la souris (mais pas chez le rat), il a également pour cible les gènes des transporteurs ABC G5 et ABC G8 qui éliminent le cholestérol natif dans la bile ([Repa 2002](#)). D'autre part, LXR α active le transport reverse du cholestérol. Ainsi, il a pour gènes-cibles les transporteurs ABC A1 et ABC G1 dans le foie mais surtout dans les tissus périphériques, et en particulier dans les macrophages ([Costet 2000](#); [Venkateswaran 2000](#)). D'autres gènes impliqués dans le transport reverse du cholestérol sont également activés par LXR α dans les tissus périphériques : le gène de l'apo E est régulé par LXR α dans les macrophages (mais pas dans les hépatocytes) de souris ([Laffitte 2001b](#); [Tontonoz 2003](#)) et ceux de la CETP (qui transfère les cholestéryl-esters des HDL aux lipoprotéines plus riches en triglycérides) et de la lipoprotéine lipase chez l'Homme et la souris ([Luo 2000](#); [Zhang 2001b](#)). L'activation conjuguée du catabolisme et du transport reverse du cholestérol expliquent le caractère athéroprotecteur prêté à LXR α .

LXR α régule également le **métabolisme des acides gras et des triglycérides**, en activant la lipogénèse. Il induit notamment la transcription de SREBP 1c, qui domine le contrôle de ce métabolisme ([DeBose-Boyd 2001](#); [Repa 2000a](#)). Ainsi, les souris invalidées pour le gène de LXR α présentent une diminution du taux de SREBP 1c et de ses cibles la stéaroylCoA désaturase et la *fatty acid synthase* ([Peet 1998](#)). Un autre facteur de transcription a été identifié comme intermédiaire possible dans l'activation des gènes lipogéniques : il s'agit du *carbohydrate response element*

binding protein (Cha 2007). Enfin, une activation directe de certains gènes de la lipogénèse par LXR α a également été mise en évidence : c'est le cas notamment de la *fatty acid synthase* (Joseph 2002) et de l'acétylCoA carboxylase α (Talukdar 2006). L'action majeure de LXR α sur le métabolisme des acides gras et des triglycérides est donc une activation de la lipogénèse.

LXR α influe également sur le **métabolisme glucidique** qui passe par une répression de la synthèse du glucose, une diminution de la glycémie et une augmentation de la sensibilité à l'insuline. La plupart des études sur ce sujet mettent en jeu l'action des agonistes synthétiques de LXR α . Ainsi, l'administration de T0901317 diminue la glycémie et améliore la sensibilité à l'insuline chez des rats Zucker, obèses et diabétiques (Cao 2003). Cette même étude indique que LXR α inhibe la transcription de plusieurs gènes de la néoglucogénèse hépatique, en particulier la glucose-6-phosphatase (par un mécanisme indirect encore inconnu) et la phosphoénolpyruvate carboxykinase. Par ailleurs, LXR α augmente l'absorption du glucose par les tissus périphériques en activant les gènes des transporteurs membranaires GLUT 1 dans le tissu adipeux et GLUT 4 dans le muscle (Laffitte 2003).

Outre les métabolismes développés ci-dessus, d'autres processus biologiques sont soumis à une régulation par LXR α et/ou LXR β . Ainsi, la régulation du métabolisme du cholestérol dans les glandes surrénales influe sur la **stéroïdogénèse**, en particulier avec l'activation par LXR α de la *steroidogenic acute regulatory protein* (StAR) qui transporte le cholestérol jusqu'à la mitochondrie où débute sa conversion en hormones stéroïdiennes (Cummins 2006). Les LXRs sont également impliqués à divers niveaux dans la fonction de **reproduction** (Mouzat 2009a), notamment dans le maintien de la structure et de la fonction testiculaires (Volle 2007) et dans le contrôle de l'ovulation (Mouzat 2009b). Enfin, les LXRs induisent également une diminution de la transcription des gènes impliqués dans l'**inflammation** *in vivo* et *in vitro*, notamment la NO-synthase inductible, la cyclooxygénase-2 et l'interleukine-6 (Joseph 2003).

Comme ses gènes-cibles, LXR α est lui-même soumis à une régulation de sa transcription et de son activité. Là encore, les interactions dépendent de l'espèce, du tissu et ne sont pas toujours bien définies. Les éléments de régulation mentionnés ci-dessous ne sont donc pas exhaustifs.

Les acides gras insaturés activent la transcription de LXR α (mais pas de LXR β) dans les hépatocytes de rats *in vitro* et *in vivo*, probablement par une activation *via* PPAR α dont ce sont les ligands naturels (Tobin 2000). En revanche, les acides gras poly-insaturés semblent avoir un effet contraire chez l'Homme : une étude sur des cellules rénales embryonnaires (HEK293) relève une répression de la transcription de LXR α par compétition avec le ligand (Yoshikawa 2002). Par ailleurs, il existe un axe de régulation positive PPAR γ -LXR α -ABC A1 dans les macrophages humains et murins (Chawla 2001; Laffitte 2001a). PPAR γ conduit également à l'auto-activation de LXR α dans les macrophages humains, mais pas murins (Laffitte 2001a). Toujours chez l'Homme, une interaction directe a été mise en évidence entre le récepteur nucléaire répresseur SHP et les deux isoformes de LXR dans des cellules de colon de la lignée Caco-2 (Brendel 2002).

En définitive, LXR α est un des récepteurs nucléaires majeurs impliqués dans le métabolisme du cholestérol. Il est activé par certains oxystérols et est considéré comme le récepteur nucléaire "senseur de stérols". Agissant à plusieurs niveaux, LXR α a une action anti-athérogène puisqu'il active le catabolisme du cholestérol dans le foie et le transport reverse dans les tissus périphériques. Il favorise en outre la lipogénèse, la néoglucogénèse et a des effets anti-inflammatoires. Cependant, il ne peut agir seul et forme obligatoirement un hétérodimère avec le récepteur nucléaire RXR.

(2) RXR

RXR (NR2B1-3) est un récepteur nucléaire très répandu et largement conservé au cours de l'évolution. Il possède une structure classique comprenant les quatre domaines principaux, et son domaine de liaison à l'ADN comporte également deux "doigts de zinc" (Szanto 2004). Il y a trois isoformes de RXR, codés par trois gènes différents. Ces isoformes ont un profil d'expression tissulaire spécifique : RXR α est principalement exprimé dans le foie, le rein, le poumon, la rate et le placenta, RXR β est ubiquitaire et RXR γ est surtout exprimé dans le muscle et le cœur (Germain 2006; Mangelsdorf 1992). Les trois isoformes de RXR ont pour ligand à forte affinité l'acide 9-cis-rétinoïque (9-CRA) (Heyman 1992), cependant l'éventuelle identification d'un autre ligand endogène de RXR est toujours en suspens. (Wolf 2006).

RXR est un partenaire d'hétérodimérisation obligatoire pour de nombreux récepteurs nucléaires. Le *thyroid hormone receptor* (TR), les *retinoic acid receptors* (RAR) et le *vitamin D receptor* (VDR) ont été les premiers partenaires identifiés. La plupart des récepteurs nucléaires contrôlant le métabolisme du cholestérol doivent également former des hétérodimères avec RXR pour être fonctionnels : c'est le cas des LXRs, de FXR et des PPARs (Desvergne 2007). RXR peut avoir différents rôles selon la nature de son partenaire : les hétérodimères formés avec les LXRs, FXR et les PPARs sont dits permissifs car ils peuvent être activés par la liaison du ligand de RXR seul ou du ligand du partenaire seul ou encore par la liaison simultanée des deux ligands, ce qui provoque une action synergique. En revanche, les hétérodimères formés avec les RARs, VDR ou TR sont dits non-permissifs car ils ne peuvent être activés que par la liaison du ligand du partenaire de RXR (Germain 2006). Enfin, RXR peut également activer la transcription de certains gènes sous forme d'homodimère (Ijpenberg 2004).

RXR a une **action pléiotropique sur le métabolisme**, puisque sa fonction est dépendante de celle de son partenaire d'hétérodimérisation. Ainsi, il peut à la fois activer la transcription de la CYP7A1 par l'action du dimère LXR-RXR, et participer à sa répression par le dimère FXR-RXR. Par ailleurs, l'action de RXR seul est difficile à déterminer tant que demeure l'incertitude sur son ligand endogène. Cependant, il est démontré que RXR joue un rôle particulièrement important dans l'**embryogénèse** et le développement, comme l'a montré la génération de souris invalidées pour chacun des 3 isoformes. En effet, les souris RXR α ^{-/-} présentent une létalité embryonnaire vers 15 jours et des malformations cardiaques et oculaires (Kastner 1994). Si la mutation de RXR α est générée dans le foie de souris adultes, des perturbations sérieuses du métabolisme lipidique notamment liées à l'action de LXR α et de PPAR α sont observées, ce qui réaffirme le caractère

indispensable de RXR α dans le foie. Ainsi, on constate une augmentation du taux de CYP7A1 et une accumulation de cholestérol hépatique en cas d'apport alimentaire de cholestérol (Wan 2000a; Wan 2000b). Les souris RXR $\beta^{-/-}$ présentent une mortalité embryonnaire de 50 % et des défauts dans la spermatogénèse qui provoquent la stérilité des souris mâles (Kastner 1996). Les souris RXR $\gamma^{-/-}$ n'ont aucune létalité embryonnaire mais présentent une augmentation de l'activité métabolique générale due à une résistance à l'hormone thyroïdienne (Brown 2000).

Ainsi, la particularité de RXR réside dans sa qualité de partenaire obligatoire d'hétérodimérisation pour de nombreux récepteurs nucléaires, ce qui en fait un régulateur central de l'activité métabolique de tissus et de l'embryogénèse. Son rôle est particulièrement important dans le métabolisme lipidique du foie, où il permet entre autre l'action de LXR α , FXR et des PPARs. Ainsi, il est par exemple indispensable à l'activation de la transcription du gène de la CYP7A1 par le dimère LXR α -RXR α . Cependant, ce dimère n'est pas suffisant à activer cette transcription : il doit interagir avec un autre récepteur nucléaire : LRH-1.

(3) LRH-1

Le liver receptor homolog-1 (LRH-1, NR5A2), également appelé *a-fetoprotein transcription factor* (FTF), est un récepteur nucléaire principalement exprimé dans le foie, l'intestin, le pancréas et l'ovaire (Fayard 2004). Il fonctionne en monomère, n'a pas de ligand connu à l'heure actuelle et est actif de façon constitutive, c'est-à-dire sans la présence de ligand (Fayard 2004).

La régulation de LRH-1 varie selon les espèces. Des sites de liaison aux facteurs de transcription GATA ont été identifiés sur les promoteurs humain et murin de LRH-1 (Pare 2001). En revanche, LRH-1 lui-même et HNF 4 α régulent positivement sa transcription chez la souris mais pas chez l'Homme, tandis que HNF 1 et HNF3 β l'activent chez l'Homme mais pas chez la souris (Zhang 2001a). La transcription de LRH-1 dans le foie semble augmentée après traitement par les acides biliaires chez le rat et l'Homme (Chen 2001; Yang 2002), mais pas chez la souris (Lu 2000). L'activité de LRH-1 est réprimée soit par des co-répresseurs comme la protéine SMRT (*silencing mediator for retinoid and thyroid receptors*), soit par des récepteurs nucléaires négatifs comme SHP (Lee 2002; Xu 2003).

❖ Rôles physiologiques et cibles

Parmi les gènes régulés par LRH-1, on retrouve plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol. On peut citer notamment la CYP7A1, la CYP8B1 (chez le rat et la souris mais pas chez l'Homme), SR-B1, ABC A1, Apo A-I, SHP, la CETP, ainsi que des transporteurs intestinaux des acides biliaires (Fayard 2004). LRH-1 joue également un rôle crucial pendant l'embryogénèse, car les souris mutées pour le gène de LRH-1 ne survivent pas au-delà du 7^{ème} jour de vie embryonnaire (Fayard 2004; Pare 2001). Enfin, LRH-1 régule la stéroïdogénèse à travers la CYP19A1 et SR-B1, il est donc particulièrement important dans les tissus stéroïdogènes. Il est notamment très fortement exprimé dans l'ovaire, où il contribuerait à la maturation folliculaire et à la fonction lutéale (Fayard 2004).

(4) Mécanisme d'activation de la transcription du gène de la CYP7A1 par LXR α -RXR et LRH-1

Le mécanisme décrit ci-après est illustré par la [Figure 25](#).

En l'absence de ligand, le dimère LXR α -RXR est constitutivement lié à l'ADN sur la séquence LXRE du promoteur de la CYP7A1. Son action est inhibée par la présence de co-répresseurs comme le *nuclear receptor corepressor* (N-CoR) et SMRT ([Hu 2003](#)).

Suite à la liaison d'un ligand de LXR α (oxystérols) ou de RXR (9-CRA) ou des deux, les co-répresseurs se dissocient du complexe LXR α -RXR et des co-activateurs sont recrutés. Différents co-activateurs de LXR α ont été décrits, notamment le *ppary co-activator 1a* (PGC-1 α) ou la *glucocorticoid receptor interacting protein 1* (GRIP1).

Il a été démontré que cette "fonctionnalisation" du complexe LXR α -RXR par ses ligands n'est pas suffisante pour déclencher la transcription du gène de la CYP7A1 : la présence de LRH-1 est nécessaire ([Lu 2000](#)). Il est communément admis que c'est une interaction physique entre LRH-1 et le complexe LXR α -RXR qui permet la transcription du gène.

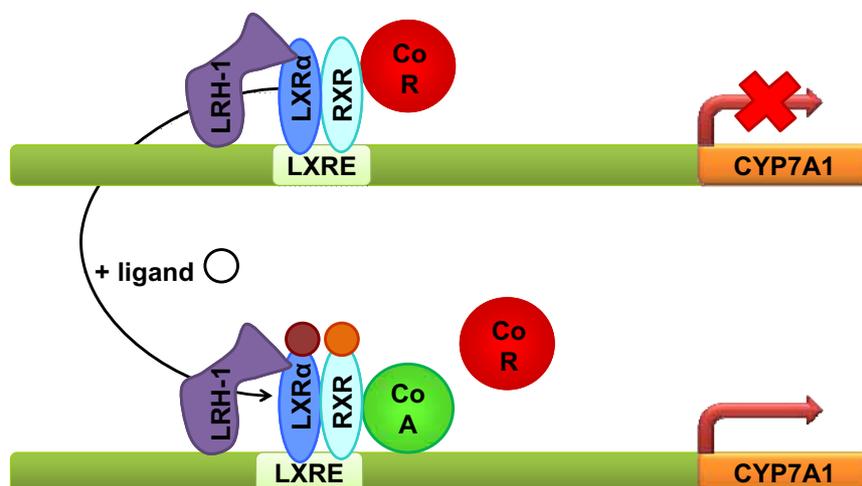


Figure 25 : Schéma du mécanisme d'activation de la transcription du gène de la CYP7A1 par les récepteurs nucléaires LXR α -RXR et LRH-1

A l'état basal, LXR α et RXR sont fixés sous forme d'hétérodimère sur l'élément de réponse à LXR α (LXRE) sur le promoteur du gène de la CYP7A1. LRH-1 est fixé sur le promoteur sur une séquence différente et interagit avec le dimère LXR α -RXR. L'action de co-répresseurs (Co R) interagissant avec LXR α -RXR empêche la transcription du gène. La liaison du ligand entraîne la dissociation des co-répresseurs et le recrutement de co-activateurs (Co A), ce qui provoque la transcription du gène de la CYP7A1.

Comme mentionné précédemment, le mécanisme décrit ci-dessus n'est pas le seul à activer la transcription de la CYP7A1 chez le rat, puisqu'il existe également un mécanisme impliquant HNF 4 α .

Les récepteurs nucléaires décrits jusqu'ici (LXR α -RXR, LRH-1) sont fortement impliqués dans le métabolisme du cholestérol hépatique et ont pour conséquence l'activation des voies qu'ils régulent. De par son action sur de nombreux gènes de ce métabolisme, LRH-1 apparaît comme un élément central de régulation transcriptionnelle. Si LXR α peut être schématiquement considéré comme favorisant l'élimination du cholestérol par son action sur différentes voies métaboliques (transport reverse, catabolisme), il est contrebalancé par FXR, dont l'action aboutit à une diminution de la transformation du cholestérol en acides biliaires. Ceux-ci étant les ligands de FXR, ils opèrent un rétrocontrôle négatif sur leur propre synthèse.

b. Exemple de rétrocontrôle négatif : la répression de la transcription du gène de la CYP7A1 par la cascade FXR-SHP-LRH-1

(1) FXR

Il existe deux isoformes du récepteur nucléaire FXR (NR1H4) : FXR α , qui est exprimé principalement dans le rein, le foie, l'intestin ainsi que dans les glandes surrénales et l'ovaire, et FXR β , qui est exprimé dans le foie et le testicule. Les deux isoformes existent chez le rat et la souris. En revanche, le gène codant pour FXR β est un pseudogène chez les primates et il n'y a donc pas de protéine FXR β chez l'Homme (Fiorucci 2007). Par la suite, le terme FXR désigne l'isoforme le plus étudié, FXR α .

FXR peut se lier à l'ADN en tant que monomère mais le plus souvent il agit sous forme d'hétérodimère avec RXR (Lefebvre 2009). Cet hétérodimère est de type permissif : la présence du ligand d'un seul des deux partenaires suffit à potentialiser le dimère et à activer la transcription du gène-cible. Le dimère FXR-RXR se lie à une séquence spécifique sur le promoteur du gène-cible nommée *FXR response element* (FXRE). Comme la plupart des récepteurs nucléaires impliqués dans le métabolisme du cholestérol, le domaine de liaison à l'ADN de FXR comporte deux "doigts de zinc".

Les ligands naturels des FXRs sont certains acides biliaires, et plus particulièrement des acides biliaires hydrophobes (Makishima 1999):

- ✱ l'acide chénodésoxycholique (forte affinité)
- ✱ l'acide lithocholique (faible affinité)
- ✱ l'acide désoxycholique (faible affinité)

❖ Rôles physiologiques et cibles

Les souris FXR^{-/-} présentent une perturbation de l'homéostasie lipidique et des acides biliaires, avec notamment une augmentation des transcrits de la CYP7A1 mais une diminution du pool total d'acides biliaires (Sinal 2000). Ceci confirme que FXR intervient de façon majeure dans le métabolisme du cholestérol, et ce à plusieurs niveaux. En outre, il module également le métabolisme des lipoprotéines et du glucose.

En ce qui concerne le **métabolisme du cholestérol**, FXR agit à différents niveaux.

Il réprime la synthèse hépatique des acides biliaires en inhibant la transcription du gène de la CYP7A1 de deux façons : *via* la cascade FXR-SHP-LRH-1 (Goodwin 2003), ou par un mécanisme indépendant de SHP (Holt 2003). Dans ce dernier mécanisme, FXR active la transcription du *fibroblast growth factor 19* (FGF19). Celui-ci se lie sur son récepteur et active la voie JNK, ce qui provoque la phosphorylation et donc l'inhibition de HNF 4 α qui active la transcription de la CYP7A1.

Outre la répression de la synthèse des acides biliaires, FXR active également l'excrétion hépatique et intestinale des acides biliaires *via* les différents transporteurs : bile salt export pump (BSEP), MDR2 sur la membrane canaliculaire des hépatocytes, et MRP2 et *intestinal bile acid binding protein* (I-BABP) dans l'entérocyte (Lefebvre 2009).

Par ailleurs, il favorise l'excrétion biliaire du cholestérol *via* l'activation d'ABC G5/G8 et l'inhibition de SR-B1 chez la souris (Repa 2002) et chez le rat *in vitro* mais pas *in vivo* (Dieter 2004).

FXR a un effet hypotriglycéridémiant *via* son action sur le **métabolisme des lipoprotéines**. Cette diminution des triglycérides plasmatiques est supposée due à une diminution de la sécrétion des VLDL hépatiques et à une répression de SREBP 1c qui active la synthèse des triglycérides et des acides gras (pour plus de détails voir (Fiorucci 2007; Lee 2006; Lefebvre 2009)).

FXR influe également sur le **métabolisme glucidique**. Il génère une répression de la néoglucogénèse par l'inhibition de la transcription des gènes de la PEPCK et de la glucose-6-phosphatase (Ma 2006; Zhang 2006). Par ailleurs, FXR augmente la sensibilité à l'insuline (Cariou 2006; Ma 2006).

❖ Régulation de FXR

La régulation de la transcription de FXR est assez peu décrite. L'activation transcriptionnelle du gène de FXR peut se faire par l'interaction de PPAR γ , HNF 4 α et PGC-1 chez la souris (Zhang 2004). Chez l'Homme, l'action positive de HNF 1 α a été récemment mise en évidence *in vitro* (Lou 2007).

Le glucose stimule la production de FXR chez le rat tandis que l'insuline la réprime (Duran-Sandoval 2004). De même, la production de TNF α et d'interleukine 1 inhibe la transcription de FXR chez la souris (Kim 2003).

En définitive, FXR se présente dans la littérature comme un senseur d'acides biliaires car il est l'instrument de leur rétrocontrôle négatif. Par ailleurs, il favorise l'élimination des acides biliaires, il diminue le taux de triglycérides plasmatiques et améliore la sensibilité à l'insuline.

FXR étant un récepteur nucléaire de type activateur, ses actions répressives sont indirectes. Elles peuvent par exemple être médiées par le récepteur nucléaire SHP.

(2) SHP

SHP (NR0B2) est un récepteur nucléaire atypique : il ne possède pas de domaine de liaison à l'ADN et interagit obligatoirement avec d'autres récepteurs nucléaires déjà fixés sur l'ADN. Ainsi, il influe sur la régulation transcriptionnelle des gènes uniquement par le biais d'une interaction protéine-protéine et non par une action sur l'ADN. Bien qu'il possède un domaine de liaison du ligand, aucun agoniste naturel de SHP n'est connu, ce qui le classe parmi les récepteurs nucléaires orphelins. Autre caractéristique rare parmi les récepteurs nucléaires, SHP réprime la transcription de la plupart de ses cibles, comme par exemple LRH-1. D'un point de vue moléculaire, l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de LRH-1 par SHP peut se faire par 3 mécanismes (Bavner 2005; Lee 2002) :

- par compétition avec les coactivateurs de LRH-1 qui se lient normalement sur son domaine de transactivation AF2
- par recrutement de co-répresseurs liés à SHP
- par induction directe de la dissociation de LRH-1 de l'ADN, soit en empêchant cette liaison, soit par un déplacement du complexe SHP-LRH-1.

❖ Cibles

Dans la littérature, les cibles de SHP peuvent correspondre soit au récepteur nucléaire avec lequel SHP interagit, soit avec le gène dont la transcription est réprimée par cette interaction. Par ailleurs, la plupart des études menées sur SHP l'ont été chez la souris et l'Homme, il y a donc peu de données disponibles chez le rat.

SHP interagit avec de nombreux récepteurs nucléaires. Parmi ceux dont l'activité est directement inhibée par SHP, on peut citer LRH-1, HNF 4 α , RXR, LXR α , FXR (qui active la transcription de SHP), PXR, le récepteur aux oestrogènes et le récepteur aux glucocorticoïdes (Bavner 2005; Boulias 2005; Brendel 2002; Goodwin 2003; Lee 2000; Lu 2000). De façon surprenante, SHP interagit également de façon directe avec PPAR γ pour activer sa transcription (Nishizawa 2002). Par ailleurs, SHP inhibe sa propre transcription *in vitro* et *in vivo* chez la souris (del Castillo-Olivares 2004).

En ce qui concerne les gènes cibles "finaux" régulés par l'action de SHP, ils couvrent un vaste champ. Dans la synthèse des acides biliaires, SHP inhibe la transcription des gènes de la CYP7A1 (Lu 2000) de la CYP8B1 (del Castillo-Olivares 2001) chez le rat et la souris, ainsi que celui de la CYP7B1 chez la souris (Boulias 2005). En ce qui concerne le transport du cholestérol, SR-B1 est inhibé par un mécanisme indirect chez la souris, tandis qu'ABC A1 est activé chez la souris mais inhibé chez l'Homme (Bavner 2005).

Outre ces actions sur le métabolisme du cholestérol (répression de la synthèse des acides biliaires, diminution du transport reverse), SHP intervient dans de nombreux aspects des différents métabolismes qui ne seront pas détaillés ici (Bavner 2005; Boulias 2005). Il induit entre autres une répression de la néoglucogénèse et de la stéroïdogénèse, une activation de la synthèse des acides gras et une modulation du transport des acides biliaires.

SHP est donc un récepteur nucléaire particulier, sans domaine de liaison à l'ADN et qui réprime la majorité de ses gènes-cibles "finaux" en inhibant l'activité des récepteurs nucléaires traditionnels. Son spectre d'interaction étant très large, il est impliqué dans de nombreux processus métaboliques et physiologiques, et notamment dans la répression de la synthèse des acides biliaires. Le mécanisme de cette action est développé ci-dessous en prenant l'exemple de la répression transcriptionnelle du gène de la CYP7A1, provoquée par les acides biliaires.

(3) Mécanisme du rétrocontrôle négatif des acides biliaires sur la CYP7A1 : la cascade FXR-SHP-LRH-1

La boucle de rétrocontrôle négatif des acides biliaires sur leur propre synthèse via la répression transcriptionnelle de la CYP7A1 est bien documentée (Goodwin 2003; Lu 2000). Elle est illustrée par la Figure 26.

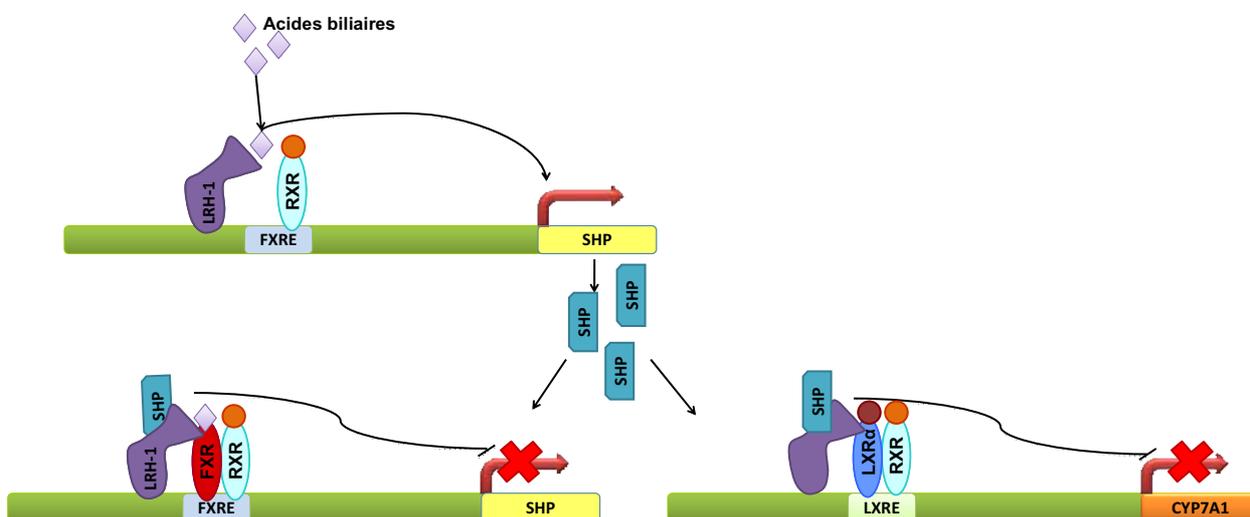


Figure 26 : Schéma du mécanisme répression de la transcription du gène de la CYP7A1 par les acides biliaires via FXR et SHP

Les acides biliaires sont les ligands de FXR et répriment leur propre synthèse par son intermédiaire. L'activation de FXR par les acides biliaires entraîne la transcription du gène de SHP et la synthèse de molécules de SHP qui vont se lier à LRH-1 positionné sur le promoteur du gène de la CYP7A1. Cette liaison empêche l'interaction de LRH-1 avec LXRα-RXR et inhibe la transcription de ce gène. Par ailleurs, les molécules de SHP inhibent leur propre synthèse par un mécanisme similaire sur le promoteur de leur gène. (d'après Lu 2000)

L'activation de la transcription du gène de la CYP7A1 par l'ensemble LXRα-RXR-LRH-1 induit une augmentation de la production d'acides biliaires. L'acide chénodésoxycholique, directement issu de cette voie de synthèse, ou les acides désoxycholique et lithocholique, issus du cycle entérohépatique, sont les ligands endogènes du récepteur nucléaire FXR. En cas d'accumulation intracellulaire excessive, ces acides biliaires vont se lier au complexe FXR-RXR fixé constitutivement sur le promoteur du gène de SHP, gène-cible de FXR. Cette liaison induit un changement de

conformation qui dissocie les co-répresseurs liés au dimère FXR-RXR et recrute des co-activateurs qui facilitent la transcription, et donc la synthèse de molécules de SHP. Celles-ci vont interagir avec leurs diverses cibles, parmi lesquelles le LRH-1 fixé sur le promoteur du gène de la CYP7A1. L'interférence de SHP sur LRH-1 provoque la rupture de l'interaction entre LRH-1 et le complexe LXR α -RXR, et donc la répression de la transcription du gène de la CYP7A1. Par ailleurs, LRH-1 est également présent sur le promoteur du gène de SHP, qui réprime donc sa propre synthèse.

Comme mentionné précédemment, les acides biliaires opèrent leur rétrocontrôle négatif en partie par ce mécanisme, mais pas uniquement. D'autres voies sans intervention de SHP ont été citées, par exemple *via* la PKC et l'inhibition de HNF 4 α ou encore *via* FXR et FGF19.

La cascade de régulation décrite ci-dessus met en jeu deux récepteurs nucléaires particulièrement importants dans le métabolisme du cholestérol : FXR, le senseur d'acides biliaires, et SHP, le récepteur nucléaire atypique à l'action majoritairement inhibitrice. Cette voie de régulation a comme particularité de réprimer la transcription d'un gène sans qu'il n'y ait d'action directe du facteur répresseur avec l'ADN du gène-cible.

Parmi les récepteurs nucléaires décrits jusqu'ici, LXR α et FXR sont deux éléments-clés du catabolisme du cholestérol : par leurs effets antagonistes, ils régulent finement la biosynthèse des acides biliaires. Bien qu'ils interviennent également dans d'autres métabolismes, leur action majeure est liée au métabolisme du cholestérol. A l'inverse, d'autres récepteurs nucléaires influent sur la régulation du métabolisme hépatique du cholestérol bien que ce ne soit pas leur champ d'action principal. Ils n'en sont pas moins des éléments importants pour le maintien de l'homéostasie du cholestérol dans le foie et dans l'organisme.

c. Autres récepteurs nucléaires : HNFs et PPARs

Les récepteurs nucléaires présentés ci-dessous interviennent dans le métabolisme du cholestérol et des acides biliaires bien que ce ne soit pas leur rôle principal. La littérature est donc beaucoup moins fournie en ce qui concerne leur action sur notre métabolisme d'intérêt. Leur influence est néanmoins importante, c'est pourquoi nous avons choisi de procéder à une présentation succincte, parfois schématique, selon les données disponibles.

(1) Les HNFs

❖ HNF 4 α

HNF 4 α (NR2A1) est un récepteur nucléaire impliqué dans de très nombreux processus physiologiques dans le foie, comme la synthèse des acides biliaires, le métabolisme des xénobiotiques, celui des acides gras, la glycolyse, la néoglucogénèse, l'urogénèse, la différenciation hépatocytaire et la synthèse de facteurs intervenant dans la coagulation sanguine. Chez l'Homme, il régule pas moins de 910 gènes dans les hépatocytes (Odom 2004).

HNF 4 α est exprimé principalement dans le foie, mais aussi dans l'estomac, l'intestin, le rein, le pancréas et plus faiblement dans le tissu adipeux. Il agit sous forme d'homodimère. Les acides gras interagissent avec HNF 4 α au niveau du domaine de liaison du ligand (Petrescu 2002; Schroeder 2008), mais la nature exacte de cette interaction et son rôle sur l'activation de HNF 4 α sont encore questionnés (Gonzalez 2008).

La mutation du gène humain de HNF 4 α est impliquée notamment dans le diabète du type adulte chez des jeunes et dans le diabète de type 2 (Gupta 2004; Love-Gregory 2007). Chez l'animal, les souris invalidées pour le gène de HNF 4 α présentent une mortalité embryonnaire totale (Chen 1994). L'inactivation hépatique de ce gène chez des souris adultes entraîne des perturbations de l'homéostasie lipidique, notamment une augmentation de la concentration plasmatique des acides biliaires, une hypocholestérolémie et une diminution de certains transporteurs des acides biliaires (Hayhurst 2001).

❖ Cibles de HNF 4 α dans le métabolisme du cholestérol

HNF 4 α active la transcription de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol. Relativement peu d'études ont été menées chez le rat, mais différents travaux ont établi une régulation positive de HNF 4 α sur les gènes de la CYP7A1 (Crestani 1998; Stroup 2000), de la CYP8B1 (Yang 2002) et des transporteurs ABC G5 et ABC G8 (Sumi 2007) dans cette espèce. Des résultats contradictoires ont été obtenus concernant l'apo A-I (Chan 1993; Murao 1997). En revanche, les données sont plus nombreuses chez la souris : le gène de la CYP7A1 ne semble pas être régulé par HNF 4 α dans cette espèce, contrairement aux autres enzymes (CYP27A1, CYP7B1, CYP8B1) qui sont régulées positivement (Inoue 2006). C'est également le cas des gènes de l'Apo B, de HNF 1 α (Inoue 2006) et de FXR (Zhang 2004).

L'action de HNF 4 α est inhibée par différents facteurs : par l'interférence de SHP (Goodwin 2003), par phosphorylation (Gupta 2001; Kerr 2002) qui peut être initiée par les acides biliaires et suivre différentes voies (Chiang 2004), par PXR (Bhalla 2004) qui est aussi un de ses gènes cibles ou encore par l'insuline (Oyadomari 2000).

❖ HNF 1 α

Comme HNF 4 α , HNF 1 α est impliqué dans de nombreux processus biologiques hépatiques, mais à une échelle beaucoup plus modeste en terme de gènes régulés (Odom 2004). La mutation du gène de HNF 1 α est impliquée dans le diabète de type 2, le nanisme, et est associée à une dysfonction hépatique, à une hypercholestérolémie et à des perturbations du métabolisme des HDL (Shih 2001).

HNF 1 α est en interrelation avec HNF 4 α qui active sa synthèse (Jung 2003). Comme lui, il est inhibé par les acides biliaires *via* SHP (Jung 2003; Rao 1999). Chez la souris, HNF 1 α semble activer la voie alternative de biosynthèse des acides biliaires : il régule positivement les gènes de la CYP27A1 et de la CYP7B1, ainsi que celui de la CYP8B1, mais il inhibe celui de la CYP7A1 (Cheung 2003; Shih 2001). L'activation de la transcription du gène de la CYP27A1 est également observée chez le rat et l'Homme (Memon 2001; Rao 1999), tandis que celle du gène de la CYP7A1 est activée

chez l'Homme mais pas chez le rat (Chen 1999). La transcription du gène de FXR est activée par HNF 1 α chez l'Homme et la souris (Lou 2007; Shih 2001), celle de LRH-1 chez l'Homme mais pas chez la souris (Zhang 2001a). Par ailleurs, HNF 1 α régule également de façon positive la transcription du gène de l'ACAT dans le foie humain (Pramfalk 2005).

Au-delà de leurs multiples rôles biologiques, HNF 4 α et HNF 1 α sont donc des éléments importants de la régulation transcriptionnelle du métabolisme du cholestérol. En particulier, HNF 4 α joue un rôle essentiel de par sa distribution et son large spectre de gènes-cibles. Ces deux récepteurs nucléaires sont impliqués dans l'activation de la biosynthèse des acides biliaires et dans le transport reverse.

(2) Les PPARs

Les PPARs sont les récepteurs nucléaires majeurs du métabolisme énergétique. Il existe trois isoformes de PPARs : PPAR α , PPAR β/δ et PPAR γ . PPAR α est principalement exprimé dans le tissu adipeux brun, le foie (où il est l'isoforme majeur), le rein, le cœur et l'intestin, PPAR β/δ est exprimé dans la peau, l'intestin, le placenta, le muscle squelettique, le tissu adipeux et le cerveau, et enfin PPAR γ est exprimé dans le tissu adipeux, l'intestin, le cerveau et les cellules vasculaires, immunitaires ou inflammatoires (Michalik 2006).

Les PPARs fonctionnent sur le modèle de LXR α : ils forment un hétérodimère permissif avec RXR, sont constitutivement fixés au promoteur du gène-cible sur une séquence *peroxisome proliferator response element* (PPRE) et nécessitent la coopération de co-activateurs (par exemple : PGC-1) ou de co-répresseurs (par exemple NCoR ou SMRT) pour réguler la transcription de leurs gènes-cibles (Michalik 2006). L'activité des PPARs est modulée au niveau post-traductionnel par phosphorylation, ubiquitinylation ou sumoylation (Feige 2006).

Ils influent sur de nombreux processus métaboliques et sont d'ailleurs des cibles thérapeutiques pour lutter contre le syndrome métabolique (Akiyama 2005). De multiples revues sont disponibles sur les rôles des PPARs (Desvergne 2006; Feige 2006; Francis 2003; Michalik 2006; Staels 2007).

❖ PPAR α

Les ligands naturels de PPAR α (NR1C1) sont les acides gras et leurs dérivés. En particulier, deux acides gras poly-insaturés à longue chaîne, l'acide docosahexaénoïque (DHA) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA), ainsi que les dérivés de l'acide arachidonique sont de puissants activateurs de PPAR α (Bishop-Bailey 2003; Francis 2003). En outre, les fibrates sont une famille d'agonistes synthétiques de PPAR α utilisés en thérapeutique (Bishop-Bailey 2003).

PPAR α a de multiples rôles métaboliques, allant dans le sens d'une consommation des lipides. Il active le catabolisme des acides gras (Kersten 1999), le catabolisme du cholestérol (Li 2009), la néoglucogenèse (Kersten 2002), et il contrôle la synthèse des lipoprotéines (Staels 1995). Ces diverses actions résultent en une diminution des triglycérides plasmatiques, de la stéatose

hépatique et en une meilleure sensibilité à l'insuline (Michalik 2006). PPAR α a également une action anti-inflammatoire (Chung 2008).

Cibles de PPAR α dans le métabolisme du cholestérol (Feige 2006; Li 2009) :

Les fibrates diminuent l'activité de l'HMGCoA Réductase et donc la synthèse du cholestérol. Chez le rat, il a été montré que PPAR α induit INSIG, qui empêche l'activation de SREBP 2. L'absorption intestinale du cholestérol est également diminuée par le clofibrate et le jeûne (qui active PPAR α).

En ce qui concerne le transport du cholestérol, PPAR α active la transcription du gène de l'Apo A-I chez l'Homme mais pas chez le rat. PPAR α régule également de manière positive la transcription des gènes d'ABC A1 et ABC G1 dans les macrophages humains et murins, probablement par l'activation de LXR α . En outre, PPAR α active la transcription des transporteurs ABC G5 et ABC G8.

L'administration de fibrates chez le rat et l'Homme résulte en une répression de la CYP7A1 par voie indirecte, et dans une moindre mesure répression de la CYP27A1 chez la souris. Au contraire, la transcription de la CYP8B1 est activée après administration de clofibrate chez le rat et la souris, par une action directe de PPAR α sur le promoteur du gène.

Une interaction entre PPAR α et LXR α a été décrite, cependant ses modalités semblent dépendantes de l'espèce et du tissu. Ainsi, dans le foie de souris LXR α inhibe la transcription de PPAR α tandis qu'elle l'active dans l'intestin. En outre, LXR α a été décrit comme gène-cible de PPAR α . Cependant, ces interactions pourraient être plus liées au métabolisme des acides gras (notamment par l'induction directe et indirecte de SREBP 1c) qu'à celui du cholestérol. Par ailleurs, l'induction de PPAR α par FXR est décrite chez l'Homme mais pas chez la souris. Enfin, SHP interagit physiquement avec PPAR α pour augmenter son activité transcriptionnelle.

❖ **PPAR γ**

PPAR γ (NR1C3) joue un rôle essentiel dans la différenciation et les fonctions des adipocytes et diminue l'inflammation (Feige 2006). Par ailleurs, il améliore la sensibilité à l'insuline et promeut le stockage des lipides. Comme PPAR α , les ligands naturels de PPAR γ sont les acides gras et leurs dérivés (Michalik 2006). Par ailleurs, plusieurs classes d'agonistes synthétiques de PPAR γ ont été identifiées, la plus connue étant la classe des glitazones (Bishop-Bailey 2003).

Cibles de PPAR γ dans le métabolisme du cholestérol (Feige 2006; Li 2009) :

Un traitement par la troglitazone induit une diminution de la synthèse du cholestérol.

Comme PPAR α , PPAR γ augmente la transcription d'ABC A1 *via* LXR α dans les macrophages humains et murins. Contrairement à PPAR α , PPAR γ active la transcription de la CYP27A1, notamment dans les macrophages. Enfin, les interactions de PPAR γ avec les autres récepteurs nucléaires impliqués dans le métabolisme du cholestérol rejoignent en partie celles de PPAR α : dans les macrophages, PPAR γ active LXR α et FXR (chez la souris), et SHP facilite l'activité de PPAR γ par une interaction directe sur le promoteur de certains gènes-cibles.

Ainsi, PPAR α et PPAR γ sont deux récepteurs nucléaires modulant de nombreux processus métaboliques. PPAR α a une action plutôt tournée vers la consommation des lipides, et PPAR γ vers leur stockage. Concernant le métabolisme du cholestérol, les PPARS inhibent la synthèse du cholestérol et favorisent le transport reverse mais inhibent la synthèse des acides biliaires.

La plupart des études visant à déterminer les cibles des PPARs ont été menées par administration d'agonistes synthétiques. L'importance physiologique des mécanismes ainsi identifiés reste donc à déterminer.

Outre les récepteurs nucléaires cités ci-dessus, d'autres éléments de régulation sont décrits dans la littérature ou sont à l'étude. Ainsi, on peut citer l'exemple de VDR, qui inhibe l'action de LXR α et donc la transcription de la CYP7A1 chez le rat (Jiang 2006). De même, outre l'activation des enzymes de détoxification des xénobiotiques et des endobiotiques, PXR diminue l'expression de la CYP7A1 par un mécanisme encore inconnu (Russell 2003; Staudinger 2001). Il est à noter que ces deux récepteurs nucléaires peuvent être activés par l'acide lithocholique, un acide biliaire secondaire à fort potentiel toxique en cas d'accumulation.

Cette partie consacrée à la régulation transcriptionnelle du métabolisme du cholestérol a permis de mettre en évidence la complexité et l'interconnexion des différentes voies de régulation mises en jeu.

De façon très schématique, elles peuvent se résumer de la manière suivante : SREBP 2 active la synthèse endogène, le stockage et la captation du cholestérol, LXR α favorise le catabolisme du cholestérol en acides biliaires, FXR compense ce dernier mécanisme par le rétrocontrôle des acides biliaires. HNF 4 α sert d'élément positif à la régulation de nombreux gènes impliqués dans le catabolisme et le transport du cholestérol, HNF 1 α jouant le même rôle à plus petite échelle. Enfin, PPAR γ et surtout PPAR α relient le métabolisme du cholestérol à celui des acides gras, et jouent donc un rôle particulier dans le transport reverse, tout en inhibant la synthèse et le catabolisme du cholestérol.

La régulation par les récepteurs nucléaires permet de maintenir l'équilibre entre les différentes voies du métabolisme du cholestérol (synthèse, transport, stockage et catabolisme) au niveau hépatique comme dans les autres organes. Si le maintien de cet équilibre est important dans tout l'organisme, il devient crucial dans certains tissus particulièrement sensibles comme le cerveau.

III. Le métabolisme du cholestérol dans le cerveau

Le cholestérol est une molécule essentielle au niveau cérébral. Ainsi que nous l'avons vu précédemment, il intervient dans la synthèse de la myéline et dans les processus de neurotransmission, et c'est également le précurseur des neurostéroïdes comme la DHEA et la prégnénolone. Une perturbation de l'équilibre du cholestérol dans le cerveau est donc à même de provoquer de sérieux dysfonctionnements dans l'organisme. Bien que l'essentiel des voies du métabolisme du cholestérol décrites au niveau hépatique soient conservées à travers les différents organes, le métabolisme cérébral fait l'objet de certaines particularités présentées ci-après. Avant de décrire ces particularités, quelques rappels sur l'organisation cellulaire du cerveau sont nécessaires.

A. Brefs rappels sur l'organisation cérébrale

Le cerveau est un organe très riche en lipides. Chez les mammifères, 25 % du cholestérol corporel est situé dans le cerveau, bien que celui-ci ne représente que 10 % de la masse corporelle (Vance 2005). Ceux-ci composent 10 % de son poids frais et 50 % de son poids sec. Les lipides cérébraux sont constitués d'environ 50 % de phospholipides, 30 % d'acides gras et 20 % de cholestérol chez l'adulte (Sastry 1985). La proportion de cholestérol monte à 26-27 % des lipides totaux dans la myéline, dont la composition biochimique diffère des autres membranes de l'organisme (Saher 2005).

Le cerveau est isolé du reste de la circulation sanguine par la barrière hémato-encéphalique (BHE). Celle-ci est constituée de plusieurs strates de cellules : les cellules endothéliales du capillaire sanguin, sur lesquelles viennent s'ajouter les péricytes et enfin des projections des astrocytes voisins (cf. Figure 27). Cette accumulation de couches cellulaires permet une filtration beaucoup plus fine que dans les autres tissus, et les échanges entre le cerveau et la circulation générale sont donc limités.

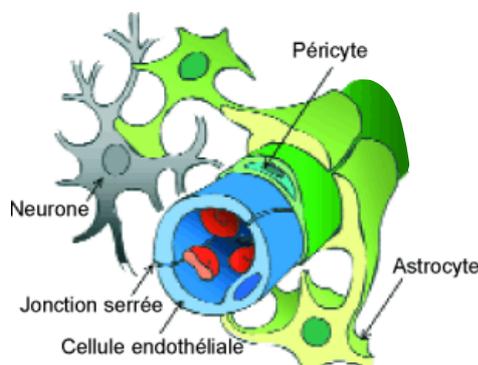


Figure 27 : Schéma de la structure de barrière hémato-encéphalique

Le cerveau est constitué de plusieurs types de cellules avec des rôles bien définis. Tout d'abord, on distingue les neurones des cellules gliales.

Le rôle des neurones est de transmettre l'influx nerveux et ils sont donc impliqués dans les fonctions cognitives, sensorielles et motrices. Ils forment des synapses entre eux pour permettre la neurotransmission (cf. Figure 28).

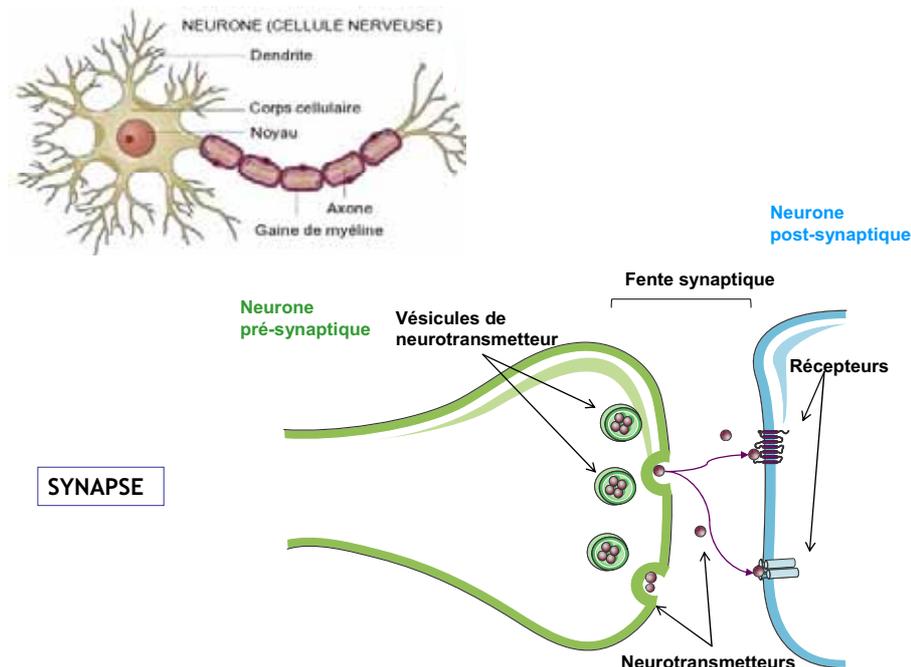
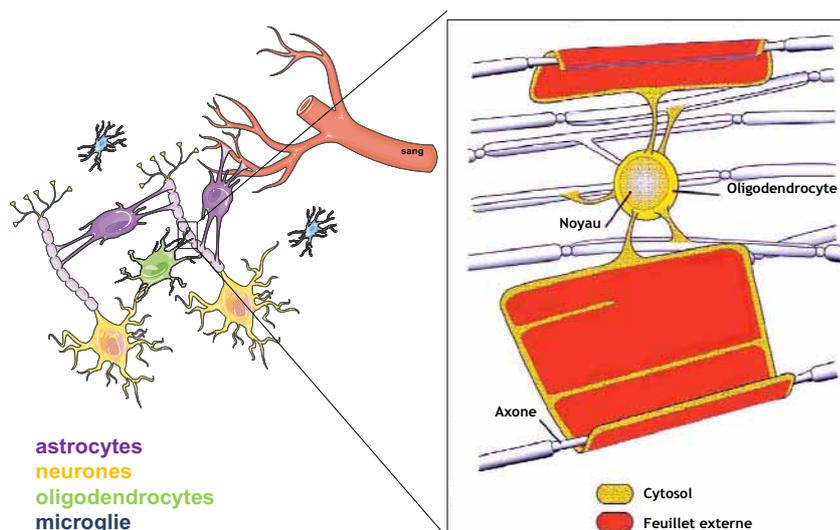


Figure 28 : Structure d'un neurone et d'une synapse

Il existe trois types de cellules gliales : les astrocytes qui assurent le soutien mécanique et la fonction nourricière nécessaires aux neurones, la microglie qui joue le rôle des macrophages, et les oligodendrocytes qui forment la gaine de myéline en s'enroulant le long des axones neuronaux (cf. Figure 29).



Formation de la gaine de myéline

Figure 29 : Les différents types cellulaires du système nerveux central et la formation de la gaine de myéline

La gaine de myéline est formée par l'enroulement d'une extension de la membrane des astrocytes autour des axones de plusieurs neurones. (modifié d'après Dietschy 2004)

B. Rôles spécifiques du cholestérol dans le cerveau

Le cholestérol intervient de façon importante dans les processus de neurotransmission pour plusieurs raisons.

- il favorise la synaptogénèse, dont il pourrait être un élément limitant (Goritz 2005; Pfrieger 2003b),
- il intervient dans la formation des vésicules synaptiques contenant les neurotransmetteurs dont l'exocytose va permettre la traduction du signal nerveux,
- il forme des radeaux lipidiques sur les membranes pré-synaptiques, où a lieu l'exocytose des neurotransmetteurs, et sur les membranes post-synaptiques, où sont enchâssés les récepteurs aux neurotransmetteurs (Claudepierre 2003),
- il est présent en grande quantité dans la myéline, qui augmente considérablement la vitesse de l'influx nerveux.

Au-delà de ces rôles dans la neurotransmission, le cholestérol conserve ses rôles généraux dans la formation et l'activité des membranes, la transduction du signal, l'embryogénèse et la synthèse de dérivés physiologiquement importants.

C. Particularités du métabolisme du cholestérol cérébral

1. L'absence d'échange de cholestérol avec la circulation générale

La structure du cholestérol ne favorise pas son passage de la BHE. De ce fait, contrairement aux autres organes, il est admis qu'il n'y a quasiment pas d'échanges de cholestérol sous forme native entre le cerveau et la circulation sanguine (Dietschy 2004; Jurevics 1995; Russell 2009b). Le cerveau est ainsi "protégé" des éventuelles fluctuations de la cholestérolémie, mais il ne dispose pas de la possibilité d'évacuer rapidement le cholestérol excédentaire dans le sang. Il doit donc assurer une synthèse suffisante et une élimination appropriée du cholestérol cérébral pour maintenir un équilibre qui lui est propre, indépendamment de l'homéostasie systémique.

2. Localisation de la synthèse endogène de cholestérol

La cascade enzymatique permettant la synthèse du cholestérol cérébral est identique à celle des autres organes producteurs de cholestérol. La singularité de la synthèse cérébrale réside dans sa localisation cellulaire. En effet, les neurones ne peuvent pas produire de cholestérol avec un rendement efficace, ou bien perdent cette capacité au cours du développement (Nieweg 2009; Pfrieger 2003a). Ils sont donc dépendants de leurs cellules nourricières, les astrocytes. Ceux-ci synthétisent *de novo* le cholestérol nécessaire à leurs propres besoins et à ceux des neurones.

3. La proportion de cholestérol estérifié

L'estérification du cholestérol cérébral est essentiellement identique à celle décrite dans le foie excepté sur deux points : d'une part la très faible proportion de cholestérol estérifié dans le cerveau, qui représente seulement 0,5 à 1 % du cholestérol total (Bjorkhem 2004), et d'autre part l'isoforme majoritaire de l'ACAT dans le cerveau, qui est l'ACAT 1 et non l'ACAT 2.

4. Les lipoprotéines cérébrales

Le cholestérol étant synthétisé par les astrocytes, il doit être transporté jusqu'aux neurones pour que ceux-ci puissent l'utiliser. De nombreuses molécules impliquées dans le transport du cholestérol dans les tissus extracérébraux sont également exprimées dans le cerveau. C'est par exemple le cas du LDL-r, du SR-BI, des ABC A1 et G1 et des apo E et A-I (Pitas 1987). En outre, des molécules sont exprimées en particulier dans le cerveau, comme ABC G4 et ABC A2 (Bjorkhem 2004). Ainsi, les éléments pour un transport du cholestérol *via* les lipoprotéines sont réunis. C'est effectivement le cas, à ceci près que les lipoprotéines cérébrales sont distinctes de celles de la circulation générale (Vance 2006b).

L'apo E est l'apolipoprotéine majeure des lipoprotéines cérébrales. On distingue les pseudo-LDLs dans le fluide cérébro-spinal, et les pseudo-HDLs synthétisées par les astrocytes (Danik 1999; Vance 2006b). Ces lipoprotéines sont synthétisées par les astrocytes et la microglie selon un processus similaire à celui mis en jeu dans le foie. Elles sont ensuite captées par les différentes cellules, notamment par les neurones *via* le LDL-r, le SR-B1 ainsi que d'autres récepteurs aux lipoprotéines positionnés le long de l'axone (Vance 2005).

Dans les neurones, ces récepteurs aux lipoprotéines cérébrales (et en particulier le LDL-r) permettent donc l'apport du cholestérol, mais ils jouent également d'autres rôles. En particulier, ils modulent la transduction du signal (lors de la liaison de l'apo E d'une lipoprotéine), le développement cérébral, la croissance neuronale ou encore la régulation de la plasticité synaptique (Herz 2009; Herz 2002; Vance 2005).

L'apo E est un élément important du métabolisme du cholestérol cérébral de par son implication dans la maladie d'Alzheimer (voir ci-dessous). En effet, il existe trois allèles du gène de l'apo E dans le cerveau ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$), et la possession de l'allèle $\epsilon 4$ de l'apo E est considérée comme un facteur de risque pour les pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. Cet allèle est moins efficace que les autres dans certains processus physiologiques comme le transport de cholestérol, la plasticité et la réparation synaptiques (Bu 2009).

5. L'élimination du cholestérol

Comme dans les autres organes périphériques, il n'y a pas de voie de dégradation du cholestérol dans le cerveau. Contrairement à ces mêmes tissus, le cerveau est isolé de la circulation sanguine par la BHE et est donc privé d'une voie d'élimination rapide du cholestérol. Or un excès de cholestérol peut s'avérer cytotoxique. Pour éviter une telle accumulation, la conversion du cholestérol en composé plus hydrophile lui permet d'être évacué plus rapidement à travers la BHE. Cette conversion est effectuée par la CYP46A1 qui synthétise le 24(S)-hydroxycholestérol.

❖ CYP46A1

La CYP46A1 (EC 1.14.13.98) est une enzyme microsomale exprimée presque exclusivement dans le cerveau chez le rat, mais on la retrouve également en faible proportion dans le foie (100 fois moins) et le testicule chez la souris (Lund 1999; Russell 2009b). Au niveau cérébral, elle est située dans les neurones et non dans les cellules gliales (Lund 1999).

La CYP46A1 catalyse la conversion du cholestérol en 24(S)-hydroxycholestérol. Celui-ci a deux devenir possibles : soit il reste dans le cerveau où il peut exercer plusieurs actions, soit il est excrété hors du cerveau à travers la BHE.

Le 24(S)-hydroxycholestérol traverse les membranes lipidiques beaucoup plus facilement et rapidement que le cholestérol. En effet, l'ajout du groupement hydroxyle au bout de la chaîne aliphatique permet une interaction plus favorable avec les phospholipides membranaires (cf. Figure 30). En outre, l'intervention du transporteur *organic anion transporting polypeptide 2* (OATP2) dans le passage du 24(S)-hydroxycholestérol à travers la BHE été démontrée chez le rat (Ohtsuki 2007).

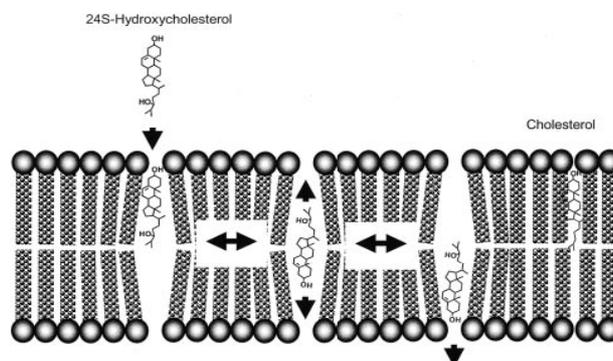


Figure 30 : Modélisation du passage rapide du 24(S)-hydroxycholestérol à travers une membrane. Le cholestérol natif est orienté parallèlement aux phospholipides, de telle sorte que le groupement OH en position 3 interagit avec la tête polaire de phospholipides. Le groupement OH en position 24 du 24(S)-hydroxycholestérol induit une réorganisation de la chaîne latérale des phospholipides, créant ainsi un "canal" par lequel le 24(S)-hydroxycholestérol peut transiter jusqu'au feuillet opposé d'où il peut être facilement extrait par un accepteur (lipoprotéine). Le sens du flux à travers la membrane est probablement déterminé par le gradient de concentration du 24(S)-hydroxycholestérol. (source : Bjorkhem 2004)

Cette capacité du 24(S)-hydroxycholestérol à franchir rapidement les membranes lipidiques explique son passage facilité à travers la BHE et son rôle de détoxification des tissus cérébraux en cas d'accumulation du cholestérol. Le 24(S)-hydroxycholestérol ainsi évacué dans la circulation générale est ensuite capté par le foie pour être intégré dans la biosynthèse des acides biliaires. 64 % du cholestérol cérébral éliminé est soumis à l'action de la CYP46A1 (Xie 2003).

La régulation transcriptionnelle de la CYP46A1 est encore largement inconnue. Une étude *in vitro* menée chez l'Homme a constaté l'absence de régulation transcriptionnelle par de nombreux facteurs, y compris par une déplétion en cholestérol, le substrat de la CYP46A1. Le seul facteur ayant entraîné une régulation (positive) de la transcription de ce gène est le stress oxydant (Ohyama 2006).

Chez les souris invalidées pour le gène de la CYP46A1, le taux de cholestérol cérébral est maintenu constant par une diminution de 40 % de sa synthèse (Lund 2003). Ces souris présentent une grande déficience dans les processus d'apprentissage (Kotti 2006; Ohyama 2006).

Ainsi, le métabolisme du cholestérol cérébral résulte de la coopération de deux populations cellulaires complémentaires. En effet, les astrocytes contrôlent la synthèse et l'efflux du cholestérol vers les neurones, et ceux-ci l'utilisent ou le dégradent en 24(S)-hydroxycholestérol. Celui-ci peut quitter rapidement le cerveau à travers la BHE ou bien en regagnant les astrocytes. Là, il servira de ligand à LXR β qui contrôle l'efflux de cholestérol, complétant ainsi la boucle d'échange de stérols entre les cellules cérébrales (cf. Figure 31).

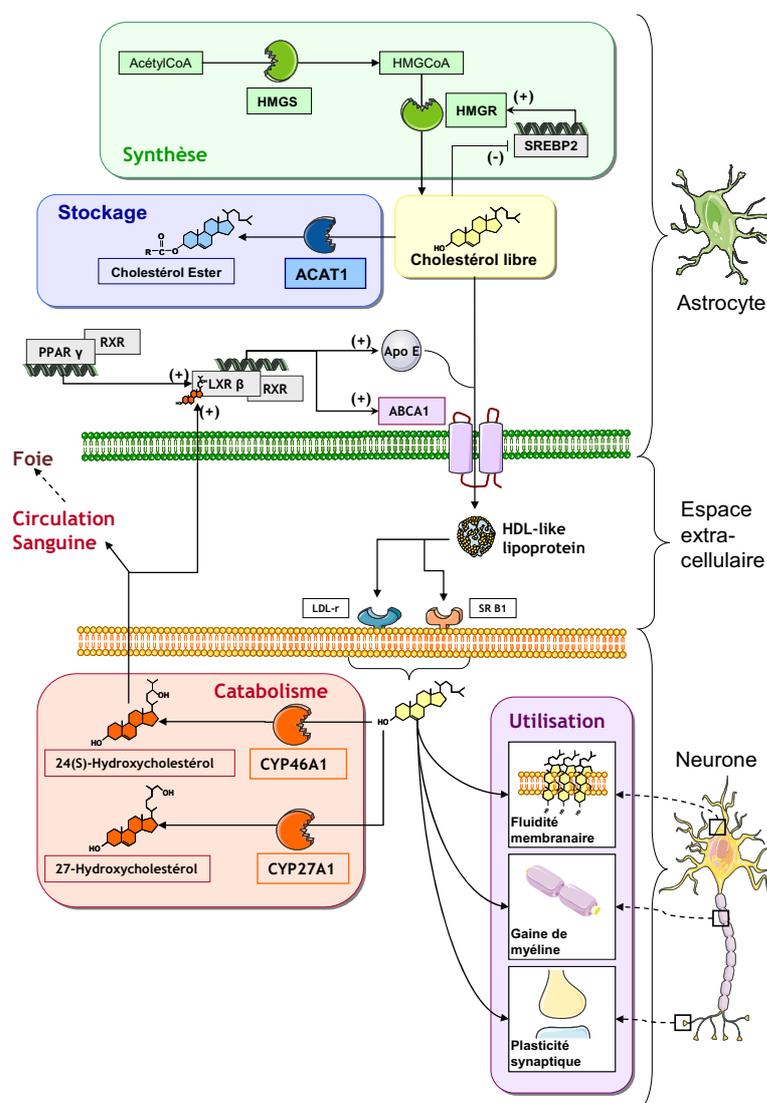


Figure 31 : Résumé des principales voies du métabolisme du cholestérol dans le cerveau
Pour détails voir le texte. Figure réalisée par F. Airault

6. La formation de dérivés 27-hydroxylés

Le flux de 24(S)-hydroxycholestérol du cerveau vers la circulation sanguine n'est pas le seul mécanisme de détoxification de stérols cérébraux par les enzymes de catabolisme du cholestérol (Bjorkhem 2006), et d'autres mouvements d'oxystérols à travers la BHE ont été identifiés. En effet, Bjorkhem *et al* ont mesuré un flux "entrant" (de la circulation vers le cerveau) de 27-hydroxycholestérol, ainsi qu'un flux "sortant" d'acide 7 α -hydroxy-3-oxo-4-cholesténoïque (Bjorkhem 2006; Heverin 2005). Celui-ci est formé à partir du 27-hydroxycholestérol par la CYP27A1. Il ne semble pas y avoir de flux de 27-hydroxycholestérol du cerveau vers le sang.

Les rôles exacts du 27-hydroxycholestérol dans le cerveau ne sont pas bien connus à l'heure actuelle. A tout le moins il pourrait influencer la synthèse de cholestérol (par exemple en activant LXR β). Il semble aussi être impliqué dans des mécanismes ayant trait à la mémoire. Ceci pourrait en faire un candidat comme lien entre la maladie d'Alzheimer et l'hypercholestérolémie qui est un de ses facteurs de risques (Bjorkhem 2009).

Par ailleurs, le taux de 27-hydroxycholestérol dans le cerveau est faible : il représente moins de 10 % du taux de 24(S)-hydroxycholestérol (Bjorkhem 2006; Meaney 2007). Il est donc probable qu'il est immédiatement transformé par la CYP27A1 et/ou la CYP7B1. La CYP27A1 est exprimée dans tous les types cellulaires du cerveau (et en particulier dans la microglie), tandis que la CYP7B1 est présente dans les neurones en faible quantité et dans les astrocytes (Gilardi 2009).

7. La régulation transcriptionnelle

La régulation transcriptionnelle du métabolisme du cholestérol cérébral est plus simple que celle du cholestérol hépatique. En effet, un certain nombre de facteurs de transcription présents dans le foie ne sont pas (ou très faiblement) exprimés dans le cerveau. C'est notamment le cas de FXR, SHP, LRH-1, HNF 4 α et HNF 1 α .

Comme dans les autres organes, la biosynthèse du cholestérol cérébral est activée par SREBP 2 (Camargo 2009).

LXR α étant faiblement exprimé dans le cerveau, c'est donc l'isoforme LXR β qui prédomine dans le tissu cérébral. Il contrôle essentiellement les échanges intercellulaires de cholestérol. L'activation de LXR dans des cultures d'astrocytes provoque l'augmentation de la transcription des gènes d'ABC A1, d'ABC G1, de l'apo E, mais également de la CYP27A1 et de la CYP7B1 (Eckert 2007; Gilardi 2009). Cette régulation de la CYP27A1 par LXR α semble spécifique au cerveau. En outre, LXR α ne module pas la transcription du gène de la CYP46A1 (Gilardi 2009).

D. Pathologies neurologiques liées au métabolisme du cholestérol

1. Pathologies diverses

L'importance du métabolisme du cholestérol dans le cerveau est illustrée par la gravité des pathologies découlant d'une rupture de son homéostasie. Quelques-unes de ces pathologies ont déjà été évoquées au fil de cet exposé :

✓ La **xanthomatose cérébrotendineuse**, qui résulte d'une mutation du gène de la CYP27A1. Elle se caractérise par une accumulation de cholestérol et de cholestanol dans le cerveau et dans des xanthomes (tumeurs bénignes constituées de macrophages riches en dépôts lipidiques) sur les tendons et le système nerveux, ce qui provoque une démence, des cataractes, et des troubles de la coordination motrice ([Bhattacharyya 2007](#); [Bjorkhem 2000](#)).

✓ Le **syndrome de Smith-Lemli-Opitz**, dû à une mutation du gène d'une enzyme de la biosynthèse du cholestérol, la 7-déhydrocholestérol réductase. Les symptômes de cette maladie sont vastes et incluent des troubles comportementaux et d'apprentissage, des troubles de la croissance ou encore des malformations ([Bjorkhem 2001](#); [Porter 2008](#)).

✓ La **maladie de Niemann-Pick de type C**, causée par une mutation du transporteur NPC1. Cette pathologie touche les enfants et elle est caractérisée par des troubles de la coordination et du tonus musculaire, des convulsions et une insuffisance hépatique aigüe ([Vance 2006a](#)). Ces symptômes sont provoqués par une accumulation de cholestérol dans les endosomes tardifs et les lysosomes.

Au-delà de ces pathologies, le cholestérol est également impliqué dans la maladie d'Alzheimer. Les recherches menées depuis quelques années sur ce sujet ont permis d'avancer dans la connaissance des mécanismes mis en jeu.

2. Implication du cholestérol dans la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est une démence neurodégénérative qui touche près de 800 000 personnes en France. Elle est caractérisée par des troubles progressifs et irréversibles de la mémoire, accompagnés de troubles du comportement au fur et à mesure que les zones cérébrales atteintes s'étendent. Elle peut être favorisée par des facteurs génétiques (apo E, *amyloid precursor protein* (APP)). Des facteurs environnementaux peuvent également favoriser l'apparition de la maladie. Parmi ceux-ci, on peut citer l'âge, le sexe, le diabète, l'hypertension artérielle ou encore l'hypercholestérolémie. Les principales interactions entre le métabolisme du cholestérol cérébral et la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer sont décrites ci-dessous.

a. Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer

Deux mécanismes principaux causent la neurodégénérescence observée : la dégénérescence neurofibrillaire et la formation de plaques neuritiques ou plaques séniles.

La neurodégénérescence fibrillaire est due à un défaut de formation du cytosquelette dans les neurones. Au niveau moléculaire, ce défaut est causé par une hyper-phosphorylation de la *tubulin associated unit* (TAU). Cette protéine intervient dans la polymérisation des microtubules qui permettent le transport axonal, et leur hyper-phosphorylation perturbe son activité, entraînant ainsi la formation d'écheveaux de filaments de microtubules. Ceci provoque la désorganisation du transport axonal, et à terme la perte de fonction du neurone.

Les plaques séniles sont formées dans le milieu extracellulaire par l'accrétion de peptides amyloïdes β ($A\beta$). Ceux-ci proviennent du clivage anormal d'une protéine transmembranaire, l'*amyloid precursor protein* (APP). Cette protéine est un récepteur de surface, elle intervient dans l'interaction cellulaire ainsi que dans la formation du cytosquelette, la régulation du taux de calcium, la formation des synapses et le métabolisme de certains neurotransmetteurs comme l'acétylcholine. L'APP subit un double clivage. Le premier clivage peut être réalisé par deux enzymes (cf. Figure 32) :

- ✓ l' α -sécrétase, qui génère le peptide P3 non-pathogène
- ✓ la β -sécrétase, qui entraîne la formation du peptide $A\beta$ non-fonctionnel et dont l'accumulation est à l'origine des plaques séniles.

Le second clivage est réalisé par la γ -sécrétase.

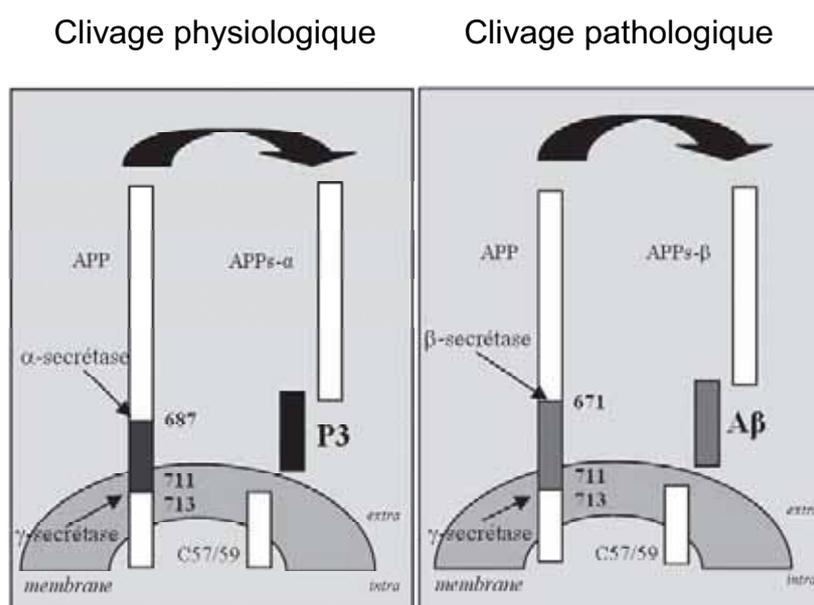


Figure 32 : Les deux voies de clivage de l'APP

Le clivage réalisé par l' α -sécrétase conduit à la formation de peptide P3 non-pathogène. Le clivage par la β -sécrétase forme le peptide $A\beta$ qui est une des causes de la maladie d'Alzheimer (d'après Govaerts 2007)

Dans les conditions physiologiques, l'action de la β -sécrétase est minoritaire, mais elle devient prépondérante dans la maladie d'Alzheimer. Les plaques ainsi formées dans le milieu extracellulaires induisent une entrée massive de calcium dans les cellules et une réaction inflammatoire, provoquant la mort neuronale par apoptose ou par nécrose.

b. Rôle du cholestérol

La β -sécrétase (comme la γ -sécrétase) est située dans des radeaux lipidiques riches en cholestérol de la membrane plasmique (Cordy 2006). L'influence du cholestérol sur la synthèse du peptide A β est encore floue. Ainsi, une augmentation de la concentration cellulaire en cholestérol semble favoriser le clivage par la β -sécrétase, ce qui entraîne une accumulation de peptides A β (Puglielli 2003; Xiong 2008). En revanche, dans une autre étude, l'inhibition de l'ACAT 1 et donc l'augmentation du cholestérol libre, induit une répression de la synthèse d'A β (Puglielli 2004). Par ailleurs, l'administration de statines, qui diminuent la synthèse du cholestérol, provoque une réduction du taux plasmatique de 24(S)-hydroxycholestérol, ainsi qu'une réduction du taux intra- et extracellulaire d'A β (Vance 2005). L'hétérogénéité de ces résultats peut s'expliquer par les divers modèles cellulaires utilisés ou par la différence d'impact d'une modification de la concentration de cholestérol. En effet, une variation du taux de cholestérol a des conséquences différentes selon le compartiment cellulaire où elle est observée. Malgré ces divergences, si les interactions moléculaires exactes restent encore à déterminer, il apparaît clairement que le taux de cholestérol influence directement la production d'A β .

c. Rôles du 24(S)-hydroxycholestérol et de la CYP46A1

Les malades d'Alzheimer présentent des taux réduits de 24(S)-hydroxycholestérol dans le cerveau (Bjorkhem 2006). Par ailleurs, le 24(S)-hydroxycholestérol, et dans une moindre mesure le 27-hydroxycholestérol, inhibent la formation d'A β *in vitro* en augmentant l'activité de l' α -sécrétase et en diminuant celle de la β -sécrétase (Brown 2004; Famer 2007).

Ainsi, la CYP46A1 qui synthétise le 24(S)-hydroxycholestérol aurait une influence positive de deux façons : d'une part grâce à la production de 24(S)-hydroxycholestérol, et d'autre part en réduisant la concentration en cholestérol des membranes, ce qui défavorise également l'action de la β -sécrétase.

Par ailleurs, la localisation de la CYP46A1 et de la CYP27A1 est différente dans la maladie d'Alzheimer (Brown 2004). La CYP46A1 (fortement exprimée dans les neurones dans les conditions physiologiques) est plus faiblement exprimée dans les neurones, sa proportion augmente dans les astrocytes, et elle est très exprimée dans et autour des plaques séniles. *A contrario*, l'expression de la CYP27A1 (exprimée physiologiquement dans tous les types cellulaires) est augmentée dans les oligodendrocytes, mais diminue dans les neurones et est inexistante des plaques séniles.

d. Rôles de l'apo E

La possession de l'allèle $\epsilon 4$ de l'apo E est considérée comme un facteur de risque pour la maladie d'Alzheimer car cet allèle produit une protéine moins "efficace" que les allèles $\epsilon 2$ et $\epsilon 3$. Or l'apo E intervient dans de nombreux processus neurologiques, notamment la phosphorylation de la protéine TAU et la formation d'A β (Cedazo-Minguez 2007). Ainsi, l'allèle $\epsilon 4$ favorise la formation et l'agrégation des peptides A β . En parallèle, il est moins efficace que l'allèle $\epsilon 3$ dans la plasticité et la réparation synaptique, et le transport du cholestérol (Bu 2009). Enfin, l'apo E intervient dans la clairance du peptide A β en se liant à celui-ci (Reiss 2005), avec là encore une plus grande efficacité des allèles $\epsilon 2$ et $\epsilon 3$ que de l'allèle $\epsilon 4$ (Bu 2009). Les différents rôles de l'apo E dans le système nerveux central et l'efficacité relative de l'isoforme de l'apo E considérée sont résumés par la Figure 33.

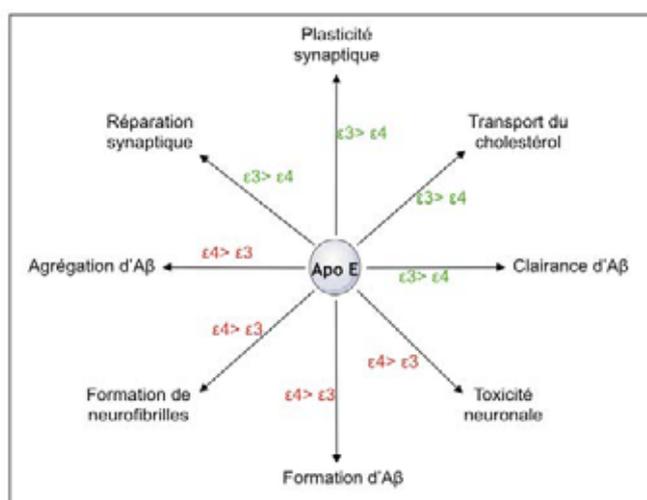


Figure 33 : Rôles de l'apo E dans le cerveau et efficacité relative des différentes isoformes (d'après Bu 2009)

Ainsi, le métabolisme du cholestérol cérébral est un élément essentiel aux fonctions cognitives et motrices puisqu'il intervient entre autres dans la neurotransmission, la transduction du signal et la synthèse de molécules-signal. La barrière hémato-encéphalique isole le cholestérol cérébral de la circulation sanguine. Son homéostasie est donc indépendante des fluctuations de la cholestérolémie et repose sur l'équilibre très fin entre sa synthèse endogène et son évacuation en tant que 24(S)-hydroxycholestérol ou dérivé 27-hydroxylé. Enfin, ce métabolisme est caractérisé par la compartimentation des étapes métaboliques : le cholestérol est synthétisé dans les cellules nourricières, les astrocytes, puis transporté dans les neurones où il est utilisé, transformé ou évacué.

Des perturbations de ce métabolisme peuvent induire des conséquences très sévères, comme le syndrome de Smith-Lemli-Opitz ou la maladie de Niemann-Pick de type C. Par ailleurs, le cholestérol et les acteurs de son métabolisme interviennent à de multiples niveaux dans le développement de la maladie d'Alzheimer. Cette implication ouvre la voie à de nombreuses études en vue d'une action thérapeutique sur certains de ces acteurs.

CONCLUSION DU CHAPITRE 2

Le cholestérol est donc un élément essentiel au bon fonctionnement de l'organisme à différents niveaux. Il entre dans la composition des membranes biologiques et influe sur leur fonction (captation de molécules extérieures, transduction du signal...), il est précurseur de nombreuses molécules physiologiquement importantes (vitamine D, hormones stéroïdiennes, acides biliaires...), il favorise la synaptogénèse et est nécessaire à la neurotransmission, etc. Le foie est au centre des différents flux de cholestérol (captation, redistribution, transport reverse). Il procède également au catabolisme du cholestérol excédentaire de l'organisme sous forme de conversion en acides biliaires. Par ailleurs, c'est un site de stockage sous forme de gouttelettes de cholestéryl esters et un gros producteur de cholestérol par synthèse endogène. Le cerveau est également un organe qui synthétise beaucoup de cholestérol. En effet, celui-ci ne peut pas franchir la barrière hémato-encéphalique. Le cholestérol cérébral est donc indépendant du reste de l'organisme, et les quatre voies métaboliques (synthèse, stockage, transport intracérébral et transformation en vue d'élimination) assurent son homéostasie au niveau de l'organe. Dans le foie comme dans le cerveau, ces quatre voies sont régulées au niveau génique par des facteurs de transcription. Une perturbation de l'homéostasie du cholestérol à l'échelle de l'organe ou du corps entier peut induire un état pathologique. Ainsi, de nombreuses maladies lipidiques (hypercholestérolémie, syndrome métabolique), hépatiques (cholestase, cirrhose) ou encore neurologiques (syndrome de Smith-Lemli-Opitz, maladie d'Alzheimer, xanthomatose cérébro-tendineuse) sont associées à des perturbations du métabolisme du cholestérol.

Un schéma récapitulatif du métabolisme du cholestérol dans le foie est dans le cerveau est présenté [Figure 34](#).

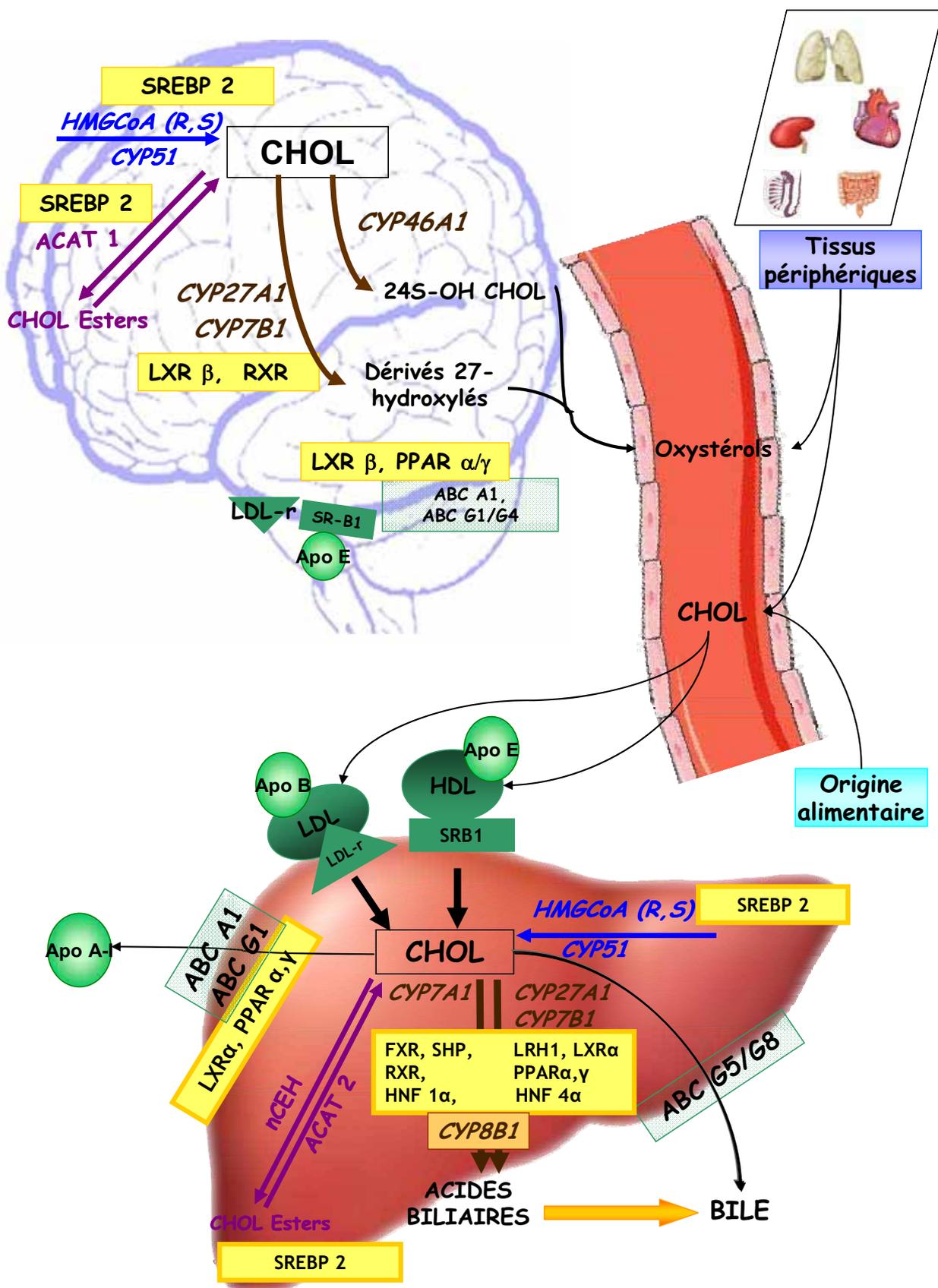


Figure 34 : Schéma récapitulatif du métabolisme du cholestérol dans le foie et dans le cerveau

CONCLUSION DE LA SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

A l'issue de cette synthèse bibliographique, il ressort que l'UA et le ^{137}Cs sont deux radionucléides avec des propriétés chimiques et radiologiques différentes. L'UA est un élément émetteur de rayonnement α , qui possède également une toxicité chimique de métal lourd et s'accumule préférentiellement dans les reins et les os. Le ^{137}Cs est un émetteur β/γ , sans toxicité chimique, qui se distribue de façon homogène dans l'organisme. Ces deux radionucléides induisent des effets biologiques et toxiques différents. Après contamination chronique interne, l'UA provoque des atteintes tubulaires au niveau rénal, des perturbations de la croissance osseuse et des désordres neurologiques et comportementaux, tandis que le ^{137}Cs provoque plutôt des effets au niveau oculaire et hépatique ainsi que sur la reproduction. Ces effets restent toutefois de portée modérée.

Certaines données de la littérature laissent penser que le métabolisme du cholestérol pourrait être affecté suite à une contamination interne chronique par les radionucléides. Une rupture de l'homéostasie du cholestérol à l'échelle de l'organisme ou d'un organe important pourrait avoir des conséquences très néfastes. En effet, le cholestérol est une molécule ayant de nombreux rôles physiologiques au niveau structural et fonctionnel. Ainsi, de nombreuses pathologies (hépatiques, neurologiques, métaboliques...) sont associées à des perturbations du métabolisme du cholestérol. L'organe-clé de ce métabolisme est le foie : il est au centre des échanges de cholestérol entre les différents tissus et c'est le seul à pouvoir cataboliser le cholestérol excédentaire de l'organisme en le transformant en acides biliaires. Le métabolisme du cholestérol est également crucial au niveau cérébral, puisqu'il contribue entre autre au bon fonctionnement de la neurotransmission. En outre, le cholestérol ne peut pas traverser la barrière hémato-encéphalique. Le pool de cholestérol cérébral est donc isolé du pool systémique et doit donc être maintenu en équilibre de façon indépendante. Cet équilibre est obtenu comme dans les autres organes par la régulation fine des différentes voies métaboliques : l'apport (endogène ou exogène), le stockage, les flux et le catabolisme.

PROBLEMATIQUE

ET

PROTOCOLE

PROBLEMATIQUE

Les radiations ionisantes peuvent induire des dommages variables en termes de cibles biologiques et de gravité en fonction des modalités d'exposition. Ainsi, outre certains cancers, la contamination par les radionucléides entraîne de nombreux effets non-cancéreux. Ces effets biologiques peuvent notamment être induits par une exposition à long terme à de faibles niveaux de radiations ionisantes.

L'impact d'une contamination interne chronique par de faibles concentrations de radionucléides est un domaine très peu étudié bien que ce soit le mode d'exposition le plus probable pour le grand public. Pour combler les lacunes dans ce domaine, l'IRSN a créé le programme ENVIRHOM, qui comporte deux volets. Le premier volet s'articule autour de l'UA, qui possède une toxicité chimique et une toxicité radiologique modérée. L'importance de la production et des utilisations de l'UA à des fins civiles ou militaires génère un risque non-négligeable de dispersion dans l'environnement. Le second volet est axé sur le ^{137}Cs et découle de la contamination par ce radionucléide de vastes zones suite à l'accident de Tchernobyl. Cette dissémination de ^{137}Cs dans l'environnement induit une situation de contamination interne chronique pour les populations vivant à l'heure actuelle sur ces territoires.

Parmi les données récentes sur les conséquences biologiques d'une ingestion quotidienne de radionucléides à long terme, différentes études ont montré que l'UA et le ^{137}Cs induisent des effets sur divers processus biologiques. En particulier, l'UA entraîne des modifications moléculaires du métabolisme de la vitamine D dans le foie et le rein et une diminution de 50 % du taux plasmatique de vitamine D active (Tissandie 2007). De même, le métabolisme des xénobiotiques est également modifié au niveau génique après ingestion chronique d'UA (Souidi 2005). En ce qui concerne le ^{137}Cs , le métabolisme de la vitamine D (Tissandie 2006a) et celui des hormones stéroïdiennes (Grignard 2008b) sont affectés après contamination interne chronique, entraînant là encore des modifications du taux plasmatique des hormones produites par ces métabolismes (vitamine D active, 17β -estradiol et corticostérone).

Ces différents métabolismes ont deux points communs : ils mettent en jeu l'action d'enzymes de type CYP et ils sont régulés par des récepteurs nucléaires. Ces deux classes de molécules sont affectées par l'exposition aux radionucléides. D'autre part, les différents métabolismes de l'organisme sont inter-reliés. Ainsi, la perturbation des récepteurs nucléaires contrôlant un métabolisme est susceptible d'avoir des conséquences sur d'autres métabolismes également régulés par ceux-ci.

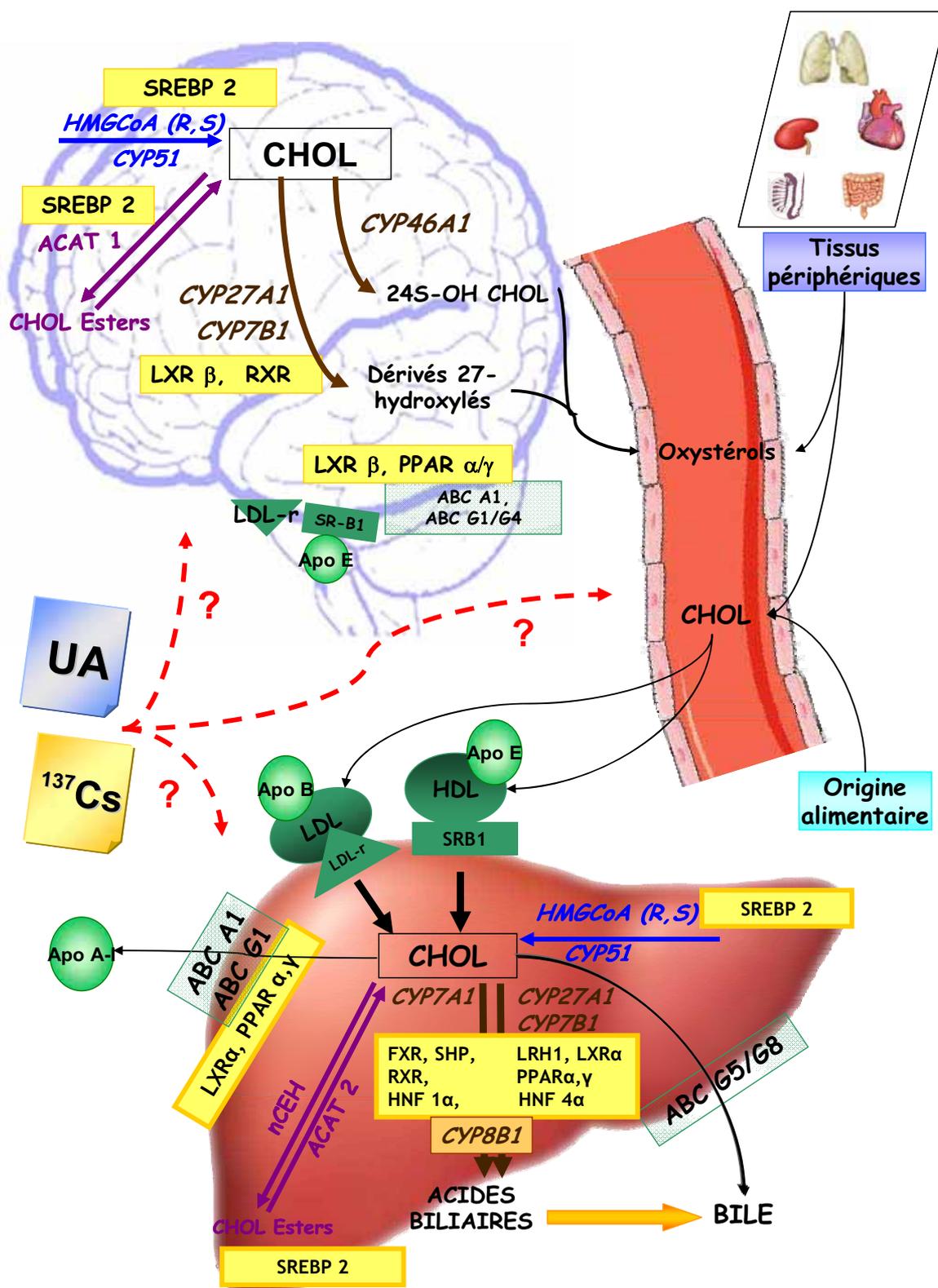


Figure 35 : Problématique de la thèse

Quels sont les effets d'une contamination interne chronique par de faibles concentrations d'UA ou de ¹³⁷Cs sur le métabolisme du cholestérol dans le foie et le cerveau ?

Ainsi, l'étude du métabolisme du cholestérol après contamination interne chronique par les radionucléides nous est apparue pertinente pour plusieurs raisons :

- ✓ comme les métabolismes mentionnés ci-dessus, le métabolisme du cholestérol fait intervenir des CYPs et des récepteurs nucléaires
- ✓ certains d'entre eux sont communs aux différents systèmes : la CYP27A1 est responsable du catabolisme du cholestérol et de l'activation de la vitamine D, plusieurs récepteurs nucléaires (LXR, FXR) sont communs aux métabolismes des hormones stéroïdiennes et du cholestérol
- ✓ les hormones stéroïdiennes comme la vitamine D sont synthétisées à partir du cholestérol ou de ses dérivés immédiats.

Outre ces éléments présumptifs, certaines données sur les effets d'une exposition aux radionucléides à fortes doses confortent le choix du métabolisme du cholestérol comme sujet d'étude. Ainsi, il est bien établi qu'une irradiation à forte dose induit une athérosclérose (Trivedi 2004), et qu'une peroxydation lipidique (une des manifestations du stress oxydant) est provoquée aussi bien après contamination aiguë que contamination chronique, quel que soit le type de rayonnement (Ghosh 2007; Neyfakh 1998a). De plus, une hypercholestérolémie a été observée chez les survivants des bombardements nucléaires à Hiroshima et Nagasaki (Wong 1999). Enfin, des études chez les liquidateurs de Tchernobyl ont relevé une augmentation de pathologies hépatiques liées au métabolisme du cholestérol et des acides biliaires, telles que les cholécystites et les cholélithiases chroniques (Komarenko 1999).

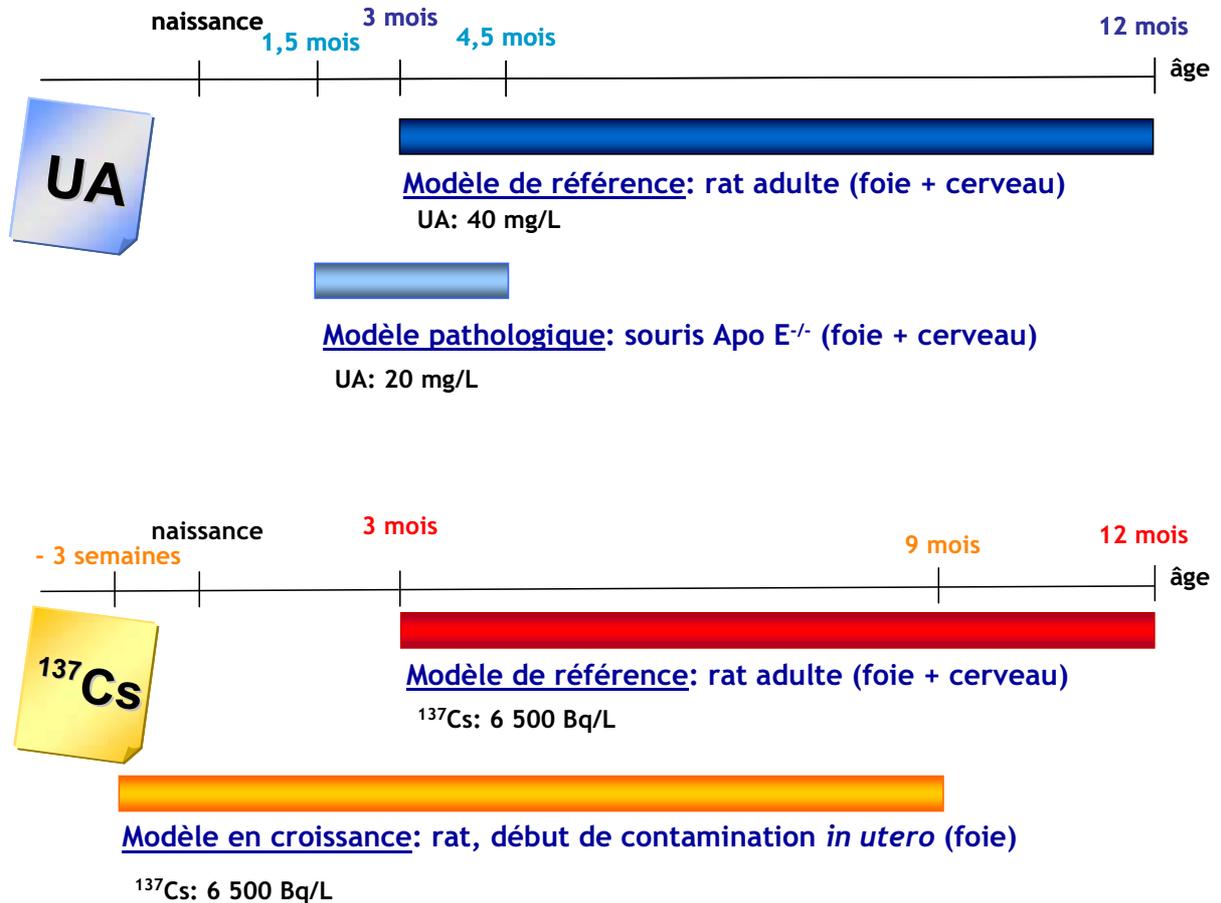
Suite à ces différentes données, le travail de thèse présenté ci-après a donc pour objet la problématique suivante (cf. Figure 35):

Décrire les effets biologiques d'une contamination interne chronique à faible niveau par l'UA ou le ^{137}Cs sur le métabolisme du cholestérol chez le rat

CONTAMINATIONS

rongeurs mâles (n=15)
via l'eau de boisson

UA : nitrate d'uranyle appauvri hexa-hydraté ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
 ^{137}Cs : chlorure de césium-137 ($^{137}\text{CsCl}$)



ANALYSES

Sang

Foie, Cerveau

- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ❖ bilan plasmatique (colorimétrie, n=15) ❖ dosage d'oxystérols (HPLC, n=10) | <ul style="list-style-type: none"> ❖ dosage du cholestérol (Fluorimétrie, n=10) ❖ expression génique (qPCR, n=10) ❖ expression protéique (Western Blot, n=5) ❖ activité enzymatique (méthode radioisotopique, n=6) |
|--|--|

Figure 36 : Protocoles utilisés au cours de la thèse

Les différentes modalités de contamination effectuées lors de cette thèse sont représentées : temps de contamination, âge, concentration en radionucléide, modèle animal et tissus étudiés.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Pour répondre à cette problématique, un modèle de contamination interne chronique par les radionucléides a été développé au laboratoire. La contamination se fait *via* l'eau de boisson (une eau minérale) dans laquelle sont dissouts l'UA ou le ^{137}Cs . Chaque groupe contaminé possède son groupe témoin propre. Tous les témoins boivent de l'eau minérale. Le temps de contamination est de 9 mois, ce qui correspond environ à 20 ans chez l'Homme (cf. Figure 36).

L'UA est administré sous forme de nitrate d'uranyle appauvri hexa-hydraté ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), à une concentration de 40 mg/l (en moyenne 1 mg/j/rat, soit 14 Bq/j/rat). Cette valeur correspond au double de la concentration d'uranium naturel la plus élevée retrouvée dans l'environnement (Juntunen 1991). Par ailleurs, cette concentration n'engendre pas de néphrotoxicité. Les animaux sont donc contaminés par de faibles niveaux d'UA.

Le ^{137}Cs est administré sous forme de chlorure de ^{137}Cs ($^{137}\text{CsCl}$) à une concentration de 6 500 Bq/l (soit en moyenne 150 Bq/j/rat). Cette valeur correspond à l'estimation haute de la concentration en ^{137}Cs retrouvée dans le bol alimentaire moyen des populations vivant sur les territoires contaminés après l'accident de Tchernobyl (Coulon 1994).

Ce travail de thèse a été conçu autour de deux modèles animaux pour chaque radionucléide :

- un modèle de référence, à savoir le rat contaminé depuis l'âge adulte (3 mois)
- un modèle plus sensible, différent selon le radionucléide

Pour l'UA, le modèle sensible est un modèle pathologique, à savoir des souris apo $E^{-/-}$ développant une hypercholestérolémie. Ces souris sont contaminées à l'âge adulte (6 semaines). Du fait de difficultés rencontrées lors de l'élevage des souris apo $E^{-/-}$ et compte tenu du calendrier de la thèse, la contamination de ces souris pendant 9 mois s'est avérée impossible. Les données présentées ultérieurement résultent donc d'un temps de contamination semi-chronique : 3 mois.

Pour le ^{137}Cs , le modèle sensible est un modèle en croissance, à savoir des ratons contaminés dès la vie fœtale (ils sont désignés par la suite sous le terme "*in utero*"). La mère est contaminée par l'eau de boisson deux semaines avant la mise en accouplement. De fait, le raton est contaminé *via* le sang maternel durant la vie fœtale, *via* le lait maternel de la naissance au sevrage, puis directement par l'eau de boisson jusqu'à l'âge de 9 mois.

A l'issue de la contamination, les animaux sont anesthésiés par inhalation d'isoflurane, le sang est prélevé par ponction intra-cardiaque. Les tissus sont prélevés et congelés dans l'azote liquide puis stockés à -80°C jusqu'aux analyses.

Nous avons choisi d'étudier ce métabolisme dans deux organes-clés du métabolisme du cholestérol :

- ❖ dans le foie, qui est à la fois la plaque tournante des échanges de cholestérol au niveau systémique, un gros producteur de cholestérol et le seul organe pouvant le cataboliser à grande échelle

- ❖ dans le cerveau, qui est en autarcie par rapport au pool de cholestérol de l'organisme et doit assurer son apport et son homéostasie propres.

Au niveau de l'animal entier, l'état général, les paramètres plasmatiques généraux et les concentrations plasmatiques des trois principaux oxystérols ont été évalués. Au niveau tissulaire, la concentration de cholestérol, ainsi que l'expression génique des acteurs du métabolisme du cholestérol présentés dans la synthèse bibliographique ont été mesurées. En raison de la quantité de tissu disponible, l'étude du métabolisme du cholestérol dans le cerveau se limite à ces paramètres. Dans le foie, l'expression protéique des acteurs du transport du cholestérol et de la régulation a été mesurée lorsque le taux d'ARNm correspondant était modifié après contamination. Pour les modifications transcriptionnelles touchant les enzymes, leur conséquence physiologique a été évaluée soit par la mesure du produit final (cholestérol libre pour la synthèse, cholestérol estérifié pour l'ACAT), soit par la mesure de leur activité spécifique (CYP7A1, CYP27A1 et CYP7B1).

RESULTATS

CHAPITRE 1

Effets de l'uranium appauvri sur
le métabolisme du cholestérol

ARTICLE 1

CHOLESTEROL 7 α -HYDROXYLASE (CYP7A1) ACTIVITY IS MODIFIED AFTER CHRONIC INGESTION OF DEPLETED URANIUM IN THE RAT

R. Racine, L. Grandcolas, S. Grison, J. Stefani, O. Delissen, P. Gourmelon, G. Veysière, M. Souidi

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology - (2010) 120: 60-66

Contexte scientifique

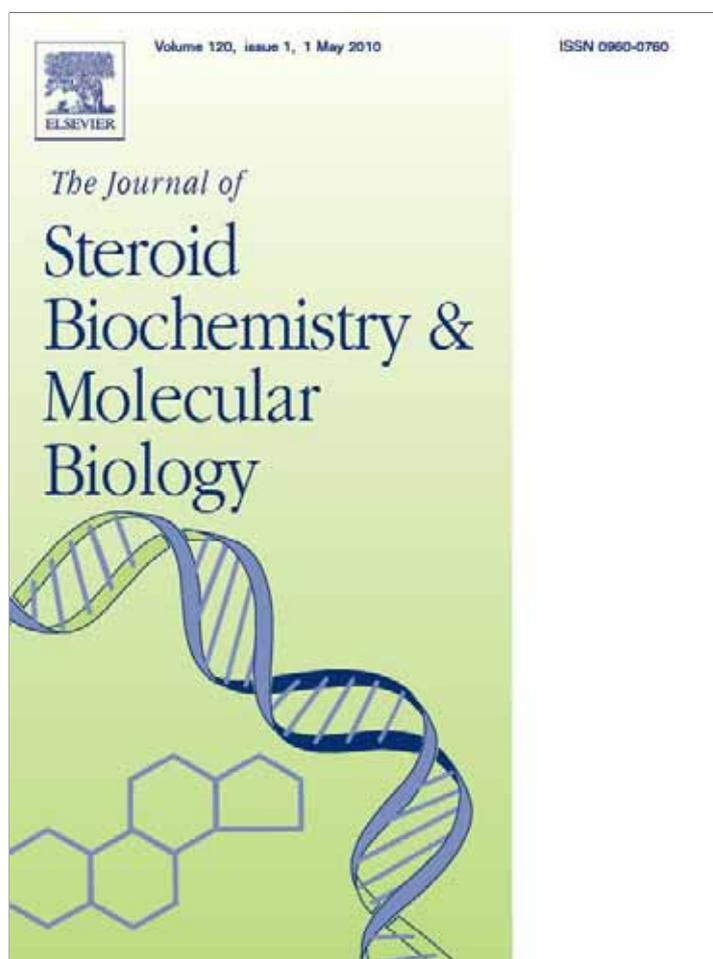
Ce premier article s'inscrit dans le volet "scientifique" du programme ENVIRHOM de l'IRSN, qui s'attache à évaluer les effets biologiques d'une contamination chronique interne par de faibles doses de radionucléides sur différents systèmes biologiques. Cette problématique de recherche répond à la fois au manque de connaissances sur les conséquences biologiques d'une contamination à faible dose et à la volonté de reproduire les circonstances les plus probables d'une exposition humaine aux radionucléides, à savoir l'ingestion *via* l'alimentation sur de longues périodes suite à une contamination environnementale. L'UA a été choisi comme radionucléide de référence pour deux raisons : d'une part pour la double toxicité (chimique et radiologique) qui s'exerce en contamination interne, et d'autre part du fait de sa production importante (en tant que sous-produit de la fabrication du combustible nucléaire) et de son utilisation dans les industries civile et militaire dans de nombreuses régions du monde.

Parmi les différents systèmes biologiques étudiés dans le cadre de ce programme, plusieurs métabolismes ont montré une sensibilité à l'UA. En particulier, le métabolisme de la vitamine D (Tissandie 2007) et celui des xénobiotiques (Souidi 2005) subissent des modifications de l'expression de certains gènes et de l'activité de certaines enzymes dans plusieurs organes (principalement le foie et le rein, mais également le cerveau). Ces deux métabolismes nécessitent l'action d'enzymes de la famille des cytochromes P450 (CYPs) et sont régulés au niveau transcriptionnel par des récepteurs nucléaires, et ces deux catégories de molécules sont affectées par la contamination à l'UA. Or les CYPs et les récepteurs nucléaires interviennent également dans d'autres métabolismes comme celui du cholestérol. En outre, ce dernier possède plusieurs éléments en commun avec le métabolisme de la vitamine D : ainsi, la CYP27A1 participe à la fois à l'activation de la vitamine D et au catabolisme du cholestérol *via* la voie alternative de biosynthèse des acides biliaires. Les récepteurs nucléaires RXR, HNF 4 α , HNF 1 α et PPAR γ régulent également ces deux métabolismes. Par ailleurs, une perturbation de l'activité de trois enzymes majeures du catabolisme du cholestérol dans le foie (CYP7A1, CYP7B1 et CYP8B1) a été mise en évidence 3 à 4 jours après une contamination aiguë par gavage d'une dose toxique d'UA (204 mg/kg) (Gueguen 2006b). L'ensemble de ces données suggère que le métabolisme du cholestérol pourrait être perturbé après contamination chronique interne par des doses de faible niveau, c'est-à-dire non néphrotoxiques. Ce premier article de notre travail de thèse s'est attaché à vérifier cette hypothèse en étudiant le métabolisme du cholestérol dans son organe-clé : le foie.

Pour cela, des rats mâles adultes (3 mois) ont été contaminés par une solution de nitrate d'uranyle appauvri (d'activité $1,4 \cdot 10^4$ Bq/g) à une concentration de 40 mg/l (soit environ 2 mg/kg/j ou 14 Bq/rat/j). Cette concentration correspond au double de la concentration d'uranium la plus forte retrouvée dans l'environnement (Juntunen 1991). La contamination se fait *via* l'eau de boisson et dure 9 mois, ce qui correspond approximativement à 20 ans chez l'Homme.

Suite à cette contamination, l'impact de l'UA sur le métabolisme du cholestérol a été évalué au niveau systémique par le profil lipidique du plasma, au niveau tissulaire par la mesure du taux de cholestérol hépatique, et enfin au niveau moléculaire par l'analyse (expression de gène, expression protéique, activité enzymatique) des principaux acteurs intervenant dans les différentes voies du métabolisme hépatique du cholestérol (synthèse, transport, stockage, catabolisme et régulation transcriptionnelle des précédents).

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jsbmb

Cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) activity is modified after chronic ingestion of depleted uranium in the rat

R. Racine^a, L. Grandcolas^a, S. Grison^a, J. Stefani^a, O. Delissen^b, P. Gourmelon^a, G. Veysi re^c, M. Souidi^{a,*}

^a Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), Laboratory of Experimental Toxicology (LRTOX), BP 17, F-92262 Fontenay-aux-Roses Cedex, France

^b Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), Laboratory of Experimental Toxicology (LRTOX), Site du Tricastin, BP 166, F-26702 Pierrelatte Cedex, France

^c Clermont Université, UMR CNRS 6247 et Centre de recherche en nutrition humaine, 24 avenue des Landais, F-63177 Aubière Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 October 2009

Received in revised form 22 March 2010

Accepted 23 March 2010

Keywords:

Cholesterol metabolism

Cytochrome P450

Liver

Depleted uranium

Chronic contamination

Oxysterol

ABSTRACT

Depleted uranium (DU) is a radioactive heavy metal derived from the nuclear energy production. Its wide use in civilian and military items increases the risk of its environmental dissemination, and thus the risk of internal contamination of populations living in such contaminated territories. Previous studies have shown that vitamin D and cerebral cholesterol metabolisms were affected following chronic ingestion of DU. Even more than the brain, the liver is a crucial organ in cholesterol homeostasis since it regulates cholesterol distribution and elimination at body level. The aim of this work was to assess the impact of a low-level chronic ingestion of DU on hepatic cholesterol metabolism. Rats were contaminated with DU in their drinking water at a concentration of 40 mg/l for 9 months. The major effect induced by DU was a decrease of CYP7A1 specific activity (–60%) correlated with a matching decrease of its product 7 α -hydroxycholesterol in the plasma. Hepatic gene expression of transporters ABC A1, ABC G5, ABC G8 and of nuclear receptor RXR was increased, whereas that of catabolism enzyme CYP7B1 was decreased. Thus, after a chronic ingestion of DU, rats experience a modulation of cholesterol catabolism but overcome it, since their cholesterolemia is preserved and no pathology is declared.

  2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Natural uranium is a radioactive heavy metal that is enriched in fissile isotope to produce energy in nuclear power plants. The waste product of this process is depleted uranium (DU), which is 40% less radioactive than natural uranium but retains its chemical properties [1]. DU is commonly used in industry (for example as counterweight or shielding), but also in military items such as armor-plate for vehicles or aircrafts and in various ammunition including armor-piercing rockets. These uses of DU contribute to its dispersion in the environment and therefore increase the risk

of human contamination. The major exposure route for the public would be through ingestion of contaminated food and drink [2]. Moreover, the 4 milliard-years' radiological half-life of DU makes it a perennial threat in contaminated territories.

Although DU is poorly absorbed in the gastrointestinal tract (ca. 1% in the rat), many experimental studies report biological alterations following a chronic internal contamination. These data mainly describe modifications in the physiology of the kidney [3–5], the bone [6,7] and the central nervous system [8–11]. However, modifications of several metabolisms have also been observed after a long-term internal exposure to DU. In particular, vitamin D and xenobiotics metabolisms are modulated after such a contamination [12,13]. Both metabolisms require the action of cytochrome P450 (CYP) enzymes and nuclear receptors, and both of these classes of molecules were affected by DU exposure. Following these results, we tested in a previous study the impact of a chronic ingestion of DU on cerebral cholesterol metabolism, another metabolism involving CYPs and nuclear receptors. We found that the gene expression of many actors involved in cholesterol synthesis, catabolism, and transport was modified, as well as that of nuclear receptors regulating these pathways [14], suggesting that cholesterol metabolism might be a target for DU. Because of the blood–brain barrier, cerebral cholesterol metabolism is independent from cholesterol metabolism in the rest of the body [15,16]. Thus, the impact of a chronic internal contamination of DU on cholesterol metabolism

Abbreviations: ABC, adenosine triphosphate binding cassette transporter; ACAT, acylCoenzymeA: cholesterol acyltransferase; ALT, alanine aminotransferase; Apo, apolipoprotein; AST, aspartate aminotransferase; CYP, cytochrome P450; DU, depleted uranium; FXR, farnesoid-X-receptor; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GGT, gamma-glutamyltranspeptidase; HDL, high-density lipoprotein; HMGCoA R/S, 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase/Synthase; HPRT, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; HNF, hepatocyte nuclear factor; LDL, low-density lipoprotein; LDLr, low-density lipoprotein receptor; LRH-1, liver receptor homolog-1; LXR, liver-X-receptor; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; RXR, retinoid-X-receptor; SHP, small heterodimer partner; SR-B1, scavenger receptor class B type 1; SREBP, sterol regulatory element binding protein.

* Corresponding author. Tel.: +33 1 58 35 91 94; fax: +33 1 58 35 84 67.

E-mail address: maamar.souidi@irsn.fr (M. Souidi).

from the general pool is still unknown. The present study was conducted in order to address this issue. The focus was set on the liver because of its high metabolic activity and of its importance in maintaining cholesterol homeostasis at organ and body level. Indeed, the liver synthesizes high amounts of cholesterol, it has a central role in cholesterol fluxes at body level through lipoprotein metabolism and it is the only organ able to massively discard the body excess cholesterol through the biosynthesis of bile acids.

The aim of the present work is thus to assess the effects of a chronic ingestion of a low level of DU on hepatic cholesterol metabolism. In this regard, rats were contaminated with DU-supplemented drinking water for 9 months. Following this exposure, the impact of the contamination was assessed on various actors of the four pathways of cholesterol metabolism in the liver, namely biosynthesis, transport, storage as cholesterol esters and catabolism into bile acids. In addition, the transcriptional regulation controlling these pathways was also studied.

2. Materials and methods

2.1. Animals

20 male Sprague–Dawley rats (Charles River, L'Arbresle, France) aged 12 weeks were divided into two groups ($n=10$), control and DU-exposed respectively. During the experiment, they were housed in pairs, and maintained in a 12 h light/12 h dark cycle (regular cycle) at $21 \pm 2^\circ\text{C}$ and $50 \pm 10\%$ humidity. The animals had access to a standard pellet rodent diet and water *ad libitum* throughout the experiment.

All experimental procedures were approved by the Animal Care Committee of the Institute of Radioprotection and Nuclear Safety, and complied with French regulation for animal experimentation (Ministry of Agriculture Act No. 87-848, October 19th 1987, modified May 20th 2001).

2.2. Contamination procedure

Depleted uranyl nitrate hexahydrate ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, AREVA-NC, France) was dissolved at a concentration of 40 mg/l (approximately 2 mg/kg/day or 14 Bq/rat/day) in mineral water, which is twice the highest concentration of uranium naturally found on Earth, in drilled wells in Finland [17]. Specific activity of DU was 1.4×10^4 Bq/g and its isotopic composition is $^{238}\text{U} = 99.74\%$, $^{235}\text{U} = 0.255\%$ and $^{234}\text{U} = 0.0055\%$. Rats of the experimental group were given the DU-supplemented water as the only drink for 9 months. Control rats received mineral water. After 9 months, the animals were anesthetized by inhalation of 5% isoflurane (Abbot France, Rungis, France) and euthanized by intracardiac puncture to collect blood. Livers were immediately dissected, deep-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.

2.3. Plasmatic parameters assay

2.3.1. Biochemical parameters

Biochemical parameters were measured in plasma samples with an automated spectrophotometric system (Konelab 20 from Thermo Electron Corporation, Cergy-Pontoise, France), using the manufacturer's biological chemistry reagents. The parameters measured in plasma include total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol, low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol, triglycerides, phospholipids, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), albumin, total bilirubin, gamma-glutamyltranspeptidase (GGT), creatinine and urea.

2.3.2. Plasma 7α -hydroxycholesterol assay

The assay of 7α -hydroxycholesterol (a marker of cholesterol hepatic catabolism) plasma level was performed as described elsewhere [18] on 0.5 ml plasma. 19-Hydroxy-3-acetate cholesterol (Sigma Diagnostics, Isle d'Abeau Chesnes, France) was added to each sample before high performance liquid chromatography as an internal standard for quantification of the peak.

2.4. Hepatic cholesterol assay

Frozen liver samples (about 250 mg) were thawed and homogenized in 5 ml isopropanol using a potter with a Teflon pestle (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). After incubation at 60°C for 1 h:30 and centrifugation at $3220 \times g$ for 10 min, the supernatant was collected and the pellet was re-extracted in 5 ml isopropanol (same procedure but with a 1-h incubation). The supernatant of this second extraction was added to the first one and the total volume was adjusted to the precise weight of 10 ml isopropanol for further calculations. Total and free cholesterol were then assayed using the Amplex Red Cholesterol Assay kit (Invitrogen-Life technologies, Cergy-Pontoise, France) according to the manufacturer's instructions. Before the assay, 100 μl of the samples (isopropanol extracts) were dried down under nitrogen flow and diluted to 1/12 in the reaction buffer of the kit. Esterified cholesterol was calculated as the difference between total and free cholesterol values.

2.5. Real-time PCR

Total RNA was extracted from 25 mg of thawed liver samples using the RNeasy total RNA isolation Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's respective recommendations.

Reverse transcription was performed on 1 μg total mRNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. The cDNA synthesis was conducted at 37°C for 2 h and was ended by the inactivation of the reverse transcriptase after 5 min at 85°C .

Real-time PCR was then carried out on 0.4 ng/ μl cDNA and 0.3 pmol/ μl primers for each reaction, using the SYBR[®] Green technology (Power SYBR[®] Green PCR Master Mix, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. The plates were analyzed on an AbiPrism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) according to the following run: incubation 2 min at 50°C , 10 min at 95°C for activation of the polymerase and 40 cycles of 15 s at 95°C for denaturation and 1 min at 60°C for annealing–extension. Results were normalized to hypoxanthine–guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) and fold-inductions calculated relatively to the control group. Sequences for the forward and reverse primers are listed in Table 1 [14,19–26].

2.6. Western blot

All antibodies were purchased from Tebu-bio (Le Perray-en-Yvelines, France).

Proteins from liver homogenate (liver microsomes for CYP7A1) were loaded, separated by 10% SDS polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto nitrocellulose membrane. The membranes were blocked for 1 h in 5% non-fat dry milk in TBS. The blots were incubated overnight at 4°C with primary antibodies anti-ABC A1 (sc-53569), anti-ABC G5 (sc-18204), anti-ABC G8 (sc-30111), anti-RXR (sc-553) or anti-CYP7A1 (sc-25536) diluted to the appropriate concentration in 2% non-fat dry milk in TBS. Immune complexes were revealed using anti-goat IgG (sc-2768), anti-mouse IgG (sc-2005) or anti-rabbit IgG (sc-2004).

Table 1
Oligonucleotide sequences of primers used in real-time quantitative PCR. The primers sequences are given in the 5'–3' orientation. The primer without reference has been designed by the authors with the PrimerExpress software.

Gene	Forward	Reverse	Length (bp)	Gene accession #	Ref.
<i>hprt</i>	gctcagatgtcatgaaggaga	tcagcgtttaaagttaaccagc	109	NM.012583	[19]
<i>cyp27a1</i>	ggaagggtgccccagaacaa	gcgagggtctccttaatca	71	NM.178847	[20]
<i>cyp7a1</i>	ccaagtcaagtgtccccctcta	gactctcagccccaagt	150	NM.012942	[25]
<i>cyp8b1</i>	gtacacatggaccccgacatc	gggtccatcaggggtgag	76	AB009686	[21]
<i>cyp7b1</i>	tcagatgcaaaagacggtcaga	ttcatgccgtagatattttcag	70	U36992	[14]
<i>cyp51</i>	ctggtcatctgggtcctaaga	cagagccatgaaggatgct	81	NM.012941	[14]
<i>hmgcoa r</i>	ggcgggtcctgcaagt	gcaggtgagcgggtgaga	60	NM.173094	[25]
<i>hmgcoa s</i>	gggtggtggaccaacctct	cacgccccgaaacaccta	65	X55286	[21]
<i>acat 2</i>	gccccagccgacatttt	gtgcaagtgaagccttgactt	80	NM.153728	[23]
<i>ldl-r</i>	cagccgatgcattctgact	agttatccgagcattttcac	69	NM.175762	[25]
<i>sr-b1</i>	gttggtcaccatgggcca	cgtagccccacaggatctca	65	NM.031541	[25]
<i>abc a1</i>	atctcatagatggaagaatgtgaagct	cgtaacaattgtataaccttccaaa	132	NM.78095	[25]
<i>abc g1</i>	aggtctcagccttcaaaagtctct	tctctgaaagtgaatgaaattatcg	85	NM.053502	[14]
<i>abc g5</i>	cgcaagaaaccgattgaa	gtcgaagtgggtggaagagct	67	NM.053754	[25]
<i>apo a1</i>	aatgggacagggtaagga	tgaaccagagtgcccagtt	146	NM.012738	[25]
<i>apo b</i>	tcctaaatcattgtgccttcat	cctgaaatcgggagggaaaact	106	NM.019287	
<i>apo e</i>	tggtgtagacagctttctg	ttgtatgctttactctgcatag	110	NM.138828	[25]
<i>lxra</i>	agcaaacagttaacagggcct	gtgcaatggccaagggc	63	NM.031627	[22]
<i>lxrβ</i>	cttccccacaagttc	cctactcgtgga	151	NM.031626	[14]
<i>rxra</i>	cgcaaacagctgacctacac	tcctcctgacggctccc	134	NM.012805	[25]
<i>fxr</i>	tgacaaagaaagccgcaat	tgtaatggtaccagaggccc	99	NM.021745	[25]
<i>shp</i>	cctggagcagccctctg	aacactgtatgcaaacaggag	64	NM.057133	[18]
<i>lrh-1</i>	gcacctgcaccaggatcag	ccgggtttttcctcaagtt	58	NM.021742	[22]
<i>ppara</i>	tctttcccaaaactcttca	gcacgagctgcgcatgctc	69	NM.013196	[20]
<i>ppary</i>	tcatgaccagggagttcctca	tcataatccagtgactgaaact	103	NM.013124	[20]
<i>hnf 1α</i>	acacctggtactccgcaag	ctggtggaattgctgagc	51	NM.012669	[24]
<i>hnf 4α</i>	tggcaaacactacggagcct	ctgaagaatcccttgcagcc	51	NM.022180	[24]
<i>srebp 2</i>	agctggcaaatcagaaaacaag	cgatctcaagtccacatcactgt	58	XM.216989	[22]

antibodies coupled to horseradish peroxidase and the luminol derivative of Immobilon Western (Millipore, Billerica, USA). Samples were normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) which was detected using a rabbit anti-rat primary antibody (sc-25778) or to β-actin using a mouse anti-rat primary antibody (sc-47778). Reaction intensity was determined by computer-assisted densitometry using a LAS-3000 analyser (Fuji-film, Courbevoie, France).

2.7. Assay of CYP7A1, CYP27A1, CYP7B1 and CYP8B1 specific activities

The specific activities of CYP7A1 and CYP27A1 were assessed on hepatic microsomal and mitochondrial fractions respectively using a radioisotopic method described previously [27]. The specific activities of CYP7B1 and CYP8B1 were conducted on hepatic microsomes according to Souidi et al. [28,29]. The assays were conducted on six animals of each group, randomly selected.

2.8. Statistical analysis

Results are expressed as mean ± SEM. Unpaired Student's *t*-test was routinely performed for statistical analysis of the data, but was replaced by Mann–Whitney Rank Sum Test when the equal variance test failed (determined by the SigmaStat software). Differences were considered statistically significant when *p* < 0.05.

3. Results

3.1. General health status and plasma biochemical parameters

Food and drink intakes were not affected by chronic ingestion of DU (data not shown), and no difference was recorded in body weight or in liver weight at the end of the contamination (Table 2). Macroscopic appearance of main organs (liver, lung, heart, intestines, kidney, brain, testis) from DU-exposed rats did not differ from that of control rats (data not shown).

In the plasma, the lipid profile was unchanged after DU chronic ingestion. Blood concentrations of markers of liver integrity (ALT and AST) and liver function (GGT and total bilirubin) were also similar in control and DU-exposed rats.

Finally, the plasmatic level of 7α-hydroxycholesterol (a liver-specific biomarker of the classical pathway of cholesterol catabolism) displayed a 59% decrease (*p* < 0.05) in the DU-exposed rats compared to the controls.

3.2. Tissue cholesterol assay

Levels of total cholesterol and free cholesterol were measured in the liver from animals of both groups, and esterified cholesterol was

Table 2
General health and biochemical parameters in control and DU-exposed animals. Values are expressed as mean ± SEM (*n* = 10) **p* < 0.05. ALT = alanine aminotransferase, AST = aspartate aminotransferase, GGT = gamma-glutamyltranspeptidase, HDL = high-density lipoprotein, LDL = low-density lipoprotein.

Parameters	Control	DU-exposed
Final body weight (g)	595 ± 11	578 ± 21
Final liver weight (g)	19.3 ± 0.7	18.7 ± 0.9
Plasma profile		
Cholesterol (mM)	2.76 ± 0.17	2.53 ± 0.13
HDL-cholesterol (mM)	1.65 ± 0.10	1.62 ± 0.10
LDL-cholesterol (mM)	0.48 ± 0.07	0.46 ± 0.04
Triglycerides (mM)	1.78 ± 0.20	1.52 ± 0.13
Phospholipids (g/l)	1.93 ± 0.08	1.79 ± 0.06
ALT (U/l)	51.0 ± 6.5	55.2 ± 6.5
AST (U/l)	122 ± 12	114 ± 8
GGT (U/l)	4.29 ± 1.35	2.73 ± 0.29
Total bilirubin (μM)	5.96 ± 0.65	4.89 ± 0.44
Creatinine (μM)	56.4 ± 2.8	58.1 ± 3.2
Urea (mM)	5.9 ± 0.5	5.7 ± 0.2
7α-Hydroxycholesterol (ng/ml)	69.0 ± 11.3	28.3 ± 4.0*
Hepatic cholesterol		
Total cholesterol (mg/g liver)	2.14 ± 0.12	2.41 ± 0.26
Free cholesterol (mg/g liver)	1.59 ± 0.05	1.78 ± 0.26
Esterified cholesterol (mg/g liver)	0.54 ± 0.15	0.62 ± 0.16

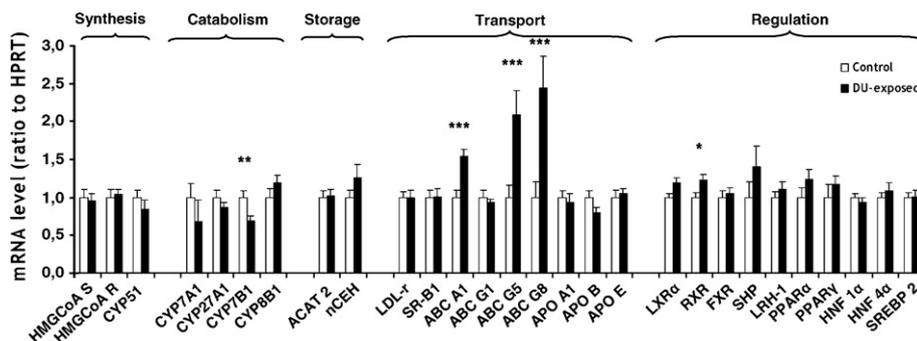


Fig. 1. mRNA levels of major actors involved in cholesterol metabolism in the liver following chronic DU ingestion. Results are expressed as a ratio to HPRT mRNA level. The levels of non-contaminated control rats were arbitrarily set at 1. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 10$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

calculated as their difference. These values are reported in Table 2. No difference was observed in the levels of total, free or esterified hepatic cholesterol between DU-exposed and control rats.

3.3. Gene expression

The mRNA levels of the major actors of cholesterol synthesis, catabolism, storage, transport and of transcription factors regulating these proteins are reported in Fig. 1. The studied genes were involved in (i) cholesterol synthesis (3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Synthase (HMGCoA S), 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase (HMGCoA R) and cyp51), (ii) cholesterol catabolism (CYP7A1, CYP27A1, CYP7B1, and CYP8B1), (iii) cholesterol storage as esters (acylCoenzymeA: cholesterol acyltransferase 2 (ACAT 2) which esterifies cholesterol and neutral hepatic cholesterol ester hydrolase (nCEH) which catalyzes the reverse reaction), (iv) hepatic cholesterol fluxes (LDL-receptor (LDL-r), scavenger receptor class b type 1 (SR-B1), ATP binding cassette (ABC) transporter A1 (ABC A1), ABC G1, ABC G5, ABC G8), and apolipoproteins (APO) A1, APO B and APO E), and finally (v) major nuclear receptors and transcription factors involved in the transcriptional regulation of the metabolic pathways cited above (liver-X-receptor α (LXR α), retinoid-X-receptor α (RXR), farnesoid-X-receptor (FXR), small heterodimer partner (SHP), liver-receptor homolog-1 (LRH-1), peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α), PPAR γ ,

hepatocyte nuclear factor 1 α (HNF 1 α), HNF 4 α , and sterol regulatory element binding protein (SREBP 2).

The gene expression of the enzymes involved in cholesterol synthesis and storage was unchanged after chronic contamination with DU.

The hepatic gene expression of CYP7B1, involved in cholesterol catabolism, was significantly decreased (-31% , $p < 0.01$) in DU-exposed animals compared to the control animals.

The mRNA level of the nuclear receptor RXR was increased ($+23\%$, $p < 0.05$) in the contaminated rats compared to the control rats.

Concerning the actors involved in cholesterol transport, the gene expression of three ABC transporters was increased in the experimental group compared to the control group: ABC A1 ($+54\%$, $p < 0.001$), ABC G5 ($+109\%$, $p < 0.001$), and ABC G8 ($+144\%$, $p < 0.001$).

3.4. Specific activities of catabolism enzymes (CYP7A1, CYP27A1, CYP7B1, and CYP8B1)

The specific activities of hepatic CYP7A1, CYP27A1, CYP7B1, and CYP8B1 are reported in Fig. 2. For CYP7A1, the DU-exposed rats displayed a specific activity of 2.97 ± 0.78 pmol/min/mg proteins vs. 7.46 ± 1.67 pmol/min/mg proteins in the control rats, leading to a significant decrease in the exposed group (-60% , $p < 0.05$). Conversely, the specific activities of CYP27A1

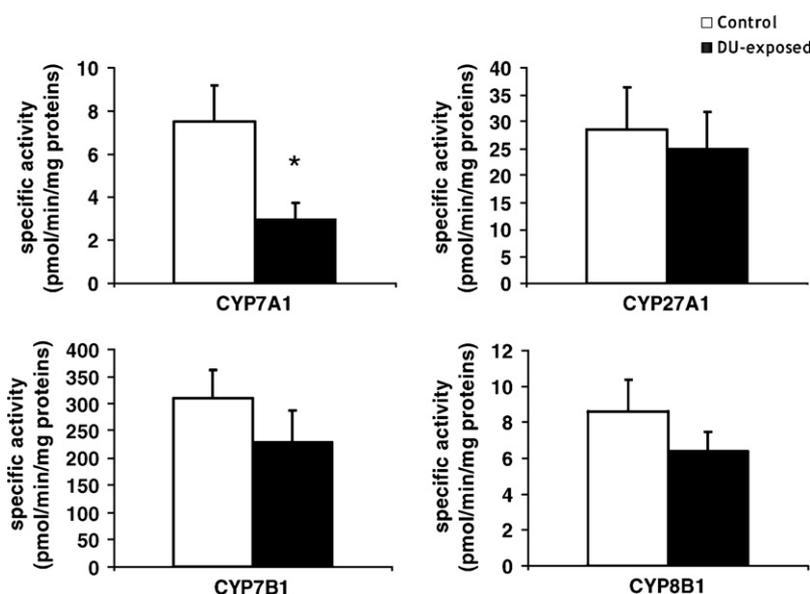


Fig. 2. Specific activities of hepatic CYP7A1, CYP27A1, CYP7B1, and CYP8B1 following chronic DU ingestion. Data are expressed as means \pm SEM ($n = 6$). * $p < 0.05$.

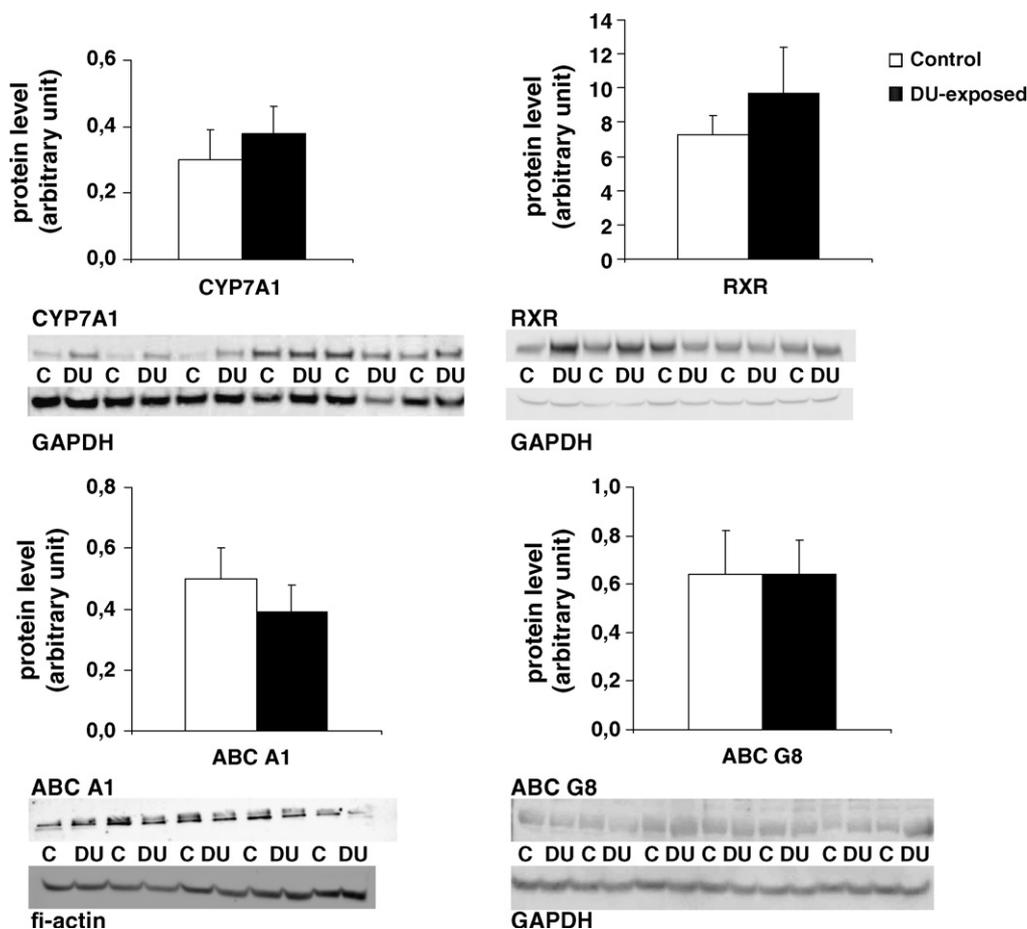


Fig. 3. Protein levels of hepatic CYP7A1, ABC A1, ABC G8 and RXR following chronic DU ingestion. Results are expressed as a ratio to GAPDH or β -actin protein level. Data are expressed as means \pm SEM ($n=5-7$).

(28.47 ± 7.91 pmol/min/mg proteins vs. 24.88 ± 6.88 pmol/min/mg proteins in the control rats), CYP7B1 (310.13 ± 53.23 pmol/min/mg proteins vs. 228.80 ± 59.65 pmol/min/mg proteins in the control rats), and CYP8B1 (8.6 ± 1.8 pmol/min/mg proteins vs. 6.40 ± 1.1 pmol/min/mg proteins in the control rats) did not differ significantly between both groups.

3.5. Protein expression

The relative protein levels of hepatic ABC A1, ABC G5, ABC G8, RXR and CYP7A1 were assessed by Western blot and the values are reported in Fig. 3.

The various antibodies tested for the assay of ABC G5 protein level did not yield a sufficient signal to be considered specific; therefore no data is presented for ABC G5 in this report.

No significant difference between both groups was observed for either ABC A1 (0.5 ± 0.1 for the DU-exposed rats vs. 0.39 ± 0.09 for the control rats), ABC G8 (0.64 ± 0.18 and 0.64 ± 0.14 for the experimental and the control groups respectively), RXR (7.30 ± 1.11 for the DU-exposed rats and 9.69 ± 2.69 for the control rats) or CYP7A1 (0.30 ± 0.09 for the DU-exposed rats and 0.38 ± 0.08 for the control rats).

4. Discussion

The aim of the present work was to ascertain whether cholesterol metabolism could be altered following a chronic internal exposure to DU. In this regard we assessed the consequences of

such a contamination on cholesterol metabolism in rats given DU in their drinking water for 9 months. This study focuses on the liver, in which DU is known to accumulate to some extent [3,4,30].

During the whole contamination time, the general health parameters (food and drink intakes, body weight gain) were preserved in the animals of the experimental group (data not shown). The plasma level of biomarkers of hepatic integrity (ALT, AST) and function (GGT, bilirubin) as well as those of biomarkers of renal function (creatinine, urea) were unchanged following DU exposure. The latter results suggest that the level of DU in the contamination solution is neither hepatotoxic nor nephrotoxic. The plasma lipid profile was also unaffected after the contamination, including total cholesterol, HDL- and LDL-cholesterol concentrations, indicating no perturbation of lipid metabolism at body level.

The plasma level of 7α -hydroxycholesterol displayed a 59% decrease in rats chronically ingesting DU compared to the control rats. This oxysterol is synthesized from cholesterol by the liver-specific enzyme cholesterol 7α -hydroxylase (CYP7A1), which initiates the classical pathway of the catabolism of cholesterol into bile acid. The level of circulating 7α -hydroxycholesterol has been previously correlated with the specific activity of CYP7A1 [31–33]. Interestingly, 7α -hydroxycholesterol plasma level was also reported to decrease 3 days after a unique subcutaneous injection of a high dose of DU in rats [18]. Moreover, two human studies reported variations of 7α -hydroxycholesterol plasma levels after accidental exposure to a high dose of ionizing radiations. In one case, it was reported to decrease [34], whereas in the other case the authors showed an increase of 7α -hydroxycholesterol blood level [35]. In both cases the variation in 7α -hydroxycholesterol preceded

a matching decrease/increase of ALT and AST levels in the blood of a man accidentally exposed to β radiations. The discrepancy in the variations observed in the different studies may be due to the difference in the exposure pattern or in the nature of the radiations (DU emits α radiations). Although these discrepancies are not yet understood, the variations of 7α -hydroxycholesterol plasma levels reported in these studies and the present work draw attention to a possible sensitivity of this metabolite to ionizing radiations exposure. Moreover, 7α -hydroxycholesterol was recently proposed as a potential biomarker for the evaluation of liver alteration after external high dose irradiation [35].

As mentioned earlier, the level of circulating 7α -hydroxycholesterol is linked to the specific activity of CYP7A1 in the liver. Thus, this activity was assessed and was found to decrease by 60% in the DU-exposed rats compared to the control group. This result perfectly matches the decrease of the plasma level of 7α -hydroxycholesterol and confirms the direct link between the level of the circulating product and the hepatic enzymatic activity.

Since the decrease of the specific activity of CYP7A1 is likely to induce a perturbation of the catabolism of cholesterol into bile acids, the specific activities of other major enzymes of this metabolic pathway were assessed. Surprisingly, the alternative pathway of bile acids synthesis did not seem to be affected, as shown by the unchanged activities of CYP27A1 and CYP7B1. Thus, these two results suggest that although the classical pathway of bile acids synthesis was decreased in the animals chronically ingesting DU, the alternative pathway did not compensate by increasing its rate.

To assess the repercussions of these results on cholesterol homeostasis in the liver, the hepatic cholesterol concentration was measured. The liver concentration of total cholesterol was unaffected after DU-exposure, as were the free and esterified fractions. Thus, the observed decrease in cholesterol hepatic catabolism did not lead to a perturbation of cholesterol homeostasis at organ level in contaminated animals.

At this point three questions arose: (1) is the effect observed on CYP7A1 activity due to an action at protein level or is it a consequence of a change in the transcriptional regulation system? (2) is this decrease compensating a modification of another metabolic pathway such as cholesterol synthesis or uptake by the liver? and (3) are there other “targets” of DU-exposure in cholesterol metabolism? To answer these questions, the gene expression of the major actors involved in cholesterol metabolism was assessed.

The answer to the first question was given by the mRNA level of CYP7A1, which did not statistically differ between DU-exposed and control rats. Thus, the action of DU is not taking place at gene expression level. This was confirmed by the absence of modification in the mRNA levels of many nuclear receptors and transcription factors regulating CYP7A1. In particular, LXR α , LRH-1, HNF 4 α , FXR, SHP and PPAR α are involved in CYP7A1 transcriptional regulation [15,36–38] and displayed similar mRNA levels in both groups. The protein level of CYP7A1 in hepatic microsomes was also unaffected after the contamination. This invalidates the hypothesis of an action of DU on the protein's synthesis or degradation rates. Consequently, it suggests that the decrease in CYP7A1 activity rather results from an alteration of a post-translational feature known to influence CYP7A1 activity (for instance its phosphorylation status [39–42]).

The questions of the impact of DU on other pathways than catabolism and of other possible targets were answered by a PCR study covering cholesterol synthesis, storage, transport, and the associated nuclear receptors. Most of these genes had an unaltered expression, suggesting that the decrease in CYP7A1 activity was not triggered by a perturbation of synthesis or storage processes, nor did it respond to a modification in cholesterol uptake. In contrast, the mRNA levels of three ABC transporters involved in cholesterol efflux were increased: ABC A1 (which is involved in

the secretion of native HDLs with Apo A-I), and ABC G5 and ABC G8, which heterodimerize and export free cholesterol directly into the bile. This concurrent increase in the transcription of ABC G5 and ABC G8 is noteworthy, since it is required for the synthesis of a functional heterodimer. In addition to the ABC transporters, a decrease in the transcription of CYP7B1 and an increase in that of RXR were observed in the DU-exposed rats. The lack of impact of all these modifications at organ level was confirmed by the absence of alteration of the corresponding enzymatic activity (for CYP7B1) or protein levels (despite the lack of data for ABC G5, the fact that ABC G8 translation was not activated is sufficient to infer that no increase in the functional heterodimer was triggered).

Thus, every pathway of cholesterol hepatic metabolism seem unaltered after DU exposure except for the matching decreases of hepatic CYP7A1 activity and 7α -hydroxycholesterol circulating level. This decrease of the classical pathway of bile acids biosynthesis is unlikely to seriously alter the bile acid pool. Indeed, an impaired pool of bile acids would have triggered changes in cholesterol intestinal absorption, thus in hepatic uptake and possibly in cholesterolemia. Moreover, bile acids are potent activators of nuclear receptors like FXR or PXR, which regulate their synthesis and transport. These nuclear receptors and their target genes would have been expected to undergo major modifications in case of a disruption in bile acid synthesis. Thus, this decrease of CYP7A1 activity is difficult to explain since cholesterol metabolism seems balanced. Further studies are needed to assess more precisely the impact of these effects on bile acid metabolism.

In any case, the results reported in this study differ entirely from those obtained in the cerebral cholesterol study after the same contamination [14]. Indeed, many genes involved in cholesterol synthesis, transport, catabolism and regulation pathways were modified in the brain after DU-exposure. Of these, only ABC A1 and RXR are in common with the present work. This is in accordance with the fact that cholesterol homeostasis is maintained independently in the brain and the liver. Moreover, the difference in DU accumulation in these organs may also be responsible for this discrepancy.

In conclusion, this work reports a 60% decrease in CYP7A1 specific activity and 7α -hydroxycholesterol blood level in rats after a daily ingestion of a low concentration of DU for 9 months. Further studies are required to elucidate the mechanism (possibly post-translational) behind this variation. Despite this modification, cholesterol homeostasis was preserved at liver and body level. The impact of this type of contamination on an already unbalanced system (like animals prone to hypercholesterolemia or cholelithiasis) would be of interest to ascertain the influence of DU on cholesterol metabolism.

Acknowledgements

The authors thank Cédric Baudelin and Frédéric Voyer for animal care and contamination. This work is part of the ENVIRHOM research program supported by the Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN) and was also partly funded by the Délégation Générale de l'Armement (2006.94.0920).

References

- [1] E. Craft, A. Abu-Qare, M. Flaherty, M. Garofolo, H. Rincavage, M. Abou-Donia, Depleted and natural uranium: chemistry and toxicological effects, *J. Toxicol. Environ. Health B: Crit. Rev.* 7 (4) (2004) 297–317.
- [2] D. Brugge, J.L. de Lemos, B. Oldmixon, Exposure pathways and health effects associated with chemical and radiological toxicity of natural uranium: a review, *Rev. Environ. Health* 20 (3) (2005) 177–193.
- [3] A.P. Gilman, D.C. Villeneuve, V.E. Secours, A.P. Yagminas, B.L. Tracy, J.M. Quinn, V.E. Valli, R.J. Willes, M.A. Moss, Uranyl nitrate: 28-day and 91-day toxicity studies in the Sprague–Dawley rat, *Toxicol. Sci.* 41 (1) (1998) 117–128.

- [4] A. Ortega, J.L. Domingo, J.M. Llobet, J.M. Tomas, J.L. Paternain, Evaluation of the oral toxicity of uranium in a 4-week drinking-water study in rats, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 42 (6) (1989) 935–941.
- [5] G. Zhu, X. Xiang, X. Chen, L. Wang, H. Hu, S. Weng, Renal dysfunction induced by long-term exposure to depleted uranium in rats, *Arch. Toxicol.* 83 (1) (2009) 37–46.
- [6] P.L. Diaz Sylvester, R. Lopez, A.M. Ubios, R.L. Cabrini, Exposure to subcutaneously implanted uranium dioxide impairs bone formation, *Arch. Environ. Health* 57 (4) (2002) 320–325.
- [7] A.M. Ubios, M.B. Guglielmotti, T. Steimetz, R.L. Cabrini, Uranium inhibits bone formation in physiologic alveolar bone modeling and remodeling, *Environ. Res.* 54 (1) (1991) 17–23.
- [8] M. Belles, M.L. Albina, V. Linares, M. Gomez, D.J. Sanchez, J.L. Domingo, Combined action of uranium and stress in the rat. I. Behavioral effects, *Toxicol. Lett.* 158 (3) (2005) 176–185.
- [9] C. Bussy, P. Lestaavel, B. Dhieux, C. Amourette, F. Paquet, P. Gourmelon, P. Houpert, Chronic ingestion of uranyl nitrate perturbs acetylcholinesterase activity and monoamine metabolism in male rat brain, *Neurotoxicology* 27 (2) (2006) 245–252.
- [10] H. Bensoussan, L. Grancolas, B. Dhieux-Lestaavel, O. Delissen, C.M. Vacher, I. Dublineau, P. Voisin, P. Gourmelon, M. Taouis, P. Lestaavel, Heavy metal uranium affects the brain cholinergic system in rat following sub-chronic and chronic exposure, *Toxicology* 261 (1–2) (2009) 59–67.
- [11] M. Monleau, C. Bussy, P. Lestaavel, P. Houpert, F. Paquet, V. Chazel, Bioaccumulation and behavioural effects of depleted uranium in rats exposed to repeated inhalations, *Neurosci. Lett.* 390 (1) (2005) 31–36.
- [12] E. Tissandie, Y. Gueguen, J.M. Lobaccaro, L. Grandcolas, P. Voisin, J. Aigueperse, P. Gourmelon, M. Souidi, In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on vitamin D3 metabolism in rat, *Biochim. Biophys. Acta* 1770 (2) (2007) 266–272.
- [13] M. Souidi, Y. Gueguen, C. Linard, N. Dudoignon, S. Grison, C. Baudelin, C. Marquette, P. Gourmelon, J. Aigueperse, I. Dublineau, In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on CYP3A and associated nuclear receptors PXR and CAR in the rat, *Toxicology* 214 (1–2) (2005) 113–122.
- [14] R. Racine, Y. Gueguen, P. Gourmelon, G. Veysiere, M. Souidi, Modifications of the expression of genes involved in cerebral cholesterol metabolism in the rat following chronic ingestion of depleted uranium, *J. Mol. Neurosci.* 38 (2) (2009) 159–165.
- [15] J.Y. Chiang, Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms, *J. Hepatol.* 40 (3) (2004) 539–551.
- [16] D.W. Russell, The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis, *Annu. Rev. Biochem.* 72 (2003) 137–174.
- [17] R. Juntunen, Uranium and radon in wells drilled into bedrock in southern Finland, in: Geological Survey of Finland, Report of Investigation 98, Espoo, 1991.
- [18] Y. Gueguen, M. Souidi, C. Baudelin, N. Dudoignon, S. Grison, I. Dublineau, C. Marquette, P. Voisin, P. Gourmelon, J. Aigueperse, Short-term hepatic effects of depleted uranium on xenobiotic and bile acid metabolizing cytochrome P450 enzymes in the rat, *Arch. Toxicol.* 80 (4) (2006) 187–195.
- [19] S. Fiorucci, C. Clerici, E. Antonelli, S. Orlandi, B. Goodwin, B.M. Sadeghpour, G. Sabatino, G. Russo, D. Castellani, T.M. Willson, M. Pruzanski, R. Pellicciari, A. Morelli, Protective effects of 6-ethyl chenodeoxycholic acid, a farnesoid X receptor ligand, in estrogen-induced cholestasis, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313 (2) (2005) 604–612.
- [20] A. Ropenga, A. Chapel, M. Vandamme, N.M. Griffiths, Use of reference gene expression in rat distal colon after radiation exposure: a caveat, *Radiat. Res.* 161 (5) (2004) 597–602.
- [21] E. Tissandie, Y. Gueguen, J.M. Lobaccaro, F. Paquet, J. Aigueperse, M. Souidi, Effects of depleted uranium after short-term exposure on vitamin D metabolism in rat, *Arch. Toxicol.* 80 (8) (2006) 473–480.
- [22] R.I. Macias, M.A. Serrano, M.J. Monte, S. Jimenez, B. Hernandez, J.J. Marin, Long-term effect of treating pregnant rats with ursodeoxycholic acid on the congenital impairment of bile secretion induced in the pups by maternal cholestasis, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 312 (2) (2005) 751–758.
- [23] S. Shibata, K. Hayakawa, Y. Egashira, H. Sanada, Roles of nuclear receptors in the up-regulation of hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase by cholestyramine in rats, *Life Sci.* 80 (6) (2007) 546–553.
- [24] R. Racine, L. Grandcolas, S. Grison, P. Gourmelon, Y. Gueguen, G. Veysiere, M. Souidi, Molecular modifications of cholesterol metabolism in the liver and the brain after chronic contamination with cesium 137, *Food. Chem. Toxicol.* 47 (7) (2009) 1642–1647.
- [25] T. Su, D.J. Waxman, Impact of dimethyl sulfoxide on expression of nuclear receptors and drug-inducible cytochromes P450 in primary rat hepatocytes, *Arch. Biochem. Biophys.* 424 (2) (2004) 226–234.
- [26] M. Souidi, E. Tissandie, L. Grandcolas, S. Grison, F. Paquet, P. Voisin, J. Aigueperse, P. Gourmelon, Y. Gueguen, Chronic contamination with 137cesium in rat: effect on liver cholesterol metabolism, *Int. J. Toxicol.* 25 (6) (2006) 493–497.
- [27] M. Souidi, M. Parquet, J. Ferezou, C. Lutton, Modulation of cholesterol 7 α -hydroxylase and sterol 27-hydroxylase activities by steroids and physiological conditions in hamster, *Life Sci.* 64 (17) (1999) 1585–1593.
- [28] M. Souidi, M. Parquet, S. Dubrac, O. Audas, T. Becue, C. Lutton, Assay of microsomal oxysterol 7 α -hydroxylase activity in the hamster liver by a sensitive method: in vitro modulation by oxysterols, *Biochim. Biophys. Acta* 1487 (1) (2000) 74–81.
- [29] M. Souidi, S. Dubrac, M. Parquet, F. Milliat, J. Ferezou, C. Serougne, C. Loison, M. Riottot, N. Boudem, T. Becue, C. Lutton, Effects of dietary 27-hydroxycholesterol on cholesterol metabolism and bile acid biosynthesis in the hamster, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 81 (9) (2003) 854–863.
- [30] F. Paquet, P. Houpert, E. Blanchardon, O. Delissen, C. Maubert, B. Dhieux, A.M. Moreels, S. Frelon, P. Gourmelon, Accumulation and distribution of uranium in rats after chronic exposure by ingestion, *Health Phys.* 90 (2) (2006) 139–147.
- [31] M. Souidi, P. Scanff, S. Grison, P. Gourmelon, J. Aigueperse, Effects of ionizing radiation on the activity of the major hepatic enzymes implicated in bile acid biosynthesis in the rat, *C. R. Biol.* 330 (12) (2007) 861–870.
- [32] I. Bjorkhem, E. Reihner, B. Angelin, S. Ewerth, J.E. Akerlund, K. Einarsson, On the possible use of the serum level of 7 α -hydroxycholesterol as a marker for increased activity of the cholesterol 7 α -hydroxylase in humans, *J. Lipid Res.* 28 (8) (1987) 889–894.
- [33] H. Oda, H. Yamashita, K. Kosahara, S. Kuroki, F. Nakayama, Esterified and total 7 α -hydroxycholesterol in human serum as an indicator for hepatic bile acid synthesis, *J. Lipid Res.* 31 (12) (1990) 2209–2218.
- [34] J.M. Bertho, L. Roy, M. Souidi, M. Benderitter, Y. Gueguen, J.J. Lataillade, M. Prat, T. Fagot, T. De Revel, P. Gourmelon, New biological indicators to evaluate and monitor radiation-induced damage: an accident case report, *Radiat. Res.* 169 (5) (2008) 543–550.
- [35] J.M. Bertho, L. Roy, M. Souidi, M. Benderitter, E. Bey, R. Racine, T. Fagot, P. Gourmelon, Initial evaluation and follow-up of acute radiation syndrome in two patients from the Dakar accident, *Biomarkers* 14 (2) (2009) 94–102.
- [36] B. Goodwin, M.A. Watson, H. Kim, J. Miao, J.K. Kemper, S.A. Kliewer, Differential regulation of rat and human CYP7A1 by the nuclear oxysterol receptor liver X receptor- α , *Mol. Endocrinol.* 17 (3) (2003) 386–394.
- [37] T.T. Lu, M. Makishima, J.J. Repa, K. Schoonjans, T.A. Kerr, J. Auwerx, D.J. Mangelsdorf, Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors, *Mol. Cell* 6 (3) (2000) 507–515.
- [38] S.M. Post, H. Duez, P.P. Gervois, B. Staels, F. Kuipers, H.M. Princen, Fibrates suppress bile acid synthesis via peroxisome proliferator-activated receptor- α -mediated downregulation of cholesterol 7 α -hydroxylase and sterol 27-hydroxylase expression, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21 (11) (2001) 1840–1845.
- [39] P.M. Tang, J.Y. Chiang, Modulation of reconstituted cholesterol 7 α -hydroxylase by phosphatase and protein kinase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134 (2) (1986) 797–802.
- [40] M. Aguiar, R. Masse, B.F. Gibbs, Regulation of cytochrome P450 by posttranslational modification, *Drug Metab. Rev.* 37 (2) (2005) 379–404.
- [41] D. Stroup, Kinase/phosphatase regulation of CYP7A1, *Front. Biosci.* 10 (2005) 1678–1692.
- [42] D. Stroup, J.R. Ramsaran, Cholesterol 7 α -hydroxylase is phosphorylated at multiple amino acids, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329 (3) (2005) 957–965.

CHOLESTEROL 7 α -HYDROXYLASE (CYP7A1) ACTIVITY IS MODIFIED AFTER CHRONIC INGESTION OF DEPLETED URANIUM IN THE RAT

R. Racine¹, L. Grandcolas¹, S. Grison¹, J. Stefani¹, O. Delissen², P. Gourmelon¹, G. Veyssièrè³, M. Souidi^{1†}

¹ Institute for Radiological protection and Nuclear Safety (IRSN), Laboratory of Experimental Toxicology (LRTOX). BP 17, F-92262 Fontenay-aux-Roses Cedex, France.

² Institute for Radiological protection and Nuclear Safety (IRSN), Laboratory of Experimental Toxicology (LRTOX). Site du Tricastin, B.P. 166, F-26702 Pierrelatte Cedex, France

³ Clermont Université, UMR CNRS 6247 et Centre de recherche en nutrition humaine, 24, avenue des Landais, F-63177 Aubière Cedex, France.

† Corresponding author. Tel : +33.1.58.35.91.94, fax : + 33.1.58.35.84.67. E-mail address : maamar.souidi@irsn.fr

1. Abstract

Depleted uranium (DU) is a radioactive heavy metal derived from the nuclear energy production. Its wide use in civilian and military items increases the risk of its environmental dissemination, and thus the risk of internal contamination of populations living in such contaminated territories. Previous studies have shown that vitamin D and cerebral cholesterol metabolisms were affected following chronic ingestion of DU. Even more than the brain, the liver is a crucial organ in cholesterol homeostasis since it regulates cholesterol distribution and elimination at body level. The aim of this work is to assess the impact of a low-level chronic ingestion of DU on hepatic cholesterol metabolism. Rats were contaminated with DU in their drinking water at a concentration of 40 mg/l for 9 months. The major effect induced by DU was a decrease of CYP7A1 specific activity (-60 %) correlated with a matching decrease of its product 7 α -hydroxycholesterol in the plasma. Hepatic gene expression of transporters ABCA1, ABCG5, ABCG8 and of nuclear receptor RXR was increased, whereas that of catabolism enzyme CYP7B1 decreased. Thus, after a chronic ingestion of DU, rats experience a modulation of cholesterol catabolism but overcome it, since their cholesterolemia is preserved and no pathology is declared.

2. Keywords

Cholesterol metabolism, cytochrome P450, liver, depleted uranium, chronic contamination, oxysterol

3. Abbreviations

ABC: adenosine triphosphate binding cassette transporter, ACAT: acylCoenzymeA: cholesterol acyltransferase, ALT: alanine aminotransferase, Apo: apolipoprotein, AST: aspartate aminotransferase, CYP: cytochrome P450, DU: depleted uranium, FXR: farnesoid-X-receptor, GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase GGT: gamma-glutamyltranspeptidase, HDL: high-density lipoprotein, HMGCoA R/S: 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase/Synthase, HPRT: hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, HNF: hepatic nuclear factor, LDL: low-density lipoprotein, LDLr: low-density lipoprotein receptor, LRH-1: liver receptor homolog-1, LXR: liver-X-receptor, PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor, RXR: retinoid-X-receptor, SHP: small heterodimer partner, SR-B1: scavenger receptor class B type 1, SREBP: sterol regulatory element binding protein.

4. Introduction

Natural uranium is a radioactive heavy metal that is enriched in fissile isotope to produce energy in nuclear power plants. The waste product of this process is depleted uranium (DU), which is 40 % less radioactive than natural uranium but retains its chemical properties (Craft 2004). DU is commonly used in industry (for example as counterweight or shielding), but also in military items such as armor-plate for vehicles or aircrafts, and various ammunition including armor-piercing rockets. These uses of DU contribute to its dispersion in the environment and therefore increase the risk of

human contamination. The major exposure route for the public would be through ingestion of contaminated food and drink (Saher 2005).

The experimental data concerning the biologic effects of a chronic internal contamination with DU mainly describe modifications in the physiology of the kidney (Altmann 2004; Gilman 1998; Ortega 1989), the bone (Diaz Sylvester 2002; Ubios 1991) and the central nervous system (Belles 2005; Bensoussan 2009; Bussy 2006; Monleau 2005). However, modifications of several metabolisms have also been observed after a long-term internal exposure to DU. In particular, vitamin D and xenobiotics metabolisms are modulated after such a contamination (Souidi 2005; Tissandie 2007). Both metabolisms require the action of cytochrome P450 (CYP) enzymes and nuclear receptors, and both of these classes of molecules were affected by DU exposure. Following these results, we tested in a previous study the impact of a chronic ingestion of DU on cerebral cholesterol metabolism, another metabolism involving CYPs and nuclear receptors. We found that the gene expression of many actors involved in cholesterol synthesis, catabolism, transport, as well as that of nuclear receptors regulating these pathways was modified (Racine 2009b), suggesting that cholesterol metabolism might be a target for DU. Because of the blood-brain barrier, cerebral cholesterol metabolism is independent from cholesterol metabolism in the rest of the body (Chiang 2004; Russell 2003). Thus, the impact of a chronic internal contamination of DU on cholesterol metabolism from the general pool is still unknown. The present study was conducted in order to address this issue. The focus was set on the liver because of its high metabolic activity and of its importance in maintaining cholesterol homeostasis at organ and body level. Indeed, the liver synthesizes high amounts of cholesterol, it has a central role in cholesterol fluxes at body level through lipoprotein metabolism and it is the only organ able to massively discard the body excess cholesterol through the biosynthesis of bile acids.

The aim of the present work is thus to assess the effects of a chronic ingestion of a low level of DU on hepatic cholesterol metabolism. In this regard, rats were contaminated through DU-supplemented drinking water for 9 months. Following this exposure, the impact of the contamination was assessed on various actors of the four pathways of cholesterol metabolism in the liver, namely biosynthesis, transport, storage as cholesterol esters and catabolism into bile acids. In addition, the transcriptional regulation controlling these pathways was also studied.

5. Materials and Methods

5.1 Animals

Male Sprague-Dawley rats (Charles River, L'Arbresle, France) aged 12 weeks were used for the experiment (n=10). During the experiment, they were housed in pairs maintained in a 12 h light/12 h dark cycle (regular cycle) at 21 ± 2 °C and 50 ± 10 % humidity, with access to a standard pellet rodent diet and water ad libitum. For the experiment, the rats were divided into two groups (n=10), control and DU-exposed respectively.

All experimental procedures were approved by the Animal Care Committee of the Institute of Radioprotection and Nuclear Safety, and complied with French regulation for animal experimentation (Ministry of Agriculture Act No. 87-848, Oct. 19th 1987, modified May 20th 2001).

5.2 Contamination procedure

Depleted uranyl nitrate hexahydrate ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, AREVA-NC, France) was dissolved at a concentration of 40 mg/L (approximately 2 mg/kg/day or 14 Bq/rat/day) in mineral water. Specific activity of DU is $1.4 \cdot 10^4$ Bq/g and its isotopic composition is $^{238}\text{U} = 99.74\%$, $^{235}\text{U} = 0.255\%$ and $^{234}\text{U} = 0.0055\%$. Rats of the experimental group were given the DU-supplemented water as the only drink for 9 months. Control rats received mineral water. After 9 months, the animals were anesthetized by inhalation of 5 % isoflurane (Abbot France, Rungis, France) and euthanized by intracardiac puncture to collect blood. Livers were immediately dissected, deep-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.

5.3 Plasmatic parameters assay

5.3.1 Biochemical parameters

Biochemical parameters were measured in plasma samples with an automated spectrophotometric system (Konelab 20 from Thermo Electron Corporation, Cergy-Pontoise, France), using the manufacturer's biological chemistry reagents. The parameters measured in plasma include total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol, low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol, triglycerides, phospholipids, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), albumin, total bilirubin and gamma-glutamyltranspeptidase (GGT), creatinine and urea.

5.3.2 Plasma 7α -hydroxycholesterol assay

The assay of 7α -hydroxycholesterol (a marker of cholesterol hepatic catabolism) plasma level was performed as described elsewhere ([Gueguen 2006b](#)) on 0.5 ml plasma. 19-Hydroxy-3-acetate cholesterol (Sigma Diagnostics, Isle d'Abeau Chesnes, France) was added to each sample before high performance liquid chromatography as an internal standard for quantification of the peak.

5.4 Hepatic cholesterol assay

Frozen liver samples (about 250 mg) were thawed and homogenized in 5 ml isopropanol using a potter with a Teflon pestle (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). After incubation at 60°C for 1h30 and centrifugation at 3.220 g for 10 minutes, the supernatant was collected and the pellet was re-extracted in 5 ml isopropanol (same procedure but with a 1-hour incubation). The supernatant of this second extraction was added to the first one and the total volume was adjusted to the precise weight of 10 ml isopropanol for further calculations. Total and free cholesterol were then assayed using the Amplex Red Cholesterol Assay kit (Invitrogen-Life technologies, Cergy-Pontoise, France) according to the manufacturer's instructions. Before the assay, 100 μl of the samples (isopropanol extracts) were dried down under nitrogen flow and diluted to 1/12 in the reaction buffer of the kit. Esterified cholesterol was calculated as the difference between total and free cholesterol values.

5.5 Real-time PCR

Total RNA was extracted from 25 mg of liver samples using the RNeasy total RNA isolation Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and from 30 mg brain samples using the RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), according to the manufacturer's respective recommendations.

Reverse transcription was performed in Sprint PowerScript PrePrimed 96 Plates (BD Biosciences Clontech, Erembodegem, Belgium) containing 1 μg of reverse transcriptase. The cDNA

synthesis was conducted at 42°C for 1 hour and was ended by the inactivation of the reverse transcriptase after 10 minutes at 70°C.

Real-time PCR was then carried out on 0.4 ng/μl cDNA and 0.3 pmol/μl primers for each reaction, using the SYBR® Green technology (Power SYBR® Green PCR Master Mix, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. The plates were analyzed on an AbiPrism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) according to the following run: incubation 2 min at 50°C, 10 min at 95°C for activation of the polymerase and 40 cycles of 15 sec at 95°C for denaturation and 1 min at 60°C for annealing-extension. Results were normalized to hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) and fold-inductions calculated relative to the control group. Sequences for the forward and reverse primers are listed in Table 1 (Fiorucci 2005; Hoshi 2000; Macias 2005; Racine 2009a; Racine 2009b; Ropenga 2004; Souidi 2006; Su 2004; Tissandie 2006c).

5.6 Western Blot

All antibodies were purchased from Tebu-bio (Le Perray-en-Yvelines, France).

Proteins from liver homogenate were loaded, separated by 10 % SDS polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto nitrocellulose membrane. The membranes were blocked for 1 hour in 5 % non-fat dry milk in TBS. The blots were incubated overnight at 4°C with primary antibodies anti-ABC A1 (sc-53569), anti-ABC G5 (sc-18204), anti-ABC G8 (sc-30111) or anti-RXR (sc-553) diluted in 2 % non-fat dry milk in TBS. Immune complexes were revealed using anti-goat IgG (sc-2768), anti-mouse IgG (sc-2005) and anti-rabbit IgG (sc-2004) antibodies coupled to horseradish peroxidase and the luminol derivative of Immobilon Western (Millipore, Billerica, USA). Samples were normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) which was detected using a rabbit anti-rat primary antibody (sc-25778) or to β-actin using a mouse anti-rat primary antibody (sc-47778). Reaction intensity was determined by computer-assisted densitometry (FujiLas3000, Raytest, France).

5.7 Assay of CYP7A1, CYP27A1 and CYP7B1 specific activities

The specific activities of CYP7A1 and CYP27A1 were assessed on hepatic microsomal and mitochondrial fractions respectively using a radioisotopic method described previously (Souidi 1999). The specific activity of CYP7B1 was conducted on hepatic microsomes accordingly to Souidi *et al* (Souidi 2000). The assays were conducted on six animals of each group, randomly selected.

5.8 Statistical analysis

Results are expressed as mean ± SEM. Unpaired Student's *t*-test was routinely performed for statistical analysis of the data, but was replaced by Mann-Whitney Rank Sum Test when the equal variance test failed (determined by the SigmaStat software). Differences were considered statistically significant when $p \leq 0.05$.

6. Results

6.1 General health status and plasma biochemical parameters

Food and drink intakes were not affected by chronic ingestion of DU (data not shown), and no difference was recorded in body weight or in liver weight at the end of the contamination (Table

2) <Insert Table 2 here>. Macroscopic appearance of main organs (liver, lung, heart, intestines, kidney, brain, testis) from DU-exposed rats did not differ from that of control rats.

In the plasma, the lipid profile was unchanged after DU chronic ingestion. Blood concentrations of markers of liver integrity (ALT and AST) and liver function (GGT and total bilirubin) were also similar in control and DU-exposed rats.

Finally, the plasmatic level of 7 α -hydroxycholesterol (a liver-specific biomarker of the classical pathway of cholesterol catabolism) displayed a 59 % decrease ($p < 0.05$) in the DU-exposed rats compared to the controls.

Parameters	Control	DU-exposed
Final body weight (g)	595 \pm 11	578 \pm 21
Final liver weight (g)	19.3 \pm 0.7	18.7 \pm 0.9
Plasma profile		
Cholesterol (mM)	2.76 \pm 0.17	2.53 \pm 0.13
HDL-Cholesterol (mM)	1.65 \pm 0.10	1.62 \pm 0.10
LDL-Cholesterol (mM)	0.48 \pm 0.07	0.46 \pm 0.04
Triglycerides (mM)	1.78 \pm 0.20	1.52 \pm 0.13
Phospholipids (g/l)	1.93 \pm 0.08	1.79 \pm 0.06
ALT (U/l)	51.0 \pm 6.5	55.2 \pm 6.5
AST (U/l)	122 \pm 12	114 \pm 8
GGT (U/l)	4.29 \pm 1.35	2.73 \pm 0.29
Total bilirubin (μ M)	5.96 \pm 0.65	4.89 \pm 0.44
Creatinine (μ M)	56.4 \pm 2.8	58.1 \pm 3.2
Urea (mM)	5.9 \pm 0.5	5.7 \pm 0.2
7 α -hydroxycholesterol (ng/ml)	69.0 \pm 11.3	28.3 \pm 4.0 *

Table 2: General health and biochemical parameters in control and DU-exposed animals

Values are expressed as mean \pm SEM (n=15). ALT = Alanine aminotransferase, AST = Aspartate aminotransferase, GGT = gamma glutamyltranspeptidase, HDL = high density lipoprotein, LDL=low density lipoprotein

6.2 Tissue cholesterol assay

Levels of total cholesterol and free cholesterol were measured in the liver from animals of both groups, and esterified cholesterol was calculated as their difference. These values are reported in Figure 1 <Insert Figure 1 here>. No difference was observed in the levels of total, free or esterified hepatic cholesterol between DU-exposed and control rats.

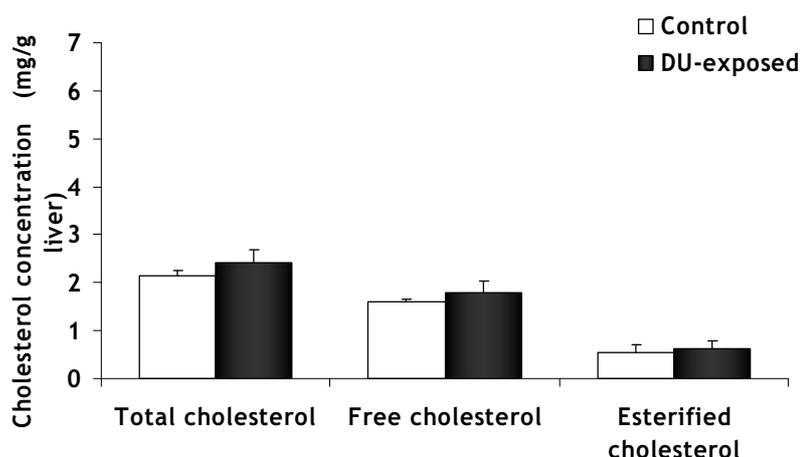


Figure 1: Levels of total, free and esterified cholesterol in the liver following chronic DU ingestion

Data are expressed as means \pm SEM (n=6-8). Esterified fraction of hepatic cholesterol is calculated as the difference of the measures obtained for total and free cholesterol concentrations.

6.3 Gene expression

The mRNA levels of the major actors of cholesterol synthesis, catabolism, storage, transport and of transcription factors regulating these proteins are reported in Figure 2 <Insert Figure 2 here>. The studied genes include 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Synthase (hmgcoa s) and 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase (hmgcoa r) and cyp51, all involved in cholesterol synthesis, cyp7a1, cyp27a1, cyp7b1 and cyp8b1 which all participate in cholesterol catabolism, and acylCoenzymeA: cholesterol acyltransferase 2 (acac2) which converts cholesterol into its storage form (cholesterol esters) and neutral hepatic cholesterol ester hydrolase (nCEH), which catalyzes the opposite reaction. In addition, several genes involved in the various fluxes of cholesterol were also studied: ldl-receptor (ldl-r), scavenger receptor class b type 1 (sr-b1), ATP binding cassette (ABC) transporter A1 (ABC A1), ABC G1, ABC G5, ABC G8 which all efflux cholesterol out of the cell, and apolipoproteins (apo) a1, apo b and apo e. Finally, the mRNA level of major nuclear receptors and transcription factors involved in the transcriptional regulation of the metabolic pathways cited above was also assessed: liver-x-receptor α (lxr α), retinoid-x-receptor α (rxr), farnesoid-x-receptor (fxr), small heterodimer partner (shp), liver-receptor homolog 1 (lrh-1), peroxisome proliferator-activated receptor α (ppar α), ppar γ , hepatocytes nuclear factor 1 α (hnf 1 α), hnf 4 α , and sterol regulatory element binding protein (srebp) 2.

The gene expression of the enzymes involved in cholesterol synthesis and storage was unchanged after chronic contamination with DU.

The hepatic gene expression of CYP7B1, involved in cholesterol catabolism, decreased (-31 %, p<0.01) in DU-exposed animals compared to controls.

The mRNA level of the nuclear receptor RXR increased (+23 %, p<0.05) on the contaminated rats compared to the control rats.

Concerning the actors involved in cholesterol transport, the gene expression of three ABC transporters was increased in the experimental group compared to the control group: ABC A1 (+54 %, $p < 0.001$), ABC G5 (+109 %, $p < 0.001$), and ABC G8 (+144 %, $p < 0.001$).

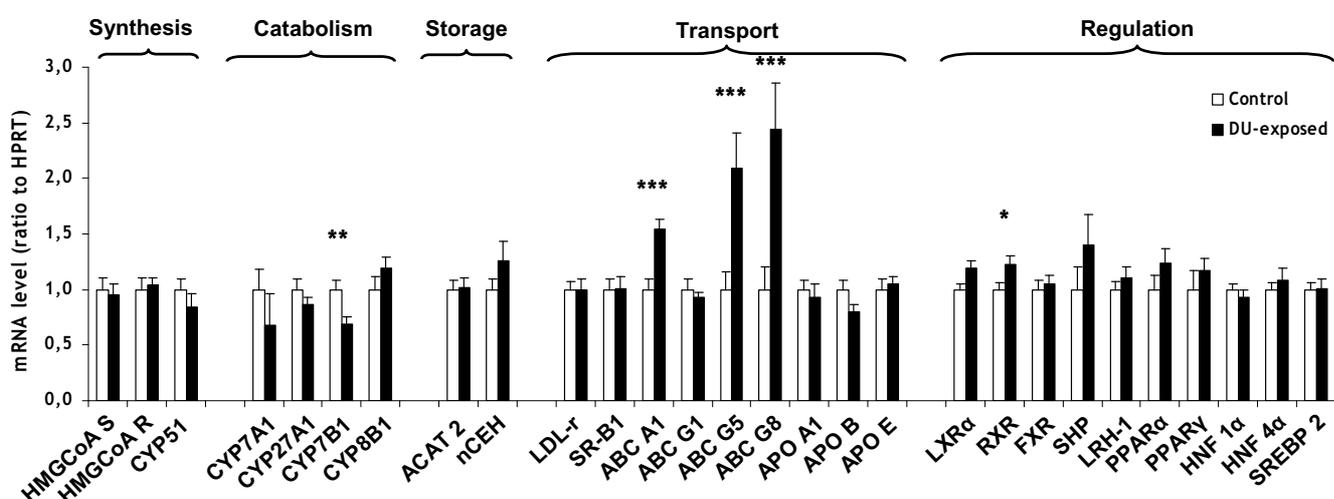


Figure 2: mRNA levels of major actors involved in cholesterol metabolism following chronic DU ingestion
Results are expressed as a ratio to HPRT mRNA level. The levels of non-contaminated control rats were arbitrarily set at 1. Data are expressed as means \pm SEM (n=10). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

6.4 Specific activities of catabolism enzymes (CYP7A1, CYP27A1, and CYP7B1)

The specific activities of hepatic CYP7A1, CYP27A1, and CYP7B1 are reported in Figure 3. <Insert Figure 3 here>. For CYP7A1, the DU-exposed rats displayed a specific activity of 2.97 ± 0.78 pmol/min/mg proteins vs. 7.46 ± 1.67 in the control rats, leading to a significant decrease in the exposed group (-60 %, $p < 0.05$). Conversely, the specific activities of CYP27A1 (28.47 ± 7.91 pmol/min/mg proteins vs. 24.88 ± 6.88 in the control rats) and of CYP7B1 (310.13 ± 53.23 pmol/min/mg proteins vs. 228.80 ± 59.65 in the control rats) did not differ significantly between both groups.

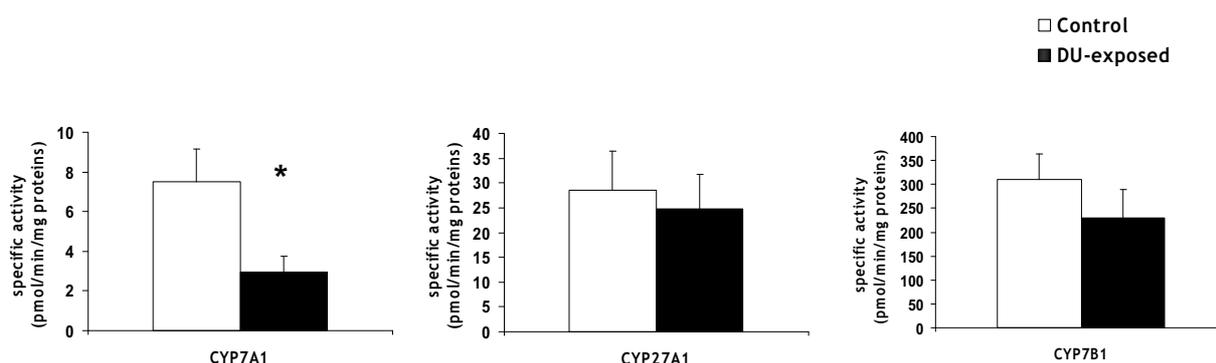


Figure 3: Specific activities of hepatic CYP7A1, CYP27A1 and CYP7B1 following chronic DU ingestion
Data are expressed as means \pm SEM (n=6). * $p < 0.05$

6.5 Protein expression

The relative protein levels of hepatic ABC A1, ABC G5, ABC G8 and RXR were assessed by Western Blot and the values are reported in Figure 4. <Insert Figure 4 here>.

The various antibodies tested for the assay of ABC G5 protein level did not yield a sufficient signal to be considered specific; therefore no data for ABC G5 is presented in this report.

No significant difference between both groups was observed for either ABC A1 (0.5 ± 0.1 for the DU-exposed rats vs. 0.39 ± 0.09 for the control rats), ABC G8 (0.64 ± 0.18 and 0.64 ± 0.14 for the experimental and the control groups respectively) or RXR (7.30 ± 1.11 for the DU-exposed rats and 9.69 ± 2.69 for the control rats).

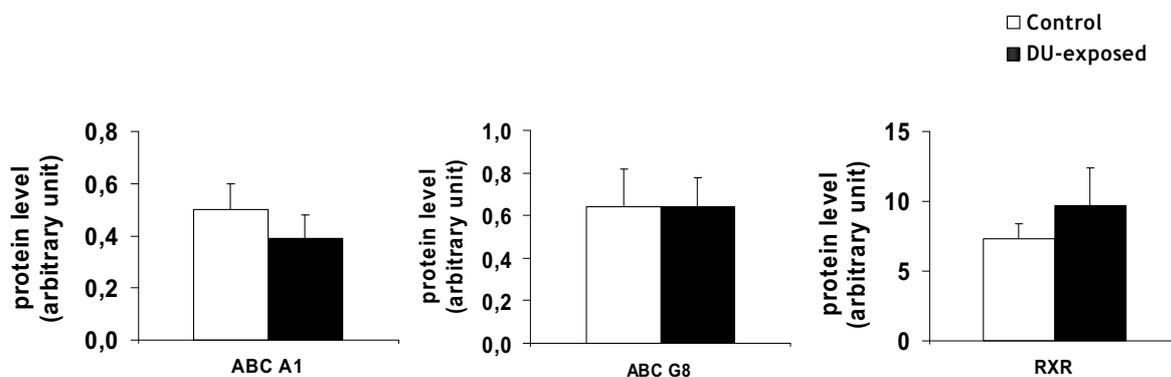


Figure 4: protein levels of ABC A1, ABC G8 and RXR following chronic DU ingestion

Results are expressed as a ratio to GAPDH protein level. Data are expressed as means \pm SEM (n=5-7).

7. Discussion

DU is a by-product of the nuclear industry. It is increasingly used for industrial and military purposes, leading to an important risk of its dispersion in the environment and therefore of human contamination, mainly through the ingestion of contaminated foodstuff. A previous work showed that the metabolism of the secosteroid hormone vitamin D was modified in rats after a chronic internal contamination with low levels of DU (Tissandie 2007). Especially, plasma level of active vitamin D decreased by 50 %, and the gene expression of nuclear receptor vitamin D receptor was decreased in the liver, kidney and brain. Another study showed that in the same conditions, almost all pathways of cholesterol metabolism were modulated at gene expression level in the brain, notably genes encoding CYP46A1, ABC A1 and RXR, PPAR α and PPAR γ (Racine 2009b). To ascertain the sensitivity of cholesterol metabolism to DU exposure, we assessed the consequences of such a contamination on cholesterol metabolism in the liver. Indeed, the liver is a major producer and eliminator of cholesterol at body level, and conversely to the brain it is in close interaction with the systemic cholesterol homeostasis. Thus, rats were given DU-supplemented drinking water for 9 months. DU is known to accumulate in the liver to some extent (Gilman 1998; Ortega 1989; Paquet 2006).

During the whole contamination time, the general health parameters were preserved in the animals of the experimental group: the weekly monitoring of the food and drink intake and of the body weight gain did not vary between both groups (data not shown). The plasma lipid profile was also unaffected after the contamination, including total cholesterol, HDL- and LDL-cholesterol concentrations. The biomarkers of hepatic integrity (ALT, AST) and function (GGT, bilirubin) were similar in both groups. Conversely, after a single subcutaneous administration of a high dose of DU

(11.5 mg/kg), ALT and AST plasma levels were markedly increased in the DU-treated rats, indicating a definite hepatotoxicity (Gueguen 2006b). In our experimental conditions, the plasma levels of creatinine and urea reflecting the kidney function were unchanged following DU exposure. The latter results indicate that the level of DU in the contamination solution is not nephrotoxic. The last parameter observed in the blood was the concentration of circulating 7 α -hydroxycholesterol. This oxysterol is synthesized from cholesterol by the liver-specific enzyme cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1), which initiates the classical pathway of the catabolism of cholesterol into bile acid. The level of circulating 7 α -hydroxycholesterol has been correlated with the specific activity of this enzyme (Bjorkhem 1987; Oda 1990; Souidi 2007). The plasma concentration of 7 α -hydroxycholesterol displayed a decrease of 59 % in rats chronically ingesting DU compared to the control rats. 7 α -hydroxycholesterol plasma level was also reported to decrease 3 days after a unique subcutaneous injection of a high dose of DU in rats (Gueguen 2006b). Two human studies reported variations of 7 α -hydroxycholesterol plasma level after accidental exposure to a high dose of ionizing radiations. In one case, it was reported to decrease (Bertho 2008), whereas in the other one the authors showed an increase of 7 α -hydroxycholesterol blood level (Bertho 2009). In both cases the variation in 7 α -hydroxycholesterol preceded a matching increase of ALT and AST levels in the blood of a man accidentally exposed to β radiations. The discrepancy in the variations observed in the different studies may be due to the difference in the exposure or the nature of the radiations (DU emits α radiations). Although these discrepancies are not yet understood, the variations of 7 α -hydroxycholesterol plasma levels reported in these studies draw attention to a possible sensitivity of this metabolite to ionizing radiations exposure and it was recently proposed as a biomarker for the evaluation of liver alteration after external high dose irradiation (Bertho 2009). As mentioned earlier, the level of circulating 7 α -hydroxycholesterol is linked to the specific activity of CYP7A1 in the liver. Thus, this activity was assessed and was found to decrease by 60 % in the DU-exposed rats compared to the control group. This result perfectly matches the decrease of the plasma level of 7 α -hydroxycholesterol and confirms the direct link between the level of the circulating product and the hepatic enzymatic activity.

Since the decrease of the specific activity of CYP7A1 is likely to induce a perturbation of the catabolism of cholesterol into bile acids, the specific activity of hepatic CYP27A1, which initiates the alternative pathway of bile acids synthesis, was assessed. Indeed, the alternative pathway compensates to some extent the perturbations of the classical pathway, and CYP27A1 activity was increased 1 day after a subcutaneous injection of a high dose of DU in rats (Gueguen 2006b). Surprisingly, CYP27A1 specific activity was identical in DU-exposed and control groups, indicating there was no compensation of the disturbance in the classical pathway. This observation was confirmed by the absence of difference in the specific activity of CYP7B1, which catalyzes the compulsory 7 α -hydroxylation for compounds of the alternative pathway to be converted into bile acids. Thus, these two results suggest that although the classical pathway of bile acids synthesis is decreased after a chronic ingestion of DU, the alternative pathway remains unaffected.

To assess the repercussions of these results on cholesterol homeostasis in the liver, the hepatic cholesterol concentration was measured. The liver concentration of total cholesterol was

unaffected after DU-exposure, as were the free and esterified fractions. Thus, the observed decrease in cholesterol hepatic catabolism does not lead to a perturbation of cholesterol homeostasis at organ level in contaminated animals.

At this point three questions arose: (1) is the effect observed on CYP7A1 activity due to an action at protein level or is it a consequence of a change in the transcriptional regulation system? (2) is this decrease compensating a modification of another metabolic pathway such as cholesterol synthesis or uptake by the liver? and (3) are there other "targets" of DU-exposure in cholesterol metabolism? To answer these questions, the gene expression of the major actors involved in cholesterol metabolism was assessed.

The answer to the first question was given by the mRNA level of CYP7A1: it was similar in DU-exposed and control rats. Thus, the action of DU is not taking place at gene expression level. This was confirmed by the absence of modification in the mRNA levels of many nuclear receptors and transcription factors regulating CYP7A1. In particular, LXR α , LRH-1, HNF 4 α , FXR, SHP and PPAR α are involved in CYP7A1 transcription regulation (Chiang 2004; Goodwin 2003; Lu 2000; Post 2001) and displayed similar mRNA levels in both groups. This strongly suggests that the decrease of CYP7A1 activity results from a modification at post-translational level. Several mechanisms are liable to modulate CYP7A1 activity. For instance, dephosphorylation is known to inactivate CYP7A1 (Aguiar 2005; Tang 1986). Another lead is given by a study in which the authors suggest that uranium exposure could interfere with ubiquitin or the ubiquitin-proteasome system to promote the degradation of cytokeratin in a human lung cell line (Malard 2005). A third hypothetical mechanism derives from the fact that DU is a heavy metal. Indeed, a perturbation of heme synthetase activity after exposure to lead, another heavy metal, has been reported (Hammond 1990). This could result in a lower synthesis of hemoproteins like CYPs. Even though it seems odd that only CYP7A1 should be affected, this possibility cannot be ruled out.

The questions of the impact of DU on the pathways other than catabolism and of the identification of other targets were answered by a PCR study covering cholesterol synthesis, storage transport, and the nuclear receptors associated to them. First of all, no modification was recorded in the mRNA levels of the enzymes involved in biosynthesis or storage of cholesterol. Besides, the gene expression of SREBP 2, which controls the transcription of these enzymes, was also unchanged after DU-exposure. This is in accordance with the preserved concentration of free and esterified cholesterol fractions. On the other hand, the decrease of CYP7A1 activity is not triggered by a perturbation of synthesis or storage processes. Moreover, it does not respond to a modification in cholesterol uptake since the gene expression of the lipoprotein receptors LDL-r and SR-B1 did not vary between both groups. In contrast, the mRNA levels of three ABC transporters involved in cholesterol efflux were increased: ABC A1 (which is involved in the secretion of native HDLs with Apo A-I), and ABC G5 and ABC G8, which form a heterodimer and export free cholesterol directly into the bile. This concurrent increase in the transcription of ABC G5 and ABC G8 is noteworthy, since it is required for the synthesis of a functional heterodimer. However, these alterations at gene expression level were not reflected at protein level: Western blots of ABC A1 and ABC G8 were similar in DU-exposed and control rats. Although ABC G5 protein level could not be reliably

measured, the fact that ABC G8 translation was not activated is sufficient to infer that no increase of the functional heterodimer was triggered. The lack of consequence of these three mRNA levels increases at organ level is confirmed by the absence of modification of other genes involved in this metabolic pathway (e.g. ABC G1, Apo A1) and of the nuclear receptors controlling them (LXR α , RXR, PPAR α , PPAR γ , HNF 4 α).

Two other modifications were observed at gene expression level: a decrease of the mRNA level of CYP7B1 and an increase of that of RXR in the contaminated rats. Both of these variations are of slight range and do not seem to have any impact at organ level: RXR protein level was unchanged after contamination, as was CYP7B1 specific activity.

Thus, the effects observed at gene expression level seem to have no physiological consequence, and every pathway of cholesterol hepatic metabolism is similar with or without DU-exposure except for the matching decreases of hepatic CYP7A1 activity and 7 α -hydroxycholesterol circulating level. This decrease of the classical pathway of bile acids biosynthesis is unlikely to seriously alter the bile acid pool. Indeed, an impaired pool of bile acids would have triggered changes in cholesterol intestinal absorption, thus in hepatic uptake and possibly in cholesterolemia. Moreover, bile acids are potent activators of nuclear receptors like FXR or PXR, which regulate their synthesis and transport. These nuclear receptors and their target genes would have been expected to undergo major modifications in case of a disruption in bile acid synthesis. Thus, this decrease of CYP7A1 activity is difficult to explain since cholesterol metabolism seems balanced. Further studies are needed to assess more precisely the impact of these effects on bile acid metabolism.

In any case, the results reported in this study differ entirely from those obtained in the cerebral cholesterol study after the same contamination ([Racine 2009b](#)). Indeed, many genes involved in cholesterol synthesis, transport, catabolism and regulation pathways were modified in the brain after DU-exposure. Of these, only ABC A1 and RXR are in common with the present work. This is in accordance with the fact that cholesterol homeostasis is maintained independently in the brain and the liver. Moreover, the difference in DU accumulation in these organs may also be responsible for this discrepancy.

In conclusion, this work reports a 60 % decrease in CYP7A1 specific activity and 7 α -hydroxycholesterol blood level in rats after a daily ingestion of a low-dose of DU for 9 months. Further studies are required to elucidate the mechanism (possibly post-translational) behind this variation. Despite this modification, cholesterol homeostasis is preserved at liver and body level. The impact of this type of contamination on an already unbalanced system (like animals prone to hypercholesterolemia or cholelithiasis) would be of interest to ascertain the influence of DU on cholesterol metabolism.

8. Acknowledgements

The authors thank Cédric Baudelin and Frédéric Voyer for animal care and contamination. This work is part of the ENVIRHOM research program supported by the Institute for Radiological

Protection and Nuclear Safety (IRSN) and is also partly funded by the Délégation Générale de l'Armement (2006.94.0920).

9. References

1. E. Craft, A. Abu-Qare, M. Flaherty, M. Garofolo, H. Rincavage, M. Abou-Donia, Depleted and natural uranium: chemistry and toxicological effects, *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 7 (4) (2004) 297-317
2. D. Brugge, J.L. de Lemos, B. Oldmixon, Exposure pathways and health effects associated with chemical and radiological toxicity of natural uranium: a review, *Rev Environ Health* 20 (3) (2005) 177-93
3. A.P. Gilman, D.C. Villeneuve, V.E. Secours, A.P. Yagminas, B.L. Tracy, J.M. Quinn, V.E. Valli, R.J. Willes, M.A. Moss, Uranyl nitrate: 28-day and 91-day toxicity studies in the Sprague-Dawley rat, *Toxicol Sci* 41 (1) (1998) 117-28
4. A. Ortega, J.L. Domingo, J.M. Llobet, J.M. Tomas, J.L. Paternain, Evaluation of the oral toxicity of uranium in a 4-week drinking-water study in rats, *Bull Environ Contam Toxicol* 42 (6) (1989) 935-41
5. G. Zhu, X. Xiang, X. Chen, L. Wang, H. Hu, S. Weng, Renal dysfunction induced by long-term exposure to depleted uranium in rats, *Arch Toxicol* 83 (1) (2009) 37-46
6. P.L. Diaz Sylvester, R. Lopez, A.M. Ubios, R.L. Cabrini, Exposure to subcutaneously implanted uranium dioxide impairs bone formation, *Arch Environ Health* 57 (4) (2002) 320-5
7. A.M. Ubios, M.B. Guglielmotti, T. Steimetz, R.L. Cabrini, Uranium inhibits bone formation in physiologic alveolar bone modeling and remodeling, *Environ Res* 54 (1) (1991) 17-23
8. C. Bussy, P. Lestaevel, B. Dhieux, C. Amourette, F. Paquet, P. Gourmelon, P. Houpert, Chronic ingestion of uranyl nitrate perturbs acetylcholinesterase activity and monoamine metabolism in male rat brain, *Neurotoxicology* 27 (2) (2006) 245-52
9. H. Bensoussan, L. Grancolas, B. Dhieux-Lestaevel, O. Delissen, C.M. Vacher, I. Dublineau, P. Voisin, P. Gourmelon, M. Taouis, P. Lestaevel, Heavy metal uranium affects the brain cholinergic system in rat following sub-chronic and chronic exposure, *Toxicology* 261 (1-2) (2009) 59-67
10. M. Monleau, C. Bussy, P. Lestaevel, P. Houpert, F. Paquet, V. Chazel, Bioaccumulation and behavioural effects of depleted uranium in rats exposed to repeated inhalations, *Neurosci Lett* 390 (1) (2005) 31-6
11. M. Belles, M.L. Albina, V. Linares, M. Gomez, D.J. Sanchez, J.L. Domingo, Combined action of uranium and stress in the rat. I. Behavioral effects, *Toxicol Lett* 158 (3) (2005) 176-85
12. E. Tissandie, Y. Gueguen, J.M. Lobaccaro, L. Grandcolas, P. Voisin, J. Aigueperse, P. Gourmelon, M. Souidi, In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on vitamin D3 metabolism in rat, *Biochim Biophys Acta* 1770 (2) (2007) 266-72
13. M. Souidi, Y. Gueguen, C. Linard, N. Dudoignon, S. Grison, C. Baudelin, C. Marquette, P. Gourmelon, J. Aigueperse, I. Dublineau, In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on CYP3A and associated nuclear receptors PXR and CAR in the rat, *Toxicology* 214 (1-2) (2005) 113-22
14. R. Racine, Y. Gueguen, P. Gourmelon, G. Veyssiere, M. Souidi, Modifications of the Expression of Genes Involved in Cerebral Cholesterol Metabolism in the Rat Following Chronic Ingestion of Depleted Uranium, *J Mol Neurosci* 38 (2) (2009) 159-165
15. J.Y. Chiang, Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms, *J Hepatol* 40 (3) (2004) 539-51
16. D.W. Russell, The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis, *Annu Rev Biochem* 72 (2003) 137-74
17. Y. Gueguen, M. Souidi, C. Baudelin, N. Dudoignon, S. Grison, I. Dublineau, C. Marquette, P. Voisin, P. Gourmelon, J. Aigueperse, Short-term hepatic effects of depleted uranium on xenobiotic and bile acid metabolizing cytochrome P450 enzymes in the rat, *Arch Toxicol* 80 (4) (2006) 187-95
18. S. Fiorucci, C. Clerici, E. Antonelli, S. Orlandi, B. Goodwin, B.M. Sadeghpour, G. Sabatino, G. Russo, D. Castellani, T.M. Willson, M. Pruzanski, R. Pellicciari, A. Morelli, Protective effects of 6-ethyl chenodeoxycholic acid, a farnesoid X receptor ligand, in estrogen-induced cholestasis, *J Pharmacol Exp Ther* 313 (2) (2005) 604-12
19. A. Ropenga, A. Chapel, M. Vandamme, N.M. Griffiths, Use of reference gene expression in rat distal colon after radiation exposure: a caveat, *Radiat Res* 161 (5) (2004) 597-602
20. E. Tissandie, Y. Gueguen, J.M. Lobaccaro, F. Paquet, J. Aigueperse, M. Souidi, Effects of depleted uranium after short-term exposure on vitamin D metabolism in rat, *Arch Toxicol* 80 (8) (2006) 473-80
21. R.I. Macias, M.A. Serrano, M.J. Monte, S. Jimenez, B. Hernandez, J.J. Marin, Long-term effect of treating pregnant rats with ursodeoxycholic acid on the congenital impairment of bile secretion induced in the pups by maternal cholestasis, *J Pharmacol Exp Ther* 312 (2) (2005) 751-8
22. S. Shibata, K. Hayakawa, Y. Egashira, H. Sanada, Roles of nuclear receptors in the up-regulation of hepatic cholesterol 7alpha-hydroxylase by cholestyramine in rats, *Life Sci* 80 (6) (2007) 546-53

23. R. Racine, L. Grandcolas, S. Grison, P. Gourmelon, Y. Gueguen, G. Veyssiere, M. Souidi, Molecular modifications of cholesterol metabolism in the liver and the brain after chronic contamination with cesium 137, *Food Chem Toxicol* 47 (7) (2009) 1642-7
24. T. Su, D.J. Waxman, Impact of dimethyl sulfoxide on expression of nuclear receptors and drug-inducible cytochromes P450 in primary rat hepatocytes, *Arch Biochem Biophys* 424 (2) (2004) 226-34
25. M. Souidi, E. Tissandie, L. Grandcolas, S. Grison, F. Paquet, P. Voisin, J. Aigueperse, P. Gourmelon, Y. Gueguen, Chronic contamination with 137cesium in rat: effect on liver cholesterol metabolism, *Int J Toxicol* 25 (6) (2006) 493-7
26. M. Souidi, M. Parquet, J. Ferezou, C. Lutton, Modulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase and sterol 27-hydroxylase activities by steroids and physiological conditions in hamster, *Life Sci* 64 (17) (1999) 1585-93
27. M. Souidi, M. Parquet, S. Dubrac, O. Audas, T. Becue, C. Lutton, Assay of microsomal oxysterol 7alpha-hydroxylase activity in the hamster liver by a sensitive method: in vitro modulation by oxysterols, *Biochim Biophys Acta* 1487 (1) (2000) 74-81
28. F. Paquet, P. Houpert, E. Blanchardon, O. Delissen, C. Maubert, B. Dhieux, A.M. Moreels, S. Frelon, P. Gourmelon, Accumulation and distribution of uranium in rats after chronic exposure by ingestion, *Health Phys* 90 (2) (2006) 139-47
29. M. Souidi, P. Scannf, S. Grison, P. Gourmelon, J. Aigueperse, Effects of ionizing radiation on the activity of the major hepatic enzymes implicated in bile acid biosynthesis in the rat, *C R Biol* 330 (12) (2007) 861-70
30. I. Bjorkhem, E. Reihner, B. Angelin, S. Ewerth, J.E. Akerlund, K. Einarsson, On the possible use of the serum level of 7 alpha-hydroxycholesterol as a marker for increased activity of the cholesterol 7 alpha-hydroxylase in humans, *J Lipid Res* 28 (8) (1987) 889-94
31. H. Oda, H. Yamashita, K. Kosahara, S. Kuroki, F. Nakayama, Esterified and total 7 alpha-hydroxycholesterol in human serum as an indicator for hepatic bile acid synthesis, *J Lipid Res* 31 (12) (1990) 2209-18
32. J.M. Bertho, L. Roy, M. Souidi, M. Benderitter, Y. Gueguen, J.J. Lataillade, M. Prat, T. Fagot, T. De Revel, P. Gourmelon, New biological indicators to evaluate and monitor radiation-induced damage: an accident case report, *Radiat Res* 169 (5) (2008) 543-50
33. J.M. Bertho, L. Roy, M. Souidi, M. Benderitter, E. Bey, R. Racine, T. Fagot, P. Gourmelon, Initial evaluation and follow-up of acute radiation syndrome in two patients from the Dakar accident, *Biomarkers* 14 (2) (2009) 94-102
34. B. Goodwin, M.A. Watson, H. Kim, J. Miao, J.K. Kemper, S.A. Kliewer, Differential regulation of rat and human CYP7A1 by the nuclear oxysterol receptor liver X receptor-alpha, *Mol Endocrinol* 17 (3) (2003) 386-94
35. T.T. Lu, M. Makishima, J.J. Repa, K. Schoonjans, T.A. Kerr, J. Auwerx, D.J. Mangelsdorf, Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors, *Mol Cell* 6 (3) (2000) 507-15
36. S.M. Post, H. Duez, P.P. Gervois, B. Staels, F. Kuipers, H.M. Princen, Fibrates suppress bile acid synthesis via peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-mediated downregulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase and sterol 27-hydroxylase expression, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21 (11) (2001) 1840-5
37. P.M. Tang, J.Y. Chiang, Modulation of reconstituted cholesterol 7 alpha-hydroxylase by phosphatase and protein kinase, *Biochem Biophys Res Commun* 134 (2) (1986) 797-802
38. M. Aguiar, R. Masse, B.F. Gibbs, Regulation of cytochrome P450 by posttranslational modification, *Drug Metab Rev* 37 (2) (2005) 379-404
39. V. Malard, O. Prat, E. Darrouzet, F. Berenguer, N. Sage, E. Quemeneur, Proteomic analysis of the response of human lung cells to uranium, *Proteomics* 5 (17) (2005) 4568-80
40. P.B. Hammond, K.N. Dietrich, Lead exposure in early life: health consequences, *Rev Environ Contam Toxicol* 115 (1990) 91-124

Table 1: Oligonucleotide sequences of primers used in real-time quantitative PCR

The primers sequences are given in the 5'-3' orientation. The primer without reference has been designed by the authors with the PrimerExpress software.

GENE	FORWARD	REVERSE	LENGTH (bp)	GENE ACCESSION #	REF
<i>hprt</i>	ggaaggtgccccagaacaa	gcgcagggtctccttaatca	109	NM_012583	19
<i>cyp27a1</i>	ggaaggtgccccagaacaa	gcgcagggtctccttaatca	71	NM_178847	20
<i>cyp7a1</i>	ccaagtcaagtgtccccctcta	gactctcagccgcaagtg	150	NM_012942	25
<i>cyp8b1</i>	gtacacatggaccccgacatc	gggtgccatcagggttgag	76	AB009686	21
<i>cyp7b1</i>	tcagatgcaaagacggtcaga	ttcatgcccgtagtatttttcag	70	U36992	14
<i>cyp51</i>	ctggtcatcctgggtcctaaga	cagaggccatgaaggatgct	81	NM_012941	14
<i>hmgcoa r</i>	ggcgggtcctgcaagtg	gcagggtgagcgggtgaga	60	NM_173094	25
<i>hmgcoa s</i>	ggtggtgggaccaaccttct	cacgcccttgaacaccta	65	X55286	22
<i>acat 2</i>	gccccagccgacatctt	gtgcagtgtgaagccttgactt	80	NM_153728	23
<i>ldl-r</i>	cagccgatgcattcctgact	agttcatccgagccattttcac	69	NM_175762	25
<i>sr-b1</i>	gttggtcaccatgggcca	cgtagccccacaggatctca	65	NM_031541	25
<i>abc a1</i>	atctcatagatggaagaatgtgaagct	cgtacaactattgtataaccatctccaaa	132	NM_78095	25
<i>abc g1</i>	agggtcagccttctaaagttcctc	tctctcgaagtgaatgaatttatcg	85	NM_053502	14
<i>abc g5</i>	cgcaggaaccgattgtaa	tgtcgaagtgggtggaagagct	67	NM_053754	25
<i>apo a1</i>	aatgggacagggtgaagga	tgaaccagagtgctccagtt	146	NM_012738	25
<i>apo b</i>	tcctaacatcattgtgccttcat	ccttgaatctgggagggaaaact	106	NM_019287	
<i>apo e</i>	tgggtgcagacgctttctg	ttgatgcctttacttcagtcatagt	110	NM_138828	25
<i>lxra</i>	agcaacagttaacaggcgct	gtgcaatgggccaaggc	63	NM_031627	22
<i>lxrβ</i>	cttccccacaagttc	cctactcgtgga	151	NM_031626	14
<i>rxra</i>	cgcaaagacctgacctacacc	tcctcctgcacggcttccc	134	NM_012805	25
<i>fxr</i>	tgacaaagaagccgcgaat	tgtaatggtaccagagggccc	99	NM_021745	25
<i>shp</i>	cctggagcagccctcgt	aacctgtatgcaaaccgagg	64	NM_057133	18
<i>lrh-1</i>	gcacctgcaccaggatcag	cccgggtgttttctcaagtt	58	NM_021742	22
<i>ppara</i>	tctcttccaaaactccttca	gcacgagctgcgatgctc	69	NM_013196	20
<i>ppary</i>	tca tga cca ggg agt tcc tca	tcataaattccagtcattgaactt	103	NM_013124	20
<i>hnf 1a</i>	acacctggtacgtccgcaag	cgtgggtgaattgctgagc	51	NM_012669	24
<i>hnf 4a</i>	tggcaaacactacggagcct	ctgaagaatcccttgagcc	51	NM_022180	24
<i>srebp 2</i>	agctggcaaatcagaaaaacaag	cgatcttcaagtcacatcactgt	58	XM_216989	22

Résultat supplémentaire

❖ Dosage de l'UA dans le foie

La concentration hépatique d'UA à l'issue de la contamination a été mesurée par spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif après minéralisation des échantillons (à partir de 1-1,5g de foie, n=5). La méthode utilisée définit une limite de détection (correspondant à trois fois la valeur du bruit de fond \pm l'écart-type), en dessous de laquelle on ne détecte pas l'UA, et une limite de quantification (correspondant à dix fois la valeur du bruit de fond \pm l'écart-type), au dessus de laquelle la valeur chiffrée est considérée comme fiable au niveau quantitatif.

Dans le cas de nos échantillons, les mesures d'UA de tous les échantillons des rats issus du groupe contrôle sont situées en dessous de la limite de détection. On considère donc qu'il n'y a pas d'accumulation particulière d'UA dans ces échantillons. Pour ceux des rats issus du groupe contaminés, tous les échantillons ont fourni une mesure située entre la limite de détection et la limite de quantification (cf. Figure 37). Ces échantillons ont donc une accumulation significative d'uranium sans que celle-ci puisse être chiffrée de façon fiable. L'histogramme ci-dessous est donné à titre indicatif.

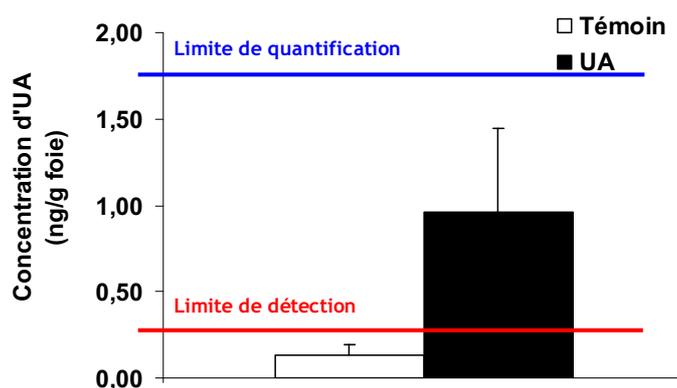


Figure 37 : Dosage de l'UA dans le foie des rats à l'issue de la contamination

Les résultats obtenus concluent donc à une accumulation d'UA de manière qualitative dans le foie des rats exposés à l'UA par rapport aux rats non-contaminés.

Résultats et Conclusion

Cette première étude a permis de montrer d'une part que le foie était bien le siège d'une accumulation d'UA (relativement faible) et d'autre part que le métabolisme hépatique du cholestérol était modulé au niveau moléculaire après contamination interne chronique par une faible concentration d'UA chez le rat.

L'effet majeur produit par la contamination est une diminution de l'activité enzymatique de la CYP7A1, qui initie la voie classique de biosynthèse des acides biliaires (voie de catabolisme du cholestérol). Cette diminution d'activité enzymatique entraîne une diminution de même ampleur (-60 %) de la concentration plasmatique du produit de la CYP7A1, le 7 α -hydroxycholestérol. Les deux paramètres sont d'ailleurs reliés couramment dans la littérature, le taux plasmatique du 7 α -hydroxycholestérol servant de biomarqueur pour évaluer le catabolisme hépatique du cholestérol. Cette diminution d'activité de la CYP7A1 semble être due à une action post-transcriptionnelle puisqu'elle n'est pas corrélée à une variation d'expression du gène de la CYP7A1.

Outre cet effet majeur, une modification de l'expression génique de divers acteurs impliqués dans le catabolisme du cholestérol (CYP7B1), son efflux (ABC A1, ABC G5 et ABC G8) et la régulation de ces voies (RXR) est observée après contamination. Cependant, ces variations ne sont pas traduites au niveau de l'activité enzymatique de la CYP7B1 ou de l'expression protéique des ABCs et de RXR.

Au-delà de ces effets moléculaires et de la diminution de la voie classique de biosynthèse des acides biliaires, l'homéostasie du cholestérol est préservée au niveau tissulaire comme au niveau plasmatique, comme l'indiquent le taux de cholestérol hépatique et la cholestérolémie similaires entre les rats contaminés à l'UA et les rats non-contaminés.

Ainsi, nous concluons de cette première étude qu'une ingestion quotidienne d'UA à une concentration de 40 mg/L pendant 9 mois ne perturbe pas l'homéostasie hépatique et générale du cholestérol chez le rat contaminé depuis l'âge adulte. Cependant, cette contamination induit des modifications moléculaires affectant certains acteurs du catabolisme et de l'efflux du cholestérol au niveau hépatique.

Cette première étude était consacrée à l'évaluation des effets de l'UA sur le métabolisme du cholestérol après ingestion chronique dans le foie, qui est l'organe central de ce système. Nous nous sommes ensuite intéressés aux conséquences de cette exposition à l'UA dans le cerveau, un organe où le métabolisme du cholestérol est indépendant du pool général.

ARTICLE 2

MODIFICATIONS OF THE GENE EXPRESSION INVOLVED IN CEREBRAL CHOLESTEROL METABOLISM IN THE RAT FOLLOWING CHRONIC INGESTION OF DEPLETED URANIUM

R. Racine, Y. Guéguen, P. Gourmelon, G. Veysière, M. Souidi

Journal of Molecular Neuroscience 2009 38(2):159-165

Modifications of the Expression of Genes Involved in Cerebral Cholesterol Metabolism in the Rat Following Chronic Ingestion of Depleted Uranium

Radjini Racine · Yann Gueguen · Patrick Gourmelon · Georges Veysièrre · Maâmar Souidi

Received: 1 August 2008 / Accepted: 25 August 2008 / Published online: 16 September 2008
 © Humana Press 2008

Abstract Depleted uranium results from the enrichment of natural uranium for energetic purpose. Its potential dispersion in the environment would set human populations at risk of being contaminated through ingestion. Uranium can build up in the brain and induce behavior disorders. As a major constituent of the myelin sheath, cholesterol is essential to brain function, and several neurological pathologies result from a disruption of cholesterol metabolism. To assess the effect of a chronic contamination with depleted uranium on cerebral cholesterol metabolism, rats were exposed to depleted uranium for 9 months through drinking water at 40 mg/l. The study focuses on gene expression. Cholesterol-catabolizing enzyme CYP46A1 displayed a 39% increase of its messenger RNA (mRNA) level. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase gene expression rose from 91%. Concerning cholesterol transport, mRNA levels of scavenger receptor-B1 and adenosine triphosphate-binding cassette transporter A1 increased by 34% and that of apolipoprotein E by 75%. Concerning regulation, gene expression of nuclear receptors peroxisome proliferator-activated receptors α and γ increased by 46%

and 36% respectively, whereas that of retinoid-X-receptor decreased by 29%. In conclusion, a chronic internal contamination with depleted uranium does not affect the health status of rats but induces molecular changes in the dynamic equilibrium of the cerebral cholesterol pool.

Keywords Depleted uranium · Brain · Cholesterol metabolism · Chronic contamination

Abbreviations

ABC (A1, A2, G1, G5)	adenosine triphosphate binding cassette transporter
ACAT (1, 2)	acylCoenzymeA: cholesterol acyltransferase
Apo E	apolipoprotein E
CYP	cytochrome P450
CYP46A1	cholesterol 24-hydroxylase
CYP7B1	oxysterol 7 α -hydroxylase
CYP27A1	sterol 27-hydroxylase
CYP51	lanosterol-14-hydroxylase
DU	depleted uranium
HDL	high-density lipoprotein
HMGCoA (R/S)	3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase/Synthase
HNF (1 α , 4 α)	hepatocyte nuclear factor
HPRT	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
LDL	low-density lipoprotein
LDLr	low-density lipoprotein receptor
LXR β	liver-X-receptor β
PPAR(α , γ)	peroxisome proliferator-activated receptor
RXR	retinoid-X-receptor
SR-B1	scavenger receptor class B type 1
SREBP (1c, 2)	sterol regulatory element binding protein

R. Racine · Y. Gueguen · P. Gourmelon · M. Souidi (✉)
 Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety,
 Radiological Protection and Human Health Division,
 Radiobiology and Epidemiology Department,
 Laboratory of Experimental Nuclear Toxicology,
 BP n°17, F-92262 Fontenay-aux-Roses Cedex, France
 e-mail: maamar.souidi@irsn.fr

G. Veysièrre
 UMR Clermont Université CNRS 6247 INSERM U931
 and centre de recherche en nutrition humaine d'Auvergne,
 24, avenue des Landais,
 F-63177 Aubière Cedex, France

Introduction

Depleted uranium (DU) is a waste of the enrichment process of natural uranium. Because of its outstanding density, DU is used in many military as well as civilian items and its utilization zone is widely spread, including in inhabited areas. Since its half-life is over 4 million years, an environmental dissemination of DU might set populations at risk of being chronically contaminated. This would primarily occur through ingestion of dust and foodstuffs. Although it is 60% less radioactive than natural uranium, DU can still be harmful: as a heavy metal, it also has a chemical toxicity.

Many studies have proved that other heavy metals such as lead (Finkelstein et al. 1998) and mercury (Castoldi et al. 2001) can be neurotoxic to humans at low level, but very few have investigated the effects of DU on human brain except as part of a general health checkup (Goasguen et al. 1982; Kathren and Moore 1986; McDiarmid et al. 2004). However, there is a growing body of work on this topic in animal studies. DU is known to build up in the brain (Gilman et al. 1998; Pellmar et al. 1999a; Barber et al. 2007). Some studies have linked DU with effects on behavior in rats after subchronic or chronic contamination (Belles et al. 2005; Briner and Murray 2005; Monleau et al. 2005). Electrophysiological activity was also changed in hippocampal cells chronically exposed to DU (Pellmar et al. 1999b). Dopaminergic and serotonergic systems, as well as acetylcholinesterase activity, were also subject to slight changes in several brain structures after subchronic and chronic contamination with DU (Bussy et al. 2006).

Besides these specific neurological features, molecular effects are reported in the brain. Indeed, changes affecting nuclear receptors and enzymes involved in xenobiotics (Souidi et al. 2005) and vitamin D (Tissandie et al. 2007) cerebral metabolisms have been described. Another crucial metabolism in the brain has not been studied yet: cholesterol metabolism. Indeed, cerebral cholesterol accounts for 25% of the body pool, brain being the richest organ in cholesterol. Its incorporation in all cell membranes makes it a key component for cerebral function by influencing membrane fluidity, hence major pathways such as signal transduction or neurotransmission in synaptic knobs. It is also a precursor of various neurosteroids of prime importance such as progesterone, pregnenolone, and dehydroepiandrosterone.

As a peculiarity, the cholesterol pool of the brain is independent from the body pool since cholesterol cannot cross the blood–brain barrier. It is then crucial that cerebral cholesterol homeostasis is maintained. Indeed, several neurological diseases directly result from a disruption of brain cholesterol metabolism, such as Niemann–Pick type C disease (Vance et al. 2006) and cerebrotendinous xantho-

matosis (Bjorkhem and Leitersdorf 2000). In Alzheimer's disease, cholesterol metabolism is part of a complicated etiology (Vaya and Schipper 2007).

As a result of these observations, a question arises: is cerebral cholesterol metabolism affected by a contamination with DU? The first step to address this issue was to conduct a gene expression study over the main actors of cholesterol metabolism in the brain. We examined many actors of the five systems of cholesterol metabolism: biosynthesis, catabolism, storage, transport, and the regulation pathways controlling the four others. All of them are detailed in Fig. 1.

Materials and Methods

All experimental procedures were approved by the Animal Care Committee of the Institute of Radioprotection and Nuclear Safety and complied with French regulations for animal experimentation (Ministry of Agriculture Act No. 87-848, October 19, 1987, modified May 29, 2001).

Animals and Contamination Procedure

Male Sprague–Dawley rats (Charles River, L'Arbresle, France) aged 12 weeks were used for the experiment. Eight rats were exposed to depleted uranyl nitrate hexahydrate (98.74% ^{238}U , 0.26% ^{235}U , 0.001% ^{234}U , specific activity $1.4 \cdot 10^4$ Bq/g, AREVA-NC, France) at a dose of 40 mg/L (560 Bq/L) in their drinking water for 9 months. Control rats ($n=6$) received mineral water. Both groups were fed regular rodent chow, with water and food ad libitum. After 9 months, the animals were anesthetized and decapitated. The brain was removed and dissected on ice (experiments were conducted on frontal cortex). Samples were immediately deep-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.

Real-Time Polymerase Chain Reaction

Total RNA was extracted with the RNeasy Lipid Tissue Mini-Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). The cDNA was produced from 1 μg of total RNA by reverse transcription with BD Sprint PowerScript PrePrimed 96 plate (BD Biosciences Clontech, Erembodegem, Belgium). Real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed on an AbiPrism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) using SYBR Green technology, with 10 ng of cDNA for each reaction. Samples were normalized to hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) and fold-inductions calculated relatively to the control group. Sequences for the primers are indicated in Table 1.

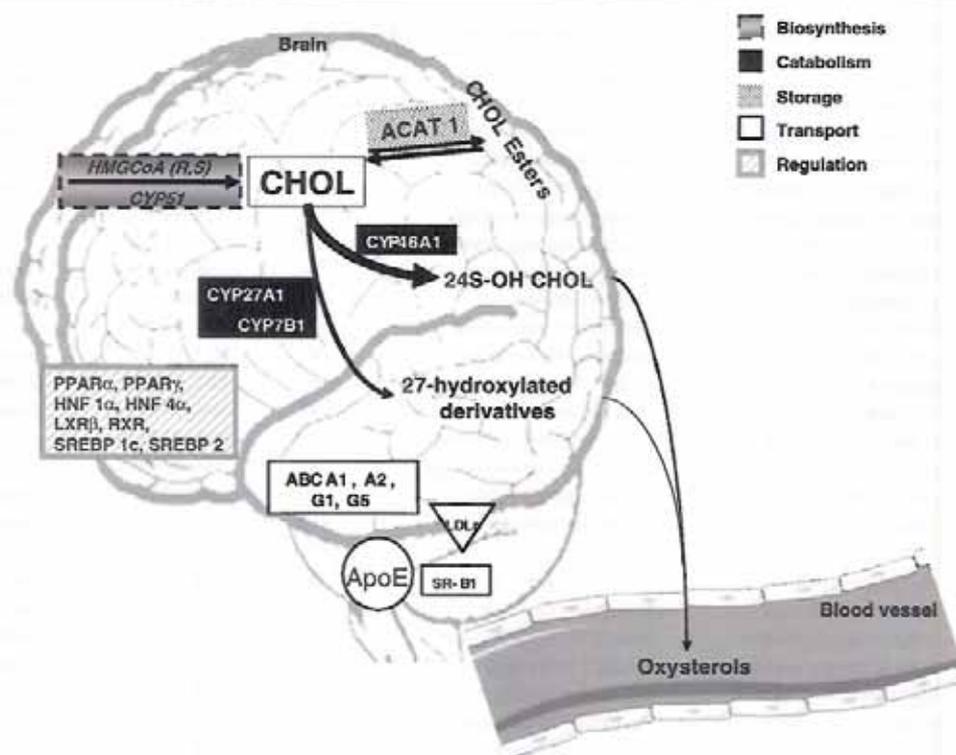


Figure 1 Cholesterol metabolism in the brain. In the brain, cholesterol has to be synthesized endogenously because it cannot cross the blood–brain barrier. Cholesterol biosynthesis (grey box with dashed outline) is carried out by a series of enzymes including HMGCoA reductase, HMGCoA synthase, and CYP51. A small fraction of cellular cholesterol is stored as cholesterol esters after action of ACAT 1 (box with grey dots). Transport of cholesterol (white boxes) between cerebral cells occurs thanks to lipoprotein particles made up of lipids and apolipoproteins like Apo E. Lipoproteins are picked up by target cells thanks to specific membrane receptors such as LDLr and SR-B1. Other transporters from the ATP-binding cassette family can export cholesterol from the cells (*ABC A1*, *ABC A2*, *ABC G1*, *ABC G5*) within the brain. Since it cannot cross the blood–brain

barrier and to prevent an excessive accumulation in the brain, cholesterol can be converted into hydroxylated compounds by catabolic enzymes (black boxes): CYP46A1, CYP27A1, and CYP7B1. CYP46A1 synthesizes brain-specific 24S-hydroxycholesterol, whereas CYP27A1 and CYP7B1 produce 27-hydroxylated derivatives of cholesterol. These compounds being more amphiphilic than cholesterol, they can cross the blood–brain barrier very quickly, pass into the circulation, and join the bile acid biosynthesis in the liver. Each pathway of this metabolism (synthesis, storage, transport, and catabolism) is regulated by transcription factors (striped box) such as LXR β , RXR, PPAR α , PPAR γ , HNF1 α , HNF4 α , SREBP 1c, and SREBP 2. *CHOL*: Cholesterol, *24S-OH CHOL*: 24S-hydroxycholesterol

Statistical Analysis

Results are reported as means \pm SEM. Statistical analyses were performed with Student's *t* test or Mann–Whitney test for non parametric values. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results and Discussion

Cholesterol cerebral metabolism is an almost autonomous system. Indeed, the exchanges of native cholesterol between the brain and the general blood flow are impossible because of its inability to cross the blood–brain barrier. Therefore, brain must produce its own cholesterol endogenously and must also transform it in order to eliminate it. Thus, this study first assessed three of the

main enzymes of cholesterol biosynthesis and two of its major catabolic enzymes.

In the biosynthesis, we focused on (1) 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA (HMGCoA) Synthase, which initiates the reaction, (2) HMGCoA reductase, which catalyses the limiting step, and (3) CYP51, a cytochrome P450 (CYP) enzyme that demethylates lanosterol, the last important intermediate. An increase of 91% of HMGCoA Synthase gene expression was observed after a chronic internal contamination with DU (Fig. 2a).

Concerning the catabolic enzymes, we studied CYP46A1 (brain-specific), CYP27A1, and CYP7B1 (both ubiquitous). Cholesterol is converted into 24S-hydroxycholesterol by CYP46A1 or into 27-hydroxylated derivatives by CYP27A1 and CYP7B1. These oxysterols being more hydrophilic than cholesterol, they can cross the blood–brain barrier more rapidly, as described by Bjorkhem (2006).

Table 1 Oligonucleotide sequences of primers used for real-time quantitative PCR

Gene	Forward	Reverse	Length (bp)	Gene accession #	Reference
<i>hpri</i>	gctcgagatgcatgaaggaga	tcagcgccttaatgtaatccagc	109	NM_012583	Ropenga et al. 2004
<i>cyp46a1</i>	ctgcacgcgccaacagllt	caatggccttgagcgtagcc	130	NM_010010	
<i>cyp27a1</i>	ggaaggtgccccagaacaa	gceaggggtctccctaatca	71	NM_178847	Tissandie et al. 2007
<i>cyp7b1</i>	tcagatgcaaagacggtcaga	ttcafgcccgtagtatttttcag	70	U36992	
<i>cyp51</i>	ctggtcatctctgggtcctaaga	cagaggccatgaaggatgct	81	NM_012941	
<i>hmgcoa reductase</i>	ggcgggtctctgcaagtg	Gcaggtgagcgggtgaga	60	NM_173094	Souidi et al. 2006
<i>hmgcoa synthase</i>	ggtggtgggaccaacctct	cacgcccctgaaacaccta	65	X55286	Shibata et al. 2007
<i>acat 1</i>	ttcgtttttgctttttgca	catctctgcacaaagcgtaac	70	NM_031118	
<i>ldlr</i>	cagccgatgcattctgact	agttcaccgagcattttcac	69	NM_175762	Souidi et al. 2006
<i>sr-b1</i>	gttgtcaccatgggcca	cgtagcccccacaggatctca	65	NM_031541	Souidi et al. 2006
<i>abc a1</i>	atctcatagtatggaagatggaaget	cgtacaactattgtataaccatctocaaa	132	NM_78095	Souidi et al. 2006
<i>abc a2</i>	cctgtcatgcagtcgcttg	caaacaaagttgctcttccactaca	127	NM_024396	
<i>abc g1</i>	aggctcagcctctaaagttcctc	ttctcgaagtgaatgaaattatcg	85	NM_053502	
<i>abc g5</i>	cgcaggaaccgattgtaa	tgctgaagtgggtggaagagct	67	NM_053754	Souidi et al. 2006
<i>apo e</i>	tgggtcagacgctctctg	ttgtatgcctttactctcagtcattg	110	NM_138828	Souidi et al. 2006
<i>lxr β</i>	cttccccacaagttc	ectactctggtgga	151	NM_031626	
<i>rxr α</i>	cgcaaaagacctgacctacacc	tcctctgcaacggtctccc	134	NM_012805	Souidi et al. 2005
<i>ppar α</i>	ttcttccccaaaactcttca	gcacgagctgctgcatgctc	69	NM_013196	Tissandie et al. 2007
<i>ppar γ</i>	tcattgaccaggagttctctca	tcattcttaftccagtgcaattgaaact	103	NM_013124	Tissandie et al. 2007
<i>hnf1α</i>	acacctggtactgctcgaag	cggtgggtgaattgctgagc	51	NM_012669	Su and Waxman 2004
<i>hnf4α</i>	tggcaaacactacggagcct	ctgaagaatcccttgagcc	51	NM_022180	Su and Waxman 2004
<i>srebp 1c</i>	gctggccaatggaactactagtgt	ttgcgatgctccagaaggtgac	111	AF286469	
<i>srebp 2</i>	agctggcaaatcagaaaacaag	cgacttcaagttccatcactgt	58	XM_216989	Shibata et al. 2007

Primers without reference have been designed by the authors with the PrimerExpress software.

After DU administration, gene expression of CYP27A1 and CYP7B1 was unchanged, but we noted an increase of 39% in messenger RNA (mRNA) level of CYP46A1 (Fig. 2b). This is interesting because of the strong relationship between CYP46A1 and Alzheimer's disease. Indeed, 24S-hydroxycholesterol inhibits the enzyme producing the pathological β -amyloid peptide involved in the disease (Brown et al. 2004; Famer et al. 2007), and CYP46A1 may be considered as a potential therapeutic target.

Both biosynthesis and catabolism pathways exhibited modifications at gene expression level. Concerning cata-

bolic enzymes, it is noteworthy that precisely CYP46A1, which is a crucial enzyme in brain cholesterol catabolism, should be modified. Besides, this echoes to the modification of other CYPs in the brain or in other organs after DU exposure (Souidi et al. 2005; Tissandie et al. 2007). Besides cholesterol production and elimination, two other systems regulating the cerebral cholesterol pool from within were studied: storage (as cholesterol esters) and inner transport.

In the brain, the major enzyme esterifying cholesterol is acylcoenzymeA:cholesterol acyltransferase 1 (ACAT 1). Its mRNA level is unaffected by DU contamination (Fig. 2c).

Figure 2 mRNA levels of enzymes involved in cerebral cholesterol metabolism. Results are expressed as a ratio to HPRT mRNA level. The levels of non-contaminated control rats were arbitrarily set at 1. **a** Biosynthesis enzymes. **b** Catabolism enzymes. **c** Esterification enzyme (storage process). Data are expressed as means±SEM ($n=6-8$), with $*p\leq 0.05$, $**p\leq 0.01$ significantly different from control

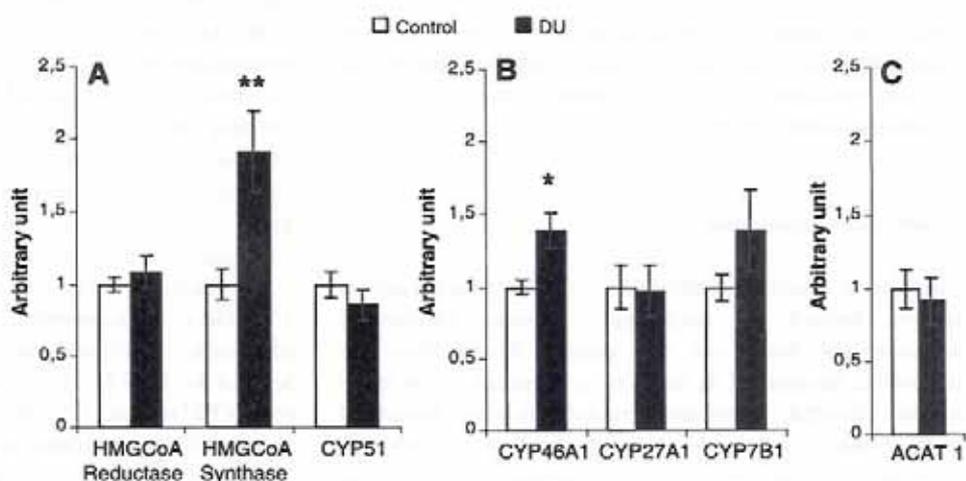
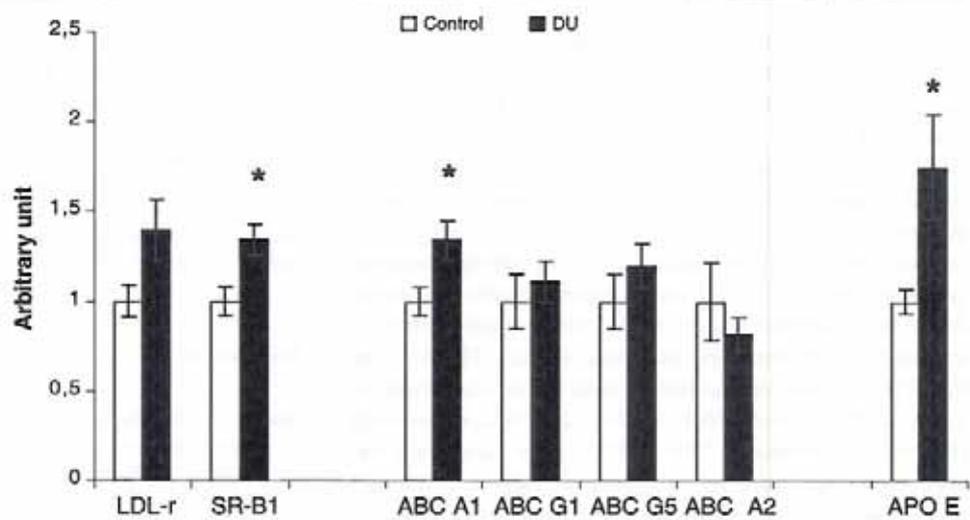


Figure 3 Gene expression of transporters and receptors involved in cholesterol transport within cerebral cortex. Results are expressed as a ratio to HPRT mRNA level. The levels of non-contaminated control rats were arbitrarily set at 1. Data are expressed as means±SEM ($n=6-8$), with $*p\leq 0.05$ significantly different from control



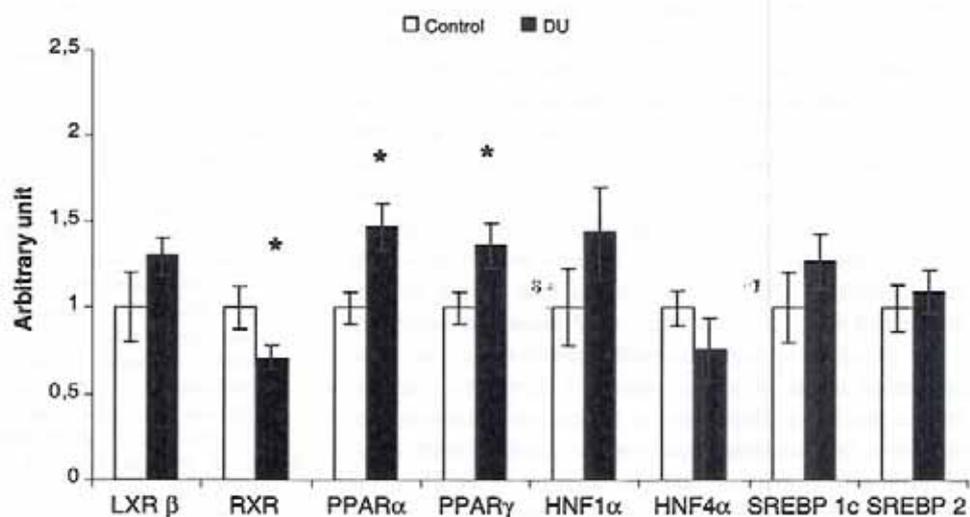
This is not surprising, since 99.5% of the brain cholesterol is unesterified (Bjorkhem and Meaney 2004). This is a quantitatively minor pathway, and it would be expected to change only under extreme conditions.

If cholesterol cannot freely enter and leave the brain, there are a lot of proteins involved in the transport of cholesterol between cerebral cells. Among them, membrane transporters of cholesterol from the adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette (ABC) family were studied: ABC A1, ABC A2, ABC G1, and ABC G5. These transporters transfer cholesterol to lipoproteic particles circulating between glial cells and neurons (Pfrieger 2003). Other studied transport proteins include apolipoprotein E (Apo E), which is incorporated in some lipoproteic particles, as well as lipoprotein membrane receptors such as low-density-lipoprotein receptor (LDLr) and scavenger-receptor class B type 1 (SR-B1), which both take up the cholesterol into the cell. Among these proteins, an identical increase of mRNA levels of ABC A1 and SR-B1 (+34%) was observed after

DU exposure. Besides, gene expression of Apo E increased by 75% (Fig. 3). This last effect is interesting with regard to the deep involvement of Apo E in Alzheimer's disease. Indeed, Apo E4 allele has deleterious effects on the formation of neuritic plaques, neurofibrillary tangles, and in other aspects of Alzheimer's disease physiopathology (Cedazo-Minguez 2007).

Thus, similarly to synthesis and catabolism and conversely to the storage pathway, the cholesterol transport system also displays modifications at gene expression level after a chronic contamination with DU. After studying the four main pathways of cholesterol metabolism, focus was set on the transcription factors controlling them. Like in others organs, cholesterol metabolism in the brain is submitted to a very fine and intricate regulation at transcriptional level. We chose to focus on a number of nuclear receptors covering most of the metabolism. In outline, sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP 1c) and SREBP 2 are involved in cholesterol

Figure 4 mRNA levels of transcription factors regulating cerebral cholesterol metabolism. Results are expressed as a ratio to HPRT mRNA level. The levels of non-contaminated control rats were arbitrarily set at 1. Data are expressed as means±SEM ($n=6-8$), with $*p\leq 0.05$ significantly different from control



biosynthesis. Versatile liver-X-receptor β (LXR β), which endogenous ligand is 24S-hydroxycholesterol, is importantly involved in the regulation of transport of cholesterol from glial cells to neurons. Hepatocyte nuclear factor 1 α (HNF 1 α) and HNF 4 α are involved in the regulation of ACAT 1 and CYP27A1. Finally, peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) and PPAR γ are involved at various levels of this metabolism, regulating transport, catabolic enzymes, and even other nuclear receptors. Retinoid-X-receptor (RXR) is the heterodimer partner of several nuclear receptors, including LXR β , PPAR α , and PPAR γ . A chronic contamination with DU increased mRNA levels of PPAR α and PPAR γ by 46% and 36%, respectively (Fig. 4). A decrease of 29% in RXR gene expression was also noted. This is the only diminution observed, but it may be unrelated to cholesterol metabolism. Indeed, RXR is a heterodimer partner for many nuclear receptors involved in various metabolic pathways. Likewise to CYPs, our observation that some transcription factors are affected by DU contamination is in accordance with previous studies (Souidi et al. 2005; Tissandie et al. 2007). In these publications, gene expression of pregnane-X-receptor, vitamin D receptor, HNF 4 α , and LXR β were reported to be significantly modified after chronic internal contamination with DU.

Taking all these observations together, it appears that mRNA levels of many genes promoting cholesterol efflux from the cell (CYP46A1, Apo E, ABC A1, PPAR α , and PPAR γ) were increased following DU exposure. Among these genes, it can be noted that both PPARs positively regulate ABC A1 and that Apo E is up-regulated by PPAR γ . Concurrently, SR-B1 and HMGCoA synthase, which both increase the cellular pool of cholesterol, also have higher mRNA levels after DU contamination. SR-B1 is also up-regulated by PPAR α and PPAR γ . Therefore, an activation of all metabolic pathways except for storage seems to be induced, resulting in an increase of cholesterol turnover. The lack of modification of the cholesterol can be interpreted as a sign of an overall balanced metabolism. The combination of these two observations leads to the hypothesis that DU-induced modifications result in a state of dynamic equilibrium at gene expression level. However, further investigations are required to confirm this hypothesis. For now, the primary target of DU in this metabolism remains unknown. Nevertheless, it seems that, whatever the direct effect of DU (increase or decrease of the cellular cholesterol pool), compensatory mechanisms are activated.

In conclusion, we observed modifications at gene expression levels of several actors of cholesterol metabolism in the brain. Biosynthesis, catabolism, transport, and regulation are modified. However, the general health status of the rats is preserved, and the changes observed in the present work are only of molecular range. These results

raise many thrilling issues, like the mechanisms of action of DU at molecular level or the physiological consequences of such a contamination on organisms weakened by pathology.

Acknowledgments The authors thank Dr Philippe Lestaevél for his helpful reading of the manuscript, as well as Cédric Baudelin, Thierry Loizeau, and Frédéric Voyer for animal care and contamination. This work is part of the ENVIRIOM research program supported by the Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN).

References

- Barber, D. S., Hancock, S. K., McNally, A. M., et al. (2007). Neurological effects of acute uranium exposure with and without stress. *Neurotoxicology*, 28, 1110–1119. doi:10.1016/j.neuro.2007.05.014.
- Belles, M., Albina, M. L., Linares, V., Gomez, M., Sanchez, D. J., & Domingo, J. L. (2005). Combined action of uranium and stress in the rat. I. Behavioral effects. *Toxicology Letters*, 158, 176–185. doi:10.1016/j.toxlet.2005.03.011.
- Bjorkhem, I. (2006). Crossing the barrier: Oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain. *Journal of Internal Medicine*, 260, 493–508. doi:10.1111/j.1365-2796.2006.01725.x.
- Bjorkhem, I., & Leitersdorf, E. (2000). Sterol 27-hydroxylase deficiency: A rare cause of xanthomas in normocholesterolemic humans. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 11, 180–183. doi:10.1016/S1043-2760(00)00255-1.
- Bjorkhem, I., & Meaney, S. (2004). Brain cholesterol: Long secret life behind a barrier. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24, 806–815. doi:10.1161/01.ATV.0000120374.59826.1b.
- Briner, W., & Murray, J. (2005). Effects of short-term and long-term depleted uranium exposure on open-field behavior and brain lipid oxidation in rats. *Neurotoxicology and Teratology*, 27, 135–144. doi:10.1016/j.ntt.2004.09.001.
- Brown 3rd, J., Theisler, C., Silberman, S., et al. (2004). Differential expression of cholesterol hydroxylases in Alzheimer's disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 34674–34681. doi:10.1074/jbc.M402324200.
- Bussy, C., Lestaevél, P., Dhieux, B., et al. (2006). Chronic ingestion of uranyl nitrate perturbs acetylcholinesterase activity and monoamine metabolism in male rat brain. *Neurotoxicology*, 27, 245–252. doi:10.1016/j.neuro.2005.11.003.
- Castoldi, A. F., Coccini, T., Ceccatelli, S., & Manzo, L. (2001). Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. *Brain Research Bulletin*, 55, 197–203. doi:10.1016/S0361-9230(01)00458-0.
- Cedazo-Minguez, A. (2007). Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: Molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 11, 1227–1238.
- Famer, D., Meaney, S., Mousavi, M., Nordberg, A., Bjorkhem, I., & Crisby, M. (2007). Regulation of alpha- and beta-secretase activity by oxysterols: Cerebrosterol stimulates processing of APP via the alpha-secretase pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 359, 46–50. doi:10.1016/j.bbrc.2007.05.033.
- Finkelstein, Y., Markowitz, M. E., & Rosen, J. F. (1998). Low-level lead-induced neurotoxicity in children: An update on central nervous system effects. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 27, 168–176. doi:10.1016/S0165-0173(98)00011-3.
- Gilman, A. P., Villeneuve, D. C., Secours, V. E., et al. (1998). Uranyl nitrate: 28-day and 91-day toxicity studies in the Sprague-Dawley rat. *Toxicological Sciences*, 41, 117–128.

- Goasguen, J., Lapresle, J., Ribot, C., & Rocquet, G. (1982). Intoxication par l'uranium métallique. Manifestations neurologiques chroniques. *La Nouvelle Presse Médicale*, *11*, 119–121. Chronic neurological syndrome resulting from intoxication with metallic uranium (author's transl).
- Kathren, R. L., & Moore, R. H. (1986). Acute accidental inhalation of U: A 38-year follow-up. *Health Physics*, *51*, 609–619. doi:10.1097/0004032-198611000-00004.
- Mediarmid, M. A., Engelhardt, S., Oliver, M., et al. (2004). Health effects of depleted uranium on exposed Gulf War veterans: A 10-year follow-up. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, *67*, 277–296. doi:10.1080/15287390490273541.
- Monleau, M., Bussy, C., Lestaevél, P., Houpert, P., Paquet, F., & Chazel, V. (2005). Bioaccumulation and behavioural effects of depleted uranium in rats exposed to repeated inhalations. *Neuroscience Letters*, *390*, 31–36. doi:10.1016/j.neulet.2005.07.051.
- Pellmar, T. C., Fuciarelli, A. F., Ejniak, J. W., et al. (1999a). Distribution of uranium in rats implanted with depleted uranium pellets. *Toxicological Sciences*, *49*, 29–39. doi:10.1093/toxsci/49.1.29.
- Pellmar, T. C., Keyser, D. O., Emery, C., & Hogan, J. B. (1999b). Electrophysiological changes in hippocampal slices isolated from rats embedded with depleted uranium fragments. *Neurotoxicology*, *20*, 785–792.
- Pfrieger, F. W. (2003). Outsourcing in the brain: Do neurons depend on cholesterol delivery by astrocytes? *BioEssays*, *25*, 72–78. doi:10.1002/bies.10195.
- Ropenga, A., Chapel, A., Vandamme, M., & Griffiths, N. M. (2004). Use of reference gene expression in rat distal colon after radiation exposure: A caveat. *Radiation Research*, *161*, 597–602. doi:10.1667/RR3173.
- Shibata, S., Hayakawa, K., Egashira, Y., & Sanada, H. (2007). Roles of nuclear receptors in the up-regulation of hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase by cholestyramine in rats. *Life Sciences*, *80*, 546–553. doi:10.1016/j.lfs.2006.10.003.
- Souidi, M., Gueguen, Y., Linard, C., et al. (2005). In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on CYP3A and associated nuclear receptors PXR and CAR in the rat. *Toxicology*, *214*, 113–122. doi:10.1016/j.tox.2005.06.006.
- Souidi, M., Tissandie, E., Grandcolas, L., et al. (2006). Chronic contamination with 137cesium in rat: Effect on liver cholesterol metabolism. *International Journal of Toxicology*, *25*, 493–497. doi:10.1080/10915810600961317.
- Su, T., & Waxman, D. J. (2004). Impact of dimethyl sulfoxide on expression of nuclear receptors and drug-inducible cytochromes P450 in primary rat hepatocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *424*, 226–234. doi:10.1016/j.abb.2004.02.008.
- Tissandie, E., Gueguen, Y., Lobaccaro, J. M., et al. (2007). In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on vitamin D3 metabolism in rat. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1770*, 266–272.
- Vance, J. E., Karten, B., & Hayashi, H. (2006). Lipid dynamics in neurons. *Biochemical Society Transactions*, *34*, 399–403. doi:10.1042/BST0340399.
- Vaya, J., & Schipper, H. M. (2007). Oxysterols, cholesterol homeostasis, and Alzheimer disease. *Journal of Neurochemistry*, *102*, 1727–1737. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04689.x.

Contexte scientifique

L'étude précédente portait sur l'évaluation des effets d'une ingestion chronique d'une faible concentration d'UA (non-néphrotoxique) *via* l'eau de boisson chez le rat adulte. Cette étude a montré que l'homéostasie du cholestérol était préservée au niveau sanguin et hépatique bien que des modifications d'expression génique et d'activité enzymatique aient été relevées. Le foie est au centre des flux de cholestérol à travers l'organisme *via* le métabolisme des lipoprotéines. La complexité de ces flux offre cependant de multiples voies d'apport ou d'élimination de cholestérol selon les besoins. L'efflux de cholestérol libre *via* les HDL circulantes est par exemple une voie efficace de lutte contre l'accumulation du cholestérol au niveau tissulaire. Cependant, un organe ne dispose pas de ce moyen d'élimination du cholestérol natif : le cerveau. En effet, le cerveau est isolé de la circulation sanguine par la barrière hémato-encéphalique. Or le cholestérol ne peut pas franchir cette barrière librement, il doit être au préalable transformé en dérivés hydroxylés. Ainsi, ce catabolisme particulier est un élément essentiel à l'homéostasie du cholestérol cérébral. De même, la synthèse et le transport intercellulaire du cholestérol revêtent dans le cerveau un caractère crucial car il n'y a pas d'alternative possible en cas de perturbation de ces voies, contrairement aux autres organes. Par ailleurs, l'importance des rôles du cholestérol dans le cerveau (composition des membranes et de la myéline, implication dans la neurotransmission, précurseur de neurostéroïdes, etc.) donne la mesure des conséquences que pourrait avoir une rupture de son homéostasie cérébrale (pour quelques exemples de pathologies neurologiques liées à un défaut du métabolisme du cholestérol, voir la synthèse bibliographique). Pour toutes ces raisons, l'étude de l'impact d'une contamination chronique interne à l'UA sur le métabolisme du cholestérol dans le cerveau apparaît importante.

Outre ces aspects métaboliques, un autre élément vient appuyer la pertinence de cette évaluation. Plusieurs études ont montré une accumulation de l'UA dans le cerveau (Bussy 2006; Houpert 2007c; Monleau 2005). En outre des effets neurologiques ont été montrés après contamination chronique : perturbation du métabolisme de certains neurotransmetteurs, légères modifications du comportement ou encore troubles de la motricité... (Bensoussan 2009; Bussy 2006; Linares 2007). Ainsi, le cerveau apparaît d'ores et déjà comme une cible de la toxicité de l'UA après exposition chronique.

Ainsi, le but de cette deuxième étude est d'évaluer les conséquences d'une ingestion quotidienne d'eau supplémentée en UA à raison de 40 mg/l (environ 2 mg/kg/j) pendant 9 mois sur le métabolisme du cholestérol chez le rat. Le protocole utilisé est le même que pour l'étude hépatique. Cependant, en raison de la faible quantité de tissu disponible, seule l'expression génique des acteurs des différentes voies du métabolisme a été analysée. L'étude a été réalisée sur le cortex frontal des rats.

Résultats et Conclusion

Cette deuxième étude a permis d'évaluer l'impact d'une contamination interne chronique par un faible niveau d'UA sur l'expression génique des principaux acteurs du métabolisme du cholestérol cérébral chez le rat.

De nombreux gènes impliqués dans les différentes voies métaboliques ont vu leur expression être modifiée suite à cette contamination. Ainsi, les taux de transcription de l'HMG-CoA synthase (impliquée dans la synthèse du cholestérol), de la CYP46A1 (qui convertit le cholestérol en 24(S)-hydroxycholestérol), de l'ABC A1, de l'apo E et du SR-B1 (participant au transport du cholestérol entre astrocytes et neurones) et enfin de PPAR α et PPAR γ sont augmentés après contamination. Une seule diminution d'expression génique est relevée, elle concerne RXR.

La plupart des variations observées sont donc des augmentations modérées du taux d'ARNm (de 29 à 91 % au maximum). Le point frappant de cette réponse à la contamination réside dans le nombre de gènes dont l'expression est modifiée, et dans leur appartenance à la quasi-totalité des voies métaboliques, stockage excepté. Cette caractéristique pourrait suggérer l'activation des différentes voies pour conserver l'homéostasie du cholestérol par un phénomène d'équilibre dynamique. Cependant, cette hypothèse demande à être vérifiée au niveau protéique et tissulaire, du fait de la faible amplitude des modifications et de l'absence de modulation de certains intermédiaires nécessaires à une activation complète de certaines voies. A titre d'exemple, on constate que l'expression génique de LXR β n'est pas modulée par la contamination alors qu'elle est nécessaire à l'activation d'ABC A1 par PPAR γ .

Ainsi, cette deuxième étude indique qu'une ingestion quotidienne d'UA à une concentration de 40 mg/L pendant 9 mois provoque une augmentation de l'expression génique de nombreux acteurs impliqués dans les différentes voies du métabolisme cérébral du cholestérol chez le rat contaminé depuis l'âge adulte. Le profil d'expression génique obtenu évoque un mécanisme de compensation suite à une perturbation d'une ou de plusieurs voies métaboliques. La réalité de cette hypothèse reste toutefois à évaluer au niveau protéique et tissulaire. Cependant, comme nous l'avons vu lors de la première étude, l'état général des rats et leur comportement ne sont pas affectés de façon visible au long de cette contamination.

Suite à ces deux premières études, il ressort que le rat contaminé depuis l'âge adulte ne subit pas d'altération majeure de son état général et de l'homéostasie du cholestérol au niveau hépatique, cérébral et systémique. Le métabolisme du cholestérol est essentiellement modulé au niveau de l'expression génique dans le foie comme dans le cerveau, avec des variations d'amplitude modérée. Ce modèle de référence s'avère robuste face à la contamination à laquelle il s'adapte. Cependant, l'impact de l'UA pourrait être plus prononcé dans un modèle dont les mécanismes de régulation sont fragilisés par l'installation d'une pathologie.

ARTICLE 3

INFLUENCE OF CHRONICALLY INGESTED DEPLETED URANIUM ON HEPATIC CHOLESTEROL METABOLISM IN APOE-DEFICIENT MICE

R. Racine, F. Airault, L. Grandcolas, S. Grison, J. Stefani, P. Gourmelon, G. Veysière, M. Souidi

En préparation

Contexte scientifique

L'étude du modèle de référence (le rat contaminé depuis l'âge adulte) suggère que les animaux ne sont pas affectés de façon importante par la contamination interne chronique à l'UA en ce qui concerne le métabolisme du cholestérol. Les mécanismes de régulation de l'homéostasie du cholestérol permettent aux animaux de s'adapter à la contamination.

Pour affiner l'évaluation de l'impact d'une telle contamination sur le métabolisme du cholestérol, la troisième étude met en jeu un modèle plus fragile que le modèle de référence, à savoir des animaux pathologiques. Nous avons choisi les souris déficientes en apo E. Ces animaux, développent une hypercholestérolémie évolutive dès les premiers mois, conduisant à un taux plasmatique de cholestérol total multiplié par quatre à l'âge de 3 mois (Moghadasian 2001). L'évolution du phénotype comprend un développement rapide d'athérosclérose ainsi que l'apparition de dépôts lipidiques (de cristaux de cholestérol entre autres) dans différents tissus y compris le cerveau à l'âge de 19 mois (Thomson 1984) du fait d'une détérioration de la barrière hémato-encéphalique (Fullerton 2001).

En raison de difficultés rencontrées lors de l'élevage des souris, l'étude présentée ci-après n'a pas pu se faire sur 9 mois comme initialement prévu. Elle s'est donc déroulée sur 3 mois, ce qui confère néanmoins à l'exposition à l'UA un caractère de chronicité.

Ainsi, le but de cette troisième étude est de déterminer l'impact d'une ingestion quotidienne de faibles niveaux d'UA pendant 3 mois sur des souris déficientes en apo E. Ces souris présenteront une hypercholestérolémie due à leur phénotype pendant et à l'issue de la contamination. Il s'agit donc d'évaluer si cette hypercholestérolémie (et les désordres tissulaires associés) est aggravée par la contamination.

Pour répondre à cette problématique, des souris mâles homozygotes pour la mutation *ApoE^{tm1Unc}* (désignées par la suite sous le terme apo E^{-/-}) âgées de 6 semaines ont été séparées en deux groupes. Les souris du groupe expérimental ont été contaminées pendant 3 mois par l'UA via leur eau de boisson (20 mg/l) tandis que les souris témoins ont reçu de l'eau minérale. A l'issue de cette contamination, le métabolisme du cholestérol a été évalué au niveau systémique (par le profil lipidique du plasma) ainsi qu'au niveau tissulaire et au niveau moléculaire dans le foie et le cerveau (cortex frontal).

INFLUENCE OF CHRONICALLY INGESTED DEPLETED URANIUM ON HEPATIC CHOLESTEROL METABOLISM IN APOE-DEFICIENT MICE

Racine R¹, Airault F¹, Grandcolas L¹, Grison S¹, Stefani J¹, Gourmelon P¹, Veysière G², Souidi M¹.

¹ Institute for Radiological protection and Nuclear Safety (IRSN), Radiological Protection and Human health Division, Radiobiology and Epidemiology Department, Laboratory of Experimental Toxicology. BP n° 17, F-92262 Fontenay-aux-Roses CEDEX, France.

² Clermont Université, UMR CNRS 6247 and Centre de recherche en nutrition humaine, 24, avenue des Landais, F-63177 Aubière Cedex France.

Corresponding author: Maâmar SOUIDI

IRSN/DRPH/SRBE/LRTOX

B.P. 17

F-92262 Fontenay-aux-Roses Cedex, France.

Tel: 33 - 1 58 35 91 94

Fax: 33 - 1 58 35 84 67

E-mail: maamar.souidi@irsn.fr

Keywords: cholesterol metabolism, depleted uranium, apolipoprotein E, chronic contamination

Abbreviations

ABC: adenosine triphosphate binding cassette transporter, ACAT: acylCoenzymeA: cholesterol acyltransferase, ALT: alanine aminotransferase, Apo: apolipoprotein, AST: aspartate aminotransferase, CYP: cytochrome P450, DU: depleted uranium, FXR: farnesoid-X-receptor, GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase GGT: gamma-glutamyltranspeptidase, HDL: high-density lipoprotein, HMGCoA R/S: 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase/Synthase, HPRT: hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, HNF: hepatic nuclear factor, LDL: low-density lipoprotein, LDLr: low-density lipoprotein receptor, LRH-1: liver receptor homolog-1, LXR: liver-X-receptor, PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor, RXR: retinoid-X-receptor, SHP: small heterodimer partner, SR-B1: scavenger receptor class B type 1, SREBP: sterol regulatory element binding protein, VLDL: very low-density lipoprotein.

1. Introduction

Depleted uranium (DU) is an artificial radioelement which results from the enrichment of natural uranium in fissile isotope ^{235}U in nuclear power plants. Because of its high density, it is used in industrial (counterweight, shielding against ionizing radiation) as well as military items (armor-plating, armor-piercing ammunition). This increases its deposition in some areas and leads to a possible exposure of the populations living on these territories through a chronic ingestion of contaminated foodstuff.

Previous studies have shown that cholesterol metabolism was modulated at molecular level in the brain and the liver of rats contaminated for 9 months with DU-supplemented drinking water (40 mg/L). However these animals did not display any pathological feature at organ or body level. In this regard, the use of a pathological model should be helpful in order to clarify the impact of this type of exposure on cholesterol metabolism. Indeed, in such a model cholesterol homeostasis is disturbed and regulation mechanisms that are powerful in a healthy animal may be more sensitive to an external contaminant.

Apolipoprotein E (apo E) is a protein that is involved in the structure of lipoproteins such as very low-density lipoproteins (VLDL) and high-density lipoproteins (HDL). Apo E is also involved in the maturation of the lipoproteins in the blood and in their uptake in the tissues by interacting with the low-density lipoproteins (LDL) receptor (LDL-r) or the LDL-r related proteins. Moreover, it is particularly important in the brain where it is the main apolipoprotein. For example, apo E's allele $\epsilon 4$ is a known risk factor for Alzheimer disease ([Kim J 2009 Neuron](#)). Moreover, apo E is involved in several aspects of the physiopathology of Alzheimer's disease, including the defective transport of cholesterol between brain cells. Therefore, apo E is a major actor of cholesterol homeostasis and its mutation leads to severe disturbed cholesterol metabolism at organ and body level.

Apo E-deficient mice develop advanced atherosclerosis within the first year of life. In accordance with this phenotype, they display an age-evolving hypercholesterolemia from the first months on, leading to a 4-fold increase in plasma total cholesterol levels in 10-12 week old mutants ([Moghadasian 2001, FASEB J](#)). However, these apo E-deficient mice have a relatively long half-life, this feature making them a good model to evaluate the effects of a chronic contamination.

Thus, the present study aims at assessing the effects of a chronic ingestion of a low level of DU on hypercholesterolemic apo E-deficient mice, i.e. at ascertaining whether the physiopathology of these animals is worsened by the contamination. In this regard, mutant mice were given DU-supplemented water for three months. Cholesterol metabolism was then studied in the liver and the brain.

2. Materials and methods

2.1. Animals

4 couples of apo E-deficient mice from the B6.129P2-ApoE^{tm1Unc}/J strain were purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) and were bred in our animal facility. The experiment was conducted on 30 male mice aged of 6 weeks, divided into two groups (n=15), control and DU-exposed respectively. All the mice were born within the same week to limit age dispersion in the groups. During the experiment, the mice were housed five per cage and maintained in a 12 h light/12 h dark cycle at 21 ± 2 °C, with access to a standard pellet rodent diet and water ad libitum.

All experimental procedures were approved by the Animal Care Committee of the Institute of Radioprotection and Nuclear Safety, and complied with French regulation for animal experimentation (Ministry of Agriculture Act No. 87-848, October 19th 1987, modified May 20th 2001).

2.2. Contamination procedure and organs removal

Depleted uranyl nitrate hexahydrate (UO₂(NO₃)₂.6H₂O, AREVA-NC, France) was dissolved at a concentration of 20 mg/L (approximately 4 mg/kg/day) in mineral water. Specific activity of DU is 1.4.10⁴ Bq/g and its isotopic composition is ²³⁸U = 99.74%, ²³⁵U = 0.255% and ²³⁴U = 0.0055%.

Mice of the experimental group were given the DU-supplemented water as the only drink for 9 months. Control mice received mineral water throughout the experiment.

After 3 months, the animals were anesthetized by inhalation of 5 % isoflurane (Abbot France, Rungis, France), euthanized by intracardiac puncture to collect blood and decapitated to harvest the brain. The liver and the brain were immediately dissected on ice, deep-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. All analyses of cerebral cholesterol metabolism were conducted on frontal cortex.

2.3. Biochemical parameters assay

Biochemical parameters were measured in plasma samples with an automated spectrophotometric system (Konelab 20 from Thermo Electron Corporation, Cergy-Pontoise, France), using the manufacturer's biological chemistry reagents. The parameters measured in plasma included total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides, phospholipids, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), albumin, direct and total bilirubin, creatinine and urea.

2.4. Cholesterol assay in the liver and the brain

Frozen samples (about 250 mg for liver and 30 mg for brain) were thawed and homogenized in 5 ml isopropanol using a potter with a Teflon pestle (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). After incubation at 60°C for 1h30 and centrifugation at 3220 g for 10 minutes, the supernatant was collected and the pellet was re-extracted in 5 ml isopropanol (same procedure but with a 1-hour incubation). The supernatant of this second extraction was added to the first one and the total volume was adjusted to the precise weight of 10 ml isopropanol for further calculations. Total and free cholesterol were then assayed using the Amplex Red Cholesterol Assay kit (Invitrogen-Life technologies, Cergy-Pontoise, France) after appropriately diluting the samples. Esterified cholesterol was calculated as the difference between total and free cholesterol measures.

2.5. Real-time PCR

Total RNA was extracted from 25 mg of liver samples using the RNeasy total RNA isolation Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and from 30 mg brain samples using the RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), according to the manufacturer's respective recommendations.

Reverse transcription was performed with Sprint PowerScript PrePrimed 96 Plates (BD Biosciences Clontech, Erembodegem, Belgium) containing 1 µg of reverse transcriptase. The cDNA synthesis was conducted at 42°C for 1 hour and was ended by the inactivation of the reverse transcriptase after 10 minutes at 70°C.

Real-time PCR was then carried out on 0.4 ng/µl cDNA and 0.3 pmol/µl primers for each reaction, using the SYBR® Green technology (Power SYBR® Green PCR Master Mix, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. The plates were analyzed on an AbiPrism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) according to the following run: incubation 2 min at 50°C, 10 min at 95°C for activation of the polymerase and 40 cycles of 15 sec at 95°C for denaturation and 1 min at 60°C for annealing-extension. Results were normalized to hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) and fold-inductions calculated relatively to the control group.

2.6. Western Blot

All antibodies were purchased from Tebu-bio (Le Perray-en-Yvelines, France), except anti-LXRα, which was a gift from Pr. JM A. Lobaccaro.

Proteins from liver homogenate were loaded, separated by 10% SDS polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto nitrocellulose membrane. The membranes were blocked for 1 hour in 5% non-fat dry milk in TBS. The blots were incubated overnight at 4°C with primary antibodies anti-LXRα, anti-HNF 4α (sc-6556) or anti-RXR (sc-553) diluted in 2% non-fat dry milk in TBS. Immune complexes were revealed using anti-goat IgG (sc-2768), and anti-rabbit IgG (sc-2004) antibodies coupled to horseradish peroxidase and the luminol derivative of Immobilon Western (Millipore, Billerica, USA). Samples were normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

(GAPDH) which was detected using a rabbit anti-rat primary antibody (sc-25778). Reaction intensity was determined by computer-assisted densitometry (FujiLas3000, Raytest, France).

2.7. Assay of CYP7A1, CYP27A1 and CYP7B1 specific activities

The specific activities of CYP7A1 and CYP27A1 were assessed on hepatic microsomal and mitochondrial fractions respectively using a radioisotopic method described previously (Souidi 1999). The specific activity of CYP7B1 was conducted on hepatic microsomes accordingly to Souidi *et al* (Souidi 2000 BBA). The assays were conducted on six animals of each group, randomly selected.

2.8. Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. Unpaired Student's *t*-test was routinely performed for statistical analysis of the data, but was replaced by Mann-Whitney Rank Sum Test when the Equal variance test failed (determined by the SigmaStat software). Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results and Discussion

The food and drink intake as well as the body weight gain were recorded once a week during the entire contamination time. None of these parameters were affected by the chronic ingestion of DU (data not shown). The behavior of the mice was similar between contaminated and control mice throughout the experiment. No difference was recorded in the final body weight or in the final liver weight between the two groups (Table 1). Finally, the macroscopic appearance of the main organs (liver, lung, heart, intestines, kidney, brain and testis) from DU-exposed mice did not differ from those of control mice. The same result was obtained in adult healthy rats contaminated for 9 months (personal data).

The pathological state of the contaminated and control Apo E^{-/-} mice was confirmed by the total plasma cholesterol level: in both groups of mutant mice, the cholesterolemia was averaging 16-17 mM, whereas age-matching wild mice (C57BL/6J) display a cholesterolemia averaging 2 mM (personal data). However, no difference was observed after DU-exposure in total cholesterol, HDL- or LDL-cholesterol, triglycerides and phospholipids plasma levels (Table 1). Similarly, no statistical difference was recorded in the blood concentration of biomarkers of hepatic integrity (AST, ALT) and function (direct and total bilirubin). Besides, the plasma levels of creatinine and urea were similar between both groups, indicating that DU exposure did not induce nephrotoxicity in the contaminated mice. Thus, DU contamination had no effect on cholesterol homeostasis in apoE-deficient mice contaminated for 3 months.

Parameters	Control	DU-exposed
Final body weight (g)	30.35 ± 0.39	29.82 ± 0.09
Final liver weight (mg)	1.37 ± 0.04	1.34 ± 0.03
Plasma profile		
Cholesterol (mM)	17.19 ± 0.79	16.25 ± 1.02
HDL-Cholesterol (mM)	6.58 ± 0.43	6.43 ± 0.51
LDL-Cholesterol (mM)	13.14 ± 0.54	12.40 ± 0.75
Triglycerides (mM)	1.20 ± 0.15	1.05 ± 0.07
Phospholipids (g/l)	4.22 ± 0.18	4.06 ± 0.22
ALT (U/l)	38.63 ± 4.73	27.49 ± 3.02
AST (U/l)	125.41 ± 25.29	93.50 ± 14.98
Direct bilirubin (mM)	29.82 ± 1.69	24.24 ± 2.91
Total bilirubin (µM)	11.74 ± 0.73	9.59 ± 1.08
Creatinine (µM)	29.19 ± 3.39	35.56 ± 3.02
Urea (mM)	8.70 ± 0.31	8.44 ± 0.44

Table 1: General health parameters in control group and DU-exposed group

Values are expressed as means ± SEM (n=15). ALT = Alanine aminotransferase, AST = Aspartate aminotransferase, HDL = high density lipoprotein, LDL=low density lipoprotein

In order to assess the effects of the contamination on cholesterol metabolism at organ level, the concentration of cholesterol was measured in the brain and the liver. No statistically significant difference was seen in the total, free and esterified cholesterol concentrations in the liver and in the brain of the mutant mice (Figure 1). This indicates that a chronic ingestion of a low level of DU does not have worsening consequences at organ level regarding hepatic and cerebral cholesterol metabolism.

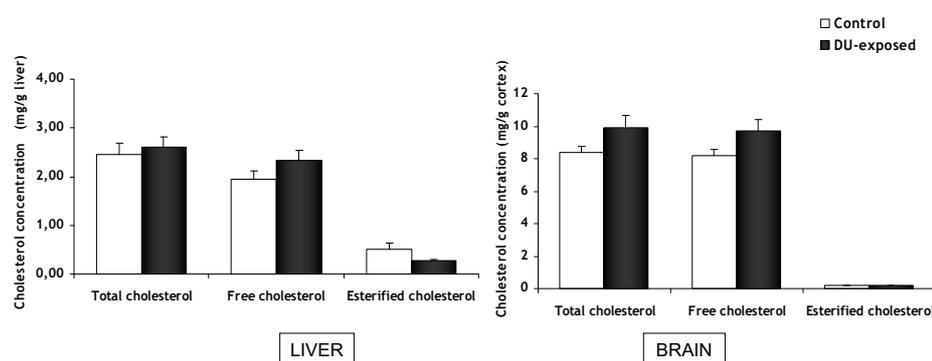


Figure 1: Levels of total, free and esterified cholesterol in the liver and the brain following DU chronic ingestion

Data are expressed as means ± SEM (n=5-7). Esterified fraction of hepatic cholesterol is calculated as the difference of the measures obtained for total and free cholesterol concentrations.

In order to verify whether in our conditions DU exposure does influence cholesterol metabolism at all in hypercholesterolemic mice, the analysis was continued at molecular level.

First of all, a gene expression study overviewing cholesterol synthesis, storage, transport and catabolism pathways as well as the transcription factors regulating them was carried out in the liver and the brain. In the liver, the gene expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A synthase (HMGCoA S), HMGCoA reductase (HMGCoA R) and CYP51, which three major enzymes involved in cholesterol synthesis, was not affected by DU exposure (Figure 2). Similarly, the mRNA level of acylCoenzymeA: cholesterol acyltransferase 2 (ACAT 2), which esterifies cholesterol into its storage form, was not significantly different between both groups. Concerning cholesterol hepatic catabolism, the gene expression of CYP7A1 and CYP27A1 (initiating the conversion of cholesterol into bile acids) and CYP8B1 (influencing the ratio of hydrophilic/hydrophobic bile acids) was similar between DU-contaminated and control Apo E^{-/-} mice. However, the mRNA level of CYP7B1, which is involved in the acidic pathway of cholesterol catabolism, was decreased of 23 % (Figure 2).

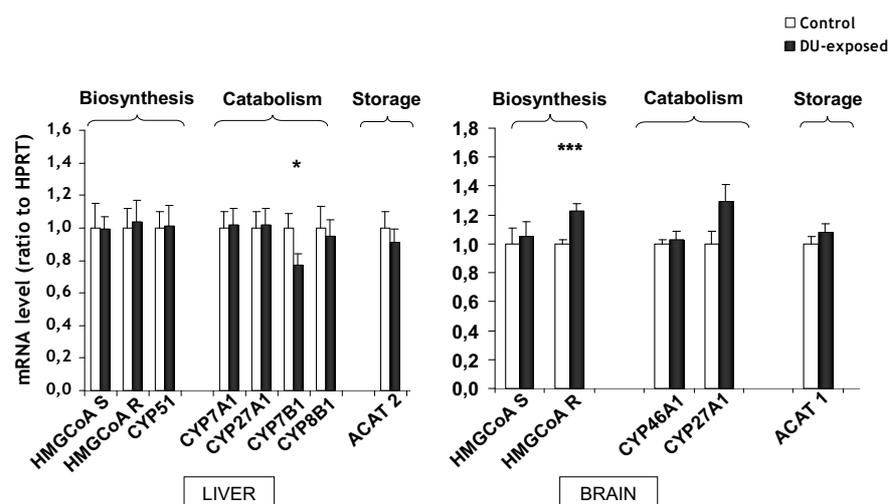


Figure 2: mRNA levels of major actors involved in cholesterol biosynthesis, catabolism and storage in the liver and the brain

Results are expressed as a ratio to HPRT mRNA level. The levels of non-contaminated control mice were arbitrarily set at 1. Data are expressed as means \pm SEM (n=8-10). *p<0.05 and ***p<0.001.

In the brain, the biosynthesis enzyme HMGCoA S displayed a similar mRNA level between both groups, whereas that of HMGCoA R was increased by 23 % in the liver of DU-exposed mice compared to the control mice. The gene expression of CYP46A1 and CYP27A1, involved in cholesterol cerebral catabolism, and that of ACAT 1, the storage enzyme in the brain, was similar between both groups. Due to tissue amount limitations, the analysis of DU molecular effects in the brain was restricted to gene expression analysis. However, it is clear that the increase in the mRNA level of HMGCoA R in the brain does not have any consequence at organ level, since the total and free cholesterol cerebral concentrations were unaffected after the contamination.

To assess the possible repercussion of the decrease in CYP7B1 gene expression in the liver, its specific activity (along with that of CYP7A1 and CYP27A1, which are two crucial enzymes in cholesterol hepatic catabolism) was measured (Figure 3). None of the three activities was modified following DU exposure of apo E-deficient mice compared to non-exposed mutant mice. This lack of variation is in accordance with the absence of effect at gene expression level in the case of CYP7A1 and CYP27A1. Concerning CYP7B1, it indicates that the decrease in its mRNA level is of weak range, which was already suggested by its small amplitude (23 %). Finally, the absence of major modification of cholesterol synthesis, catabolism and storage of cholesterol in the liver is in accordance with the preserved level of hepatic cholesterol (total, free and esterified) previously observed.

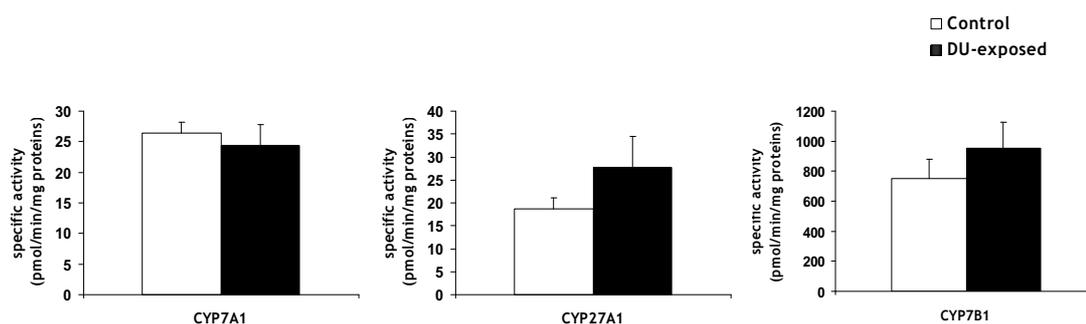


Figure 3: Specific activities of hepatic CYP7A1, CYP27A1 and CYP7B1
Data are expressed as means \pm SEM (n=6). *p<0.05

Concerning the actors of cholesterol transport, the gene expression of lipoprotein receptors (LDL-r, scavenger receptor class B type 1 (SR-B1)), ATP binding cassette (ABC transporters involved in cholesterol efflux from the cell (ABC A1, ABC G1, ABC G5 and ABC G8) and apolipoproteins (apo A1, apo B, apo J)) was analyzed in the liver and/or the brain according to their respective expression in these organs. None of these genes displayed any modification of expression following DU chronic ingestion in apo E-deficient mice (Figure 4). In a previous work, rats exposed to DU chronic ingestion (40 mg/L) over nine months displayed an increase of SR-B1, ABC A1 and apo E cerebral gene expression (Racine 2009 JMN). The fact that these effects are not seen in the present study is somewhat puzzling since even though the concentration of DU given to the mice is smaller than that of the rats, the quantity of ingested DU per day as a ratio to body weight is higher for the mice. This discrepancy might be due to species difference, or to the lack of apo E, which is likely to disorganize cholesterol transport from astrocytes (where it is synthesized) to neurons (where it is used).

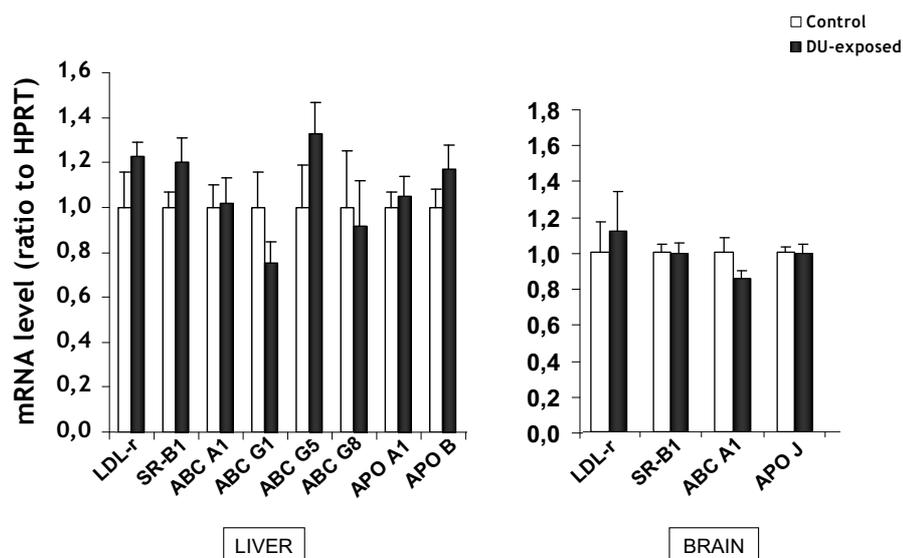


Figure 4: mRNA levels of major actors involved in cholesterol transport in the liver and the brain
Results are expressed as a ratio to HPRT mRNA level. The levels of non-contaminated control mice were arbitrarily set at 1. Data are expressed as means \pm SEM (n=8-10).

Finally, the gene expression of transcription factors involved in the regulation of the genes previously cited was studied. This overview includes liver-X-receptor α (LXR α) and LXR β in the liver and the brain respectively, farnesoid-X-receptor (FXR), hepatic nuclear factor 1 α (HNF 1 α), HNF 4 α , liver receptor homolog-1 (LRH-1), peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) and small heterodimer partner (SHP) in the liver, as well as retinoid-X-receptor (RXR), PPAR γ and sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP 2) in both organs (Figure 5).

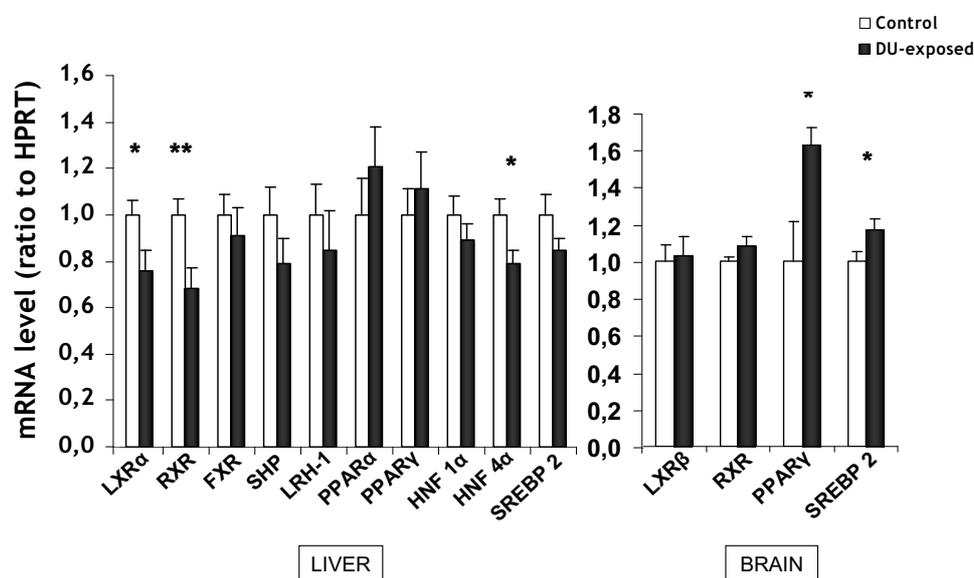


Figure 5: mRNA levels of major actors involved in the regulation of cholesterol metabolism in the liver and the brain
Results are expressed as a ratio to HPRT mRNA level. The levels of control mice were arbitrarily set at 1. Data are expressed as means \pm SEM (n=8-10). *p<0.05 and **p<0.01.

In the liver, the gene expression of LXR α , RXR and HNF 4 α decreased by 24, 32 and 21 % respectively. RXR is the obligate heterodimer partner for many nuclear receptors, including LXRs, FXR, and PPARs. Moreover, all three genes are involved in the upregulation of cholesterol catabolism and transport (Chiang 2004). In particular, LXR α -RXR regulate positively the transcription of the gene of CYP7A1, ABC A1, ABC G1, ABC G5 and ABC G8, whereas HNF 4 α upregulates the transcription of the genes of CYP27A1, CYP7B1, CYP8B1, apo B, HNF 1 α and FXR. It is striking that except for CYP7B1, none of the target genes of LXR α -RXR and HNF 4 α are modified in the liver. This lack of repercussion is in accordance with the protein expression assay conducted on these nuclear receptors in the liver: the decrease observed at gene expression level has no consequence on the protein level (Figure 6).

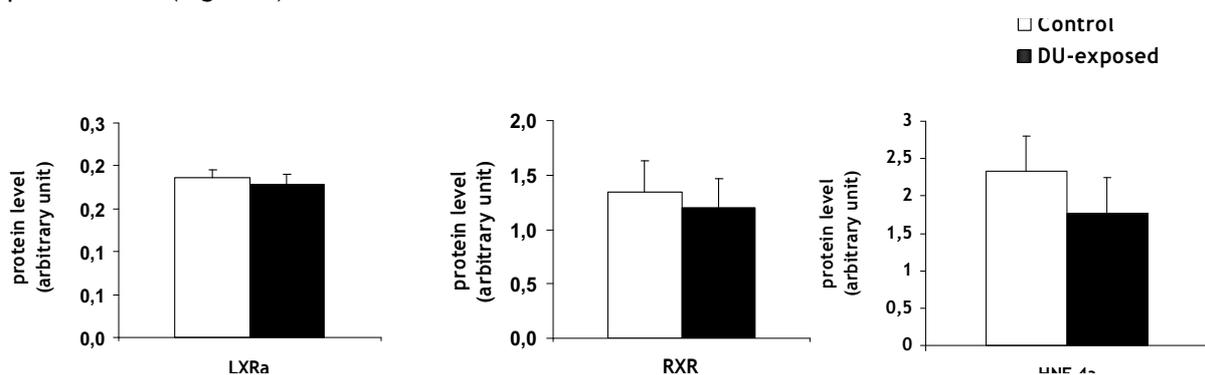


Figure 6: protein levels of LXR α , RXR and HNF 4 α in the liver
Results are expressed as a ratio to GAPDH protein level. Data are expressed as means \pm SEM (n=7).

In the brain, an increase in PPAR γ and SREBP 2 mRNA levels was observed in the DU-exposed group compared to the control group (Figure 5). The increase of SREBP 2 gene expression is in accordance with the increase in the mRNA level of HMGCoA R, which is one of its target genes. However, this needs to be confirmed at protein level since SREBP 2 is known to be strongly regulated at post-transcriptional level (Goldstein 2006, Brown 2009).

In conclusion, this present study establishes that a 3-month daily ingestion of a low dose of cholesterol in hypercholesterolemic apo E-deficient mice does not worsen the physiopathology of these animals in our experimental conditions. The gene expression of some actors of cholesterol metabolism in the liver and the brain of these mice is slightly modified, but this modulation has no repercussion at organ level, let alone at body level. A longer time of contamination may be of interest to extend the exposure until dementia appears in the animals: the effect of aging and the disturbance of cholesterol homeostasis in the brain will then be two factors influencing the sensitivity of cholesterol metabolism to DU contamination.

Acknowledgements

This work was part of the ENVIRHOM research program supported by the Institute for Radiological protection and Nuclear Safety (IRSN). The authors thank Pr. JM Lobaccaro for the generous gift of the anti-LXR α antibody, as well as Cédric Baudelin, Frédéric Voyer, and Thierry Loiseau for animal breeding, care and contamination.

References

- Brown, M.S. and Goldstein, J.L. 2009. Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL. *J Lipid Res* 50 Suppl, S15-27.
- Chiang, J.Y. 2004. Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *J Hepatol* 40, 539-51.
- Goldstein, J.L., DeBose-Boyd, R.A. and Brown, M.S. 2006. Protein sensors for membrane sterols. *Cell* 124, 35-46.
- Kim, J., Basak, J.M. and Holtzman, D.M. 2009. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron* 63, 287-303.
- Moghadasian, M.H., McManus, B.M., Nguyen, L.B., Shefer, S., Nadji, M., Godin, D.V., Green, T.J., Hill, J., Yang, Y., Scudamore, C.H. and Frohlich, J.J. 2001. Pathophysiology of apolipoprotein E deficiency in mice: relevance to apo E-related disorders in humans. *Faseb J* 15, 2623-30.
- Racine, R., Gueguen, Y., Gourmelon, P., Veysièrè, G. and Souidi, M. 2009. Modifications of the Expression of Genes Involved in Cerebral Cholesterol Metabolism in the Rat Following Chronic Ingestion of Depleted Uranium. *J Mol Neurosci* 38, 159-165.
- Souidi, M., Parquet, M., Dubrac, S., Audas, O., Becue, T. and Lutton, C. 2000. Assay of microsomal oxysterol 7 α -hydroxylase activity in the hamster liver by a sensitive method: in vitro modulation by oxysterols. *Biochim Biophys Acta* 1487, 74-81.
- Souidi, M., Parquet, M., Ferezou, J. and Lutton, C. 1999. Modulation of cholesterol 7 α -hydroxylase and sterol 27-hydroxylase activities by steroids and physiological conditions in hamster. *Life Sci* 64, 1585-93.

Résultats supplémentaires

Pour toutes les figures, les valeurs sont exprimées sous la forme moyenne +/- SEM.

*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

	Souris sauvages	souris apo E ^{-/-}
Profil lipidique		
Cholestérol (mM)	2,2 ± 0,0	17,2 ± 0,79 ***
HDL Cholestérol (mM)	2,02 ± 0,06	6,58 ± 0,43 ***
LDL Cholestérol (mM)	0,3 ± 0,0	13,1 ± 0,54 ***
Phospholipides (g/l)	2,1 ± 0,1	4,22 ± 0,18 ***
Triglycérides (mM)	1,04 ± 0,08	1,20 ± 0,15
Marqueurs hépatiques		
ALT (U/l)	30,8 ± 1,8	38,6 ± 4,7
AST (U/l)	90,27 ± 13,86	125 ± 25
Bilirubine totale (µM)	2,7 ± 0,4	11,7 ± 0,73 ***
Marqueurs rénaux		
Créatinine (µM)	37,46 ± 1,11	29,2 ± 3,4
Urée (mM)	8,8 ± 0,4	8,70 ± 0,31

Tableau 6 : Effet de la mutation homozygote *ApoE^{tm1Unc}* sur le profil plasmatique à 4,5 mois

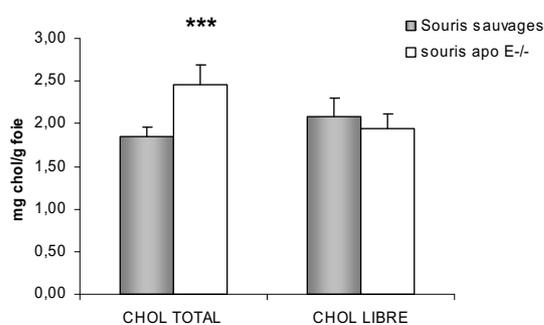


Figure 38 : Dosage du cholestérol dans le foie des souris sauvages et apo E^{-/-} à l'issue de la contamination

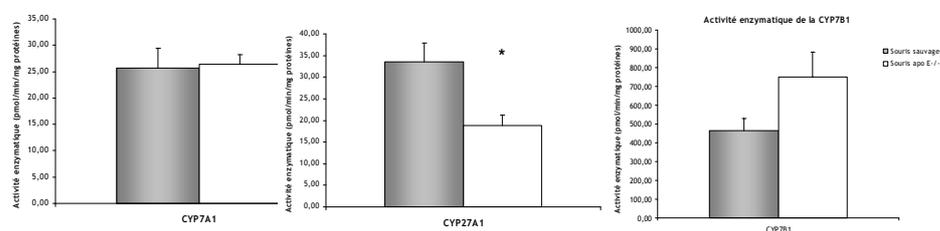


Figure 39 : Dosage des activités enzymatiques de la CYP7A1, de la CYP27A1 et de la CYP7B1 dans le foie des souris sauvages et apo E^{-/-} à l'issue de la contamination

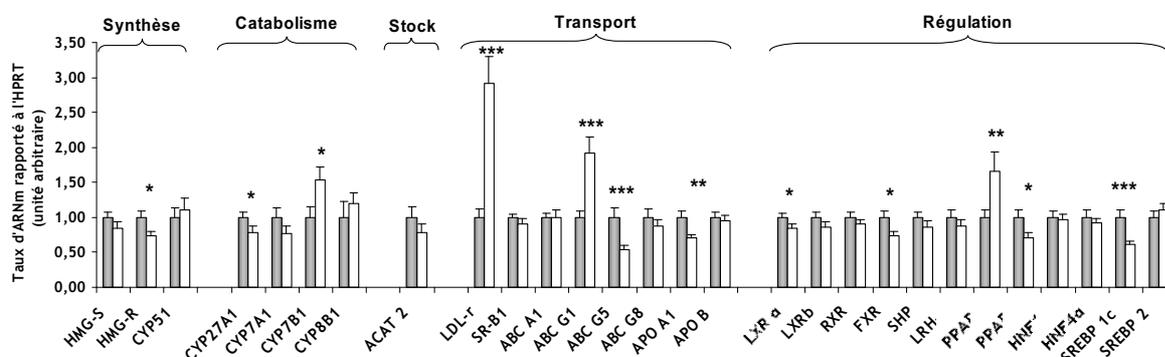


Figure 40 : Effet de la mutation homozygote *ApoE^{tm1Unc}* sur le profil d'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol dans le foie des souris sauvages et apo E^{-/-} à l'issue de la contamination

Résultats supplémentaires

❖ Dosage de l'UA dans le foie

Comme pour l'étude sur le modèle adulte, le dosage d'UA dans le foie des souris apo E^{-/-} (Figure 41) ne peut pas être utilisé de façon quantitative.

Concentration hépatique d'UA (ng/g foie)

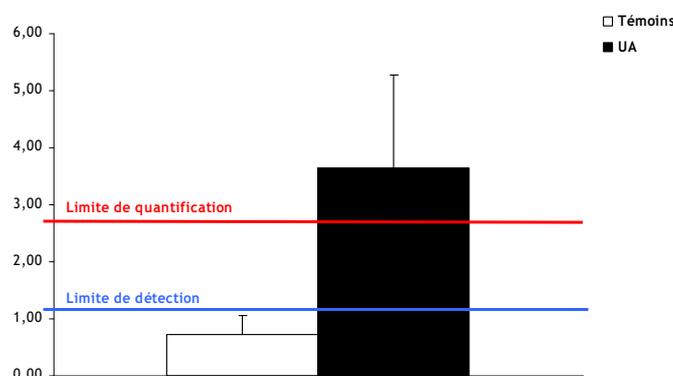


Figure 41 : Dosage de l'UA dans le foie des souris apo E^{-/-} à l'issue de la contamination

Limite de détection = valeur du bruit de fond x 3 ± écart-type, limite de quantification = valeur du bruit de fond x 10 ± écart-type

Cependant, on peut conclure à une accumulation d'uranium dans le foie des souris contaminées puisque toutes les valeurs du groupe UA sont comprises entre la limite de détection et la limite de quantification ou supérieures à celle-ci, tandis que toutes les valeurs du groupe témoins sont inférieures à la limite de détection.

❖ Caractérisation du phénotype hépatique et plasmatique des souris apo E^{-/-} non-contaminées par rapport à des souris sauvages

En vue de vérifier le caractère pathologique des souris apo E^{-/-} non contaminées et de définir les modifications tissulaires dues au phénotype, un groupe supplémentaire de souris sauvages (souche C57BL/6J) non-contaminées a été hébergé et sacrifié en même temps que les souris apo E déficientes. Les résultats de l'analyse du métabolisme du cholestérol hépatique effectuée sur ses souris sont présentés ci-dessous.

Le profil lipidique du sang est totalement perturbé par la mutation (Tableau 6). La cholestérolémie est multipliée par 8, le ratio LDL-HDL est inversé et largement défavorable chez les souris mutées. La bilirubine totale est augmentée, ce qui semble indiquer une atteinte de la fonction hépatique. En outre, les souris mutées présentent une augmentation de la concentration en cholestérol total de 25 % (Figure 38) et une diminution paradoxale de l'activité enzymatique de la CYP27A1 (Figure 39). En outre, de nombreux gènes impliqués dans la plupart des voies du métabolisme du cholestérol présentent une modification de leur expression (Figure 40).

Ainsi, nous pouvons conclure que les souris apo E^{-/-} présentent bien un phénotype d'hypercholestérolémie associé à une perturbation du métabolisme du cholestérol hépatique à l'âge de 4,5 mois.

Résultats et Conclusion

Cette troisième étude a permis d'évaluer l'effet d'une contamination interne chronique à de faibles doses d'UA sur le métabolisme hépatique et cérébral du cholestérol dans un modèle pathologique : les souris apo E- déficientes hypercholestérolémiques.

Le phénotype pathologique des souris mutées a été confirmé par l'étude d'une souche sauvage au niveau sanguin et hépatique. Les souris apo E^{-/-} présentent notamment une cholestérolémie huit fois supérieure à celle des souris sauvages à l'âge de 4,5 mois, qui correspond à la fin du temps de contamination.

L'effet de l'UA est beaucoup moins marqué que celui de la mutation. Ainsi, les souris mutées et exposées à l'UA ne présentent pas de différence significative avec les souris mutées non-contaminées en ce qui concerne le profil plasmatique, le taux de cholestérol tissulaire dans le foie et le cerveau et les activités des principales enzymes du catabolisme hépatique du cholestérol. La seule influence de l'UA s'exerce donc de nouveau sur l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol dans le foie et le cerveau. En outre, ces gènes sont peu nombreux et différent entre le foie (CYP7B1, LXR α , RXR et HNF 4 α) et le cerveau (HMG-CoA R, SREBP 2, PPAR γ). Ces modulations d'expression génique sont de faible amplitude et ne mettent pas en évidence d'activation d'une voie en particulier (pas de corrélation récepteur nucléaire-gène-cible). Par ailleurs, dans le foie, elles ne sont pas répercutées au niveau protéique.

En conclusion, cette dernière étude indique qu'une ingestion quotidienne d'UA à une concentration de 20 mg/L pendant 3 mois ne provoque pas d'aggravation de la pathologie chez des souris apo E-déficientes développant une hypercholestérolémie. L'influence de l'UA s'exerce au niveau de l'expression génique de quelques acteurs du métabolisme du cholestérol dans le foie et le cerveau. Celle-ci affecte des récepteurs nucléaires et des facteurs de transcription, sans modification de leurs gènes-cibles.

Cette étude sur un modèle pathologique clôt notre chapitre sur les effets de l'UA sur le métabolisme du cholestérol. Dans nos différentes conditions expérimentales, l'UA induit principalement des effets d'ordre moléculaire sans provoquer de modification de l'homéostasie du cholestérol ni d'aggravation d'une pathologie lipidique chez les modèles étudiés.

CHAPITRE 2

Effets du césium-137 sur le
métabolisme du cholestérol

ARTICLE 4

MOLECULAR MODIFICATIONS OF CHOLESTEROL METABOLISM IN THE LIVER AND THE BRAIN AFTER CHRONIC CONTAMINATION WITH CESIUM-137

R. Racine, L. Grandcolas, S. Grison, P. Gourmelon, Y. Guéguen, G. Veyssière, M. Souidi

Food and Chemical Toxicology (2009) 47(7):1642-7

Contexte scientifique

Ce deuxième chapitre s'inscrit dans le volet "sociétal" du programme ENVIRHOM de l'IRSN, dédié aux situations avérées de contamination chronique par les radionucléides. L'exemple le plus médiatisé et qui génère le plus de travaux scientifiques est sans comparaison l'accident de Tchernobyl.

Suite à l'explosion du réacteur nucléaire de la centrale de Tchernobyl en 1986, de nombreux radionucléides se sont dispersés en grandes quantités sur de vastes territoires, où ils se sont ensuite déposés principalement dans les sols, les eaux et les feuillages. Parmi le mélange de radionucléides disséminés, certains possèdent une période de décroissance de plusieurs dizaines d'années, ce qui provoque une contamination à long terme des territoires où ils se sont déposés. C'est notamment le cas du ¹³⁷Cs, qui a une demi-vie de 30 ans. Par la quantité de radioactivité qu'il génère, le ¹³⁷Cs est actuellement la principale source de radiations ionisantes dans les territoires contaminés suite à l'accident de Tchernobyl. Il est connu que le ¹³⁷Cs est transféré du sol aux plantes et des plantes aux animaux. Ainsi, la contamination de l'environnement entraîne celle des aliments et donc des êtres humains qui les consomment.

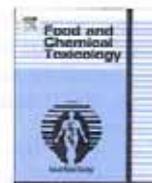
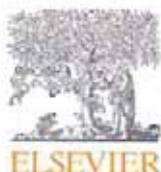
Si les effets du ¹³⁷Cs après exposition externe aiguë à forte dose sont largement étudiés, les conséquences d'une exposition chronique à des doses environnementales sont peu décrites. Des travaux précédents sur le métabolisme de la vitamine D et des hormones stéroïdiennes ont montré que ces deux métabolismes étaient affectés par ce type de contamination. En particulier, une altération des taux plasmatiques de la vitamine D, du 17β-œstradiol et de la corticostérone est observée après contamination ([Grignard 2008b](#); [Tissandie 2006a](#)). Par ailleurs, les CYPs et les récepteurs nucléaires sont également modulés suite à une contamination interne chronique. Ainsi, le métabolisme du cholestérol apparaît comme une cible potentielle de ce type de contamination. En outre, la vitamine D et les hormones stéroïdiennes sont des dérivés du cholestérol et les perturbations de leurs métabolismes sont peut-être liées à une modification affectant le métabolisme du cholestérol. Par ailleurs, les études menées sur les liquidateurs rapportent une augmentation des hépatites persistantes et des cholécystites chroniques ([Komarenko 1999](#); [Shkala 1998](#); [Tribat 1999](#)) ; , des maladies hépatiques impliquant le métabolisme du cholestérol et des acides biliaires.

Une étude préliminaire à ce travail de thèse a mis en évidence une modulation de l'expression génique de plusieurs acteurs du métabolisme du cholestérol (LDL-r : x2, Apo B : +34 %, LXRα : +20 %, ABCG5 -40 %) ainsi qu'une augmentation de l'activité d'une enzyme catabolisant le cholestérol (CYP27A1 +34 %) après 3 mois de contamination interne au ¹³⁷Cs chez le rat adulte ([Souidi 2006](#)). L'évolution de l'impact du ¹³⁷Cs en cas de contamination plus longue reste à déterminer.

Suite à ces données, l'article présenté ci-après est consacré à l'évaluation des conséquences d'une ingestion quotidienne d'une concentration post-accidentelle de ^{137}Cs pendant 9 mois sur le métabolisme hépatique et cérébral du cholestérol chez le rat.

Pour cela, des rats adultes (3 mois) ont été exposés à du chlorure de ^{137}Cs dans leur eau de boisson pendant 9 mois. La concentration de ^{137}Cs était de 6 500 Bq/l. Rapportée au volume d'eau bue par un rat chaque jour, cette valeur correspond l'estimation haute de la quantité de ^{137}Cs présent dans la ration alimentaire moyenne de personnes vivant sur les territoires contaminés (Coulon 1994).

A l'issue de la contamination, l'impact du ^{137}Cs sur le métabolisme du cholestérol a été évalué au niveau systémique, hépatique et cérébral selon les analyses utilisées dans le chapitre 1.



Molecular modifications of cholesterol metabolism in the liver and the brain after chronic contamination with cesium 137

R. Racine^a, L. Grandcolas^a, S. Grison^a, P. Gourmelon^a, Y. Guéguen^a, G. Veyssière^b, M. Souidi^{a,*}

^aInstitute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), Radiological Protection and Human Health Division, Radiobiology and Epidemiology Department, Laboratory of Experimental Toxicology, BP No. 17, F-92262 Fontenay-aux-Roses Cedex, France

^bClermont Université, UMR CNRS 6247 and Centre de Recherche en Nutrition Humaine, 24, Avenue des Landais, F-63177 Aubière Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 December 2008

Accepted 15 April 2009

Keywords:

Cholesterol

Cesium 137

Chernobyl

Liver

Brain

Chronic contamination

ABSTRACT

Twenty years after Chernobyl accident, the daily ingestion of foodstuff grown on contaminated grounds remains the main source for internal exposure to ionizing radiations, and primarily to cesium 137 (^{137}Cs). Though the effects of a long-term internal contamination with radionuclides are poorly documented, several non-cancerous pathologies have been described in this population. However, lipid metabolism was never investigated after chronic internal contamination although disturbances were observed in externally-exposed people. In this regard, we assessed the effects of a chronic ingestion of ^{137}Cs on hepatic and cerebral cholesterol metabolism. To mimic a chronically-exposed population, rats were given ^{137}Cs -supplemented water at a post-accidental dose (150 Bq/rat/day) during 9 months. The plasma profile, and brain and liver cholesterol concentrations were unchanged. A decrease of ACAT 2, Apo E, and LXR α mRNA levels was recorded in the liver. In the brain, a decrease of CYP27A1 and ACAT 1 gene expression was observed. These results clearly show that cholesterol metabolism is not disrupted by a chronic ingestion of ^{137}Cs , although several molecular alterations are observed. This work would be interestingly completed by studying the influence of ^{137}Cs in models likely more sensitive to contaminants, such as the fetus or individuals susceptible to a lipidic disease.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The accident of the Chernobyl nuclear power plant on April 26th 1986 led to a major dispersion of radionuclides in the environment. Among them, cesium 137 (^{137}Cs) is the only one combining a high level of released activity (approximately 85×10^{15} Bq) and a long half-life (30 years) (IAEA, 2006). This combination makes it the prime source for a long-term exposure to ionizing radiations. Most people evacuated immediately after the explosion have soon settled back in contaminated lands, and have therefore

been exposed to chronic internal radiations through food intake (Handl et al., 2003; Hoshi et al., 2000).

Twenty years after the accident, the health experts of the United Nations Chernobyl Forum, who assess Chernobyl's long-term sanitary consequences, deplore the lack of scientific knowledge concerning the health effects of a chronic internal contamination of a low dose of ionizing radiations (WHO, 2006). Indeed, the early studies addressing Chernobyl's long-term sanitary outcomes (Rozhinskaia et al., 1994; Zhavoronkova et al., 1996) were conducted on liquidators (cleanup workers on the radioactive site), who were submitted first of all to a very strong acute irradiation which biases the conclusions about chronic contamination alone. Recently, studies concerning people exposed to a chronic contamination alone have been published. Most of them mention an increase of cancers incidence (Likhtarov et al., 2005; Romanenko et al., 2003), but a number of studies focused on non-cancerous pathologies or health perturbations: birth defects (Lazjuk et al., 1997), disturbances of the immune system (DeVita et al., 2000) and an increase of cataracts (Sumner, 2007) affecting children, and cognitive decline linked with the received dose of ^{137}Cs (Gamache et al., 2005) have been described. Surprisingly, lipid metabolism was never considered although it is a crucial biological system. In order to fill this gap, an experimental study mimicking the exposure to ^{137}Cs of

Abbreviations: ^{137}Cs , Cesium 137; ABC, adenosine triphosphate binding cassette transporter; ACAT, acylCoenzymeA: cholesterol acyltransferase; ALT, alanine aminotransferase; Apo, apolipoprotein; AST, aspartate aminotransferase; CYP, cytochrome P450; FXR, farnesoid-X-receptor; GGT, gamma-glutamyltranspeptidase; HDL, high-density lipoprotein; HMGCoA R/S, 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase/Synthase; HPRT, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; HNF, hepatocyte nuclear factor; LDL, low-density lipoprotein; LDLr, low-density lipoprotein receptor; LRH-1, liver receptor homolog-1; LXR, liver-X-receptor; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; RXR, retinoid-X-receptor; SHP, small heterodimer partner; SR-B1, scavenger receptor class B type 1; SREBP, sterol regulatory element binding protein.

* Corresponding author. Tel.: +33 1 58 35 91 94; fax: +33 1 58 35 84 67.

E-mail address: maamar.souidi@irsn.fr (M. Souidi).

people living in contaminated territories was conducted on rats. The focus was set on cholesterol metabolism, for its impairments are linked to various hepatic (Kosters et al., 2003; O'Leary and Pratt, 2007) and neurological diseases (Vaya and Schipper, 2007; Vance, 2006).

Dietary ^{137}Cs is known to be efficiently absorbed (over 90%) in rats (Moore and Comar, 1962). Moreover, modifications on the metabolism of cholesterol-derived steroid hormones (Grignard et al., 2008) and vitamin D (Tissandie et al., 2006a) have been described after 9 and 3 months of ^{137}Cs ingestion, respectively. Concerning cholesterol metabolism itself, a first study was conducted with a sub-chronic internal contamination (Souidi et al., 2006), revealing subtle modulations by ^{137}Cs ingestion, notably at gene expression level.

To go further, the present work assesses the effects of a chronic (9 months, ca. 20 years of human lifetime) dietary contamination with ^{137}Cs on hepatic and cerebral cholesterol metabolism. Indeed, the liver is the only organ able to eliminate the excess cholesterol of the body. As for the brain, the cholesterol pool is independent from the rest of the body because the blood–brain barrier prevents any exchange of native cholesterol with the bloodstream. In both organs, synthesis, storage, catabolism, transport, and regulation pathways are analyzed.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male Sprague-Dawley rats, aged 12 weeks, weighing 274 ± 2 g, were obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). They were housed in pairs upon arrival and allowed to recover from transportation for 2 weeks before the first day of contamination. During the experiment, they were maintained in a 12 h light/12 h dark cycle (regular cycle) at 21 ± 2 °C and $50 \pm 10\%$ humidity, with access to a standard pellet rodent diet and water ad libitum. For the experiment, the rats were divided into two groups ($n = 10$), control and ^{137}Cs -exposed respectively.

All experimental procedures were approved by the Animal Care Committee of the Institute of Radioprotection and Nuclear Safety, and complied with French regulation for animal experimentation (Ministry of Agriculture Act No. 87–848, October 19th 1987, modified May 20th 2001).

2.2. Contamination procedure and organs removal

The contamination was carried out with $^{137}\text{cesium chloride}$ ($^{137}\text{CsCl}$, CAS number 20334-19-4) obtained from CERCA (Pierrelatte, France). The rats of the experimental group were exposed to $^{137}\text{CsCl}$ in their drinking water at a concentration of 6500 Bq/l (ca. 150 Bq/rat/day) for 9 months. This concentration is based on the top estimate of the ^{137}Cs dietary intake of the surrounding populations in the years following the Chernobyl accident (Coulon, 1994). The rats of the control group were given uncontaminated mineral water. The food and water intake of both groups was monitored on a weekly basis during the entire contamination time.

After 9 months, the rats were anesthetized by inhalation of 5% isoflurane (Abbot France, Rungis, France) and euthanized by intracardiac puncture to collect blood. Cerebral cortex and liver were immediately dissected on ice, deep-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C.

2.3. Biochemical parameters assay

Biochemical parameters were measured in plasma samples with an automated spectrophotometric system (Konelab 20 from Thermo Electron Corporation, Cergy-Pontoise, France), using the manufacturer's biological chemistry reagents. The parameters measured in plasma included total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol, low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol, triglycerides, phospholipids, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), albumin, total bilirubin and gamma-glutamyltranspeptidase (GGT).

2.4. Plasma oxysterols assay

The assay of plasma 7 α -hydroxycholesterol and 24(S)-hydroxycholesterol concentrations was performed according to Gueguen et al. (2006) on 0.5 ml of plasma samples. The oxysterols were separated and quantified by high performance liquid chromatography (Waters Symmetry, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). 19-Hydroxy-3-acetate cholesterol (Sigma Diagnostics, L'Isle d'Abeau Chesnes, France) was added to each sample as an internal standard.

2.5. Cholesterol assay in the liver and the brain

Frozen samples (about 250 mg for liver and 30 mg for brain) were thawed and homogenized in 5 ml isopropanol using a potter with a Teflon pestle (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). After incubation at 60 °C for 1 h 30 min and centrifugation at 3220g for 10 min, the supernatant was collected and the pellet was re-extracted in 5 ml isopropanol (same procedure but with a 1 h incubation). The supernatant of this second extraction was added to the first one and the total volume was adjusted to the precise weight of 10 ml isopropanol for further calculations. Total and free cholesterol were then assayed using the Amplex Red Cholesterol Assay kit (Invitrogen-Life technologies, Cergy-Pontoise, France) after appropriately diluting the samples. Esterified cholesterol was calculated as the difference between total and free cholesterol values.

2.6. Real-time PCR

Total RNA was extracted from 25 mg of liver samples using the RNeasy total RNA isolation kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and from 30 mg brain samples using the RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), according to the manufacturer's respective recommendations.

Reverse transcription was performed in Sprint PowerScript PrePrimed 96 Plates (BD Biosciences Clontech, Erembodegem, Belgium) containing 1 μg of reverse transcriptase. The cDNA synthesis was conducted at 42 °C for 1 h and was ended by the inactivation of the reverse transcriptase after 10 min at 70 °C.

Real-time PCR was then carried out on 0.4 ng/ μl cDNA and 0.3 pmol/ μl primers for each reaction, using the SYBR[®] Green technology (Power SYBR[®] Green PCR Master Mix, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. The plates were analyzed on an AbiPrism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) according to the following run: incubation 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C for activation of the polymerase and 40 cycles of 15 s at 95 °C for denaturation and 1 min at 60 °C for annealing-extension. Results were normalized to hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) and fold-inductions calculated relative to the control group. Sequences for the forward and reverse primers are listed in Table 1.

2.7. Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. Unpaired Student's *t*-test was routinely performed for statistical analysis of the data, but was replaced by Mann-Whitney Rank Sum Test when the equal variance test failed (determined by the SigmaStat software). Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. General health status and plasma biochemical parameters

Food and drink intake was not affected by chronic ingestion of ^{137}Cs (data not shown), and no difference was recorded in body weight (635.5 ± 16.5 g for control rats vs. 617.2 ± 15.5 g for contaminated rats) or in liver weight (22.6 ± 0.8 g vs. 20.8 ± 0.7 g). Macroscopic appearance of main organs (liver, lung, heart, intestines, kidney, brain and testis) from ^{137}Cs -exposed rats did not differ from those of control rats.

In the plasma, the lipid profile was unchanged (total cholesterol = 2.42 ± 0.17 mM for control rats vs. 2.42 ± 0.36 mM for ^{137}Cs -exposed rats, triglycerides = 2.23 ± 0.53 mM vs. 1.73 ± 0.18 mM, phospholipids = 1.76 ± 0.15 g/l vs. 1.91 ± 0.19 g/l). Blood concentrations of markers of liver integrity (ALT = 34.8 ± 5.4 U/l vs. 41.9 ± 5.2 U/l and AST = 71.0 ± 10.8 U/l vs. 71.9 ± 6.8 U/l) and liver function (GGT = 4.82 ± 0.57 U/l vs. 4.84 ± 0.53 U/l) and total bilirubin = 3.55 ± 0.18 μM vs. 5.78 ± 1.84 μM) were also similar in control and ^{137}Cs -exposed rats. Finally, the plasmatic level of liver-specific 7 α -hydroxycholesterol was unchanged between the two groups (117 ± 40 ng/ml vs. 109 ± 34 ng/ml), whereas the level of brain-specific 24(S)-hydroxycholesterol was under detection limit.

3.2. Gene expression study

3.2.1. Cholesterol synthesis, esterification, and catabolism

The expression of the main genes involved in cholesterol synthesis (3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase (hmg-

Table 1
Oligonucleotide sequences of primers used in real-time quantitative PCR. The primers sequences are given in the 5'-3' orientation. The primers without reference have been designed for this study by the authors with the PrimerExpress software.

Gene	Accession No.	Forward primer	Reverse primer	Size (bp)	Reference
hprt	NM_012583	gcgagggtctcttaataca	ggaagggtccccagaacaa	109	Ropenga et al. (2004)
cyp27a1	NM_178847	ggaagggtccccagaacaa	gcgagggtctcttaataca	71	Tissandie et al. (2006b)
cyp7a1	NM_012942	ccaagtcaagtgccccctcta	gactctcagcgcacaagtg	150	This study
cyp8b1	AB009686	gtacacatggacccccgacatc	gggtgccatcagggttgag	76	Macias et al. (2005)
cyp7b1	NM_019138	tcagatgcaaaagacgggcaga	ttcatgcccccttagtatttttcag	70	Racine et al. (2008)
cyp46a1	NM_001108723	ctgcatcgcccaacagttt	caatggttagcagcgtagcc	130	Racine et al. (2008)
cyp51	NM_012941	ctggtcatcctgggtcctaaga	cagaggccatgaaggatgct	81	Racine et al. (2008)
hmgcoa r	NM_173094	ggcgggtcctgcaagtg	gcaggtgagcgggtgaga	60	Hoshi et al. (2000)
hmgcoa s	X55286	zglzgtggyaccaactctt	caegcccttgaacacta	65	Racine et al. (2008)
acat 1	NM_031118	ttcgtctttgcttttttca	calctctgcccacaagcgtaac	70	Racine et al. (2008)
acat 2	NM_153728	gccccagcgcacatttt	gtgcagtgtaagccttgactt	80	This study
ldlr	NM_175762	cagccgatgcattcctgact	agttcatccgagcattttcac	69	Racine et al. (2008)
sr-b1	NM_031541	gttggtaaccatgggcca	cgtagccccacaggatctca	65	Racine et al. (2008)
abc a1	NM_178095	atctcatagatggaagaatgtgaagct	cgtaacaattgtataaccatctccaaa	132	Racine et al. (2008)
abc a2	NM_024396	ctctgcatcagtcgctttg	caacaagtgtctcttccactaca	127	Racine et al. (2008)
abc g1	NM_053502	aggtctcagcctcttaaaagtctctc	ttctctgaaagtgaatgaaattatcg	85	Racine et al. (2008)
abc g5	NM_053754	cgcaggaaaccgattgtaa	tgctcgaagtgtggaagagct	67	Racine et al. (2008)
apo a1	NM_012738	aatgggacaggggtgaagga	tgaaccagagtgctccagtt	146	This study
apo e	NM_138828	tgggtgcagacgctttctg	ttgtatgcttttctcagtcattagt	110	Racine et al. (2008)
lxr α	NM_031627	agcaacagtgtaaacagcgcct	gtgcaattggcccaggc	63	Tissandie et al. (2007)
lxr β	NM_031626	cttccccacaagttc	ctctctgtgga	151	Racine et al. (2008)
rxr α	NM_012805	cgcaaaagcctgacctacacc	tcctctgcacggcttccc	134	Souidi et al. (2005)
fxr	NM_021745	tgacaagaagccgcgaat	tgtaatgtaccagagccccc	99	Souidi et al. (2006)
shp	NM_057133	ccttgagcagcctctgt	aaactgatgcaaacaggagg	64	Fiorucci et al. (2005)
lrh-1	NM_021742	gcactgcaccaggatcag	cccgtgttttctcctcaagtt	58	Hoshi et al. (2000)
ppar α	NM_013196	tcttctccaaaactcttca	gcacgagctgcatgctc	69	Tissandie et al. (2006b)
ppar γ	NM_013124	tca tga cca ggg agt tcc tca	tcattcaattccagtcattgaaact	103	Tissandie et al. (2006b)
hnf 1α	NM_012669	acactgtgtacgtccgcaag	ctgagggaattgctgagc	51	Su and Waxman (2004)
hnf 4α	NM_022180	tggcaaacactacggagcct	ctgaagaatccttgcagcc	51	Su and Waxman (2004)
srebp 1c	AF286469	gttgccaatggactactagtgt	ttgcgatctccagaagtgtac	111	Racine et al. (2008)
srebp 2	XM_216989	agctggcaaatcagaaaaacaag	cgatctcaagtcacatcactgt	58	Hoshi et al. (2000)

coa r) and 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Synthase (hmgcoa s)), esterification (acylCoenzymeA: cholesterol acyltransferase (acat) 1 and acat 2 in the brain and the liver respectively) and catabolism (cyp27a1 and cyp7a1 in the liver; cyp46a1 and cyp27a1 in the brain) was assessed after 9 months of ¹³⁷Cs daily ingestion, and results are given in Fig. 1.

In the liver, the gene expression of enzymes involved in cholesterol synthesis and catabolism was unchanged in ¹³⁷Cs-exposed rats compared to control rats. ACAT 2, the major enzyme for cholesterol esterification in the liver, displayed a decrease of its mRNA level (-44%, p ≤ 0.05) in the contaminated group. In the brain, the gene expression of CYP27A1 and ACAT 1 decreased (-41%, p ≤ 0.05 and -47%, p ≤ 0.05 respectively) in ¹³⁷Cs-exposed rats.

Gene expression of less important enzymes like CYP51 (synthesis), CYP7B1, and CYP8B1 (catabolism) were also analyzed and did not vary after ¹³⁷Cs chronic ingestion (data not shown).

3.2.2. Cholesterol transport

Fig. 2 displays the expression of genes coding for key proteins of hepatic and cerebral cholesterol transport. These genes include apolipoprotein (apo) b and apo e, lipoprotein receptors (LDL receptor (ldlr) and scavenger-receptor class B type 1 (sr-b1)), and adenosine triphosphate binding cassette (abc) transporters a1 and g5 (abc a1 and abc g5).

Only one effect was observed in the liver: the decrease of APO E gene expression (-38%, p ≤ 0.05) in ¹³⁷Cs-exposed rats. In the brain, none of the studied genes showed any significant difference of expression between contaminated and control rats.

In the liver, mRNA level of APO A1 and ABC G1 were also assessed, as well as that of ABC A2 and ABC G1 in the brain. Gene expression of these variables was not different after ¹³⁷Cs chronic ingestion (data not shown).

3.2.3. Transcriptional regulation

Gene expression of the main nuclear receptors regulating cholesterol metabolism in the liver and in the brain was assessed. Expression of retinoid-X-receptor (rxr), peroxisome proliferator-activated receptor (ppar) <alpha>, ppar <gamma>, and sterol regulatory element binding protein (srebp) 2 was assessed in both organs, as well as that of liver-X-receptor (lxr) <alpha> and farnesoid-X-receptor (fxr) in the liver and that of lxr <beta> in the brain. The results are reported in Fig. 3. The hepatic gene expression of LXR <alpha> decreased (-27%, p ≤ 0.05) and that of RXR increased (+37%, p ≤ 0.05) on the contaminated rats. In the brain, every studied transcription factor had a similar gene expression level in the experimental and control groups.

Additional assays included gene expression of hepatocyte nuclear factor (HNF) 1 <alpha>, HNF 4 <alpha>, and SREBP 1c in both organs, and of LXR <beta>, small heterodimer partner (SHP), and liver receptor homolog-1 (LRH-1) in the liver. The mRNA levels of these nuclear receptors were similar in ¹³⁷Cs-exposed and in control rats (data not shown).

3.3. Tissue cholesterol assay

In the brain as in the liver, the levels of total cholesterol and free cholesterol were measured, and esterified cholesterol was calculated as their difference. These values are reported in Fig. 4. The total cholesterol level was similar between ¹³⁷Cs-exposed and control rats in both organs. Moreover, there was no significant difference in the ratio of free vs. esterified cholesterol after ¹³⁷Cs contamination, whichever the considered organ (data not shown).

4. Discussion

The effects of a dietary intake of ¹³⁷Cs alone over a long stretch of time are still unclear. The present paper assesses the effects on

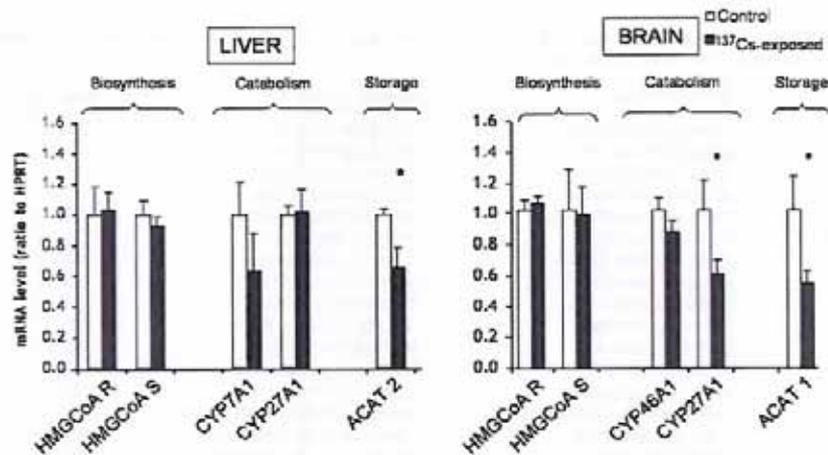


Fig. 1. mRNA levels of enzymes involved in cholesterol biosynthesis, catabolism and storage. Results are expressed as a ratio to HPRT mRNA level. The levels of non-contaminated control rats were arbitrarily set at 1. Data are expressed as means ± SEM (n = 8), with *p < 0.05 significantly different from control.

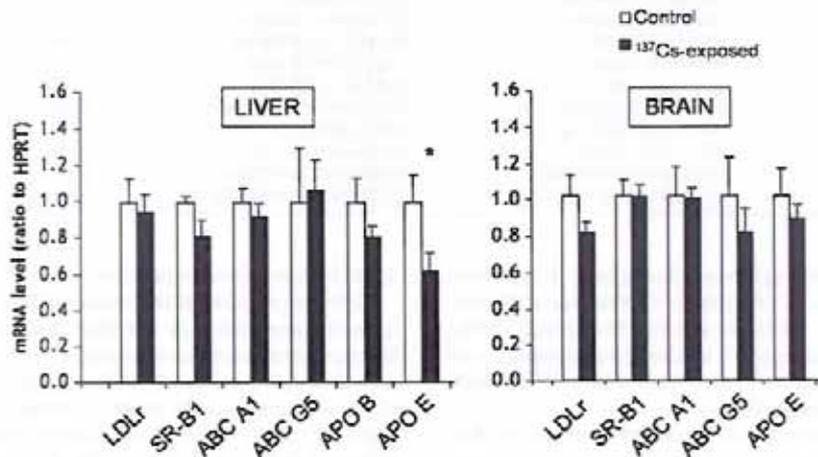


Fig. 2. Gene expression of transporters and membrane receptors involved in cholesterol transport. Results are expressed as a ratio to HPRT mRNA level. The levels of non-contaminated control rats were arbitrarily set at 1. Data are expressed as means ± SEM (n = 8), with *p < 0.05 significantly different from control.

cholesterol metabolism of a daily ingestion of ¹³⁷Cs for 9 months in adult rats. In these conditions, no modification of the general health status was noted. This was also the case after a 3-month contamination, as reported by Souidi et al. (2006). This first-sight impression was confirmed by the normal values of biochemical parameters in the plasma (lipid profile, markers of hepatic integrity, and hepatic and renal functions). These observations indicate a normal physiologic state at body level. To go beyond this general good health status and uncover potential effects of ¹³⁷Cs contamination, experiments were also conducted at tissue level, in the liver and in the brain.

The most striking effect concerned the storage of cholesterol as esters. The main storage enzyme of each tissue displayed a decrease of its gene expression: respectively ACAT 1 in the brain and ACAT 2 in the liver. It is somewhat puzzling that it should happen in both organs, because cholesterol metabolism is independent in the brain and in the liver. Moreover, the storage of cholesterol as esters is a quantitatively minor pathway compared to synthesis, transport or catabolism, especially in the brain. However, it may be suggested that the ACAT genes are sensitive to a chronic internal contamination with ¹³⁷Cs.

The other observed modifications include a decrease of mRNA levels of APO E (involved in cholesterol transport) in the liver and of CYP27A1 (a catabolic enzyme) in the brain. Both of them seem to be isolated effects since no other gene involved in hepatic transport or cerebral catabolism of cholesterol was modulated. Besides, CYP27A1 and APO E gene expression was unchanged after 3 months of ¹³⁷Cs contamination (Souidi et al., 2006). On the whole, the effects of ¹³⁷Cs chronic contamination on cholesterol transport, biosynthesis and catabolism are light: the main systems regulating cholesterol homeostasis are overall balanced, in accordance with the plasma results. This may be the sign of a normal physiological state, but it could also result from the compensation of a ¹³⁷Cs-induced deregulation. Therefore, the gene expression of the main transcription factors controlling this metabolism was studied.

In our experimental conditions, the gene expression of nuclear receptors LXR < alpha > and RXR was modified in the liver. LXR < alpha > gene expression was also modified in the testis after a 9-month contamination (Grignard et al., 2008) and in the liver after 3 months (Souidi et al., 2006). Thus, LXR < alpha > mRNA level seems to be repeatedly modulated by a chronic ¹³⁷Cs intake. This is

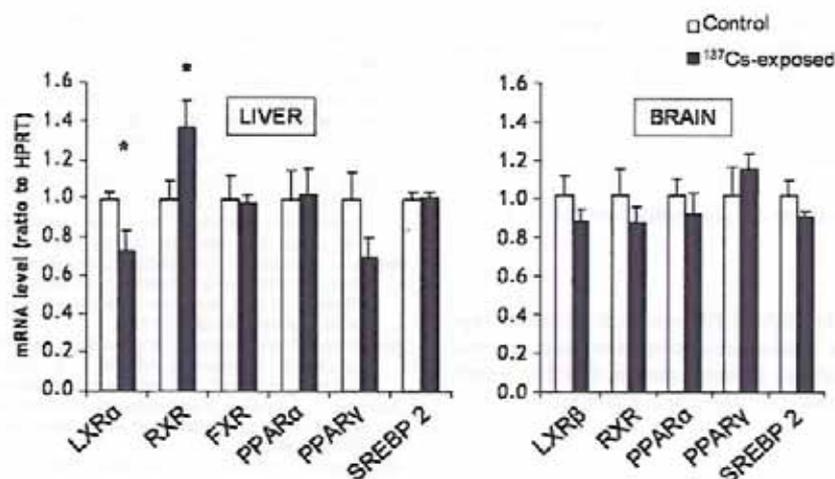


Fig. 3. mRNA levels of transcription factors regulating cholesterol metabolism. Results are expressed as a ratio to HPRT mRNA level. The levels of non-contaminated control rats were arbitrarily set at 1. Data are expressed as means \pm SEM ($n = 8$), with * $p < 0.05$ significantly different from control.

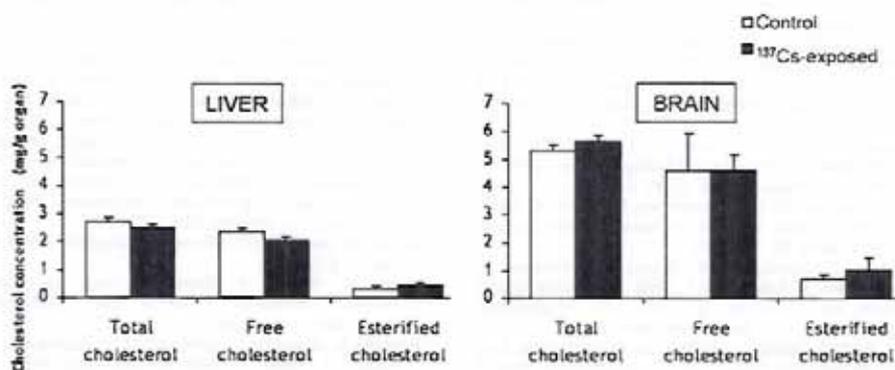


Fig. 4. Levels of total, free and esterified cholesterol in the liver and in the cerebral cortex. Data are expressed as means \pm SEM. In the liver, $n = 9$ –10, in the brain, $n = 5$ –7. Esterified cholesterol was calculated as the difference between total and free cholesterol.

interesting since LXR α is a key actor of cholesterol metabolism regulation, having many targets in the catabolic and transport pathways. Conversely, our result concerning RXR is peculiar since its expression was unchanged in the two previous studies. Besides, in the present work RXR is the only gene that displays an increase of its expression. It is possible that this modification of RXR is unrelated to cholesterol metabolism, given the broad spectrum of RXR's dimer partners (Mangelsdorf and Evans, 1995; Szanto et al., 2004).

To sum up this overview of cholesterol metabolism, there is globally no strong impact of chronic ingestion of ^{137}Cs at gene level in our experimental conditions. Molecular changes are observed but they seem unrelated to each other. The noteworthy fact is the decrease of ACAT gene expression both in the liver and in the brain. This overall normal state is confirmed by the assessment of hepatic and cerebral cholesterol: no difference is observed in the total cholesterol concentration or in the ratio between free and esterified cholesterol. This proves that the genic effects have no consequences at organ and body level.

These results are apparently not in accordance with papers studying wild rodents captured in contaminated areas. For example, Shishkina et al. (1992) described changes in the lipid composition of the liver and a depletion of liver lipids by antioxidants. A morphological and structural study of the liver of rats captured between 1986 and 1988 in the accident zone was conducted by Pin-

chuk et al. (1991). It showed "considerable non-specific changes in hepatocytes" as well as necrosis and cholangiomas. This presupposes serious damages at tissular and molecular levels. This major difference with our results can be explained by the fact that these rodents were captured in these areas a few months after the accident and were therefore exposed to intense external and internal radiations, possibly during the explosion itself or at any rate after the deposition of the radionuclides in the environment. Moreover, there was a mixture of many radioelements like iodine, cesium, strontium, etc., which all acted simultaneously. Thus, the present study is not contradictory to those cited since the experimental conditions do not reproduce exactly the exposure after the accident, but it does indicate the contribution of ^{137}Cs alone in the effects observed in the wild type rodents. Interestingly, it provides the information that chronic ingestion of an environmental concentration of ^{137}Cs is not deleterious to adult rats concerning cholesterol metabolism. Further studies are needed to confirm or invalidate this harmlessness of a chronic contamination by ^{137}Cs towards less robust organisms, like the fetus or rodents susceptible to pathology.

In conclusion, the effects of a daily ingestion of ^{137}Cs supplied through drinking water over 9 months on cholesterol metabolism in the brain and in the liver were assessed. Such a contamination induces light modifications at gene level but does not disturb the physiological state at organ or body level in rats. Thus, at 150 Bq/

rat/day, the intake of ¹³⁷Cs alone is not harmful to adult rats, even exposed for a very long time. Effects of such a contamination on more sensitive models such as *in utero* pups or rodents prone to pathology are yet to be assessed.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work was part of the ENVIRHOM research program supported by the Institute for Radiological protection and Nuclear Safety (IRSN). The authors thank Thierry Loiseau, Frédéric Voyer, and Cédric Baudelin for animal care and contamination.

References

Coulon, R., 1994. Caesium 137 and Chernobyl accident, IAEA international project. Publications du Comité de Radioprotection d'Electricité de France 8, 10–16.

DeVita, R., Olivieri, A., Spinelli, A., Grollino, M.G., Padovani, L., Tarroni, G., Cozza, R., Sorcini, M., Pennelli, P., Casparini, G., Crescenzi, G.S., Mauro, F., Carta, S., 2000. Health status and internal radiocontamination assessment in children exposed to the fallout of the Chernobyl accident. *Arch. Environ. Health* 55, 181–196.

Florucci, S., Clerici, C., Antonelli, E., Orlandi, S., Goodwin, B., Sadeghpour, B.M., Sabatino, G., Russo, G., Castellani, D., Willson, T.M., Pruzanski, M., Pellicciari, R., Morelli, A., 2005. Protective effects of 6-ethyl chenodeoxycholic acid, a farnesoid x receptor ligand, in estrogen-induced cholestasis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313, 604–612.

Gamache, G.L., Levinson, D.M., Reeves, D.L., Bidyuk, P.I., Brantley, K.K., 2005. Longitudinal neurocognitive assessments of Ukrainians exposed to ionizing radiation after the Chernobyl nuclear accident. *Arch. Clin. Neuropsychol.* 20, 81–93.

Grignard, E., Gueguen, Y., Grison, S., Lobaccaro, J.M., Gourmelon, P., Souidi, M., 2008. In vivo effects of chronic contamination with ¹³⁷cesium on testicular and adrenal steroidogenesis. *Arch. Toxicol.* 82, 583–589.

Gueguen, Y., Souidi, M., Baudelin, C., Dudoignon, N., Grison, S., Dublineau, L., Marquette, C., Voisin, P., Gourmelon, P., Aigueperse, J., 2006. Short-term hepatic effects of depleted uranium on xenobiotic and bile acid metabolizing cytochrome P450 enzymes in the rat. *Arch. Toxicol.* 80, 187–195.

Handl, J., Beltz, D., Botsch, W., Harb, S., Jakob, D., Michel, R., Romantschuk, L.D., 2003. Evaluation of radioactive exposure from ¹³⁷Cs in contaminated areas of Northern Ukraine. *Health Phys.* 84, 502–517.

Hoshi, M., Konstantinov, Y.O., Evdeeva, T.Y., Kovalev, A.I., Aksenov, A.S., Koulikova, N.V., Sato, H., Takatsui, T., Takada, J., Endo, S., Shibata, Y., Yamashita, S., 2000. Radiocesium in children residing in the western districts of the Bryansk Oblast from 1991–1996. *Health Phys.* 79, 182–186.

IAEA, 2006. Radioactive Contamination of the Environment in: Environmental consequences of the Chernobyl Accident and their remediation: twenty years of experience. Report of the Chernobyl Forum Expert Group "Environment", Radiological Assessment Reports Series, International Atomic Energy Agency (IAEA), Vienna, p. 19.

Kosters, A., Jirsa, M., Groen, A.K., 2003. Genetic background of cholesterol gallstone disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1637, 1–19.

Lazjuk, G.I., Nikolaev, D.L., Novikova, I.V., 1997. Changes in registered congenital anomalies in the Republic of Belarus after the Chernobyl accident. *Stem Cells* 15 (Suppl 2), 255–260.

Likhtarov, I., Kovgan, L., Vavilov, S., Chepurny, M., Bouville, A., Luckyanov, N., Jacob, P., Volleque, P., Voigt, G., 2005. Post-Chernobyl thyroid cancers in Ukraine. Report 1: estimation of thyroid doses. *Radiat. Res.* 163, 125–136.

Macias, R.I., Serrano, M.A., Monte, M.J., Jimenez, S., Hernandez, B., Marin, J.J., 2005. Long-term effect of treating pregnant rats with ursodeoxycholic acid on the

congenital impairment of bile secretion induced in the pups by maternal cholestasis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 312, 751–758.

Mangelsdorf, D.J., Evans, R.M., 1995. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841–850.

Moore, W.J., Comar, C.L., 1962. Absorption of caesium 137 from the gastro-intestinal tract of the rat. *Int. J. Radiat. Biol.* 5, 247–254.

O'Leary, J.G., Pratt, D.S., 2007. Cholestasis and cholestatic syndromes. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 23, 232–236.

Pinchuk, V.G., Nikitchenko, V.V., Gol'dshmid, B., Andrushchak, L.I., Serkiz Ia, L., 1991. The biological effects in animals related to the accident at the Chernobyl Atomic Electric Power Station. 4. The morphological and ultrastructural changes in the liver of rats. *Radiobiologia* 31, 648–653.

Racine, R., Gueguen, Y., Gourmelon, P., Veysiere, G., Souidi, M., 2008. Modifications of the expression of genes involved in cerebral cholesterol metabolism in the rat following chronic ingestion of depleted uranium. *J. Mol. Neurosci.*, in press. doi:10.1007/s12031-008-9145-8.

Romanenko, A., Morimura, K., Wambuchi, H., Wei, M., Zamarin, W., Vinnichenko, W., Kinoshita, A., Vozjanov, A., Fukushima, S., 2003. Urinary bladder lesions induced by persistent chronic low-dose ionizing radiation. *Cancer Sci.* 94, 328–333.

Ropenga, A., Chapel, A., Vandamme, M., Griffiths, N.M., 2004. Use of reference gene expression in rat distal colon after radiation exposure: a caveat. *Radiat. Res.* 161, 597–602.

Rozhinskaia, L., Marova, E.L., Rassokhin, B.M., Purtova, G.S., Bukhman, A.I., Oganov, V.S., Rakhmanov, A.S., Bakulin, A.V., Rodionova, S.S., Mishchenko, B.P., 1994. Osteopenic syndrome in liquidators of the after effects of the accident at the Chernobyl power plant. *Probl. Endokrinol. (Mosk)* 40, 24–27.

Shishkina, L.N., Materii, L.D., Kudiasheva, A.G., Zagorskaia, N.G., Taskaev, A.I., 1992. The structural-functional disorders in the liver of wild rodents from areas of the accident at the Chernobyl Atomic Electric Power Station. *Radiobiologia* 32, 19–29.

Souidi, M., Gueguen, Y., Linard, C., Dudoignon, N., Grison, S., Baudelin, C., Marquette, C., Gourmelon, P., Aigueperse, J., Dublineau, I., 2005. In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on CYP3A and associated nuclear receptors PXR and CAR in the rat. *Toxicology* 214, 113–122.

Souidi, M., Tissandie, E., Grandcolas, L., Grison, S., Paquet, F., Voisin, P., Aigueperse, J., Gourmelon, P., Gueguen, Y., 2006. Chronic contamination with ¹³⁷cesium in rat: effect on liver cholesterol metabolism. *Int. J. Toxicol.* 25, 493–497.

Su, T., Waxman, D.J., 2004. Impact of dimethyl sulfoxide on expression of nuclear receptors and drug-inducible cytochromes P450 in primary rat hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 424, 226–234.

Sumner, D., 2007. Health effects resulting from the chernobyl accident. *Med. Confl. Surviv.* 23, 31–45.

Szanto, A., Narkar, V., Shen, Q., Uray, I.P., Davies, P.J., Nagy, L., 2004. Retinoid x receptors: X-ploring their (patho)physiological functions. *Cell Death Differ.* 11 (Suppl 2), S126–S143.

Tissandie, E., Gueguen, Y., Lobaccaro, J.M., Aigueperse, J., Gourmelon, P., Paquet, F., Souidi, M., 2006a. Chronic contamination with ¹³⁷cesium affects vitamin D3 metabolism in rats. *Toxicology* 225, 75–80.

Tissandie, E., Gueguen, Y., Lobaccaro, J.M., Grandcolas, L., Voisin, P., Aigueperse, J., Gourmelon, P., Souidi, M., 2007. In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on vitamin D3 metabolism in rat. *Biochim. Biophys. Acta* 1770, 266–272.

Tissandie, E., Gueguen, Y., Lobaccaro, J.M., Paquet, F., Aigueperse, J., Souidi, M., 2006b. Effects of depleted uranium after short-term exposure on vitamin D metabolism in rat. *Arch. Toxicol.* 80, 473–480.

Vance, J.E., 2006. Lipid imbalance in the neurological disorder, Niemann-Pick C disease. *FEBS Lett.* 580, 5518–5524.

Vaya, J., Schipper, H.M., 2007. Oxysterols, cholesterol homeostasis, and Alzheimer disease. *J. Neurochem.* 102, 1727–1737.

WHO, 2006. Non-cancerous and non-thyroid health effects. In: Repacholi, M., Bennett, B., Carr, Z. (Eds.), Health Effects of the Chernobyl Accident and Special Care Programmes – Reports of the UN Chernobyl Forum Expert Group "Health". World Health Organization (WHO), Geneva, pp. 75–77.

Zhavoronkova, L.A., Gogitidze, N.V., Kholodova, N.B., 1996. The characteristics of the late reaction of the human brain to radiation exposure: the EEG and neuropsychological study (the sequelae of the accident at the Chernobyl Atomic Electric Power Station). *Zh Vyssh Nerv Dejiat Im I P Pavlova* 46, 699–711.

Résultats supplémentaires

❖ Dosage du ^{137}Cs hépatique

Le dosage du césium hépatique a été réalisé à l'aide d'un compteur à scintillation gamma.

La valeur du groupe témoins est en dessous du seuil de détection du compteur, tandis que les rats contaminés ont une concentration moyenne de ^{137}Cs $6,88 \pm 0.39$ Bq/g de foie à l'issue de la contamination.

Le ^{137}Cs s'est donc accumulé dans le foie. Le comptage dans le cerveau n'a pas été réalisé faute de matériel biologique suffisant. Cependant, le ^{137}Cs ayant une répartition homogène dans l'organisme, il est très probable qu'il en soit également retrouvé dans le cerveau à l'issue des 9 mois de contamination.

❖ Expression protéique

L'expression protéique dans le foie de LXR α , RXR et apo E (dont le taux de transcription est modulé par le ^{137}Cs après contamination chronique) a été mesurée par immunodétection (Western blot). Il n'y a pas de modification du taux de ces trois protéines hépatiques suite à la contamination par le ^{137}Cs (cf. Figure 42).

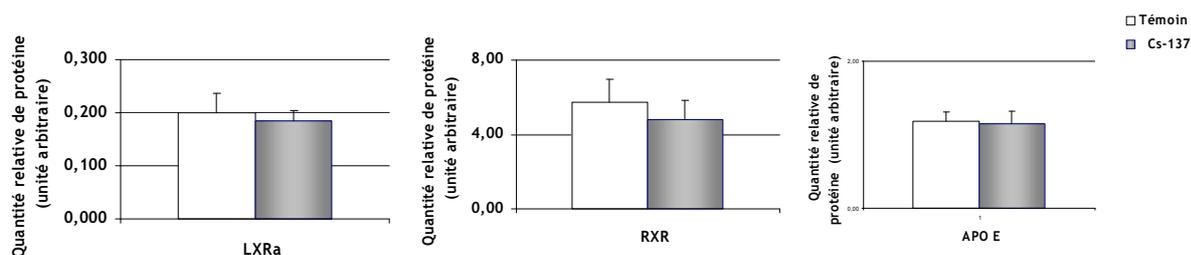


Figure 42 : Effet d'une contamination interne chronique au ^{137}Cs sur l'expression protéique de LXR α , RXR et apo E dans le foie de rat

❖ Activité spécifique de la CYP7A1 et de la CYP27A1 hépatiques

L'activité spécifique de la CYP7A1 et de la CYP27A1 hépatiques n'est pas affectée suite à une contamination interne chronique par le ^{137}Cs (cf. Figure 43).

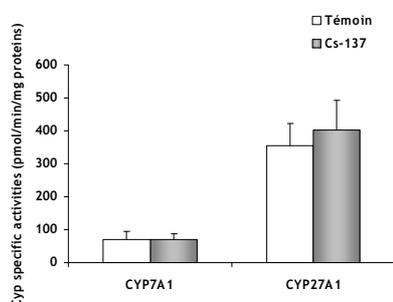


Figure 43 : Effet d'une contamination interne chronique au ^{137}Cs sur l'activité spécifique de la CYP7A1 et de la CYP27A1 dans le foie de rat

Résultats et Conclusion

Une ingestion quotidienne de ^{137}Cs à une concentration de 6 500 Bq/l ne modifie pas le profil lipidique sanguin chez le rat exposé depuis l'âge adulte. Les taux plasmatiques des marqueurs de la fonction et de l'intégrité hépatiques sont également préservés après contamination. De même la concentration du cholestérol tissulaire (hépatique et cérébral) n'est pas modifiée par le ^{137}Cs dans nos conditions expérimentales. L'expression de quelques gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol est modulée chez les rats contaminés par rapports aux rats témoins. Dans le foie, les gènes affectés sont ceux de l'ACAT 2, de l'apo E, de LXR α et de RXR. Dans le cerveau, seuls les gènes de l'ACAT 1 et la CYP27A1 sont modulés. Les modifications enzymatiques (ACAT 1, ACAT 2 et CYP27A1) sont sans conséquence physiologique car les fractions de cholestérol libre et estérifié sont inchangées après contamination dans les deux organes. En ce qui concerne les modulations géniques de l'apo E, LXR α et RXR dans le foie, elles ne sont pas répercutées au niveau protéique et aucun de leurs gènes-cibles, régulateurs ou partenaire n'est affectée. Il n'y a donc probablement pas de modification de l'activité de ces protéines.

Ainsi, une ingestion de ^{137}Cs à raison de 6 500 Bq/l sur 9 mois ne conduit pas à une perturbation du métabolisme du cholestérol au niveau tissulaire ou systémique. Seules des modifications légères au niveau de l'expression génique sont observées. Ces modifications affectent des gènes différents dans le foie et le cerveau, à l'exception de l'ACAT, dont le taux d'ARNm diminue dans les deux organes.

Pour compléter cette étude effectuée sur le modèle de référence (le rat contaminé depuis l'âge adulte), le même schéma de contamination a été appliqué à un modèle plus sensible aux contaminants : le modèle en croissance.

ARTICLE 5

HEPATIC CHOLESTEROL METABOLISM FOLLOWING A CHRONIC INGESTION OF CESIUM-137 STARTING AT FETAL STAGE IN RATS

R. Racine, L. Grandcolas, E. Blanchardon, P. Gourmelon, G. Veysseyre, M. Souidi

Journal of Radiation Research - (2010) 51:37-45

Contexte scientifique

Suite à la première étude consacrée aux effets du ^{137}Cs après contamination interne chronique sur le métabolisme du cholestérol chez le rat adulte, l'utilisation d'un modèle plus sensible permet d'évaluer l'impact de ce type de contamination lorsque les mécanismes biologiques impliqués dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol sont différents de ceux de l'adulte sain.

Dans le cadre de l'accident de Tchernobyl, nous avons choisi le cas des "enfants de Tchernobyl" comme modèle sensible. En effet, la plupart des conséquences pathologiques ou délétères de l'accident de Tchernobyl ont été observées soit chez les liquidateurs (soumis à une forte exposition externe lors de la décontamination du site de l'accident), soit chez les enfants de populations vivant sur des territoires contaminés. La majorité de ces enfants sont nés de parents vivant sur des territoires contaminés suite à l'accident et ont grandi sur ces mêmes territoires. Ils ont été exposés *in utero via* leur mère, puis directement *via* l'alimentation.

Ainsi, pour évaluer les effets d'une ingestion quotidienne dès la vie fœtale d'une concentration post-accidentelle de ^{137}Cs sur le métabolisme du cholestérol, un schéma de contamination mimant celui des enfants de Tchernobyl a été établi. Des femelles gestantes ont été exposées au ^{137}Cs (6 500 Bq/l) deux semaines avant la mise en accouplement et jusqu'au sevrage des portées. Les ratons (mâles uniquement) sont ainsi contaminés *via* le sang maternel à travers la barrière hémato-placentaire, puis *via* le lait maternel. Le passage du ^{137}Cs dans le sang fœtal et dans le lait maternel est scientifiquement établi (Sundberg 1991; von Zallinger 1998). Une fois sevrés, ils sont directement exposés à la source d'eau contaminée, et ce jusqu'à l'âge de 9 mois. A l'issue de la contamination, l'impact du ^{137}Cs sur l'homéostasie du cholestérol et son métabolisme hépatique a été évalué par les analyses biologiques précédemment citées.



Hepatic Cholesterol Metabolism Following a Chronic Ingestion of Cesium-137 Starting at Fetal Stage in Rats

Radjini RACINE¹, Line GRANDCOLAS¹, Eric BLANCHARDON²,
Patrick GOURMELON¹, Georges VEYSSIERE³
and Maamar SOUIDI^{1*}

Cesium-137/Cholesterol metabolism/Chronic contamination/Liver/Low dose.

The Chernobyl accident released many radionuclides in the environment. Some are still contaminating the ground, and thus the people through dietary intake. The long-term sanitary consequences of this disaster are still unclear and several biological systems remain to be investigated. Cholesterol metabolism is of particular interest, with regard to the link established between atherosclerosis and exposure to high-dose ionizing radiations. This study assesses the effect of cesium-137 on cholesterol metabolism in rats, after a chronic exposure since fetal life. To achieve this, rat dams were contaminated with cesium-137-supplemented water from two weeks before mating until the weaning of the pups. Thereafter, the weaned rats were given direct access to the contaminated drinking water until the age of 9 months. After the sacrifice, cholesterol metabolism was investigated in the liver at gene expression and protein level. The cholesterolemia was preserved, as well as the cholesterol concentration in the liver. At molecular level, the gene expressions of ACAT 2 (a cholesterol storage enzyme), of Apolipoprotein A-I and of RXR (a nuclear receptor involved in cholesterol metabolism) were significantly decreased. In addition, the enzymatic activity of CYP27A1, which catabolizes cholesterol, was increased. The results indicate that the rats seem to adapt to the cesium-137 contamination and display modifications of hepatic cholesterol metabolism only at molecular level and within physiological range.

INTRODUCTION

The explosion of the nuclear reactor at the Chernobyl Power Plant in 1986 led to the spread and deposition of various radionuclides in forests, in the soil and in many bodies of water. Some of these radionuclides have long half-lives, especially cesium-137 (¹³⁷Cs). Therefore, they still generate a direct environmental contamination¹⁾ threatening the surrounding wildlife and crops, which in turn induces the dietary contamination of the populations through the food

chain. These populations have become very important in the framework of the research on Chernobyl's long-term sanitary consequences, especially with regard to their contamination pattern: internal exposure to low levels of ionizing radiations over a long stretch of time. Within this group, children are of particular importance because of their enhanced sensitivity towards many contaminants including ionizing radiations,²⁾ and because of their lifespan, making them the prime target for long-term effects.

Some health effects of ionizing radiations are already observed during childhood. Besides thyroid cancer and leukemia, various non-cancerous effects have been studied. To date, only focal lens defects³⁾ and cataracts⁴⁾ have been directly attributed to ionizing radiations. Other non-cancerous effects require greater statistical power or further investigation. Despite the link established between high-dose external irradiation and atherosclerosis,⁵⁾ cardiovascular symptoms stand among the less documented areas. In the only easily available study on cardiovascular symptoms in the "Chernobyl children", the authors describe abnormal cardiac features.⁶⁾ Besides, another work on children reports modifications in the levels of plasmatic markers of hepatic structure and function.⁷⁾ In this regard, cholesterol metabolism

*Corresponding author: Phone: +33-1 58 35 91 94,
Fax: +33-1 58 35 84 67,
E-mail: maamar.souidi@irsn.fr

¹⁾Institute for Radiological protection and Nuclear Safety (IRSN), Radiological Protection and Human health Division, Radiobiology and Epidemiology Department, Laboratory of Experimental Toxicology (LRTOX). BP n°17, F-92262 Fontenay-aux-Roses Cedex, France; ²⁾Institute for Radiological protection and Nuclear Safety (IRSN), Radiological Protection and Human health Division, Internal Dosimetry Department, Laboratory of Internal Dose Assessment (LEDI). BP n°17, F-92262 Fontenay-aux-Roses Cedex, France; ³⁾Clermont Université, UMR CNRS 6247 et Centre de recherche en nutrition humaine, 24, avenue des Landais, F-63177 Aubière Cedex, France.
doi:10.1269/jrr.09064

appears as a prime target for studies. Indeed, it is an important risk factor for cardiovascular complications (as are high levels of ionizing radiations) and it is mainly catabolized in the liver.

Disruptions of cholesterol homeostasis are linked with various diseases, among which cardiovascular diseases like atherosclerosis⁸⁾ or neurodegenerative pathologies such as Alzheimer's disease.⁹⁾ The metabolism of cholesterol in the liver is crucial, since it is the only organ able to eliminate the excess body cholesterol by converting it into bile acids. Bile acids also have an important role in the intestinal absorption of liposoluble vitamins and in the regulation of cholesterol homeostasis.¹⁰⁾ If hepatic cholesterol metabolism is disrupted, many pathologies such as cholestasis, jaundice or gallstones can occur,^{11,12)} possibly leading to a perturbation of the hepatic function at a larger scale. Moreover, the intricate crosstalks in the regulation of cholesterol metabolism and that of other metabolic pathways (fatty acids, glucose...) may induce wide repercussions if one of these systems is perturbed. Thus, cholesterol metabolism seems an important system to study in order to evaluate certain non-cancerous effects of ionizing radiations. This is supported by the work of Wong *et al.* reporting an increase of serum cholesterol levels in atomic bomb survivors,¹³⁾ which appeared to be linked with the radiation level. Moreover, cholesterol metabolism is of prime importance in the development of the fetus because of its multiple roles in membrane structure, membrane protein activity, and as a precursor for steroids involved in metabolic regulation.¹⁴⁾

Thus, the present experimental work addresses two requests of the United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation¹⁵⁾ and the World Health Organization¹⁶⁾: studying the impact of a chronic low dose of ionizing radiations on a biological system (cholesterol metabolism) related to cardiovascular diseases and studying the long-term consequences of an exposure pattern covering the childhood. As recreating the exact mixture of the remaining radiations sources would be very difficult, the focus was set on ¹³⁷Cs alone, which is mainly a beta-gamma emitter with a decay period of 30 years and therefore the main contributor to the current level of ionizing radiations resulting from Chernobyl accident. The exposure started at embryo stage in order to mimic in the closest way the exposure of children living on contaminated land. This also allows studying the effects of ¹³⁷Cs chronic ingestion on the fetus, whose sensitivity towards many contaminants makes it a reference model in toxicology. Thus, the aim of this study is to investigate the effects of a chronic ingestion of a low level of ¹³⁷Cs on the five main pathways of hepatic cholesterol metabolism (biosynthesis, catabolism, storage as esters, transport and transcriptional regulation) in rats exposed since fetal life.

MATERIALS AND METHODS

Animals and ¹³⁷Cs administration

The study included male Sprague-Dawley rats divided into ¹³⁷Cs-exposed and control groups. Each group consisted of 10 animals. The parents of the rats in the experimental group were exposed to ¹³⁷CsCl (CERCA, Pierrelatte, France) at a concentration of 6.5 kBq/l (approximately 610 Bq/kg/day) in their drinking water for two weeks before mating. Then, pregnant females were administered ¹³⁷Cs throughout the pregnancy and until the weaning, so that the pups were contaminated *via* their dam's milk. After weaning, the pups were directly exposed to ¹³⁷Cs-supplemented water until they were 9 months old.

This pattern of exposure was chosen in order to mimic the children born to people living on contaminated land after Chernobyl accident and daily ingesting contaminated foodstuff. The concentration of ¹³⁷Cs is based on the top estimate of their dietary intake in the years following the accident.¹⁷⁾ This level of ¹³⁷Cs, which establish the reality of the food contamination, leads nevertheless to a low-dose internal exposure at organ level, as will be confirmed by the measurement of ¹³⁷Cs in the liver of the treated rats.

The animals were housed in pairs and were maintained in a 12 h light/12 h dark cycle. Food and water were freely accessible and their intakes were monitored on a weekly basis. The animals were weighed once a week and right before the sacrifice.

At the end of the period of exposure to ¹³⁷Cs, blood was collected by intracardiac puncture under gaseous anesthesia and the liver was dissected on ice. All samples were deep-frozen in liquid nitrogen. All experimental procedures were approved by the Animal Care Committee of the Institute (IRSN) and complied with French regulations for animal experimentation (Ministry of Agriculture Act No. 87-848, October 19, 1987, modified May 29, 2001).

Plasma parameters assessment

Routine plasma biochemical parameters were measured using a Konelab 20 automated spectrophotometer (Thermo Electron Corporation, Cergy-Pontoise, France) and the manufacturer's reagents. The parameters measured in plasma included total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol, low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol, triglycerides, phospholipids, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), direct and total bilirubin, gamma-glutamyltranspeptidase (γ GT), creatinine and urea.

Plasma 7 α -hydroxycholesterol assay

The assay of 7 α -hydroxycholesterol level was performed as described elsewhere¹⁸⁾ on 0.5 ml plasma. 19-Hydroxy-3-acetate cholesterol (Sigma Diagnostics, Isle d'Abeau Chesnes, France) was added to each sample before high per-

formance liquid chromatography as an internal standard for quantification of the peak.

Hepatic ¹³⁷Cs assay

¹³⁷Cs measurement in liver samples was conducted using gamma spectrometry with a Packard Cobra II gamma counter (PerkinElmer, Courtaboeuf, France). In order to obtain a conservative, upper estimate of the dose, the activity measured in the liver at the autopsy was assumed to have been constant from the start of the experiment. The resulting number of nuclear transformations of ¹³⁷Cs and Barium-137 m was therefore obtained by multiplying this activity by the duration of the experiment, expressed in seconds. Each nuclear transformation is associated with the photon and electron emissions described in ICRP publication 107.¹⁹⁾ The resulting liver absorbed dose was derived from the number of nuclear transformations and energy spectrum by applying the absorbed fraction of energy calculated by Stabin *et al.*²⁰⁾ for photons and electrons in a rat computa-

tional model, and dividing by the mass of the liver.

Hepatic cholesterol assay

Cholesterol was extracted from 250 mg liver samples as described by Boelher *et al.*²¹⁾ Total and free cholesterol were assessed using the Amplex Red Cholesterol Assay kit (Invitrogen-Life technologies, Cergy-Pontoise, France) according to the manufacturer's instructions. Esterified cholesterol was calculated as the difference between total and free cholesterol values.

Real-time PCR

Total RNA of liver samples was extracted using RNeasy total RNA isolation Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instruction. Reverse transcription was performed with BD Sprint PowerScript PrePrimed 96 Plate (BD Biosciences Clontech, Erembodegem, Belgium). Real-time PCR was then carried out on an AbiPrism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) using SYBR Green technology with

Table 1. Oligonucleotide sequences of primers used in real-time quantitative PCR

GENE NAME	ACCESSION #	FORWARD PRIMER	REVERSE PRIMER	LENGTH (bp)	REF
hprt	NM_012583	gctcgagatgtcatgaaggaga	tcagccttfaatgtaaccage	109	(22)
hmgcoa-s	NM_173094	ggcgggtcctgcaagt	gcaggtgagcgggtgaga	150	(23)
hmgcoa-r	X55286	ggtggtgggaccaacctct	cacgccccctgaacaccta	70	(24)
cyp27a1	NM_178847	ggaaggtgccccagaacia	gcgcagggtctcctaatca	65	(25)
cyp7a1	NM_012942	ccaagtcaagtgtccccctcta	gactctcagccccaagt	60	
cyp7b1	NM_019138	tcagatgcaaagacggtcaga	ttcatgccctagatatttttcag	71	(23)
acat 2	NM_153728	gccccagccgacatttt	gtgcagtgtgaagccttgactt	80	
nceh	L46791	agcaagagtttgctgcatcat	agagggatttgctgttttctg	87	
ldlr	NM_175762	cagccgatgcattcctgact	agttcatccgagccattttcac	63	(23)
sr-b1	NM_031541	gttggtcaccatgggcca	cgtagccccacaggatctca	134	(23)
abc a1	NM_178095	atctcatagatggaagaatgtgaagc	cgtacaactattgtataaccatctccaaa	99	(23)
abc g5	NM_053754	cgcaggaaccgcattgtaa	tgtcgaagtgggtgaagagct	69	(23)
abc g8	NM_130414	gatgctggctatcatagggagc	tctctgcctgtgataacgtcga	51	
apo a-1	NM_012738	aatgggacagggtgaagga	tgaaccagaggtgccagtt	58	
apo b	NM_019287	tcctaaccatcattgtccttcat	ccttgaatctgggagggaaaact	51	
lxrα	NM_031627	agcaacagtgtaacagcgct	gtgcaatggccaagc	132	(26)
rxr	NM_012805	cgcaaagacctgacctacacc	tcctctgcacggcttccc	69	(27)
fxr	NM_021745	tgacaagaagccgcgaat	tgaatggtaccagaggccc	65	(18)
pparα	NM_013196	tcttcccacaaactcctca	gcacgagctcgcatgctc	67	(25)
hnf1α	NM_012669	acacctggtacgtccgcaag	ctgtgggtgaattgctgagc	146	(28)
hnf4α	NM_022180	tggcaaacactacggagcct	ctgaagaatcccttcagcc	106	(28)
srebp 2	XM_216989	agctggcgaatcagaaaaacaag	cgatcttcaagccacatcactgt	69	(24)

The primers sequences are given in the 5'-3' orientation. The primers without reference have been designed for this study by the authors with the PrimerExpress software.

0.4 µg/ml cDNA and 0.3 nmol/ml primers for each reaction. Samples were normalized to hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) and fold-inductions were calculated relative to the control group. Sequences for the primers are listed in Table 1.^{18,22–28)}

Western Blot

Assays were carried out on liver homogenate of five animals of each group (randomly selected). Proteins were separated on a 12% SDS polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto a nitrocellulose membrane. The membranes were blocked for one hour at room temperature in 5% non-fat dry milk reconstituted in TBS. A rabbit anti-retinoid-X-receptor (RXR) polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Germany) and a rabbit anti-Apolipoprotein A-I (Apo A-I) polyclonal antibody (Abcam, Cambridge, United Kingdom) were diluted in 2% non-fat dry milk in TBS and incubated overnight at 4°C with the membranes. Secondary antibody coupled to horseradish peroxidase was incubated with the membranes in 2% non-fat milk for one hour at room temperature. Samples were normalized to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and beta-actin respectively. Signal was detected using ECL technology (Immobilon Western, Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). The reaction intensity was quantified by computer-assisted densitometry (Fuji Las3000, Fujifilm, Courbevoie, France).

Enzymes specific activities assay

The specific activities of cytochrome P450 (CYP) 27A1 and CYP7A1 were assessed on hepatic mitochondrial and microsomal fractions respectively using a radioisotopic method described previously.²⁹⁾ The assay was conducted on six animals of each group, randomly selected.

Statistics

Significance was assessed using Student's t-test or Mann-Whitney Rank Sum Test when Student's test failed (determined by Sigmastat software). Differences were considered significant when $p < 0.05$. Results are expressed as means \pm SEM.

RESULTS

Accumulation of ¹³⁷Cs in the liver of contaminated rats

The measured level of hepatic ¹³⁷Cs in the exposed rats was 5.48 ± 0.57 Bq/g liver whereas the level in the control rats was below detection limit ($p = 0.029$). The radiation level in the liver was calculated as 60 cGy over 10 months (*cf.* Material and Methods).

General and plasma parameters

The contaminated rats were in a good general status: their food and water intakes, as well as the final body weight and

liver weight were similar to those of the control group.

The plasma lipids profile (including levels of total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides, and phospholipids) was statistically similar in both groups. This was also the case for the plasmatic markers of liver integrity (ALT and AST) and liver function (direct and total bilirubin and γ GT) as shown in Table 1. Plasma levels of creatinine and urea were also unchanged after ¹³⁷Cs chronic administration.

The plasma level of 7 α -hydroxycholesterol was not significantly different between the two groups (577 ± 145 ng/ml in ¹³⁷Cs-exposed rats vs. 257 ± 61 ng/ml in control rats) as reported in Table 1.

RT-qPCR

The gene expression of two key enzymes of cholesterol synthesis, 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A (HMG-CoA)-Synthase and HMGCoA-Reductase, were unchanged between ¹³⁷Cs-exposed and control rats, as illustrated in Fig. 1. Likewise, the main enzymes involved in cholesterol catabolism into bile acids in the liver (CYP7A1, CYP27A1, and CYP7B1) displayed statistically similar mRNA levels in

Table 2. General and plasma biochemical parameters after chronic ingestion of ¹³⁷Cs

	Control	¹³⁷ Cs-exposed
Final body weight (g)	558 \pm 26	572 \pm 19
Final liver weight (mg)	18.5 \pm 0.9	16.4 \pm 0.7
Plasma		
Cholesterol (mM)	2.71 \pm 0.19	2.66 \pm 0.17
HDL Cholesterol (mM)	2.23 \pm 0.2	2.14 \pm 0.11
LDL Cholesterol (mM)	0.4 \pm 0.05	0.36 \pm 0.04
Triglycerids (mM)	1.48 \pm 0.27	1.65 \pm 0.16
Phospholipids (g/l)	1.96 \pm 0.09	2.02 \pm 0.09
ALT (U/l)	60.5 \pm 9.6	49.2 \pm 4.3
AST (U/l)	156 \pm 21	146 \pm 15
Direct Bilirubin (µM)	4.88 \pm 0.27	4.65 \pm 0.31
Total Bilirubin (µM)	5.19 \pm 0.46	5.15 \pm 0.4
γ GT (U/l)	2.27 \pm 0.42	2.87 \pm 0.29
Creatinine (µM)	49.6 \pm 1.7	52.9 \pm 2.1
Urea (mM)	6.01 \pm 0.17	6.17 \pm 0.17
7 α -hydroxycholesterol (ng/ml)	257 \pm 61	576 \pm 144

Data are expressed as means SEM (n = 10, except 7 α -hydroxycholesterol: control n = 5, ¹³⁷Cs-exposed n = 9). HDL: high-density lipoprotein, LDL: low-density lipoprotein, ALT: alanine aminotransferase, AST: aspartate aminotransferase, gamma-GT: gamma glutamyltranspeptidase.

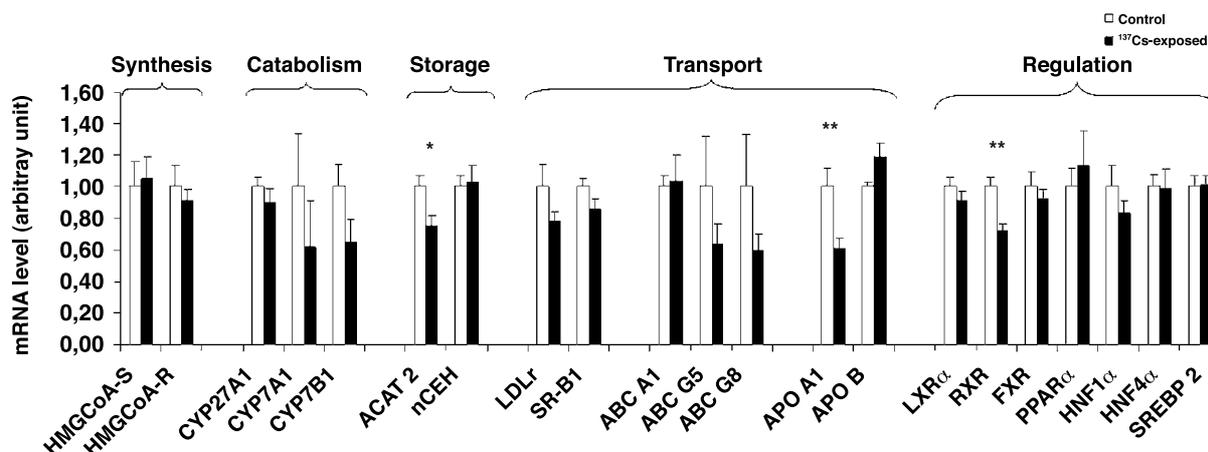


Fig. 1. Gene expression of the molecular actors of cholesterol metabolism in the liver after chronic contamination with ¹³⁷Cs. Results are expressed as a ratio to HPRT mRNA level. The mRNA levels of control rats were arbitrarily set at 1. Data are expressed as means \pm SEM (n = 10). * and ** mark p < 0.05 and p < 0.01 respectively. HMG-S: 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Synthase, HMG-R: 3-hydroxy-3-methylglutamyl Coenzyme A Reductase, ACAT 2: acylCoenzymeA: cholesterol acyltransferase, nCEH: hepatic neutral cholesteryl ester hydrolase, LDLr: low-density lipoprotein receptor, SR-B1: scavenger receptor class B type 1, ABC: adenosine triphosphate binding cassette transporter, APO: apolipoprotein, LXR α : liver-X-receptor alpha, RXR: retinoid-X-receptor, FXR: farnesoid-X-receptor, PPAR α : peroxisome proliferator-activated receptor alpha, HNF 1 α /4 α : hepatocyte nuclear factor 1alpha/4alpha, SREBP 2: sterol regulatory element binding protein 2.

both groups.

The gene expression of AcylCoenzymeA: cholesterol acyltransferase 2 (ACAT 2), which esterifies free cholesterol into its storage form, statistically decreased of 25% (p = 0.023). Conversely, the hepatic neutral cholesteryl ester hydrolase (nCEH), which catalyses the reverse reaction, did not exhibit any significant modification of its mRNA level after ¹³⁷Cs exposure.

Lipoprotein receptors LDL-receptor (LDLr) and Scavenger Receptor type B class 1 (SR-B1), as well as adenosine triphosphate binding cassette transporters (ABC) A1, ABC G5 and ABC G8 had statistically similar mRNA level in ¹³⁷Cs-exposed and control groups. So did apolipoprotein (Apo) B, which is involved in LDL formation, whereas Apo A-I (involved in HDL formation) had its gene expression decreased of 39% (p = 0.006) after chronic administration of ¹³⁷Cs, as shown in Fig. 1.

Finally, concerning the studied transcription factors, retinoid-X-receptor (RXR) gene expression decreased significantly of 28% (p = 0.001). Conversely, liver-X-receptor α (LXR α), farnesoid-X-receptor (FXR), peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α), hepatocyte nuclear factor 1 α (HNF 1 α), HNF 4 α and the sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP 2) mRNA levels were not statistically different between the experimental and the control group.

Western Blots

The relative protein levels of hepatic RXR and Apo A-I were assessed by Western Blot (cf. Fig. 2). No significant difference was seen for either RXR (1.92 \pm 0.19 for the

¹³⁷Cs-exposed rats vs. 2.53 \pm 0.61 for the control rats) or Apo A-I (0.41 \pm 0.11 and 0.62 \pm 0.12 for the experimental and the control groups respectively).

Hepatic cholesterol assay

The assessment of cholesterol hepatic concentration is represented in Fig. 3. The total cholesterol was measured (2.16 \pm 0.31 mg/g liver for the ¹³⁷Cs-exposed vs. 2.02 \pm 0.23 for the control rats) as well as the free cholesterol (1.82 \pm 0.31 and 1.52 \pm 0.16 mg/g liver for the experimental and control groups respectively). The esterified fraction corresponds to the difference between total and free cholesterol: the means for cholesteryl ester concentration in the liver are 0.35 \pm 0.11 mg/g liver in the ¹³⁷Cs-treated group and 0.50 \pm 0.10 in the sham-treated group. None of these values indicate a significant difference in cholesterol hepatic content after ¹³⁷Cs administration.

CYP7A1 and CYP27A1 specific activities

The specific activities for CYP7A1 and CYP27A1 (initiating both pathways for cholesterol catabolism into bile acids in the liver) are reported in Fig. 4. For CYP7A1, the ¹³⁷Cs-exposed rats displayed a specific activity of 8.76 \pm 0.69 pmol/min/mg proteins vs. 10.19 \pm 2.23 in the control rats, leading to no significant difference between both groups. Conversely, the specific activity of CYP27A1 displayed a significant increase of 66% after a chronic internal exposure to ¹³⁷Cs (22.36 \pm 3.91 pmol/min/mg proteins and 13.43 \pm 1.56 in ¹³⁷Cs-exposed and control rats respectively), as shown in Fig. 4.

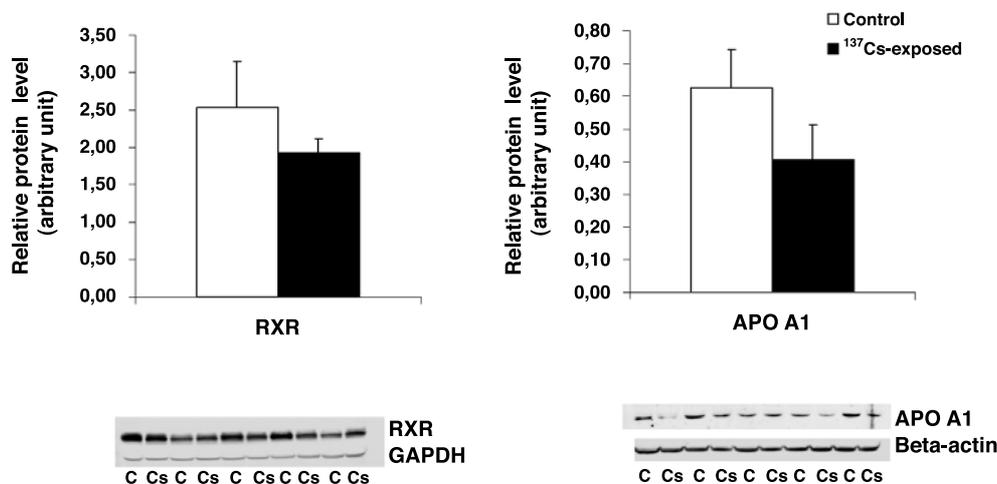


Fig. 2. Relative protein level of RXR and Apo A-I in the liver following exposure to ¹³⁷Cs. Results are expressed as a ratio to GAPDH protein level for RXR and to beta-actin protein level for Apo A-I. Data are expressed as means ± SEM (n = 5). C: Control, Cs: ¹³⁷Cs-exposed.

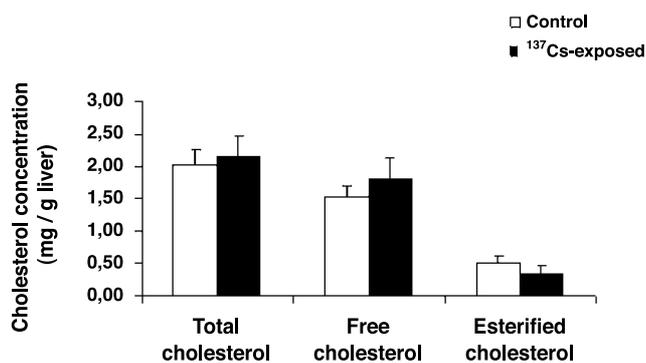


Fig. 3. Total, free and esterified cholesterol concentrations in the liver after ¹³⁷Cs chronic ingestion. Results are expressed in mg cholesterol/g liver. Data are expressed as means ± SEM (n = 7–9).

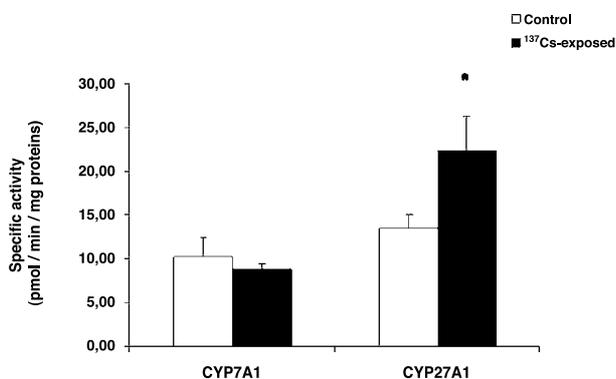


Fig. 4. CYP7A1 and CYP27A1 specific activities in the liver after chronic ingestion of ¹³⁷Cs. Results are expressed in pmol substrate/ min/mg of microsomal or mitochondrial proteins for CYP7A1 and CYP27A1 respectively. Data are expressed as means ± SEM (n = 6). * indicates a significant difference with p < 0.05.

DISCUSSION

There is a gap in the knowledge concerning the long-term sanitary consequences (especially the non-cancerous effects) of an internal exposure since fetal life to long-lived radionuclides, as generated by the Chernobyl accident. To address this, an experimental model was developed: rat pups were administered ¹³⁷Cs *in utero* and until the age of 9 months (approximately corresponding to 20 years of human life). The continuity of the contamination is ensured by the fact that ¹³⁷Cs crosses the placental barrier³⁰⁾ and is transmitted to the pup through the dam's milk.³¹⁾ This is supported by the amount of ¹³⁷Cs in the livers of the exposed animals (5 Bq/g liver, *i.e.* 60 cGy for the whole liver in 10 months), whereas the ¹³⁷Cs hepatic concentration was under detection limit in the control rats. This value confirms the fact that the liver of the contaminated animals was exposed to a low level of ionizing radiations in this study.

Despite the accumulation of ¹³⁷Cs in the exposed rats, they were in a good general status: their food and water intakes, and their final body and liver weights did not differ from those of the untreated animals. This is noteworthy since a decrease in food intake and body weight gain is induced by a high-dose whole body gamma irradiation (*e.g.* at 1, 3, 5, and 8 Gy).^{32,33)} This external evaluation was confirmed by the levels of routine biochemical parameters: the plasma lipids profile and the hepatic profile were at similar levels with or without ¹³⁷Cs chronic internal administration. These results indicate a preservation of the lipid homeostasis and no declared hepatic toxicity, as opposed to the consequences of an external high dose gamma irradiation in rats: Pradeep *et al.* reported a decrease of plasma levels of ALT, AST, γ GT as well as lactate dehydrogenase and alkaline

phosphatase at 1, 3 and 5 Gy and in correlation with the radiation level.³²⁾

7 α -hydroxycholesterol has been proposed as an early marker of liver impairment after external irradiation.³⁴⁾ In this work, the authors hypothesize that a change in 7 α -hydroxycholesterol plasma level may foreshadow a hepatic alteration that is not yet detectable with the ALT and AST tests. Levels of plasmatic 7 α -hydroxycholesterol in our study were not significantly different between the two groups, implying that no predictable liver alteration is induced in these experimental conditions.

Thus, the absence of significant difference in the plasma profile between control and exposed rats suggests that the chronic ingestion of a post-accidental level of ¹³⁷Cs has no effect on the lipid homeostasis at body level. Still, ¹³⁷Cs may induce modifications at organ level. Therefore, the five pathways of cholesterol hepatic metabolism (biosynthesis, storage, transport, catabolism and regulation) have been studied.

First of all, a gene expression study was conducted (*cf.* Fig. 1). Three of the main actors of cholesterol metabolism had decreased gene expression levels: ACAT 2, which esterifies free cholesterol into its storage form, Apo A-I, involved in HDL formation and cholesterol excretion, and retinoid-X-receptor (RXR), a heterodimer partner for many nuclear receptors regulating cholesterol metabolism and other systems.

The protein levels of Apo A-I and of RXR were not significantly different in the livers of ¹³⁷Cs-administered and control rats (*cf.* Fig. 2). This suggests that the modifications at gene level are of mild importance since they are not reflected on the protein level. It is however possible that the non-significance of this result is due to a limited statistical power. Indeed, the protein expression of Apo A-I and RXR decrease by 34% and 24% respectively, which is close to the 39% and 28% respective decrease in their gene expression. Nevertheless, even admitting that the protein and mRNA levels decrease coordinately, the expression of no other gene involved in RXR or Apo A-I functions is modified. If these changes had led to non-physiological modifications of a metabolic pathway, heterodimer partners to RXR (LXR α , FXR, PPAR α , or others) and interacting partners of Apo A-I (such as ABC A1) would have been expected to undergo matching changes.

Concerning ACAT 2, the repercussion of its mRNA level decrease was assessed by the measurement of its product: esterified cholesterol. The hepatic concentration of esterified cholesterol was similar in both groups, as was the concentration of the free cholesterol fraction (*cf.* Fig. 3). Therefore, it is inferred that the decrease in the gene expression of ACAT 2 has no consequence on the global hepatic cholesterol homeostasis. Moreover, this conservation of the total cholesterol rate (corresponding to the sum of the free and esterified fractions) is in accordance with the absence of

modification in the biosynthesis pathway and in the gene expression of nCEH, which produces free cholesterol from the esterified form.

A 66% increase of CYP27A1 specific activity was observed (*cf.* Fig. 4). Concurrently, no significant modification of CYP27A1 gene expression was recorded (*cf.* Fig. 1). Although there is no certainty about this, at least two hypotheses can be formulated. The first one would regard the possibility of a post-translational modification. The phosphorylation status has been described to influence the activity of cytochromes P450 (CYPs).³⁵⁾ Even if most studies concern xenobiotics-metabolizing CYPs, the modulation of cholesterol-catabolizing CYP7A1 activity by phosphorylation/dephosphorylation has been demonstrated *in vitro*.³⁶⁾ Moreover, Ghazarian *et al.* have shown that CYP27A1 activity is decreased after phosphorylation in a study using the mitochondria of chicken kidney.³⁷⁾ A second hypothesis to explain the discrepancy between the increased CYP27A1 activity and the unchanged mRNA level could lie in an interference with the enzyme degradation system, leading to a higher activity global level than needed. This could be triggered by an action at the proteasome level, or in the ubiquitination of the enzymes to be degraded. However, although ubiquitination is a known process for degradation of some xenobiotics-metabolizing CYPs,³⁵⁾ no study concerning CYP27A1 degradation is available in this regard.

Whatever the mechanism lying behind this discrepancy between the effect of ¹³⁷Cs chronic ingestion on CYP27A1 gene expression and specific activity, the issue of the biological significance of these results remains. Indeed, the specific activity of CYP27A1 (which initiates the alternative pathway for cholesterol catabolism into bile acids) is enhanced after a chronic ingestion of ¹³⁷Cs but that of CYP7A1 (initiating the classical pathway) is not. The combination of these two results suggest that the increase in CYP27A1 specific activity is probably a physiological adjustment, since no other changes in this metabolism support a direct effect of ¹³⁷Cs intake. Indeed, the alternative pathway is usually enhanced when the classical pathway is disrupted,³⁸⁾ which is not the case here. Moreover, it has been shown in a previous study that a whole body external gamma irradiation of 8 Gy in rats modifies the specific activities of several CYPs of the bile acids synthesis, including CYP7A1 but not CYP27A1.³⁹⁾

In conclusion, this study assessed for the first time the effects of a chronic ingestion of a low level of ¹³⁷Cs since fetal life in rats. After 10 months of continuous internal exposure at 6.500 Bq/l, ¹³⁷Cs does not appear to induce hepatic toxicity and nor affect cholesterol hepatic metabolism in rats, neither at organ nor at body level. The observed molecular changes are of physiological range, and the rats seem to adapt to the lasting contamination. This long-term exposure to ¹³⁷Cs was started on a sensitive model: rat embryo. Yet, the effects of this type of exposure on more

sensitive individuals (already developing a lipidic pathology like hypercholesterolemia) are still unknown and would be helpful to ascertain the harmlessness of a chronic ingestion of ^{137}Cs on cholesterol hepatic metabolism.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work is part of the ENVIRHOM program of the Institute for Radiological protection and Nuclear Safety (IRSN). The authors thank E. Tournonias for ^{137}Cs measurement, as well as F. Voyer and T. Loiseau for animal care.

REFERENCES

- IAEA (2006) Environmental consequences of the Chernobyl Accident and their remediation : twenty years of experience. Report of the Chernobyl Forum Expert Group "Environment". Radiological Assessment Reports Series. International Atomic Energy Agency (IAEA), Vienna.
- ATSDR (1999) Toxicological profile of Uranium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), P. H. S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA.
- Day, R., Gorin, M. B. and Eller, A. W. (1995) Prevalence of lens changes in Ukrainian children residing around Chernobyl. *Health Phys.* **68**: 632–642.
- Sumner, D. (2007) Health effects resulting from the Chernobyl accident. *Med. Confl. Surviv.* **23**: 31–45.
- Trivedi, A. and Hannan, M. A. (2004) Radiation and cardiovascular diseases. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **23**: 99–106.
- Bandazhevskaya, G. S., Nesterenko, V. B., Babenko, V. I., Yerkovich, T. V. and Bandazhevsky, Y. I. (2004) Relationship between caesium (^{137}Cs) load, cardiovascular symptoms, and source of food in 'Chernobyl' children -- preliminary observations after intake of oral apple pectin. *Swiss. Med. Wkly.* **134**: 725–729.
- Sychik, S. I. and Stozharov, A. N. (1999) [Delayed effect of prenatal irradiation on the critical organs functional state in children after Chernobyl accident]. *Radiats. Biol. Radioecol.* **39**: 500–504.
- Poli, G., Sottero, B., Gargiulo, S. and Leonarduzzi, G. (2009) Cholesterol oxidation products in the vascular remodeling due to atherosclerosis. *Mol. Aspects. Med.* **30**: 180–189.
- Vaya, J. and Schipper, H. M. (2007) Oxysterols, cholesterol homeostasis, and Alzheimer disease. *J. Neurochem.* **102**: 1727–1737.
- Monte, M. J., Marin, J. J., Antelo, A. and Vazquez-Tato, J. (2009) Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J. Gastroenterol.* **15**: 804–816.
- Kosters, A., Jirsa, M. and Groen, A. K. (2003) Genetic background of cholesterol gallstone disease. *Biochim. Biophys. Acta.* **1637**: 1–19.
- O'Leary, J. G. and Pratt, D. S. (2007) Cholestasis and cholestatic syndromes. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **23**: 232–236.
- Wong, F. L., Yamada, M., Sasaki, H., Kodama, K. and Hosoda, Y. (1999) Effects of radiation on the longitudinal trends of total serum cholesterol levels in the atomic bomb survivors. *Radiat. Res.* **151**: 736–746.
- Woollett, L. A. (2008) Where does fetal and embryonic cholesterol originate and what does it do? *Annu. Rev. Nutr.* **28**: 97–114.
- UNSCEAR (2008) Effects of Ionizing Radiation: United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation - UNSCEAR 2006 Report, Volume 1 - Report to the General Assembly, with Scientific Annexes A and B. United Nations, Vienna.
- WHO (2006) Health Effects of the Chernobyl Accident and Special care programmes - reports of the UN Chernobyl Forum Expert Group "Health". World Health Organization (WHO), R. M. Bennett B., Carr Z., Geneva.
- Coulon, R. (1994) Caesium 137 and Chernobyl accident, IAEA international project. Publications du Comité de Radio-protection d'Electricité de France **8**: 10–16.
- Gueguen, Y., Souidi, M., Baudelin, C., Dudoignon, N., Grison, S., Dublineau, I., Marquette, C., Voisin, P., Gourmelon, P. and Aigueperse, J. (2006) Short-term hepatic effects of depleted uranium on xenobiotic and bile acid metabolizing cytochrome P450 enzymes in the rat. *Arch. Toxicol.* **80**: 187–195.
- ICRP (2008) ICRP Publication 107: Nuclear Decay Data for Dosimetric Calculations *Annals of the ICRP* **38**: e1-e26, 1–96.
- Stabin, M. G., Peterson, T. E., Holburn, G. E. and Emmons, M. A. (2006) Voxel-based mouse and rat models for internal dose calculations. *J. Nucl. Med.* **47**: 655–659.
- Boehler, N., Riottot, M., Ferezou, J., Souidi, M., Milliat, F., Serougne, C., Smith, J. L. and Lutton, C. (1999) Antilithiasic effect of beta-cyclodextrin in LPN hamster: comparison with cholestyramine. *J. Lipid. Res.* **40**: 726–734.
- Ropenga, A., Chapel, A., Vandamme, M. and Griffiths, N. M. (2004) Use of reference gene expression in rat distal colon after radiation exposure: a caveat. *Radiat. Res.* **161**: 597–602.
- Racine, R., Gueguen, Y., Gourmelon, P., Veyssiere, G. and Souidi, M. (2009) Modifications of the expression of genes involved in cerebral cholesterol metabolism in the rat following chronic ingestion of depleted uranium. *J. Mol. Neurosci.* **38**: 159–165.
- Shibata, S., Hayakawa, K., Egashira, Y. and Sanada, H. (2007) Roles of nuclear receptors in the up-regulation of hepatic cholesterol 7alpha-hydroxylase by cholestyramine in rats. *Life Sci.* **80**: 546–553.
- Tissandie, E., Gueguen, Y., Lobaccaro, J. M., Paquet, F., Aigueperse, J. and Souidi, M. (2006) Effects of depleted uranium after short-term exposure on vitamin D metabolism in rat. *Arch. Toxicol.* **80**: 473–480.
- Tissandie, E., Gueguen, Y., Lobaccaro, J. M., Grandcolas, L., Voisin, P., Aigueperse, J., Gourmelon, P. and Souidi, M. (2007) In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on vitamin D3 metabolism in rat. *Biochim. Biophys. Acta.* **1770**: 266–272.
- Souidi, M., Gueguen, Y., Linard, C., Dudoignon, N., Grison, S., Baudelin, C., Marquette, C., Gourmelon, P., Aigueperse, J. and Dublineau, I. (2005) In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on CYP3A and associated nuclear receptors PXR and CAR in the rat. *Toxicology* **214**: 113–122.
- Su, T. and Waxman, D. J. (2004) Impact of dimethyl sulfoxide

- on expression of nuclear receptors and drug-inducible cytochromes P450 in primary rat hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **424**: 226–234.
29. Souidi, M., Parquet, M., Ferezou, J. and Lutton, C. (1999) Modulation of cholesterol 7 α -hydroxylase and sterol 27-hydroxylase activities by steroids and physiological conditions in hamster. *Life Sci.* **64**: 1585–1593.
 30. von Zallinger, C. and Tempel, K. (1998) Transplacental transfer of radionuclides. *A Review Zentralbl Veterinarmed A* **45**: 581–590.
 31. Hoshi, M., Konstantinov, Y. O., Evdeeva, T. Y., Kovalev, A. I., Aksenov, A. S., Koulikova, N. V., Sato, H., Takatsui, T., Takada, J., Endo, S., Shibata, Y. and Yamashita, S. (2000) Radiocesium in children residing in the western districts of the Bryansk Oblast from 1991–1996. *Health Phys.* **79**: 182–186.
 32. Pradeep, K., Park, S. H. and Ko, K. C. (2008) Hesperidin a flavanoglycone protects against gamma-irradiation induced hepatocellular damage and oxidative stress in Sprague-Dawley rats. *Eur. J. Pharmacol.* **587**: 273–280.
 33. Scanff, P., Souidi, M., Grison, S., Griffiths, N. M. and Gourmelon, P. (2004) Alteration of the enterohepatic recirculation of bile acids in rats after exposure to ionizing radiation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **82**: 114–124.
 34. Bertho, J. M., Roy, L., Souidi, M., Benderitter, M., Gueguen, Y., Lataillade, J. J., Prat, M., Fagot, T., De Revel, T. and Gourmelon, P. (2008) New biological indicators to evaluate and monitor radiation-induced damage: an accident case report. *Radiat. Res.* **169**: 543–550.
 35. Aguiar, M., Masse, R. and Gibbs, B. F. (2005) Regulation of cytochrome P450 by posttranslational modification. *Drug. Metab. Rev.* **37**: 379–404.
 36. Nguyen, L. B., Shefer, S., Salen, G., Chiang, J. Y. and Patel, M. (1996) Cholesterol 7 α -hydroxylase activities from human and rat liver are modulated in vitro posttranslationally by phosphorylation/dephosphorylation. *Hepatology* **24**: 1468–1474.
 37. Ghazarian, J. G. and Yanda, D. M. (1985) Inhibition of 25-hydroxyvitamin D 1 α -hydroxylase by renal mitochondrial protein kinase-catalyzed phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res Commun.* **132**: 1095–1102.
 38. Vlahcevic, Z. R., Stravitz, R. T., Heuman, D. M., Hylemon, P. B. and Pandak, W. M. (1997) Quantitative estimations of the contribution of different bile acid pathways to total bile acid synthesis in the rat. *Gastroenterology* **113**: 1949–1957.
 39. Souidi, M., Scanff, P., Grison, S., Gourmelon, P. and Aigueperse, J. (2007) Effects of ionizing radiation on the activity of the major hepatic enzymes implicated in bile acid biosynthesis in the rat. *C R Biol* **330**: 861–870.

Received on June 3, 2009

Revision received on August 28, 2009

Accepted on September 1, 2009

J-STAGE Advance Publication Date: ●●●● ●●●●, 2009

Résultats et Conclusion

Une contamination interne chronique par le ^{137}Cs (6 500 Bq/l) débutant lors de la vie fœtale et prolongée jusqu'à l'âge adulte ne provoque pas de modification du profil plasmatique chez le rat. De même, les taux d'oxystérols circulants (7 α -hydroxycholestérol, 27-hydroxycholestérol) sont inchangés après contamination. La concentration du cholestérol hépatique et le ratio cholestérol libre/cholestérol estérifié sont également similaires chez les rats contaminés et chez les rats témoins. On relève une modification de l'activité spécifique de la CYP27A1 dans le foie. L'expression génique de cette enzyme n'étant pas affectée, cette modification est probablement post-traductionnelle. Toutefois, elle n'affecte pas d'un point de vue quantitatif le catabolisme du cholestérol en acides biliaires. Trois gènes voient leur expression diminuer dans le foie : l'ACAT 2 (de façon similaire aux modèle de référence), l'apo A-I et le RXR. Ces modulations géniques n'ont pas de répercussion au niveau protéique et tissulaire. Par ailleurs, chaque gène modulé agit dans une voie métabolique particulière dans laquelle les autres gènes ont une expression inchangée après contamination.

En conclusion de cette dernière étude, il apparaît que seules des modifications moléculaires de faible amplitude sont induites par une contamination interne au ^{137}Cs à une concentration post-accidentelle (6 500 Bq/l) depuis la vie fœtale jusqu'à l'âge adulte chez le rat. L'homéostasie du cholestérol est maintenue au niveau hépatique et systémique. Cet état biologique peut découler d'une non-toxicité du ^{137}Cs tout au long de la contamination ou bien d'une adaptation des individus à une perturbation antérieure.

DISCUSSION

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes attachés à évaluer et à décrire les conséquences biologiques d'une ingestion chronique de faibles niveaux d'UA ou de ^{137}Cs sur le métabolisme du cholestérol chez le rat. Un modèle expérimental de référence (le rat contaminé depuis l'âge adulte), et un modèle plus sensible (pathologique ou en croissance) ont été utilisés pour évaluer les effets de chaque radionucléide. Les analyses ont été menées au niveau systémique, ainsi qu'aux niveaux tissulaire et moléculaire dans le foie et le cerveau.

L'UA et le ^{137}Cs sont deux radionucléides possédant des caractéristiques physico-chimiques et radiologiques différentes, ainsi qu'un comportement spécifique dans l'organisme. Ainsi, l'UA possède une double toxicité chimique (du fait de sa qualité de métal lourd) et radiologique. La composante chimique de cette toxicité est considérée comme prépondérante sur la composante radiologique. L'UA émet principalement un rayonnement α délivrant une forte énergie aux cellules à son contact direct mais ayant une faible propagation dans les tissus biologiques, et donc un faible rayon d'action. Dans l'organisme, il est peu absorbé au niveau intestinal et il s'accumule principalement dans le rein et l'os, qui sont les cibles majeures de sa toxicité. Le cerveau est également un organe sensible à une contamination par l'UA, au même titre que d'autres métaux lourds comme le plomb ou le mercure. En revanche, le ^{137}Cs n'exerce qu'une très faible toxicité chimique et sa toxicité radiologique est due à l'émission de rayonnements de type β et γ . Il possède donc un rayon d'action beaucoup plus large que l'uranium dans les tissus biologiques qu'il traverse aisément. Autre différence, le césium est absorbé en quasi-totalité au niveau intestinal et il se distribue de façon relativement homogène dans l'organisme, avec une rétention à long terme préférentiellement dans le muscle squelettique.

Ainsi, en dépit du schéma de contamination commun aux deux radionucléides de ce projet, il paraît difficile de comparer directement les effets qu'ils induisent. Les impacts respectifs de l'UA et du ^{137}Cs sur le métabolisme du cholestérol après exposition chronique interne à faible niveau seront donc discutés séparément.

I. Effets de l'UA sur le métabolisme du cholestérol

A. Le modèle de référence : le rat contaminé depuis l'âge adulte

1. Paramètres généraux

La première étude de cette thèse a consisté à contaminer des rats adultes, âgés de 3 mois, avec une concentration non-néphrotoxique d'UA pendant 9 mois (approximativement 20 ans chez l'Homme).

Cette contamination n'a pas engendré de différence dans la consommation alimentaire et hydrique, ni sur le gain de poids au cours de l'exposition. Ces paramètres sont également inchangés 1 et 3 jours après injection sous-cutanée d'une dose néphrotoxique d'UA (11,5 mg/kg, contre 2

mg/kg/j pour notre étude) chez le rat (Gueguen 2006b). En revanche, la contamination chronique à faible niveau n'induit pas de modification du poids du foie chez les rats contaminés tandis qu'une diminution du ratio poids du foie/poids corporel est observée 3 jours après exposition aiguë à forte dose. Ceci confirme l'absence d'effet toxique d'une contamination interne à faible niveau sur l'état général de nos animaux.

Le bilan plasmatique de nos animaux (profil lipidique, marqueurs de l'atteinte hépatique, marqueurs de l'atteinte rénale) n'est pas perturbé après contamination chronique à l'UA. En particulier, l'absence de modification du taux plasmatique de la créatinine et de l'urée confirme l'absence de néphrotoxicité patente suite à notre schéma de contamination. En outre, le bilan hépatique des animaux contaminés (ALAT, ASAT, bilirubine totale et directe, γ GT) est normal. Ce résultat est en contradiction avec une précédente étude dans les mêmes conditions montrant une diminution des transaminases ALAT et ASAT (Souidi 2005). En outre, une diminution des transaminases est également observée après une contamination subchronique à forte dose (8-16 mg/kg pendant 4 semaines) chez le rat (Ortega 1989). La raison de la diminution des transaminases n'est pas clairement établie. Elle ne traduit pas une cytolysse hépatique comme l'augmentation de leur concentration plasmatique observée après exposition aiguë à forte dose (Gueguen 2006b). Elle pourrait être liée à une diminution de la synthèse protéique au niveau hépatique. L'absence de modifications des transaminases et des marqueurs de la fonction hépatique (bilirubine, γ GT) chez nos animaux contaminés indique qu'ils ne souffrent pas d'hépatotoxicité.

Le profil lipidique général est également inchangé après contamination interne chronique. Lors d'une ingestion chronique d'UA chez le rat, Souidi *et al* ont noté une augmentation légère mais significative de la cholestérolémie qui reste cependant dans les valeurs physiologiques observées au laboratoire (Souidi 2005). Un à trois jours après une contamination interne aiguë à forte dose, la cholestérolémie est inchangée, mais une diminution des triglycérides plasmatiques est observée (Gueguen 2006b). Ainsi, il semble que l'UA n'ait pas d'effet caractéristique sur le profil lipidique. Les variations d'effets entre les deux études chroniques sont peut-être dues à la cinétique d'accumulation de l'uranium. En effet, il a été montré que la concentration d'uranium dans le corps entier, les urines et certains organes comme le foie et le cerveau est variable au cours du temps lors d'expositions internes longues dans certains organes comme le foie (Paquet 2006). Par ailleurs, le plomb fournit l'exemple d'un autre métal lourd présentant les mêmes caractéristiques d'accumulation que l'UA (P'An 1989) et influant de manière variable sur la cholestérolémie. Ainsi, une hypercholestérolémie est décrite après exposition aiguë par injection intraveineuse chez le rat (Sumi 2007) mais pas après injection intramusculaire (Othman 1998). Parallèlement, l'ingestion chronique d'acétate de plomb pendant 2 à 6 semaines provoque une légère augmentation des paramètres du bilan hépatique dans le sang (ALAT, ASAT, γ GT, et phosphatase alcaline) mais pas de variations de la cholestérolémie (Shalan 2005).

Il semble donc que ni la radiotoxicité ni la toxicité chimique de métal lourd de l'UA n'exercent d'effets caractéristiques sur les paramètres généraux de santé et sur le profil plasmatique des animaux, mais plutôt que les effets produits dépendent de variations de paramètres différents comme la cinétique d'accumulation de l'UA. Dans le cas de notre étude,

après de 9 mois d'ingestion chronique de faibles quantités d'UA, les rats exposés ne présentent aucune altération de l'état général ni aucun signe d'hépatotoxicité et de néphrotoxicité. Ceci ne préjuge cependant pas de l'impact de l'UA au niveau tissulaire et moléculaire.

2. Paramètres tissulaires et moléculaires

a. Accumulation de l'UA dans les organes

Le dosage de l'UA dans le foie à l'issue de la contamination a permis de conclure qu'il y avait une accumulation d'UA dans cet organe sans que l'on puisse la quantifier. Ce résultat est donc à apprécier au niveau qualitatif, d'autant plus que l'accumulation de l'UA dans le foie (comme dans le cerveau) varie en fonction du temps et que la mesure au temps final ne saurait représenter l'historique de l'exposition du foie. Nous pouvons néanmoins conclure que la contamination a bien été réelle chez les rats exposés.

Le dosage de l'UA dans le cerveau n'a pas été réalisé à l'heure actuelle, néanmoins il est établi dans la littérature qu'une accumulation faible mais significative d'uranium est observée au niveau cérébral dans des conditions expérimentales similaires aux nôtres (Bussy 2006; Houpert 2007b; Paquet 2006).

L'accumulation tissulaire de l'UA dans les organes d'intérêt est un paramètre crucial de l'expérimentation car les effets radiotoxiques ou chimiotoxiques directs qu'il est susceptible d'engendrer affecteront les molécules à proximité immédiate d'une particule d'UA.

b. Effets tissulaires et moléculaires dans le foie

La concentration du cholestérol hépatique ainsi que le ratio fraction libre/fraction estérifiée sont inchangés suite à la contamination par l'UA. Ceci conforte le bilan plasmatique d'ordre physiologique de ces animaux. Le dosage du cholestérol cérébral doit être réalisé pour vérifier l'impact de la contamination dans cet organe. En effet, il n'y a à notre connaissance aucune étude rapportant influence de l'UA sur le cholestérol cérébral.

A titre de comparaison, d'autres métaux lourds influent sur le cholestérol hépatique. Ainsi, le cadmium induit une diminution de la concentration hépatique de cholestérol estérifié après ingestion chronique chez le rat (Larregle 2008). En outre, il diminue la fraction de cholestérol mitochondriale et augmente celle du noyau. Par ailleurs, le plomb est connu pour provoquer une augmentation du taux hépatique de cholestérol après exposition aiguë (Litcher 2000; Sumi 2007).

Ainsi, dans nos conditions expérimentales, l'UA ne modifie pas l'homéostasie du cholestérol hépatique. Les effets qu'il est susceptible de produire sur le métabolisme hépatique du cholestérol seront donc d'ordre moléculaire.

Dans le foie, le principal effet de la contamination à l'UA se traduit par une diminution de 60 % de l'activité de la CYP7A1 qui initie la voie classique de la biosynthèse des acides biliaires. L'impact de cette diminution est associé à la diminution équivalente du taux plasmatique de son produit, le 7 α -hydroxycholestérol. Ces effets sont en accord avec ceux observés 3 jours après une

injection sous-cutanée d'une forte concentration d'UA chez le rat : cette exposition conduit à une diminution de 52 % du taux plasmatique du 7 α -hydroxycholestérol. Une diminution importante mais non-significative de l'activité de la CYP7A1 est également rapportée dans cette étude (Gueguen 2006b). L'absence de variation de la transcription génique de la CYP7A1 et des facteurs de transcription contrôlant sa régulation suggère que cette diminution d'activité est due à une modification post-transcriptionnelle ou post-traductionnelle. De plus, cet effet semble isolé puisque la voie alternative de biosynthèse des acides biliaires n'est pas modifiée, comme le montre l'absence de variation de l'activité de la CYP27A1 et de la CYP7B1, deux enzymes-clés de cette voie.

D'un point de vue mécanistique, il est difficile d'expliquer cette altération de la CYP7A1 uniquement. En effet, les autres CYPs étudiés dans ce travail et dans d'autres études après ingestion chronique (Souidi 2005; Tissandie 2007) ou exposition aiguë (Gueguen 2006b) n'ont pas montré de modification de l'activité des CYPs impliqués dans le métabolisme du cholestérol, de la vitamine D ou des xénobiotiques. Une interaction de l'ion uranyle avec l'hème affecterait probablement d'autres CYPs. Une interaction avec le site catalytique de la CYP7A1 pourrait être une hypothèse à explorer. Enfin, il est possible que cette observation découle d'une interaction de l'UA sur une molécule intermédiaire et dont les effets se reflèteraient entre autres sur la CYP7A1 comme sur d'autres enzymes non-étudiées dans le cadre de ce projet. Cette action indirecte de l'UA pourrait affecter le système de phosphorylation/déphosphorylation, qui est un mécanisme établi de suppression de l'activité enzymatique de la CYP7A1 (Aguiar 2005; Tang 1986). Par ailleurs, une influence de l'UA sur le système ubiquitine-protéasome entraînant une augmentation de la dégradation d'une protéine dans le poumon a été suggérée (Malard 2005).

Outre cette diminution de l'activité de la CYP7A1 et du 7 α -hydroxycholestérol plasmatique, les autres effets observés sur le métabolisme hépatique du cholestérol suite à l'ingestion chronique d'UA sont des modifications d'expression génique affectant la CYP7B1 (dont l'activité n'est pas modifiée), les transporteurs ABC A1, ABC G5 et ABC G8 impliqués dans l'efflux du cholestérol vers le sang ou la bile, et le récepteur nucléaire RXR, dont aucun des partenaires d'hétérodimérisation impliqués dans le métabolisme du cholestérol n'est modulé. Ces modifications restent d'ordre génique car d'une part elles ne sont pas traduites au niveau protéique et d'autre part le taux du cholestérol hépatique est préservé.

c. Effets moléculaires dans le cerveau

En ce qui concerne les effets de l'UA sur le métabolisme cérébral du cholestérol, le profil d'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol est totalement différent de celui relevé dans le foie. L'expression de nombreux gènes impliqués dans toutes les voies du métabolisme du cholestérol cérébral excepté le stockage est affectée. Cette absence d'effet sur le stockage est en accord avec la très faible proportion de cholestérol estérifié dans le cerveau. Parmi les gènes modulés, seuls deux sont communs avec le foie : ABC A1, dont la transcription augmente dans les deux organes, et RXR, dont l'expression génique augmente dans le foie et diminue dans le cerveau. Excepté RXR, l'ensemble des gènes affectés par la contamination dans le cerveau voient

leur expression génique stimulée. Cette homogénéité suggère un mécanisme de compensation des voies entre elles, quelle que soit la cible initialement affectée par l'UA. Toutefois, il est nécessaire d'une part de vérifier si ces effets d'ordre génique sont répercutés au niveau de l'expression protéique et de l'activité enzymatique des différents acteurs, et d'autre part d'évaluer l'impact global sur la concentration cérébrale en cholestérol pour émettre cette hypothèse.

En définitive, deux points importants ressortent de la comparaison entre les effets au niveau du foie et du cerveau sur ce modèle de référence. Le premier point porte sur la différence de réponse des deux organes en termes de profil de modification et de cibles. Ceci vient souligner l'indépendance du métabolisme du cholestérol dans le cerveau par rapport au reste du corps.

Le second point important est un point commun aux deux tissus : il s'agit de la faible portée des effets observés, et en particulier de l'amplitude des modifications d'expression génique observées. Nos conditions de contamination ne provoquent pas de perturbation de l'homéostasie du cholestérol ni de l'état général des rats. Cet état de fait provient peut-être de la "robustesse" du modèle de référence : la contamination se fait sur un organisme sain, dont les mécanismes de régulation sont robustes. Nous avons donc orienté notre étude des effets d'une ingestion quotidienne d'UA vers un modèle pathologique, où l'homéostasie du cholestérol est déjà perturbée.

B. Comparaison entre le modèle de référence et le modèle pathologique (souris apo E-déficientes)

Nous avons donc procédé à la contamination par l'UA de souris invalidées pour le gène de l'apo E dans le but de voir si cette contamination pourrait aggraver l'hypercholestérolémie qui se déclare dès les premiers mois de la vie et les perturbations associées du métabolisme du cholestérol hépatique et cérébral (Kuipers 1996; Moghadasian 2001). Cette expérience étant réalisée pour la première fois, nous n'avons aucun repère préalable concernant l'effet potentiel de la radiotoxicité ni de la chimiotoxicité (pas d'études avec d'autres métaux lourds) sur ce modèle.

❖ Caractérisation du phénotype pathologique

L'utilisation d'un groupe de souris sauvages de même souche et de même âge nous a permis d'établir le phénotype des souris apo E^{-/-} associé au métabolisme hépatique du cholestérol à l'issue de la contamination.

A l'issue de l'étude, les souris mutées avaient une cholestérolémie 8 fois supérieure à celle des souris sauvages, le cholestérol plasmatique est majoritairement transporté dans des LDLs et non des HDLs comme chez les souris sauvages. Par ailleurs, le cholestérol total est augmenté. Ces observations sont en accord avec des travaux d'autres équipes (Kuipers 1996; Moghadasian 2001).

Chez les souris mutées, le cholestérol hépatique est augmenté et l'activité de la CYP27A1 initiant la voie alternative de biosynthèse des acides biliaires est également diminuée. En revanche,

l'activité de la CYP7A1 (initiant la voie classique) et de la CYP7B1 (indispensable à la voie alternative) reste inchangée malgré la mutation. Enfin, le profil d'expression génique dans le foie est largement perturbé, avec notamment une augmentation marquée de la transcription des gènes du LDL-r et d'ABC G1, et des modifications plus légères de gènes impliqués dans toutes les voies du métabolisme du cholestérol (diminution de HMG-CoA R, CYP27A1, ABC G5, apo A-I et PPAR γ , augmentation de CYP7B1, LXR α , FXR et PPAR α).

Les souris apo E^{-/-} non-contaminées présentent donc bien un phénotype hypercholestérolémique à l'âge de fin de la contamination.

1. Paramètres généraux

La consommation alimentaire et hydrique ainsi que le gain de poids ne sont pas affectés par la contamination chez les souris apo E-déficientes. En outre, l'UA n'aggrave pas l'hypercholestérolémie de ces souris après 3 mois de contamination. Les autres paramètres plasmatiques sont également similaires entre les deux groupes (souris mutées contaminées ou non). Au final, cette absence d'effet global de la contamination à l'UA sur les souris apo E^{-/-} rejoint les résultats du modèle de référence.

2. Paramètres tissulaires et moléculaires

Comme pour le modèle de référence, le dosage d'UA dans le foie permet de conclure à l'accumulation d'UA sans pouvoir la quantifier. Le dosage d'UA dans le cerveau est à effectuer.

a. Effets tissulaires et moléculaires dans le foie

La contamination à l'UA ne modifie pas la concentration hépatique du cholestérol, comme dans le modèle de référence. *A contrario*, il n'y a pas de modulation de l'activité enzymatique de la CYP7A1 comme chez les rats adultes. Cette différence entre les deux modèles pourrait être due à plusieurs paramètres expérimentaux comme la différence d'espèce (et plus particulièrement la différence d'importance respective des deux voies de biosynthèse des acides biliaires chez le rat et la souris) ou la différence d'âge et/ou de temps de contamination.

Le profil d'expression génique du métabolisme du cholestérol hépatique révèle que seuls 4 gènes sont modifiés après contamination : CYP7B1, LXR α , RXR et HNF 4 α . Tous voient leur expression génique diminuer faiblement (de 20 à 30 %). Parmi ces gènes, celui de la CYP7B1 diminuait également chez les rats adultes sans modification de son activité enzymatique. L'expression génique de RXR était également affectée chez le modèle de référence, mais elle augmentait chez le rat tandis qu'elle diminue chez les souris apo E-déficientes. Comme pour les rats adultes, les modifications d'expression génique sont de faible amplitude et ne sont pas répercutées au niveau protéique, ce qui est en accord avec l'absence de variation de la concentration tissulaire et systémique du cholestérol. L'impact de la contamination à l'UA sur le

métabolisme hépatique du cholestérol est donc très faible, même sur un modèle fragilisé par une pathologie lipidique.

b. Effets tissulaires et moléculaires dans le cerveau

La concentration du cholestérol cérébral des souris apo E^{-/-} n'est pas modifiée suite à la contamination par l'UA. Cette donnée sera à comparer avec celle du rat contaminé pendant 9 mois une fois le dosage du cholestérol cérébral effectué dans ce modèle.

Le profil d'expression génique dans le cerveau a révélé l'augmentation concernant trois gènes : HMG-CoA R, SREBP 2 et PPAR γ . L'augmentation de la transcription du gène de l'HMG-CoA R pourrait être provoquée par celle de SREBP 2, cependant il convient de vérifier le niveau de protéine mature de SREBP 2 pour pouvoir conclure sur ce point.

Ce profil diffère à la fois du profil hépatique des souris (confirmant notre remarque sur le modèle de référence) et du profil cérébral des rats adultes. L'observation concernant la faible amplitude des effets est de nouveau valable ici.

Ainsi donc, les effets d'une contamination interne chronique par de faibles doses d'UA sur le métabolisme hépatique et cérébral du cholestérol sont essentiellement des effets d'ordre génique, affectant un ou deux acteurs d'une voie métabolique sans la moduler entièrement. L'homéostasie tissulaire et systémique du cholestérol est préservée, aussi bien chez le modèle robuste du rat adulte sain que chez le modèle de souris transgénique fragilisée par une hypercholestérolémie. Concernant ce dernier modèle, il est possible que l'ampleur des perturbations engendrées par l'hypercholestérolémie due à la mutation ait masqué certains effets de l'UA. La contamination de souris de souche sauvage selon le même protocole permettrait de s'affranchir de la différence d'espèce et des variations métaboliques qui y sont associées, et donc de déterminer la part des effets de l'UA liée à l'espèce et celle liée à la pathologie.

II. Effets du césium-137 sur le métabolisme du cholestérol

L'altération de certains paramètres hépatiques par le ¹³⁷Cs a été décrite dans plusieurs études, en particulier après exposition aiguë à des doses relativement fortes. Ainsi, après une irradiation à 25 ou 75 Gy, une nécrose cellulaire et des lésions des veines hépatiques sont visibles chez le rat, en association avec une atteinte fonctionnelle mise en évidence par une augmentation du temps de rétention hépatique du rose Bengale (Geraci 1991). Par ailleurs, le foie peut également être atteint par répercussion de l'atteinte d'un autre organe. Ainsi, une atteinte intestinale peut provoquer une hépatotoxicité *via* le cycle entéro-hépatique des acides biliaires en cas de déséquilibre de la composition du pool d'acides biliaires (Mouiseddine 2009). Ceci est d'ailleurs confirmé par une autre étude montrant des perturbations d'activités des 4 CYPs majeurs de la synthèse des acides biliaires après irradiation externe à forte dose (Souidi 2007). Par ailleurs, des atteintes hépatiques sont décrites chez les liquidateurs suite à l'accident de Tchernobyl (Komarenko 1999; Shkala 1998; Tribat 1999). Ces observations ouvrent la voie à une possibilité d'atteinte hépatique suite à une contamination à faible dose.

Comme pour l'UA, l'évaluation des effets du ¹³⁷Cs sur le métabolisme du cholestérol après ingestion chronique d'une dose post-accidentelle a débuté par une étude sur le modèle de référence du programme ENVIRHOM, à savoir le rat contaminé depuis l'âge adulte.

A. Le modèle de référence : le rat contaminé depuis l'âge adulte

1. Paramètres généraux

Les paramètres généraux de prise alimentaire, consommation hydrique et gain de poids mesurés de façon hebdomadaire ne diffèrent pas entre les deux groupes de rats au fil de la contamination. Cette observation est similaire à celle faite lors d'une contamination de 3 mois (Souidi 2006). En revanche, des animaux soumis à une irradiation externe à forte dose par un rayonnement γ ont une consommation alimentaire et une prise de poids plus faible que les animaux non-irradiés (Feurgard 1999; Pradeep 2008; Scanff 2004; Souidi 2007).

Le profil plasmatique (lipides, transaminases, marqueurs de la fonction hépatique) n'est pas affecté après 9 mois de contamination interne au ¹³⁷Cs chez nos animaux. C'était déjà le cas lors d'une étude précédente dans laquelle les animaux étaient contaminés dans les mêmes conditions pendant 3 mois (Souidi 2006; Tissandie 2006a). Une perturbation du profil lipidique, et en particulier une hypercholestérolémie, a été mise en évidence chez les liquidateurs de Tchernobyl exposés à une irradiation interne et externe à une forte dose lors du nettoyage du site de l'accident (Chaialo 1991). En ce qui concerne les transaminases, une augmentation de leur taux plasmatique en corrélation avec une atteinte hépatique a été décrite après une irradiation externe à forte dose (Mouiseddine 2009) et après un gavage de 1,16 μ Ci de ¹³⁷Cs chez le rat (Stojadinovic 1966). Par ailleurs, une augmentation de

ces paramètres est observée chez les liquidateurs (Shkala 1998), tandis qu'une diminution des transaminases et de la bilirubine totale a été rapportée chez les enfants des territoires contaminés (Sychik 1999). Ces résultats indiquent que l'intégrité et la fonction hépatique sont probablement altérées après une exposition à de fortes doses de radiations ionisantes.

Ainsi, dans nos conditions expérimentales les paramètres généraux, et en particulier la cholestérolémie, sont préservés après une contamination chronique. Ceci suggère que la quantité de ¹³⁷Cs ingérée par nos animaux n'entraîne pas de toxicité avérée.

2. Paramètres tissulaires et moléculaires

a. Accumulation du Cs dans le foie

La mesure du ¹³⁷Cs dans le foie en fin de contamination a permis de confirmer la réalité de l'exposition et du faible niveau accumulé dans le foie (6,9 Bq/g de foie, soit 6,7 mGy sur 9 mois). Comme pour l'UA, cette valeur est mesurée à l'issue des 9 mois de contamination et ne préjuge pas de la cinétique d'accumulation réelle dans le foie au cours de cette période.

b. Effets tissulaires et moléculaires dans le foie

Les concentrations de cholestérol hépatique (total, libre et estérifié) ne sont pas modifiées suite à la contamination dans notre étude, ce qui confirme les résultats obtenus à 3 mois de contamination (Souidi 2006).

Le profil d'expression génique des acteurs du métabolisme hépatique du cholestérol a révélé une altération de quatre d'entre eux : ACAT 2, apo E et LXRA diminuent tandis que RXR augmente. Ces modifications sont d'amplitude faible (40 % au maximum) et ne sont pas répercutées sur l'expression protéique en ce qui concerne l'apo E et les deux récepteurs nucléaires. La diminution de la transcription de l'ACAT n'a pas de conséquences au niveau de la concentration de cholestérol estérifié comme nous l'avons vu précédemment. LXRA était déjà affecté au niveau génique après 3 mois de contamination, mais sa transcription était activée (Souidi 2006). C'est le seul gène dont la transcription est modulée dans les deux études, à l'exception de l'ACAT 2 pour laquelle il n'y a pas de données à 3 mois. On remarque par ailleurs que la transcription de RXR est de nouveau modulée, après les différentes études sur l'UA.

L'activité enzymatique de la CYP27A1 et de la CYP7A1 ne présente pas de modification après 9 mois de contamination au ¹³⁷Cs. Ceci est en opposition avec l'augmentation d'activité de la CYP27A1 à 3 mois (Souidi 2006) Ainsi, comme l'UA, le ¹³⁷Cs entraîne des effets biologiques essentiellement au niveau génique sans conséquence tissulaire.

c. Effets tissulaires et moléculaires dans le cerveau

Dans le cerveau, le cholestérol total et ses fractions libre et estérifiée ne sont pas modulés après 9 mois de contamination par le ¹³⁷Cs. On sait cependant que le cholestérol cérébral peut être modifié par une exposition chronique : une diminution du taux de cholestérol dans le cerveau a été décrite après une irradiation externe fractionnée correspondant à une dose cumulée de 20 Gy sur 5 mois (Semenova 1997).

Au niveau génique, seuls deux gènes subissent des modifications de leur transcription : l'ACAT 1 et la CYP27A1. On retrouve donc une diminution de la transcription de l'ACAT comme dans le foie. Cette variation dans le même sens, avec une amplitude similaire, est importante au même titre que celle de la CYP7B1 pour l'UA : il s'agit dans les deux cas d'une altération "corrélée" dans deux organes où le métabolisme du cholestérol est indépendant. La diminution affectant la CYP27A1 n'a pas de conséquence visible sur l'homéostasie générale du cholestérol cérébral. Par ailleurs, le taux d'ARNm de la CYP27A1 n'était pas modifié après 3 mois de contamination (Tissandie 2006a).

Suite à ces différents résultats, on constate que les gènes affectés par la contamination au ¹³⁷Cs sont les seuls de leur voie métabolique à être altérés, ce qui exclut toute activation ou répression d'une voie métabolique entière. Ceci suggère donc des effets de type stochastique. Une hypothèse d'action du ¹³⁷Cs pour expliquer la nature de ces effets serait celle du stress oxydant. En effet, il est bien établi qu'une irradiation externe ou interne par les rayonnements ionisants (et en particulier les rayonnements γ) produit une augmentation du stress oxydant, notamment sous forme de peroxydation lipidique. Celle-ci a été relevée chez les liquidateurs (Souchevitch 1997) et chez les enfants de Tchernobyl (Neyfakh 1998a; Neyfakh 1998b), mais également chez les rongeurs ou le bétail des territoires contaminés (Chobot'ko 1999; Mirzoev 1999). Le stress oxydant est connu pour interférer avec l'ADN et pourrait donc être à l'origine de ces diverses modulations transcriptionnelles. Par exemple, une modification du taux d'ARNm de plusieurs CYPs impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques a été décrite après induction d'un stress oxydant (Barker 1994; Nagai 2004), ce qui pourrait également être le cas avec la diminution transcriptionnelle de la CYP27A1 observée dans le cerveau des rats adultes.

Au final, on constate que les modifications du métabolisme du cholestérol après 9 mois de contamination au ¹³⁷Cs ne correspondent pas à une aggravation de celles observées à 3 mois. Dans les deux cas l'homéostasie systémique et tissulaire du cholestérol est préservée, les effets induits sont d'ordre moléculaire et ils n'ont pas de conséquence physiopathologique autre que la modulation de la transcription de certains gènes. Comme pour l'UA, on ne peut écarter l'hypothèse d'une relative insensibilité à la contamination due à la robustesse du modèle de référence. Nous avons donc poursuivi cette étude par l'analyse de l'impact d'une telle contamination sur un modèle plus sensible.

B. Le modèle en croissance : le rat contaminé depuis la vie fœtale

Le choix du modèle en croissance comme modèle sensible découle du côté sociétal de cette étude. Ce choix nous permet de reproduire l'exposition d'une catégorie particulière au sein des populations vivant sur les territoires contaminés, à savoir les enfants nés après l'accident de parents exposés au ¹³⁷Cs (et qui n'ont donc reçu aucune irradiation à forte dose). Le métabolisme du cholestérol jouant un rôle important dans l'embryogénèse et le développement, une contamination dès la vie fœtale pourrait avoir un impact délétère sur les rats. Par ailleurs, il existe une évolution de différents paramètres de ce métabolisme durant la période de croissance (post-natale) par rapport à l'âge adulte (Cuesta de Juan 2007). Le modèle de contamination choisi offre donc plusieurs aspects promouvant une sensibilité au ¹³⁷Cs différente de celle observée chez le modèle de référence.

1. Paramètres généraux

Les paramètres généraux de prise alimentaire, consommation hydrique et gain de poids mesurés de façon hebdomadaire ne diffèrent pas entre les deux groupes de rats au fil de la contamination. Le profil lipidique de même que les marqueurs de l'atteinte hépatique ne sont pas modifiés après contamination par le ¹³⁷Cs. Au niveau général, il apparaît donc que la contamination par le ¹³⁷Cs n'a pas d'impact plus fort chez les rats contaminés depuis la vie fœtale (dénommés ci-après "*in utero*") que chez les rats contaminés depuis l'âge adulte.

2. Paramètres tissulaires et moléculaires dans le foie

a. Accumulation du Cs dans le foie

Le dosage du ¹³⁷Cs dans le foie des rats à l'issue de la contamination résulte en une concentration de $5,5 \pm 0,57$ Bq/g de foie chez les rats exposés (soit 5,9 mGy sur 10 mois), tandis que la valeur pour les rats témoins est inférieure à la limite de détection. La concentration chez les rats "*in utero*" est légèrement inférieure à celle des rats adultes bien que le temps de contamination soit plus long d'un mois. Cependant, la différence est minime et l'on peut considérer que la concentration finale est similaire dans les deux études.

b. Effets tissulaires et moléculaires dans le foie

Le taux de cholestérol hépatique est inchangé après contamination chez les rats "*in utero*", de même que le ratio cholestérol libre/cholestéryl esters. La contamination durant l'embryogénèse et le développement n'a pas donc pas d'impact biologique particulier à long terme.

Au niveau génique, on relève une diminution de la transcription de l'apo A-I. Deux autres gènes sont également affectés par cette contamination : l'ACAT 2 et RXR. Ces deux gènes étaient déjà modifiés dans le modèle de référence. Dans un cas comme dans l'autre, il est difficile d'expliquer cette sensibilité particulière de ces gènes au ¹³⁷Cs. Comme pour les rats contaminés à l'âge adulte, ces effets n'ont qu'une portée génique, puisque la diminution observée n'est pas confirmée par

l'expression protéique de RXR et de l'apo A-I, tandis que la fraction estérifiée du cholestérol hépatique reste inchangée après contamination. Enfin, l'activité de la CYP7A1 hépatique est inchangée à l'issue de la contamination chez les rats exposés par rapport aux témoins. En revanche, on note une augmentation de l'activité enzymatique de la CYP27A1 hépatique (sans modification de son expression génique). Le ¹³⁷Cs n'ayant qu'une très faible toxicité chimique, l'hypothèse d'une interaction directe de l'ion Cs⁺ avec une molécule est peu probable. En ce qui concerne l'éventualité d'une action indirecte, par exemple *via* l'augmentation du stress oxydant, elle pourrait affecter les systèmes d'inactivation de l'enzyme par phosphorylation/déphosphorylation, ou encore conduire à une diminution de sa dégradation (par exemple *via* le système ubiquitine-protéasome).

Ainsi, la contamination en continu de rats dès la vie fœtale jusqu'à un âge adulte n'induit pas de modification de l'état général des rats, ni d'altération de l'homéostasie du cholestérol au niveau sanguin et hépatique. En ce qui concerne le métabolisme du cholestérol dans le foie, seule l'expression de quelques gènes isolés est modulée comme cela a déjà été observé pour le modèle de référence. Deux hypothèses peuvent expliquer ces résultats : ou bien la contamination dans nos conditions expérimentales ne provoque pas d'effet particulier sur le métabolisme du cholestérol, ou bien il y a effectivement un impact de la contamination mais celui-ci est effacé par une adaptation de l'animal à son contaminant de longue durée. D'autres schémas de contamination permettront de départager ces deux hypothèses.

CONCLUSION GENERALE

Cette thèse a permis d'effectuer un travail exploratoire dans le cadre du programme ENVIRHOM de l'IRSN visant à évaluer et décrire les effets d'une contamination interne chronique à faible niveau par l'UA ou le ^{137}Cs sur le métabolisme du cholestérol chez le rat. Les différentes études réalisées ont permis de mettre en évidence les points suivants :

- ✓ L'état général des animaux est préservé malgré la contamination, quelque soit le radionucléide testé. En particulier, l'homéostasie du cholestérol est conservée aux niveaux systémique et tissulaire dans tous les modèles animaux étudiés.
- ✓ La plupart des effets induits sont d'ordre génique et n'ont pas de répercussion à l'échelle cellulaire ou tissulaire.
- ✓ Bien qu'ayant des propriétés physico-chimiques, biocinétiques et radiologiques différentes, les effets de l'UA et du ^{137}Cs sont de portée similaire mais différent sur l'identité de leurs cibles biologiques dans le métabolisme du cholestérol.
- ✓ Le gène du récepteur nucléaire RXR (impliqué dans la régulation du métabolisme du cholestérol) semble sensible aux radionucléides car il est modulé dans tous les modèles, et parfois dans le foie et le cerveau d'un même modèle.
- ✓ Le gène de la CYP7B1 (impliquée dans le catabolisme du cholestérol) chez les modèles contaminés à l'UA, et celui de l'ACAT 1 ou 2 (enzymes de stockage) chez les rats contaminés au ^{137}Cs semblent être des cibles particulières de leur radionucléide respectif car ils varient de façon similaire d'un modèle à l'autre et d'un organe à l'autre. Cependant, les mécanismes moléculaires d'une éventuelle action déterministe des radionucléides sur ces gènes sont inconnus.

En conclusion, ce travail de thèse a permis de démontrer l'absence de toxicité concernant le métabolisme du cholestérol chez les animaux après une contamination interne chronique de faible niveau par l'UA ou le ^{137}Cs . Dans nos conditions expérimentales, les radionucléides étudiés n'altèrent ni l'homéostasie systémique du cholestérol, ni son métabolisme au niveau tissulaire. Les effets induits sont d'ordre moléculaire et restent d'amplitude physiologique, suggérant l'adaptation de l'animal à la contamination à long terme.

Il convient toutefois de préciser que ces observations découlent directement de nos conditions expérimentales et qu'elles ne peuvent pas être extrapolées à l'Homme telles quelles. Un suivi épidémiologique du bilan plasmatique à long terme (au moins pour le ^{137}Cs) indiquerait dans quelle mesure les résultats de cette thèse pourraient être transposés du rongeur à l'Homme.

PERSPECTIVES

Les études réalisées au cours de cette thèse ont permis de répondre à la problématique posée. En effet, nous avons décrit les effets biologiques induits après une exposition interne à long terme par de l'UA et le ^{137}Cs sur le métabolisme du cholestérol. Ces effets sont peu nombreux, semblent peu spécifiques du contaminant et ne dépassent pas l'amplitude d'une réponse à des modulations physiologiques. Le fait de faire notre étude à un temps si long a pu masquer une éventuelle perturbation précoce plus forte à laquelle les animaux se seraient adaptés. Cette hypothèse reste à vérifier avant d'étudier un éventuel mécanisme d'action pouvant expliquer les modulations de faible amplitude que nous avons observées.

Ainsi, les résultats de ce travail de thèse ouvrent plutôt des perspectives à long terme. Nous pouvons d'ores et déjà définir deux perspectives communes aux deux radionucléides étudiés et une spécifique de chacun d'entre eux.

*** Perspectives communes aux deux radionucléides**

➤ Poursuivre l'étude des modèles sensibles

Les deux modèles sensibles que nous avons utilisés mettent chacun en jeu une forme particulière de "fragilisation" du métabolisme du cholestérol. Ainsi, les conclusions émises sur l'impact de l'UA chez des souris hypercholestérolémiques et sur celui du ^{137}Cs lors du développement et la croissance ne peuvent pas s'étendre *a priori* au-delà de ces modèles particuliers. Ainsi, il serait intéressant d'inverser les modèles et les contaminations associés dans cette thèse, c'est-à-dire d'examiner l'impact sur le métabolisme du cholestérol chez des souris hypercholestérolémiques exposées au ^{137}Cs et sur des rats contaminés par l'UA de la vie fœtale à l'âge adulte en continu. L'intérêt de ces nouvelles études est conforté par des éléments scientifiques importants.

En ce qui concerne l'étude proposée pour l'UA, nous avons vu précédemment l'importance du cholestérol dans l'embryogénèse et le développement. Diverses maladies causées par une perturbation du métabolisme du cholestérol d'origine génétique affectent de façon drastique le développement des enfants et sont parfois létales au bout de quelques années de vie seulement. Ainsi, le caractère génotoxique et mutagène de l'UA pourrait avoir une influence néfaste sur le métabolisme du cholestérol et donc avoir des répercussions physiopathologiques importantes en cas d'exposition prolongée depuis la vie fœtale.

En ce qui concerne l'étude proposée pour le ^{137}Cs , il est admis qu'à forte dose il provoque une athérosclérose chez des sujets sains (sans pathologies cardiovasculaires), comme l'a montré une étude menée chez les survivants des bombardements atomiques de 1945 au Japon. Ainsi, l'impact du ^{137}Cs à des doses plus faibles mais sur un organisme déjà prédisposé à l'athérosclérose pourrait aggraver ou accélérer l'apparition de la pathologie.

➤ Etudier la cinétique des effets induits par les radionucléides

Une des hypothèses que nous avons émises au cours de l'analyse de nos résultats est celle d'une adaptation des animaux à une perturbation d'amplitude plus forte et à laquelle ils se seraient adaptés à la faveur de la chronicité de l'exposition. Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions ré-éditer le schéma de contamination déjà testé, mais en évaluant les principaux paramètres du métabolisme du cholestérol à intervalle régulier (par exemple tous les 15 jours) en début de contamination. Ceci permettrait soit de valider notre hypothèse d'une adaptation des animaux à une perturbation précoce, soit de vérifier s'il y a un impact avéré des radionucléides sur le métabolisme du cholestérol à quelque moment que ce soit au cours de cette contamination prolongée.

✱ Perspective spécifique de l'UA

➤ Etudier la part de la chimiotoxicité et la part de radiotoxicité dans les effets observés.

La faible amplitude des effets observés pourrait découler du fait que nous avons utilisé de l'uranium appauvri, qui n'est que faiblement radioactif et dont la toxicité prépondérante est la toxicité chimique. Cependant, il est possible qu'une augmentation de la radiotoxicité provoque des effets plus marqués, voire néfastes, sur notre métabolisme d'étude. Pour déterminer la part de la radiotoxicité dans nos résultats, il pourrait être intéressant de renouveler la contamination suivant le même schéma mais en utilisant de l'uranium enrichi à différents degrés (4 %, 12 % ...). La contamination à l'UA servirait de témoin pour l'effet radiotoxique puisque l'UA et l'UE possèdent la même toxicité chimique.

✱ Perspective spécifique du ^{137}Cs

➤ Améliorer le schéma de contamination par rapport à la situation réelle due à l'accident de Tchernobyl en tenant compte de la multipollution

L'étude que nous avons réalisée sur le ^{137}Cs était basée sur le fait que celui-ci représente la majeure source de radiations ionisantes à l'heure actuelle sur les territoires contaminés. Cependant, il faut garder en mémoire que c'est un mélange de radionucléides qui a été dispersé dans l'environnement. Plusieurs d'entre eux possèdent des demi-vies radiologiques et des activités spécifiques plus fortes que celles du ^{137}Cs même s'ils se sont déposés en plus faible quantité. D'autre part, il est possible que le mélange de plusieurs radionucléides ait un effet synergique. Ainsi, il serait intéressant d'évaluer les effets d'une contamination par un mélange de radionucléides dans les proportions retrouvées dans les zones contaminées. Par exemple, le ^{137}Cs pourrait être couplé avec du ^{90}Sr (strontium-90), le deuxième radionucléide le plus dispersé par l'explosion du réacteur.

BIBLIOGRAPHIE

- Abou-Donia MB, Dechkovskaia AM, Goldstein LB, Shah DU, Bullman SL, Khan WA (2002). Uranyl acetate-induced sensorimotor deficit and increased nitric oxide generation in the central nervous system in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 72(4): 881-90.
- Agalesdes P, Manesse D, Philippe M, Israël F, Robeau D (2000). Inventaire des sources de césium. . in *Le Césium, de l'environnement à l'Homme*. Robeau D, Daburon F, Métivier H. Paris, EDP Sciences.
- Aghajanyan A, Suskov I (2009). Transgenerational Genomic Instability in Children of Irradiated Parents as a Result of the Chernobyl Nuclear Accident Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis sous presse (doi:10.1016/j.mrfmmm.2009.08.012).
- Aguiar M, Masse R, Gibbs BF (2005). Regulation of cytochrome P450 by posttranslational modification. *Drug Metab Rev* 37(2): 379-404.
- Akiyama TE, Meinke PT, Berger JP (2005). PPAR ligands: potential therapies for metabolic syndrome. *Curr Diab Rep* 5(1): 45-52.
- Albina ML, Belles M, Linares V, Sanchez DJ, Domingo JL (2005). Restraint stress does not enhance the uranium-induced developmental and behavioral effects in the offspring of uranium-exposed male rats. *Toxicology* 215(1-2): 69-79.
- Altmann SW, Davis HR, Jr., Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, Iyer SP, Maguire M, Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N, Graziano MP (2004). Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 303(5661): 1201-4.
- Andersson S, Davis DL, Dahlback H, Jornvall H, Russell DW (1989). Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme. *J Biol Chem* 264(14): 8222-9.
- Anspaugh LR (2007). Doses to members of the general public and observed effects on biota: Chernobyl Forum update. *J Environ Radioact* 96(1-3): 13-9.
- Archer VE, Renzetti AD, Doggett RS, Jarvis JQ, Colby TV (1998). Chronic diffuse interstitial fibrosis of the lung in uranium miners. *J Occup Environ Med* 40(5): 460-74.
- Arfsten DP, Bekkedal M, Wilfong ER, Rossi J, 3rd, Grasman KA, Healey LB, Rutkiewicz JM, Johnson EW, Thitoff AR, Jung AE, Lohrke SR, Schaeffer DJ, Still KR (2005). Study of the reproductive effects in rats surgically implanted with depleted uranium for up to 90 days. *J Toxicol Environ Health A* 68(11-12): 967-97.
- Arfsten DP, Schaeffer DJ, Johnson EW, Robert Cunningham J, Still KR, Wilfong ER (2006). Evaluation of the effect of implanted depleted uranium on male reproductive success, sperm concentration, and sperm velocity. *Environ Res* 100(2): 205-15.
- Arfsten DP, Still KR, Wilfong ER, Johnson EW, McInturf SM, Eggers JS, Schaeffer DJ, Bekkedal MY (2009). Two-generation reproductive toxicity study of implanted depleted uranium (DU) in CD rats. *J Toxicol Environ Health A* 72(6): 410-27.
- Arfsten DP, Wilfong ER, Bekkedal MY, Johnson EW, McInturf SM, Eggers JS, Schaeffer DJ, Still KR (2007). Evaluation of the effect of implanted depleted uranium (DU) on adult rat behavior and toxicological endpoints. *J Toxicol Environ Health A* 70(23): 1995-2010.
- Arnault E, Doussau M, Pesty A, Gouget B, Van der Meeren A, Fouchet P, Lefevre B (2008). Natural uranium disturbs mouse folliculogenesis in vivo and oocyte meiosis in vitro. *Toxicology* 247(2-3): 80-7.
- ATSDR (1999). Toxicological Profile for Ionizing Radiation Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), U.S. Department of health and human services, Public Health Service Atlanta, GA
- ATSDR (2004a). Toxicological Profile for Cesium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), U.S. Department of health and human services, Public Health Service Atlanta, GA
- ATSDR (2004b). Toxicological profile for cesium. In: Toxicological profile. US, department of health and human services. Public health service. Agency for toxic Substances and Disease Registry, Atlanta.
- Avramoglu RK, Adeli K (2004). Hepatic regulation of apolipoprotein B. *Rev Endocr Metab Disord* 5(4): 293-301.
- Axelsson M, Sjoval J (1990). Potential bile acid precursors in plasma--possible indicators of biosynthetic pathways to cholic and chenodeoxycholic acids in man. *J Steroid Biochem* 36(6): 631-40.
- Axen E, Postlind H, Wikvall K (1995). Effects on CYP27 mRNA expression in rat kidney and liver by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3, a suppressor of renal 25-hydroxyvitamin D3 1 alpha-hydroxylase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 215(1): 136-41.
- Babiker A, Andersson O, Lindblom D, van der Linden J, Wiklund B, Lutjohann D, Diczfalusy U, Bjorkhem I (1999). Elimination of cholesterol as cholestenic acid in human lung by sterol 27-hydroxylase: evidence that most of this steroid in the circulation is of pulmonary origin. *J Lipid Res* 40(8): 1417-25.
- Babiker A, Diczfalusy U (1998). Transport of side-chain oxidized oxysterols in the human circulation. *Biochim Biophys Acta* 1392(2-3): 333-9.
- Baldan A, Bojanic DD, Edwards PA (2009). The ABCs of sterol transport. *J Lipid Res* 50 Suppl: S80-5.
- Ballou JE, Thompson RC (1958). Metabolism of cesium-137 in the rat comparison of acute and chronic administration experiments. *Health Phys* 1(1): 85-9.
- Bandazhevskaya GS, Nesterenko VB, Babenko VI, Yerkovich TV, Bandazhevsky YI (2004). Relationship between caesium (137Cs) load, cardiovascular symptoms, and source of food in 'Chernobyl' children -- preliminary observations after intake of oral apple pectin. *Swiss Med Wkly* 134(49-50): 725-9.
- Bandazhevsky YI (2003). Chronic Cs-137 incorporation in children's organs. *Swiss Med Wkly* 133(35-36): 488-90.
- Bar Joseph N, Reisfeld D, Tirosh E, Silman Z, Rennert G (2004). Neurobehavioral and cognitive performances of children exposed to low-dose radiation in the Chernobyl accident: the Israeli Chernobyl Health Effects Study. *Am J Epidemiol* 160(5): 453-9.

- Baranov AE, Davtian AA, Gordeeva AA, Nugis V, Gusev IA, Gus'kova AK (2004). [Case of chronic radiation sickness with subsequent leukemia in track driver subjected to long-external gamma-irradiation (cesium-137)]. *Med Tr Prom Ekol*(3): 36-40.
- Baranowski M (2008). Biological role of liver X receptors. *J Physiol Pharmacol* 59 Suppl 7: 31-55.
- Barber DS, Ehrich MF, Jortner BS (2005). The effect of stress on the temporal and regional distribution of uranium in rat brain after acute uranyl acetate exposure. *J Toxicol Environ Health A* 68(2): 99-111.
- Barber DS, Hancock SK, McNally AM, Hinckley J, Binder E, Zimmerman K, Ehrich MF, Jortner BS (2007). Neurological effects of acute uranium exposure with and without stress. *Neurotoxicology* 28(6): 1110-9.
- Barillet S, Adam C, Palluel O, Devaux A (2007). Bioaccumulation, oxidative stress, and neurotoxicity in Danio rerio exposed to different isotopic compositions of uranium. *Environ Toxicol Chem* 26(3): 497-505.
- Barker CW, Fagan JB, Pasco DS (1994). Down-regulation of P4501A1 and P4501A2 mRNA expression in isolated hepatocytes by oxidative stress. *J Biol Chem* 269(6): 3985-90.
- Bavner A, Sanyal S, Gustafsson JA, Treuter E (2005). Transcriptional corepression by SHP: molecular mechanisms and physiological consequences. *Trends Endocrinol Metab* 16(10): 478-88.
- Bayazit V (2004). Cytotoxic effects of some animal and vegetable extracts and some chemicals on liver and colon carcinoma and myosarcoma. *Saudi Med J* 25(2): 156-63.
- Belles M, Albina ML, Linares V, Gomez M, Sanchez DJ, Domingo JL (2005). Combined action of uranium and stress in the rat. I. Behavioral effects. *Toxicol Lett* 158(3): 176-85.
- Bensoussan H, Grancolas L, Dhieux-Lestaevél B, Delissen O, Vacher CM, Dublineau I, Voisin P, Gourmelon P, Taouis M, Lestaevél P (2009). Heavy metal uranium affects the brain cholinergic system in rat following sub-chronic and chronic exposure. *Toxicology* 261(1-2): 59-67.
- Berradi H, Bertho JM, Dudoignon N, Mazur A, Grandcolas L, Baudelin C, Grison S, Voisin P, Gourmelon P, Dublineau I (2008). Renal anemia induced by chronic ingestion of depleted uranium in rats. *Toxicol Sci* 103(2): 397-408.
- Bertho JM, Roy L, Souidi M, Benderitter M, Bey E, Racine R, Fagot T, Gourmelon P (2009). Initial evaluation and follow-up of acute radiation syndrome in two patients from the Dakar accident. *Biomarkers* 14(2): 94-102.
- Bertho JM, Roy L, Souidi M, Benderitter M, Gueguen Y, Lataillade JJ, Prat M, Fagot T, De Revel T, Gourmelon P (2008). New biological indicators to evaluate and monitor radiation-induced damage: an accident case report. *Radiat Res* 169(5): 543-50.
- Bhalla S, Ozalp C, Fang S, Xiang L, Kemper JK (2004). Ligand-activated pregnane X receptor interferes with HNF-4 signaling by targeting a common coactivator PGC-1alpha. Functional implications in hepatic cholesterol and glucose metabolism. *J Biol Chem* 279(43): 45139-47.
- Bhattacharyya AK, Lin DS, Connor WE (2007). Cholesterol metabolism in patients with cerebrotendinous xanthomatosis: absorption, turnover, and tissue deposition. *J Lipid Res* 48(1): 185-92.
- Biddinger SB, Haas JT, Yu BB, Bezy O, Jing E, Zhang W, Unterman TG, Carey MC, Kahn CR (2008). Hepatic insulin resistance directly promotes formation of cholesterol gallstones. *Nat Med* 14(7): 778-82.
- Bishop-Bailey D, Wray J (2003). Peroxisome proliferator-activated receptors: a critical review on endogenous pathways for ligand generation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 71(1-2): 1-22.
- Bjorkhem I (2006). Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain. *J Intern Med* 260(6): 493-508.
- Bjorkhem I, Andersson O, Diczfalusy U, Sevastik B, Xiu RJ, Duan C, Lund E (1994). Atherosclerosis and sterol 27-hydroxylase: evidence for a role of this enzyme in elimination of cholesterol from human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(18): 8592-6.
- Bjorkhem I, Araya Z, Rudling M, Angelin B, Einarsson C, Wikvall K (2002). Differences in the regulation of the classical and the alternative pathway for bile acid synthesis in human liver. No coordinate regulation of CYP7A1 and CYP27A1. *J Biol Chem* 277(30): 26804-7.
- Bjorkhem I, Cedazo-Minguez A, Leoni V, Meaney S (2009). Oxysterols and neurodegenerative diseases. *Mol Aspects Med* 30(3): 171-9.
- Bjorkhem I, Leitersdorf E (2000). Sterol 27-hydroxylase deficiency: a rare cause of xanthomas in normocholesterolemic humans. *Trends Endocrinol Metab* 11(5): 180-3.
- Bjorkhem I, Meaney S (2004). Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(5): 806-15.
- Bjorkhem I, Reihner E, Angelin B, Ewerth S, Akerlund JE, Einarsson K (1987). On the possible use of the serum level of 7 alpha-hydroxycholesterol as a marker for increased activity of the cholesterol 7 alpha-hydroxylase in humans. *J Lipid Res* 28(8): 889-94.
- Bjorkhem I, Starck L, Andersson U, Lutjohann D, von Bahr S, Pikuleva I, Babiker A, Diczfalusy U (2001). Oxysterols in the circulation of patients with the Smith-Lemli-Opitz syndrome: abnormal levels of 24S- and 27-hydroxycholesterol. *J Lipid Res* 42(3): 366-71.
- Blantz RC (1975). The mechanism of acute renal failure after uranyl nitrate. *J Clin Invest* 55(3): 621-35.
- Bosque MA, Domingo JL, Llobet JM, Corbella J (1993). Embryotoxicity and teratogenicity of uranium in mice following subcutaneous administration of uranyl acetate. *Biol Trace Elem Res* 36(2): 109-18.
- Boulias K, Katrakili N, Bamberg K, Underhill P, Greenfield A, Talianidis I (2005). Regulation of hepatic metabolic pathways by the orphan nuclear receptor SHP. *Embo J* 24(14): 2624-33.

- Bozhok OV, BezdrobnyluV, Kulik GO, Serkiz Ia I, Kartel AA (1994). [Protein phosphorylation and activity of insulin and epidermal growth factor receptors in liver plasma membranes of rats kept in the zone of the accident at the Chernobyl nuclear power station]. *Ukr Biokhim Zh* 66(5): 35-9.
- Brandao-Mello CE, Oliveira AR, Valverde NJ, Farina R, Cordeiro JM (1991). Clinical and hematological aspects of 137Cs: the Goiania radiation accident. *Health Phys* 60(1): 31-9.
- Breitling R (2007). Greased hedgehogs: new links between hedgehog signaling and cholesterol metabolism. *Bioessays* 29(11): 1085-94.
- Brendel C, Schoonjans K, Botrugno OA, Treuter E, Auwerx J (2002). The small heterodimer partner interacts with the liver X receptor alpha and represses its transcriptional activity. *Mol Endocrinol* 16(9): 2065-76.
- Briner W, Murray J (2005). Effects of short-term and long-term depleted uranium exposure on open-field behavior and brain lipid oxidation in rats. *Neurotoxicol Teratol* 27(1): 135-44.
- Brodeur MR, Luangrath V, Bourret G, Falstrault L, Brissette L (2005). Physiological importance of SR-BI in the in vivo metabolism of human HDL and LDL in male and female mice. *J Lipid Res* 46(4): 687-96.
- Brodsky JL, Fisher EA (2008). The many intersecting pathways underlying apolipoprotein B secretion and degradation. *Trends Endocrinol Metab* 19(7): 254-9.
- Brown AJ, Jessup W (1999). Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 142(1): 1-28.
- Brown AJ, Jessup W (2009a). Oxysterols: Sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis. *Mol Aspects Med* 30(3): 111-22.
- Brown DA, London E (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14: 111-36.
- Brown J, 3rd, Theisler C, Silberman S, Magnuson D, Gottardi-Littell N, Lee JM, Yager D, Crowley J, Sambamurti K, Rahman MM, Reiss AB, Eckman CB, Wolozin B (2004). Differential expression of cholesterol hydroxylases in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 279(33): 34674-81.
- Brown MJ, Boyd GS (1974). The specificity of the rat-liver cholesterol 7alpha-hydroxylase. *Eur J Biochem* 44(1): 37-47.
- Brown MS, Dana SE, Goldstein JL (1975). Cholesterol ester formation in cultured human fibroblasts. Stimulation by oxygenated sterols. *J Biol Chem* 250(10): 4025-7.
- Brown MS, Goldstein JL (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232(4746): 34-47.
- Brown MS, Goldstein JL (1997). The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89(3): 331-40.
- Brown MS, Goldstein JL (2009b). Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL. *J Lipid Res* 50 Suppl: S15-27.
- Brown NS, Smart A, Sharma V, Brinkmeier ML, Greenlee L, Camper SA, Jensen DR, Eckel RH, Krezel W, Chambon P, Haugen BR (2000). Thyroid hormone resistance and increased metabolic rate in the RXR-gamma-deficient mouse. *J Clin Invest* 106(1): 73-9.
- Bu G (2009). Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurosci* 10(5): 333-44.
- Bulman RA (1980). Uranium uptake into the rat liver: effect of thioacetamide and lipophilic glycerophosphate upon hepatic uptake. *Int J Nucl Med Biol* 7(4): 295-8.
- Bussy C, Lestaevél P, Dhieux B, Amourette C, Paquet F, Gourmelon P, Houpert P (2006). Chronic ingestion of uranyl nitrate perturbs acetylcholinesterase activity and monoamine metabolism in male rat brain. *Neurotoxicology* 27(2): 245-52.
- Byskov AG, Andersen CY, Nordholm L, Thogersen H, Xia G, Wassmann O, Andersen JV, Guddal E, Roed T (1995). Chemical structure of sterols that activate oocyte meiosis. *Nature* 374(6522): 559-62.
- Camargo N, Smit AB, Verheijen MH (2009). SREBPs: SREBP function in glia-neuron interactions. *Febs J* 276(3): 628-36.
- Cantaluppi C, Degetto S (2000). Civilian and military uses of depleted uranium: environmental and health problems. *Ann Chim* 90(11-12): 665-76.
- Cariou B, van Harmelen K, Duran-Sandoval D, van Dijk TH, Grefhorst A, Abdelkarim M, Caron S, Torpier G, Fruchart JC, Gonzalez FJ, Kuipers F, Staels B (2006). The farnesoid X receptor modulates adiposity and peripheral insulin sensitivity in mice. *J Biol Chem* 281(16): 11039-49.
- Cases S, Novak S, Zheng YW, Myers HM, Lear SR, Sande E, Welch CB, Lusis AJ, Spencer TA, Krause BR, Erickson SK, Farese RV, Jr. (1998). ACAT-2, a second mammalian acyl-CoA:cholesterol acyltransferase. Its cloning, expression, and characterization. *J Biol Chem* 273(41): 26755-64.
- Caywood K, Ice R, Hertel N (1997). Biokinetic model for 137Cs in the fetus. *Health Phys* 73(5): 736-46.
- Cedazo-Minguez A (2007). Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *J Cell Mol Med* 11(6): 1227-38.
- Cha JY, Repa JJ (2007). The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J Biol Chem* 282(1): 743-51.
- Chaialo PP, Chobot'ko GM, Shimelis IV, Prevarskii BP (1991). [Content of blood lipids and characteristics of dyslipoproteinemias in people exposed to radiation during the accident at the Chernobyl nuclear power station]. *Ukr Biokhim Zh* 63(6): 93-6.
- Chan J, Nakabayashi H, Wong NC (1993). HNF-4 increases activity of the rat Apo A1 gene. *Nucleic Acids Res* 21(5): 1205-11.
- Chang TY, Chang CC, Ohgami N, Yamauchi Y (2006). Cholesterol sensing, trafficking, and esterification. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 129-57.

- Chang TY, Li BL, Chang CC, Urano Y (2009). Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferases. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297(1): E1-9.
- Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB, Liao D, Nagy L, Edwards PA, Curtiss LK, Evans RM, Tontonoz P (2001). A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell* 7(1): 161-71.
- Chen J, Cooper AD, Levy-Wilson B (1999). Hepatocyte nuclear factor 1 binds to and transactivates the human but not the rat CYP7A1 promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 260(3): 829-34.
- Chen SH, Habib G, Yang CY, Gu ZW, Lee BR, Weng SA, Silberman SR, Cai SJ, Deslypere JP, Rosseneu M, et al. (1987). Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon. *Science* 238(4825): 363-6.
- Chen W, Chen G, Head DL, Mangelsdorf DJ, Russell DW (2007). Enzymatic reduction of oxysterols impairs LXR signaling in cultured cells and the livers of mice. *Cell Metab* 5(1): 73-9.
- Chen W, Chiang JY (2003). Regulation of human sterol 27-hydroxylase gene (CYP27A1) by bile acids and hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4alpha). *Gene* 313: 71-82.
- Chen W, Owsley E, Yang Y, Stroup D, Chiang JY (2001). Nuclear receptor-mediated repression of human cholesterol 7alpha-hydroxylase gene transcription by bile acids. *J Lipid Res* 42(9): 1402-12.
- Chen W, Suruga K, Nishimura N, Gouda T, Lam VN, Yokogoshi H (2005). Comparative regulation of major enzymes in the bile acid biosynthesis pathway by cholesterol, cholate and taurine in mice and rats. *Life Sci* 77(7): 746-57.
- Chen WJ, Goldstein JL, Brown MS (1990). NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 265(6): 3116-23.
- Chen WS, Manova K, Weinstein DC, Duncan SA, Plump AS, Prezioso VR, Bachvarova RF, Darnell JE, Jr. (1994). Disruption of the HNF-4 gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos. *Genes Dev* 8(20): 2466-77.
- Chernyshov AV, Talko VV, Andreychenko SV, Kovalenko AN, Grishko, Didenko NV (2007). PO3-57 LIPID AND LIPOPROTEIN METABOLISM IN CHERNOBYL CLEAN-UP WORKERS. *Atherosclerosis supplements* 8(1): 32.
- Chernyshov VP, Vykhovanets EV, Slukvin, II, Antipkin YG, Vasyuk AN, Strauss KW (1997). Analysis of blood lymphocyte subsets in children living on territory that received high amounts of fallout from Chernobyl accident. *Clin Immunol Immunopathol* 84(2): 122-8.
- Cheung C, Akiyama TE, Kudo G, Gonzalez FJ (2003). Hepatic expression of cytochrome P450s in hepatocyte nuclear factor 1-alpha (HNF1alpha)-deficient mice. *Biochem Pharmacol* 66(10): 2011-20.
- Chiang JY (2002). Bile acid regulation of gene expression: roles of nuclear hormone receptors. *Endocr Rev* 23(4): 443-63.
- Chiang JY (2003). Bile acid regulation of hepatic physiology: III. Bile acids and nuclear receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284(3): G349-56.
- Chiang JY (2004). Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *J Hepatol* 40(3): 539-51.
- Chiang JY, Kimmel R, Stroup D (2001). Regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXRalpha). *Gene* 262(1-2): 257-65.
- Chiang JY, Kimmel R, Weinberger C, Stroup D (2000). Farnesoid X receptor responds to bile acids and represses cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) transcription. *J Biol Chem* 275(15): 10918-24.
- Chobot'ko HM (1999). [Effect of incorporated ionizing radiation by cesium-137 on the state of free radical processes and the lipoprotein spectrum in rat blood]. *Ukr Biokhim Zh* 71(1): 53-5.
- Chumak A, Thevenon C, Gulaya N, Guichardant M, Margitich V, Bazyka D, Kovalenko A, Lagarde M, Prigent AF (2001). Monohydroxylated fatty acid content in peripheral blood mononuclear cells and immune status of people at long times after the Chernobyl accident. *Radiat Res* 156(5 Pt 1): 476-87.
- Chung JH, Seo AY, Chung SW, Kim MK, Leeuwenburgh C, Yu BP, Chung HY (2008). Molecular mechanism of PPAR in the regulation of age-related inflammation. *Ageing Res Rev* 7(2): 126-36.
- Claudepierre T, Pfrieger FW (2003). [New aspects of cholesterol in the central nervous system]. *Med Sci (Paris)* 19(5): 601-5.
- Cooley HM, Evans RE, Klaverkamp JF (2000a). Toxicology of dietary uranium in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquat Toxicol* 48(4): 495-515.
- Cooley HM, Klaverkamp JF (2000b). Accumulation and distribution of dietary uranium in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquat Toxicol* 48(4): 477-494.
- Cooper AD (1997). Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J Lipid Res* 38(11): 2173-92.
- Cooper JR, Stradling GN, Smith H, Ham SE (1982). The behaviour of uranium-233 oxide and uranyl-233 nitrate in rats. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 41(4): 421-33.
- Cordy JM, Hooper NM, Turner AJ (2006). The involvement of lipid rafts in Alzheimer's disease. *Mol Membr Biol* 23(1): 111-22.
- Costet P, Krempf M, Cariou B (2008). PCSK9 and LDL cholesterol: unravelling the target to design the bullet. *Trends Biochem Sci* 33(9): 426-34.
- Costet P, Luo Y, Wang N, Tall AR (2000). Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem* 275(36): 28240-5.
- Coulon R (1994). [Caesium 137 and Chernobyl accident, IAEA international project]. *Publications du Comité de Radioprotection d'Electricité de France* 8: 10-6.

- Craft E, Abu-Qare A, Flaherty M, Garofolo M, Rincavage H, Abou-Donia M (2004). Depleted and natural uranium: chemistry and toxicological effects. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 7(4): 297-317.
- Crestani M, De Fabiani E, Caruso D, Mitro N, Gilardi F, Vigil Chacon AB, Patelli R, Godio C, Galli G (2004). LXR (liver X receptor) and HNF-4 (hepatocyte nuclear factor-4): key regulators in reverse cholesterol transport. *Biochem Soc Trans* 32(Pt 1): 92-6.
- Crestani M, Sadeghpour A, Stroup D, Galli G, Chiang JY (1998). Transcriptional activation of the cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A) by nuclear hormone receptors. *J Lipid Res* 39(11): 2192-200.
- Cross FT, Palmer RF, Busch RH, Filipy RE, Stuart BO (1981). Development of lesions in Syrian golden hamsters following exposure to radon daughters and uranium ore dust. *Health Phys* 41(1): 135-53.
- Cuesta de Juan S, Monte MJ, Macias RI, Wauthier V, Calderon PB, Marin JJ (2007). Ontogenic development-associated changes in the expression of genes involved in rat bile acid homeostasis. *J Lipid Res* 48(6): 1362-70.
- Cummins CL, Mangelsdorf DJ (2006). Liver X receptors and cholesterol homeostasis: spotlight on the adrenal gland. *Biochem Soc Trans* 34(Pt 6): 1110-3.
- Danik M, Champagne D, Petit-Turcotte C, Beffert U, Poirier J (1999). Brain lipoprotein metabolism and its relation to neurodegenerative disease. *Crit Rev Neurobiol* 13(4): 357-407.
- Day R, Gorin MB, Eller AW (1995). Prevalence of lens changes in Ukrainian children residing around Chernobyl. *Health Phys* 68(5): 632-42.
- de la Llera-Moya M, Rothblat GH, Connelly MA, Kellner-Weibel G, Sakr SW, Phillips MC, Williams DL (1999). Scavenger receptor BI (SR-BI) mediates free cholesterol flux independently of HDL tethering to the cell surface. *J Lipid Res* 40(3): 575-80.
- Debeljak N, Fink M, Rozman D (2003). Many facets of mammalian lanosterol 14 α -demethylase from the evolutionarily conserved cytochrome P450 family CYP51. *Arch Biochem Biophys* 409(1): 159-71.
- DeBose-Boyd RA (2008). Feedback regulation of cholesterol synthesis: sterol-accelerated ubiquitination and degradation of HMG CoA reductase. *Cell Res* 18(6): 609-21.
- DeBose-Boyd RA, Ou J, Goldstein JL, Brown MS (2001). Expression of sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) mRNA in rat hepatoma cells requires endogenous LXR ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(4): 1477-82.
- del Castillo-Olivares A, Campos JA, Pandak WM, Gil G (2004). The role of alpha1-fetoprotein transcription factor/LRH-1 in bile acid biosynthesis: a known nuclear receptor activator that can act as a suppressor of bile acid biosynthesis. *J Biol Chem* 279(16): 16813-21.
- del Castillo-Olivares A, Gil G (2001). Suppression of sterol 12 α -hydroxylase transcription by the short heterodimer partner: insights into the repression mechanism. *Nucleic Acids Res* 29(19): 4035-42.
- del Castillo-Olivares A, Gil G (2002). Differential effects of sterol regulatory binding proteins 1 and 2 on sterol 12 α -hydroxylase. SREBP-2 suppresses the sterol 12 α -hydroxylase promoter. *J Biol Chem* 277(8): 6750-7.
- DeLamatre JG, Sarphe TG, Archibold RC, Hornick CA (1990). Metabolism of apoE-free high density lipoproteins in rat hepatoma cells: evidence for a retroendocytic pathway. *J Lipid Res* 31(2): 191-202.
- Deng J, Rudick V, Dory L (1995). Lysosomal degradation and sorting of apolipoprotein E in macrophages. *J Lipid Res* 36(10): 2129-40.
- Desvergne B (2007). RXR: from partnership to leadership in metabolic regulations. *Vitam Horm* 75: 1-32.
- Desvergne B, Michalik L, Wahli W (2006). Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol Rev* 86(2): 465-514.
- DeVita R, Olivieri A, Spinelli A, Grollino MG, Padovani L, Tarroni G, Cozza R, Sorcini M, Pennelli P, Casparini G, Crescenzi GS, Mauro F, Carta S (2000). Health status and internal radiocontamination assessment in children exposed to the fallout of the Chernobyl accident. *Arch Environ Health* 55(3): 181-6.
- Deykin D, Goodman DS (1962). The hydrolysis of long-chain fatty acid esters of cholesterol with rat liver enzymes. *J Biol Chem* 237: 3649-56.
- Diamond GL, Morrow PE, Panner BJ, Gelein RM, Baggs RB (1989). Reversible uranyl fluoride nephrotoxicity in the Long Evans rat. *Fundam Appl Toxicol* 13(1): 65-78.
- Diaz Sylvester PL, Lopez R, Ubios AM, Cabrini RL (2002). Exposure to subcutaneously implanted uranium dioxide impairs bone formation. *Arch Environ Health* 57(4): 320-5.
- Dieter MZ, Maher JM, Cheng X, Klaassen CD (2004). Expression and regulation of the sterol half-transporter genes ABCG5 and ABCG8 in rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 139(4): 209-18.
- Dietschy JM, Turley SD (2002). Control of cholesterol turnover in the mouse. *J Biol Chem* 277(6): 3801-4.
- Dietschy JM, Turley SD (2004). Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res* 45(8): 1375-97.
- Domingo JL, Llobet JM, Tomas JM, Corbella J (1987). Acute toxicity of uranium in rats and mice. *Bull Environ Contam Toxicol* 39(1): 168-74.
- Domingo JL, Paternain JL, Llobet JM, Corbella J (1989). The developmental toxicity of uranium in mice. *Toxicology* 55(1-2): 143-52.
- Donnars O (2002). Uranium : l'abondance au rendez-vous. *Les défis de CEA* 94: 4-5.
- Du X, Pham YH, Brown AJ (2004). Effects of 25-hydroxycholesterol on cholesterol esterification and sterol regulatory element-binding protein processing are dissociable: implications for cholesterol movement to the regulatory pool in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 279(45): 47010-6.
- Duane WC, Javitt NB (1999). 27-hydroxycholesterol: production rates in normal human subjects. *J Lipid Res* 40(7): 1194-9.

- Dublineau I, Grandcolas L, Grison S, Baudelin C, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P (2007a). Modifications of inflammatory pathways in rat intestine following chronic ingestion of depleted uranium. *Toxicol Sci* 98(2): 458-68.
- Dublineau I, Grison S, Baudelin C, Dudoignon N, Souidi M, Marquette C, Paquet F, Aigueperse J, Gourmelon P (2005). Absorption of uranium through the entire gastrointestinal tract of the rat. *Int J Radiat Biol* 81(6): 473-82.
- Dublineau I, Grison S, Grandcolas L, Baudelin C, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P (2007b). Effects of chronic ¹³⁷Cs ingestion on barrier properties of jejunal epithelium in rats. *J Toxicol Environ Health A* 70(10): 810-9.
- Dublineau I, Grison S, Grandcolas L, Baudelin C, Tessier C, Suhard D, Frelon S, Cossonnet C, Claraz M, Ritt J, Paquet P, Voisin P, Gourmelon P (2006a). Absorption, accumulation and biological effects of depleted uranium in Peyer's patches of rats. *Toxicology* 227(3): 227-39.
- Dublineau I, Grison S, Linard C, Baudelin C, Dudoignon N, Souidi M, Marquette C, Paquet F, Aigueperse J, Gourmelon P (2006b). Short-term effects of depleted uranium on immune status in rat intestine. *J Toxicol Environ Health A* 69(17): 1613-28.
- Duran-Sandoval D, Mautino G, Martin G, Percevault F, Barbier O, Fruchart JC, Kuipers F, Staels B (2004). Glucose regulates the expression of the farnesoid X receptor in liver. *Diabetes* 53(4): 890-8.
- Eaton S (2008). Multiple roles for lipids in the Hedgehog signalling pathway. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(6): 437-45.
- Eckert GP, Vardanian L, Rebeck GW, Burns MP (2007). Regulation of central nervous system cholesterol homeostasis by the liver X receptor agonist TO-901317. *Neurosci Lett* 423(1): 47-52.
- Edwards PA, Tabor D, Kast HR, Venkateswaran A (2000). Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochim Biophys Acta* 1529(1-3): 103-13.
- Eggertsen G, Olin M, Andersson U, Ishida H, Kubota S, Hellman U, Okuda KI, Bjorkhem I (1996). Molecular cloning and expression of rabbit sterol 12 α -hydroxylase. *J Biol Chem* 271(50): 32269-75.
- Erickson SK, Shrewsbury MA, Brooks C, Meyer DJ (1980). Rat liver acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase: its regulation in vivo and some of its properties in vitro. *J Lipid Res* 21(7): 930-41.
- Famer D, Meaney S, Mousavi M, Nordberg A, Bjorkhem I, Crisby M (2007). Regulation of alpha- and beta-secretase activity by oxysterols: cerebrosterol stimulates processing of APP via the alpha-secretase pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 359(1): 46-50.
- Fayard E, Auwerx J, Schoonjans K (2004). LXR-1: an orphan nuclear receptor involved in development, metabolism and steroidogenesis. *Trends Cell Biol* 14(5): 250-60.
- Fazio S, Linton MF, Hasty AH, Swift LL (1999). Recycling of apolipoprotein E in mouse liver. *J Biol Chem* 274(12): 8247-53.
- Feige JN, Gelman L, Michalik L, Desvergne B, Wahli W (2006). From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog Lipid Res* 45(2): 120-59.
- Feshchenko SP, Schroder HC, Muller WE, Lazjuk GI (2002). Congenital malformations among newborns and developmental abnormalities among human embryos in Belarus after Chernobyl accident. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 48(4): 423-6.
- Feugier A, Frelon S, Gourmelon P, Claraz M (2008). Alteration of mouse oocyte quality after a subchronic exposure to depleted Uranium. *Reprod Toxicol* 26(3-4): 273-7.
- Feurgard C, Boehler N, Ferezou J, Serougne C, Aigueperse J, Gourmelon P, Lutton C, Mathe D (1999). Ionizing radiation alters hepatic cholesterol metabolism and plasma lipoproteins in Syrian hamster. *Int J Radiat Biol* 75(6): 757-66.
- Field FJ, Kam NT, Mathur SN (1990). Regulation of cholesterol metabolism in the intestine. *Gastroenterology* 99(2): 539-51.
- Field FJ, Watt K, Mathur SN (2007). Ezetimibe interferes with cholesterol trafficking from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum in CaCo-2 cells. *J Lipid Res* 48(8): 1735-45.
- Fielding CJ, Fielding PE (2004). Membrane cholesterol and the regulation of signal transduction. *Biochem Soc Trans* 32(Pt 1): 65-9.
- Fiorucci S, Clerici C, Antonelli E, Orlandi S, Goodwin B, Sadeghpour BM, Sabatino G, Russo G, Castellani D, Willson TM, Pruzanski M, Pellicciari R, Morelli A (2005). Protective effects of 6-ethyl chenodeoxycholic acid, a farnesoid X receptor ligand, in estrogen-induced cholestasis. *J Pharmacol Exp Ther* 313(2): 604-12.
- Fiorucci S, Rizzo G, Donini A, Distrutti E, Santucci L (2007). Targeting farnesoid X receptor for liver and metabolic disorders. *Trends Mol Med* 13(7): 298-309.
- Fitsanakis VA, Erikson KM, Garcia SJ, Evje L, Syversen T, Aschner M (2006). Brain accumulation of depleted uranium in rats following 3- or 6-month treatment with implanted depleted uranium pellets. *Biol Trace Elem Res* 111(1-3): 185-97.
- Fluiter K, van der Westhuijzen DR, van Berkel TJ (1998). In vivo regulation of scavenger receptor BI and the selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters in rat liver parenchymal and Kupffer cells. *J Biol Chem* 273(14): 8434-8.
- Francis GA, Fayard E, Picard F, Auwerx J (2003). Nuclear receptors and the control of metabolism. *Annu Rev Physiol* 65: 261-311.
- Fresnedo O, De Heredia ML, Martinez MJ, Cristobal S, Rejas MT, Cuezva JM, Ochoa B (2001). Immunolocalization of a novel cholesteryl ester hydrolase in the endoplasmic reticulum of murine and human hepatocytes. *Hepatology* 33(3): 662-7.

- Friedman A, Kaufer D, Shemer J, Hendler I, Soreq H, Tur-Kaspa I (1996). Pyridostigmine brain penetration under stress enhances neuronal excitability and induces early immediate transcriptional response. *Nat Med* 2(12): 1382-5.
- Fukuda S, Ikeda M, Chiba M, Kaneko K (2006). Clinical diagnostic indicators of renal and bone damage in rats intramuscularly injected with depleted uranium. *Radiat Prot Dosimetry* 118(3): 307-14.
- Fullerton SM, Shirman GA, Strittmatter WJ, Matthew WD (2001). Impairment of the blood-nerve and blood-brain barriers in apolipoprotein e knockout mice. *Exp Neurol* 169(1): 13-22.
- Gafvels M, Olin M, Chowdhary BP, Raudsepp T, Andersson U, Persson B, Jansson M, Bjorkhem I, Eggertsen G (1999). Structure and chromosomal assignment of the sterol 12 α -hydroxylase gene (CYP8B1) in human and mouse: eukaryotic cytochrome P-450 gene devoid of introns. *Genomics* 56(2): 184-96.
- Galle P (1997). Uranium. *in* Toxiques nucléaires. Galle P. Paris, Masson: 185-205.
- Gamache GL, Levinson DM, Reeves DL, Bidyuk PI, Brantley KK (2005). Longitudinal neurocognitive assessments of Ukrainians exposed to ionizing radiation after the Chernobyl nuclear accident. *Arch Clin Neuropsychol* 20(1): 81-93.
- Garuti R, Croce MA, Piccinini L, Tiozzo R, Bertolini S, Calandra S (2002). Functional analysis of the promoter of human sterol 27-hydroxylase gene in HepG2 cells. *Gene* 283(1-2): 133-43.
- Gelissen IC, Harris M, Rye KA, Quinn C, Brown AJ, Kockx M, Cartland S, Packianathan M, Kritharides L, Jessup W (2006). ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(3): 534-40.
- Geraci JP, Mariano MS, Jackson KL (1991). Hepatic radiation injury in the rat. *Radiat Res* 125(1): 65-72.
- Germain P, Chambon P, Eichele G, Evans RM, Lazar MA, Leid M, De Lera AR, Lotan R, Mangelsdorf DJ, Gronemeyer H (2006). International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors. *Pharmacol Rev* 58(4): 760-72.
- Ghosh S, Grogan WM (1992). Immunological characterization of neutral cholesteryl ester hydrolase from rat liver cytosol. *Biochem Cell Biol* 70(9): 800-3.
- Ghosh S, Kounnas MZ, Grogan WM (1990). Separation and differential activation of rat liver cytosolic cholesteryl ester hydrolase, triglyceride lipase and retinyl palmitate hydrolase by cholestyramine and protein kinases. *Lipids* 25(4): 221-5.
- Ghosh S, Kumar A, Pandey BN, Mishra KP (2007). Acute exposure of uranyl nitrate causes lipid peroxidation and histopathological damage in brain and bone of Wistar rat. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 26(4): 255-61.
- Ghosh S, Mallonee DH, Hylemon PB, Grogan WM (1995). Molecular cloning and expression of rat hepatic neutral cholesteryl ester hydrolase. *Biochim Biophys Acta* 1259(3): 305-12.
- Ghosh S, Natarajan R, Pandak WM, Hylemon PB, Grogan WM (1998). Regulation of hepatic neutral cholesteryl ester hydrolase by hormones and changes in cholesterol flux. *Am J Physiol* 274(4 Pt 1): G662-8.
- Gilardi F, Viviani B, Galmozzi A, Boraso M, Bartesaghi S, Torri A, Caruso D, Crestani M, Marinovich M, de Fabiani E (2009). Expression of sterol 27-hydroxylase in glial cells and its regulation by liver X receptor signaling. *Neuroscience*.
- Gill S, Chow R, Brown AJ (2008). Sterol regulators of cholesterol homeostasis and beyond: the oxysterol hypothesis revisited and revised. *Prog Lipid Res* 47(6): 391-404.
- Gilman AP, Villeneuve DC, Secours VE, Yagminas AP, Tracy BL, Quinn JM, Valli VE, Willes RJ, Moss MA (1998). Uranyl nitrate: 28-day and 91-day toxicity studies in the Sprague-Dawley rat. *Toxicol Sci* 41(1): 117-28.
- Ginsberg HN, Fisher EA (2009). The ever-expanding role of degradation in the regulation of apolipoprotein B metabolism. *J Lipid Res* 50 Suppl: S162-6.
- Giraud-D'Hollander F, Magot T, Chevallier F (1976). In vivo study of free and esterified cholesterol turnover in various tissues of the rat. *Biochimie* 58(7): 855-62.
- Goasguen J, Lapresle J, Ribot C, Rocquet G (1982). Intoxication par l'uranium métallique. Manifestations neurologiques chroniques. [Chronic neurological syndrome resulting from intoxication with metallic uranium (author's transl)]. *Nouv Presse Med* 11(2): 119-21.
- Goldman M, Yaari A, Doshnitzki Z, Cohen-Luria R, Moran A (2006). Nephrotoxicity of uranyl acetate: effect on rat kidney brush border membrane vesicles. *Arch Toxicol* 80(7): 387-93.
- Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS (2006). Protein sensors for membrane sterols. *Cell* 124(1): 35-46.
- Gonzalez FJ (2008). Regulation of hepatocyte nuclear factor 4 α -mediated transcription. *Drug Metab Pharmacokinet* 23(1): 2-7.
- Goodwin B, Watson MA, Kim H, Miao J, Kemper JK, Kliewer SA (2003). Differential regulation of rat and human CYP7A1 by the nuclear oxysterol receptor liver X receptor- α . *Mol Endocrinol* 17(3): 386-94.
- Goritz C, Mauch DH, Pfrieger FW (2005). Multiple mechanisms mediate cholesterol-induced synaptogenesis in a CNS neuron. *Mol Cell Neurosci* 29(2): 190-201.
- Gorzowski B, Sobocinski L (1991). [Evaluation of radiocesium retention in selected tissues and internal organs of the rat]. *Rocz Panstw Zakl Hig* 42(3): 291-6.
- Graf GA, Li WP, Gerard RD, Gelissen I, White A, Cohen JC, Hobbs HH (2002). Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface. *J Clin Invest* 110(5): 659-69.
- Graf GA, Yu L, Li WP, Gerard R, Tuma PL, Cohen JC, Hobbs HH (2003). ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion. *J Biol Chem* 278(48): 48275-82.
- Greenow K, Pearce NJ, Ramji DP (2005). The key role of apolipoprotein E in atherosclerosis. *J Mol Med* 83(5): 329-42.

- Grignard E, Gueguen Y, Grison S, Lobaccaro JM, Gourmelon P, Souidi M (2008a). Contamination with depleted or enriched uranium differently affects steroidogenesis metabolism in rat. *Int J Toxicol* 27(4): 323-8.
- Grignard E, Gueguen Y, Grison S, Lobaccaro JM, Gourmelon P, Souidi M (2008b). In vivo effects of chronic contamination with 137 cesium on testicular and adrenal steroidogenesis. *Arch Toxicol* 82(9): 583-589.
- Grignard E, Gueguen Y, Lobaccaro JM, Voisin P, Gourmelon P, Souidi M (2007). Effets de contaminations chroniques par ingestion de césium 137 ou d'uranium sur la stéroïdogénèse testiculaire chez le rat. 6ème Congrès National de Radioprotection, Reims, France, du 19 au 21 Juin. .
- Gu X, Kozarsky K, Krieger M (2000). Scavenger receptor class B, type I-mediated [3H]cholesterol efflux to high and low density lipoproteins is dependent on lipoprotein binding to the receptor. *J Biol Chem* 275(39): 29993-30001.
- Gueguen Y, Grandcolas L, Baudelin C, Grison S, Tissandie E, Jourdain JR, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P, Souidi M (2007). Effect of acetaminophen administration to rats chronically exposed to depleted uranium. *Toxicology* 229(1-2): 62-72.
- Gueguen Y, Lestaevel P, Grandcolas L, Baudelin C, Grison S, Jourdain JR, Gourmelon P, Souidi M (2008). Chronic contamination of rats with 137 cesium radionuclide: impact on the cardiovascular system. *Cardiovasc Toxicol* 8(1): 33-40.
- Gueguen Y, Mouzat K, Ferrari L, Tissandie E, Lobaccaro JM, Batt AM, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P, Souidi M (2006a). [Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance]. *Ann Biol Clin (Paris)* 64(6): 535-48.
- Gueguen Y, Souidi M, Baudelin C, Dudoignon N, Grison S, Dublineau I, Marquette C, Voisin P, Gourmelon P, Aigueperse J (2006b). Short-term hepatic effects of depleted uranium on xenobiotic and bile acid metabolizing cytochrome P450 enzymes in the rat. *Arch Toxicol* 80(4): 187-95.
- Guglielmotti MB, Ubios AM, Cabrini RL (1985). Alveolar wound healing alteration under uranyl nitrate intoxication. *J Oral Pathol* 14(7): 565-72.
- Gupta RK, Kaestner KH (2004). HNF-4alpha: from MODY to late-onset type 2 diabetes. *Trends Mol Med* 10(11): 521-4.
- Gupta S, Stravitz RT, Dent P, Hylemon PB (2001). Down-regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase (CYP7A1) gene expression by bile acids in primary rat hepatocytes is mediated by the c-Jun N-terminal kinase pathway. *J Biol Chem* 276(19): 15816-22.
- Haley DP (1982a). Morphologic changes in uranyl nitrate-induced acute renal failure in saline- and water-drinking rats. *Lab Invest* 46(2): 196-208.
- Haley DP, Bulger RE, Doby DC (1982b). The long-term effects of uranyl nitrate on the structure and function of the rat kidney. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 41(1-2): 181-92.
- Hamilton RL, Wong JS, Guo LS, Krisans S, Havel RJ (1990). Apolipoprotein E localization in rat hepatocytes by immunogold labeling of cryothin sections. *J Lipid Res* 31(9): 1589-603.
- Hammond PB, Dietrich KN (1990). Lead exposure in early life: health consequences. *Rev Environ Contam Toxicol* 115: 91-124.
- Handl J, Beltz D, Botsch W, Harb S, Jakob D, Michel R, Romantschuk LD (2003). Evaluation of radioactive exposure from 137Cs in contaminated areas of Northern Ukraine. *Health Phys* 84(4): 502-17.
- Hayhurst GP, Lee YH, Lambert G, Ward JM, Gonzalez FJ (2001). Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol Cell Biol* 21(4): 1393-403.
- Hegardt FG (1999). Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase: a control enzyme in ketogenesis. *Biochem J* 338 (Pt 3): 569-82.
- Hennekam RC (2005). Congenital brain anomalies in distal cholesterol biosynthesis defects. *J Inherit Metab Dis* 28(3): 385-92.
- Henrichs H, Paretzke HG, Voigt G, Berg D (1989). Measurements of Cs absorption and retention in man. *Health Phys* 57(4): 571-8.
- Herz J (2009). Apolipoprotein E receptors in the nervous system. *Curr Opin Lipidol* 20(3): 190-6.
- Herz J, Bock HH (2002). Lipoprotein receptors in the nervous system. *Annu Rev Biochem* 71: 405-34.
- Heverin M, Meaney S, Lutjohann D, Diczfalusy U, Wahren J, Bjorkhem I (2005). Crossing the barrier: net flux of 27-hydroxycholesterol into the human brain. *J Lipid Res* 46(5): 1047-52.
- Heyman RA, Mangelsdorf DJ, Dyck JA, Stein RB, Eichele G, Evans RM, Thaller C (1992). 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 68(2): 397-406.
- Holt JA, Luo G, Billin AN, Bisi J, McNeill YY, Kozarsky KF, Donahee M, Wang DY, Mansfield TA, Kliewer SA, Goodwin B, Jones SA (2003). Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. *Genes Dev* 17(13): 1581-91.
- Honda A, Salen G, Matsuzaki Y, Batta AK, Xu G, Leitersdorf E, Tint GS, Erickson SK, Tanaka N, Shefer S (2001). Differences in hepatic levels of intermediates in bile acid biosynthesis between Cyp27(-/-) mice and CTX. *J Lipid Res* 42(2): 291-300.
- Honda A, Salen G, Nguyen LB, Xu G, Tint GS, Batta AK, Shefer S (1998). Regulation of early cholesterol biosynthesis in rat liver: effects of sterols, bile acids, lovastatin, and BM 15.766 on 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase and acetoacetyl coenzyme A thiolase activities. *Hepatology* 27(1): 154-9.
- Hori M, Satoh M, Furukawa K, Sakamoto Y, Hakamata H, Komohara Y, Takeya M, Sasaki Y, Miyazaki A, Horiuchi S (2004). Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-2 (ACAT-2) is responsible for elevated intestinal ACAT activity in diabetic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(9): 1689-95.

- Horton JD, Cuthbert JA, Spady DK (1995). Regulation of hepatic 7 alpha-hydroxylase expression and response to dietary cholesterol in the rat and hamster. *J Biol Chem* 270(10): 5381-7.
- Horton JD, Goldstein JL, Brown MS (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 109(9): 1125-31.
- Hoshi M, Konstantinov YO, Evdeeva TY, Kovalev AI, Aksenov AS, Koulikova NV, Sato H, Takatsui T, Takada J, Endo S, Shibata Y, Yamashita S (2000). Radiocesium in children residing in the western districts of the Bryansk Oblast from 1991-1996. *Health Phys* 79(2): 182-6.
- Houpert P, Bizot JC, Bussy C, Dhieux B, Lestaavel P, Gourmelon P, Paquet F (2007a). Comparison of the effects of enriched uranium and 137-cesium on the behaviour of rats after chronic exposure. *Int J Radiat Biol* 83(2): 99-104.
- Houpert P, Frelon S, Lestaavel P, Bussy C, Gourmelon P, Paquet F (2007b). Parental exposure to enriched uranium induced delayed hyperactivity in rat offspring. *Neurotoxicology* 28(1): 108-13.
- Houpert P, Frelon S, Monleau M, Bussy C, Chazel V, Paquet F (2007c). Heterogeneous accumulation of uranium in the brain of rats. *Radiat Prot Dosimetry* 127(1-4): 86-9.
- Houpert P, Lestaavel P, Bussy C, Paquet F, Gourmelon P (2005). Enriched but not depleted uranium affects central nervous system in long-term exposed rat. *Neurotoxicology* 26(6): 1015-20.
- Houten SM, Watanabe M, Auwerx J (2006). Endocrine functions of bile acids. *Embo J* 25(7): 1419-25.
- Howe GR (2007). Leukemia following the Chernobyl accident. *Health Phys* 93(5): 512-5.
- Hu X, Li S, Wu J, Xia C, Lala DS (2003). Liver X receptors interact with corepressors to regulate gene expression. *Mol Endocrinol* 17(6): 1019-26.
- Hua X, Yokoyama C, Wu J, Briggs MR, Brown MS, Goldstein JL, Wang X (1993). SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(24): 11603-7.
- Hui DY, Howles PN (2005). Molecular mechanisms of cholesterol absorption and transport in the intestine. *Semin Cell Dev Biol* 16(2): 183-92.
- Hunt MC, Yang YZ, Eggertsen G, Carneheim CM, Gafvels M, Einarsson C, Alexson SE (2000). The peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) regulates bile acid biosynthesis. *J Biol Chem* 275(37): 28947-53.
- Hussain MM, Fatma S, Pan X, Iqbal J (2005). Intestinal lipoprotein assembly. *Curr Opin Lipidol* 16(3): 281-5.
- IAEA (2006). Environmental consequences of the Chernobyl Accident and their remediation : twenty years of experience. Report of the Chernobyl Forum Expert Group "Environment". Radiological Assessment Reports Series. International Atomic Energy Agency (IAEA). Vienna
- Ibrulj S, Kronic-Haveric A, Haveric S, Pojskic N, Hadziselimovic R (2004). Micronuclei occurrence in population exposed to depleted uranium and control human group in correlation with sex, age and smoking habit. *Med Arh* 58(6): 335-8.
- ICRP (1990). ICRP Publication 56: Age-dependent doses to members of the public from intake of radionuclides: Part 1.
- ICRP (1995a). Age-dependent doses to members of the public from intake of radionuclides: Part 3, Ingestion dose coefficients. ICRP Publication 69. Oxford, Pergamon Press.
- ICRP (1995b). Age-dependent Doses to Members of the Public from Intake of Radionuclides: Part 4 Inhalation Dose Coefficients, ICRP Publication 71, . Oxford, Pergamon Press.
- ICRP (2004). ICRP publication 95: Doses to infants from ingestion of radionuclides in mother's milk.
- IJpenberg A, Tan NS, Gelman L, Kersten S, Seydoux J, Xu J, Metzger D, Canaple L, Chambon P, Wahli W, Desvergne B (2004). In vivo activation of PPAR target genes by RXR homodimers. *Embo J* 23(10): 2083-91.
- Inoue Y, Yu AM, Yim SH, Ma X, Krausz KW, Inoue J, Xiang CC, Brownstein MJ, Eggertsen G, Bjorkhem I, Gonzalez FJ (2006). Regulation of bile acid biosynthesis by hepatocyte nuclear factor 4alpha. *J Lipid Res* 47(1): 215-27.
- Iqbal J, Hussain MM (2009). Intestinal lipid absorption. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296(6): E1183-94.
- Ishibashi S, Schwarz M, Frykman PK, Herz J, Russell DW (1996). Disruption of cholesterol 7alpha-hydroxylase gene in mice. I. Postnatal lethality reversed by bile acid and vitamin supplementation. *J Biol Chem* 271(30): 18017-23.
- Ishida H, Kuruta Y, Gotoh O, Yamashita C, Yoshida Y, Noshiro M (1999). Structure, evolution, and liver-specific expression of sterol 12alpha-hydroxylase P450 (CYP8B). *J Biochem* 126(1): 19-25.
- Ishida H, Yamashita C, Kuruta Y, Yoshida Y, Noshiro M (2000). Insulin is a dominant suppressor of sterol 12 alpha-hydroxylase P450 (CYP8B) expression in rat liver: possible role of insulin in circadian rhythm of CYP8B. *J Biochem* 127(1): 57-64.
- Istvan ES (2002). Structural mechanism for statin inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Am Heart J* 144(6 Suppl): S27-32.
- Ivanov VK (2007). Late cancer and noncancer risks among Chernobyl emergency workers of Russia. *Health Phys* 93(5): 470-9.
- Ivanov VK, Gorski AI, Maksoutov MA, Tsyb AF, Souchkevitch GN (2001). Mortality among the Chernobyl emergency workers: estimation of radiation risks (preliminary analysis). *Health Phys* 81(5): 514-21.
- Ivanov VK, Maksoutov MA, Chekin S, Kruglova ZG, Petrov AV, Tsyb AF (2000). Radiation-epidemiological analysis of incidence of non-cancer diseases among the Chernobyl liquidators. *Health Phys* 78(5): 495-501.

- Ivanov VK, Maksoutov MA, Chekin SY, Petrov AV, Biryukov AP, Kruglova ZG, Matyash VA, Tsyb AF, Manton KG, Kravchenko JS (2006). The risk of radiation-induced cerebrovascular disease in Chernobyl emergency workers. *Health Phys* 90(3): 199-207.
- Ivanov VK, Tsyb AF, Gorsky AI, Maksyutov MA, Rastopchin EM, Konogorov AP, Biryukov AP, Matyash VA, Mould RF (1997). Thyroid cancer among "liquidators" of the Chernobyl accident. *Br J Radiol* 70(837): 937-41.
- Iyer SP, Yao X, Crona JH, Hoos LM, Tetzloff G, Davis HR, Jr., Graziano MP, Altmann SW (2005). Characterization of the putative native and recombinant rat sterol transporter Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) protein. *Biochim Biophys Acta* 1722(3): 282-92.
- Jahan A, Chiang JY (2005). Cytokine regulation of human sterol 12 α -hydroxylase (CYP8B1) gene. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288(4): G685-95.
- Jamroz-Wisniewska A, Wojcicka G, Horoszewicz K, Beltowski J (2007). Liver X receptors (LXRs). Part II: non-lipid effects, role in pathology, and therapeutic implications. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 61: 760-85.
- Javitt NB (2008). Oxysterols: novel biologic roles for the 21st century. *Steroids* 73(2): 149-57.
- Jeon H, Blacklow SC (2005). Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annu Rev Biochem* 74: 535-62.
- Jiang W, Miyamoto T, Kakizawa T, Nishio SI, Oiwa A, Takeda T, Suzuki S, Hashizume K (2006). Inhibition of LXRA α signaling by vitamin D receptor: possible role of VDR in bile acid synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 351(1): 176-84.
- Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P (2003). Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med* 9(2): 213-9.
- Joseph SB, Laffitte BA, Patel PH, Watson MA, Matsukuma KE, Walczak R, Collins JL, Osborne TF, Tontonoz P (2002). Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J Biol Chem* 277(13): 11019-25.
- Jung D, Kullak-Ublick GA (2003). Hepatocyte nuclear factor 1 α : a key mediator of the effect of bile acids on gene expression. *Hepatology* 37(3): 622-31.
- Juntunen R (1991). Uranium and radon in wells drilled into bedrock in southern Finland. Geological Survey of Finland, Report of Investigation 98. Espoo
- Jurevics H, Morell P (1995). Cholesterol for synthesis of myelin is made locally, not imported into brain. *J Neurochem* 64(2): 895-901.
- Kararli TT (1995). Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharm Drug Dispos* 16(5): 351-80.
- Kastner P, Grondona JM, Mark M, Gansmuller A, LeMeur M, Decimo D, Vonesch JL, Dolle P, Chambon P (1994). Genetic analysis of RXR α developmental function: convergence of RXR and RAR signaling pathways in heart and eye morphogenesis. *Cell* 78(6): 987-1003.
- Kastner P, Mark M, Leid M, Gansmuller A, Chin W, Grondona JM, Decimo D, Krezel W, Dierich A, Chambon P (1996). Abnormal spermatogenesis in RXR β mutant mice. *Genes Dev* 10(1): 80-92.
- Kathren RL, Moore RH (1986). Acute accidental inhalation of U: a 38-year follow-up. *Health Phys* 51(5): 609-19.
- Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, Harada M, Yoshida H, Miwa M, Fukusumi S, Habata Y, Itoh T, Shintani Y, Hinuma S, Fujisawa Y, Fujino M (2003). A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem* 278(11): 9435-40.
- Keitel V, Kubitz R, Haussinger D (2008). Endocrine and paracrine role of bile acids. *World J Gastroenterol* 14(37): 5620-9.
- Keller GA, Barton MC, Shapiro DJ, Singer SJ (1985). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase is present in peroxisomes in normal rat liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(3): 770-4.
- Kerr TA, Saeki S, Schneider M, Schaefer K, Berdy S, Redder T, Shan B, Russell DW, Schwarz M (2002). Loss of nuclear receptor SHP impairs but does not eliminate negative feedback regulation of bile acid synthesis. *Dev Cell* 2(6): 713-20.
- Kersten S (2002). Peroxisome proliferator activated receptors and obesity. *Eur J Pharmacol* 440(2-3): 223-34.
- Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest* 103(11): 1489-98.
- Kesminiene A, Cardis E (2007). [Cancer epidemiology after the Chernobyl accident]. *Bull Cancer* 94(5): 423-30.
- Kharchenko VP, Rassokhin BM, Zubovskii GA (2001). [Value of bone densitometry in the determination of vertebral mineral density in participants of the clean-up after Chernobyl accident]. *Med Tr Prom Ekol*(2): 29-32.
- Kim MS, Shigenaga J, Moser A, Feingold K, Grunfeld C (2003). Repression of farnesoid X receptor during the acute phase response. *J Biol Chem* 278(11): 8988-95.
- Knobel Y, Gleit M, Weise A, Osswald K, Schaferhenrich A, Richter KK, Claussen U, Pool-Zobel BL (2006). Uranyl nitrotriacetate, a stabilized salt of uranium, is genotoxic in nontransformed human colon cells and in the human colon adenoma cell line LT97. *Toxicol Sci* 93(2): 286-97.
- Kobayashi A, Takanezawa Y, Hirata T, Shimizu Y, Misasa K, Kioka N, Arai H, Ueda K, Matsuo M (2006). Efflux of sphingomyelin, cholesterol, and phosphatidylcholine by ABCG1. *J Lipid Res* 47(8): 1791-802.
- Kolomiitseva IK, Potekhina NI, Kaznacheev Iu S, Kuzin AM (1985). [Lipid transport activity of liver cell cytosol at early periods following gamma-irradiation of rats]. *Radiobiologiya* 25(1): 16-9.
- Komarenko DI, Soboleva LP, Kadiuk EN, Glukhenkii EV, Nosach EV (1999). [Biliary tract diseases in persons suffering as a result of the accident at the Chernobyl Atomic Electric Power Station]. *Lik Sprava*(5): 21-3.

- Konogorov AP, Ivanov VK, Chekin SY, Khait SE (2000). A case-control analysis of leukemia in accident emergency workers of Chernobyl. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 19(1-2): 143-51.
- Kosters A, Kunne C, Looije N, Patel SB, Oude Elferink RP, Groen AK (2006). The mechanism of ABCG5/ABCG8 in biliary cholesterol secretion in mice. *J Lipid Res* 47(9): 1959-66.
- Kotlar TJ, Borensztajn J (1979). Hydrolysis of chylomicron triacylglycerol by endothelium-bound lipoprotein lipase. Effect of decreased apoprotein C-II/C-III ratio. *Biochem J* 183(1): 171-4.
- Kotti TJ, Ramirez DM, Pfeiffer BE, Huber KM, Russell DW (2006). Brain cholesterol turnover required for geranylgeraniol production and learning in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(10): 3869-74.
- Kovalchuk O, Baulch JE (2008). Epigenetic changes and nontargeted radiation effects--is there a link? *Environ Mol Mutagen* 49(1): 16-25.
- Krieger M (1999). Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annu Rev Biochem* 68: 523-58.
- Krieger M (2001). Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *J Clin Invest* 108(6): 793-7.
- Krisans SK (1996). Cell compartmentalization of cholesterol biosynthesis. *Ann N Y Acad Sci* 804: 142-64.
- Kronic A, Haveric S, Ibrulj S (2005). Micronuclei frequencies in peripheral blood lymphocytes of individuals exposed to depleted uranium. *Arh Hig Rada Toksikol* 56(3): 227-32.
- Kudiasheva AG, Shishkina LN, Zagorskaia NG, Shevchenko OG, Ivashchevskaia EV (2000). [The phospholipid composition of the liver in root voles living under different radioecological conditions]. *Radiats Biol Radioecol* 40(3): 327-33.
- Kudiasheva AG, Zagorskaia NG, Shevchenko OG (1996). [Biochemical changes in the brain of the root vole (*Microtus oeconomus*) from a 30-kilometer zone around the Chernobyl Atomic Electric Power Station]. *Ukr Biokhim Zh* 68(2): 87-93.
- Kuipers F, van Ree JM, Hofker MH, Wolters H, In't Veld G, Havinga R, Vonk RJ, Princen HM, Havekes LM (1996). Altered lipid metabolism in apolipoprotein E-deficient mice does not affect cholesterol balance across the liver. *Hepatology* 24(1): 241-7.
- Kundt M, Ubios AM, Cabrini RL (2000). Effects of uranium poisoning on cultured preimplantation embryos. *Biol Trace Elem Res* 75(1-3): 235-44.
- Kundt MS, Martinez-Taibo C, Muhlmann MC, Furnari JC (2009). Uranium in drinking water: effects on mouse oocyte quality. *Health Phys* 96(5): 568-74.
- Kurjane N, Bruvere R, Shitova O, Romanova T, Jaunalksne I, Kirschfink M, Sochnevs A (2001). Analysis of the immune status in Latvian Chernobyl clean-up workers with nononcological thyroid diseases. *Scand J Immunol* 54(5): 528-33.
- Kurttio P, Auvinen A, Salonen L, Saha H, Pekkanen J, Makelainen I, Vaisanen SB, Penttila IM, Komulainen H (2002). Renal effects of uranium in drinking water. *Environ Health Perspect* 110(4): 337-42.
- Kurttio P, Harmoinen A, Saha H, Salonen L, Karpas Z, Komulainen H, Auvinen A (2006). Kidney toxicity of ingested uranium from drinking water. *Am J Kidney Dis* 47(6): 972-82.
- Kurttio P, Komulainen H, Leino A, Salonen L, Auvinen A, Saha H (2005). Bone as a possible target of chemical toxicity of natural uranium in drinking water. *Environ Health Perspect* 113(1): 68-72.
- La Touche YD, Willis DL, Dawydiak OI (1987). Absorption and biokinetics of U in rats following an oral administration of uranyl nitrate solution. *Health Phys* 53(2): 147-62.
- Laffitte BA, Chao LC, Li J, Walczak R, Hummasti S, Joseph SB, Castrillo A, Wilpitz DC, Mangelsdorf DJ, Collins JL, Saez E, Tontonoz P (2003). Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(9): 5419-24.
- Laffitte BA, Joseph SB, Walczak R, Pei L, Wilpitz DC, Collins JL, Tontonoz P (2001a). Autoregulation of the human liver X receptor alpha promoter. *Mol Cell Biol* 21(22): 7558-68.
- Laffitte BA, Repa JJ, Joseph SB, Wilpitz DC, Kast HR, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P (2001b). LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(2): 507-12.
- Lammert F, Wang DQ (2005). New insights into the genetic regulation of intestinal cholesterol absorption. *Gastroenterology* 129(2): 718-34.
- Lange Y, Ory DS, Ye J, Lanier MH, Hsu FF, Steck TL (2008). Effectors of rapid homeostatic responses of endoplasmic reticulum cholesterol and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *J Biol Chem* 283(3): 1445-55.
- Langheim S, Yu L, von Bergmann K, Lutjohann D, Xu F, Hobbs HH, Cohen JC (2005). ABCG5 and ABCG8 require MDR2 for secretion of cholesterol into bile. *J Lipid Res* 46(8): 1732-8.
- Lariviere D, Packer AP, Marro L, Li C, Chen J, Cornett RJ (2007). Age dependence of natural uranium and thorium concentrations in bone. *Health Phys* 92(2): 119-26.
- Larregle EV, Varas SM, Oliveros LB, Martinez LD, Anton R, Marchevsky E, Gimenez MS (2008). Lipid metabolism in liver of rat exposed to cadmium. *Food Chem Toxicol* 46(5): 1786-92.
- Lazjuk GI, Nikolaev DL, Novikova IV (1997). Changes in registered congenital anomalies in the Republic of Belarus after the Chernobyl accident. *Stem Cells* 15 Suppl 2: 255-60.
- Leach LJ, Gelein RM, Panner BJ, Yuile CL, Cox CC (1984). The acute toxicity of the hydrolysis products of uranium hexafluoride (UF6) when inhaled by the rat and guinea pig. Final report. . US National Technical Information Service

- Leach LJ, Yuile CL, Hodge HC, Sylvester GE, Wilson HB (1973). A five-year inhalation study with natural uranium dioxide (UO₂) dust. II. Postexposure retention and biologic effects in the monkey, dog and rat. *Health Phys* 25(3): 239-58.
- Lee FY, Lee H, Hubbert ML, Edwards PA, Zhang Y (2006). FXR, a multipurpose nuclear receptor. *Trends Biochem Sci* 31(10): 572-80.
- Lee SJ, Sekimoto T, Yamashita E, Nagoshi E, Nakagawa A, Imamoto N, Yoshimura M, Sakai H, Chong KT, Tsukihara T, Yoneda Y (2003). The structure of importin-beta bound to SREBP-2: nuclear import of a transcription factor. *Science* 302(5650): 1571-5.
- Lee YK, Dell H, Dowhan DH, Hadzopoulou-Cladaras M, Moore DD (2000). The orphan nuclear receptor SHP inhibits hepatocyte nuclear factor 4 and retinoid X receptor transactivation: two mechanisms for repression. *Mol Cell Biol* 20(1): 187-95.
- Lee YK, Moore DD (2002). Dual mechanisms for repression of the monomeric orphan receptor liver receptor homologous protein-1 by the orphan small heterodimer partner. *J Biol Chem* 277(4): 2463-7.
- Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B (2009). Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev* 89(1): 147-91.
- Leggett RW (1994). Basis for the ICRP's age-specific biokinetic model for uranium. *Health Phys* 67(6): 589-610.
- Leggett RW, Williams LR, Melo DR, Lipsztein JL (2003). A physiologically based biokinetic model for cesium in the human body. *Sci Total Environ* 317(1-3): 235-55.
- Leininger-Muller B, Siest G (1996). The rat, a useful animal model for pharmacological studies on apolipoprotein E. *Life Sci* 58(6): 455-67.
- Lemercier V, Millot X, Ansoborlo E, Menetrier F, Flury-Herard A, Rousselle C, Scherrmann JM (2003). Study of uranium transfer across the blood-brain barrier. *Radiat Prot Dosimetry* 105(1-4): 243-5.
- Lestaevel P, Dhieux B, Tournalias E, Houpert P, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P (2006). Evaluation of the effect of chronic exposure to ¹³⁷Cesium on sleep-wake cycle in rats. *Toxicology* 226(2-3): 118-25.
- Lestaevel P, Grandcolas L, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P (2008). Neuro-inflammatory response in rats chronically exposed to (¹³⁷)Cesium. *Neurotoxicology* 29(2): 343-8.
- Lestaevel P, Romero E, Dhieux B, Ben Soussan H, Berradi H, Dublineau I, Voisin P, Gourmelon P (2009). Different pattern of brain pro-/anti-oxidant activity between depleted and enriched uranium in chronically exposed rats. *Toxicology* 258(1): 1-9.
- Li-Hawkins J, Gafvels M, Olin M, Lund EG, Andersson U, Schuster G, Bjorkhem I, Russell DW, Eggertsen G (2002). Cholic acid mediates negative feedback regulation of bile acid synthesis in mice. *J Clin Invest* 110(8): 1191-200.
- Li-Hawkins J, Lund EG, Bronson AD, Russell DW (2000a). Expression cloning of an oxysterol 7alpha-hydroxylase selective for 24-hydroxycholesterol. *J Biol Chem* 275(22): 16543-9.
- Li-Hawkins J, Lund EG, Turley SD, Russell DW (2000b). Disruption of the oxysterol 7alpha-hydroxylase gene in mice. *J Biol Chem* 275(22): 16536-42.
- Li T, Chiang JY (2005a). Mechanism of rifampicin and pregnane X receptor inhibition of human cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene transcription. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288(1): G74-84.
- Li T, Chiang JY (2009). Regulation of Bile Acid and Cholesterol Metabolism by PPARs. *PPAR Res* 2009: 501739.
- Li WB, Roth P, Wahl W, Oeh U, Hollriegel V, Paretzke HG (2005b). Biokinetic modeling of uranium in man after injection and ingestion. *Radiat Environ Biophys* 44(1): 29-40.
- Lichtenstein AH, Brecher P (1983). Esterification of cholesterol and 25-hydroxycholesterol by rat liver microsomes. *Biochim Biophys Acta* 751(3): 340-8.
- Likhtarov I, Kovgan L, Vavilov S, Chepurny M, Bouville A, Luckyanov N, Jacob P, Voilleque P, Voigt G (2005). Post-Chornobyl thyroid cancers in Ukraine. Report 1: estimation of thyroid doses. *Radiat Res* 163(2): 125-36.
- Limson Zamora M, Zielinski JM, Meyerhof D, Moodie G, Falcomer R, Tracy B (2003). Uranium gastrointestinal absorption: the f1 factor in humans. *Radiat Prot Dosimetry* 105(1-4): 55-60.
- Lin-Shiau SY, Fu WM (1986). Antagonistic action of uranyl nitrate on presynaptic neurotoxins from snake venoms. *Neuropharmacology* 25(1): 95-101.
- Lin-Shiau SY, Fu WM, Lee CY (1979). Effects of uranyl ions on neuromuscular transmission of chick biventer cervicis muscle. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 241(2): 332-43.
- Lin RH, Lee CH, Chen WK, Lin-Shiau SY (1994). Studies on cytotoxic and genotoxic effects of cadmium nitrate and lead nitrate in Chinese hamster ovary cells. *Environ Mol Mutagen* 23(2): 143-9.
- Linares V, Albina ML, Belles M, Mayayo E, Sanchez DJ, Domingo JL (2005). Combined action of uranium and stress in the rat. II. Effects on male reproduction. *Toxicol Lett* 158(3): 186-95.
- Linares V, Sanchez DJ, Belles M, Albina L, Gomez M, Domingo JL (2007). Pro-oxidant effects in the brain of rats concurrently exposed to uranium and stress. *Toxicology* 236(1-2): 82-91.
- Liscum L, Finer-Moore J, Stroud RM, Luskey KL, Brown MS, Goldstein JL (1985). Domain structure of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, a glycoprotein of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 260(1): 522-30.
- Litcher L, Bromet EJ, Carlson G, Squires N, Goldgaber D, Panina N, Golovakha E, Gluzman S (2000). School and neuropsychological performance of evacuated children in Kyiv 11 years after the Chornobyl disaster. *J Child Psychol Psychiatry* 41(3): 291-9.
- Llobet JM, Sirvent JJ, Ortega A, Domingo JL (1991). Influence of chronic exposure to uranium on male reproduction in mice. *Fundam Appl Toxicol* 16(4): 821-9.

- Lloyd DC, Lucas JN, Edwards AA, Deng W, Valente E, Hone PA, Moquet JE (2001). A study to verify a reported excess of chromosomal aberrations in blood lymphocytes of Namibian uranium miners. *Radiat Res* 155(6): 809-17.
- Lopez D, McLean MP (1999). Sterol regulatory element-binding protein-1a binds to cis elements in the promoter of the rat high density lipoprotein receptor SR-BI gene. *Endocrinology* 140(12): 5669-81.
- Lou G, Li Y, Chen B, Chen M, Chen J, Liao R, Zhang Y, Wang Y, Zhou D (2007). Functional analysis on the 5'-flanking region of human FXR gene in HepG2 cells. *Gene* 396(2): 358-68.
- Love-Gregory L, Permutt MA (2007). HNF4A genetic variants: role in diabetes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10(4): 397-402.
- Low JC, Wasan KM, Fazli L, Eberding A, Adomat H, Guns ES (2007). Assessing the therapeutic and toxicological effects of cesium chloride following administration to nude mice bearing PC-3 or LNCaP prostate cancer xenografts. *Cancer Chemother Pharmacol* 60(6): 821-9.
- Lu TT, Makishima M, Repa JJ, Schoonjans K, Kerr TA, Auwerx J, Mangelsdorf DJ (2000). Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell* 6(3): 507-15.
- Lund E, Bjorkhem I, Furster C, Wikvall K (1993). 24-, 25- and 27-hydroxylation of cholesterol by a purified preparation of 27-hydroxylase from pig liver. *Biochim Biophys Acta* 1166(2-3): 177-82.
- Lund EG, Guileyardo JM, Russell DW (1999). cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(13): 7238-43.
- Lund EG, Xie C, Kotti T, Turley SD, Dietschy JM, Russell DW (2003). Knockout of the cholesterol 24-hydroxylase gene in mice reveals a brain-specific mechanism of cholesterol turnover. *J Biol Chem* 278(25): 22980-8.
- Luo Y, Tall AR (2000). Sterol upregulation of human CETP expression in vitro and in transgenic mice by an LXR element. *J Clin Invest* 105(4): 513-20.
- Ma K, Saha PK, Chan L, Moore DD (2006). Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J Clin Invest* 116(4): 1102-9.
- Macias RI, Serrano MA, Monte MJ, Jimenez S, Hernandez B, Marin JJ (2005). Long-term effect of treating pregnant rats with ursodeoxycholic acid on the congenital impairment of bile secretion induced in the pups by maternal cholestasis. *J Pharmacol Exp Ther* 312(2): 751-8.
- Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, Hull MV, Lustig KD, Mangelsdorf DJ, Shan B (1999). Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 284(5418): 1362-5.
- Malard V, Prat O, Darrouzet E, Berenguer F, Sage N, Quemeneur E (2005). Proteomic analysis of the response of human lung cells to uranium. *Proteomics* 5(17): 4568-80.
- Malenchenko AF, Barkun NA, Guseva GF (1978). Effect of uranium on the induction and course of experimental autoimmune orchitis and thyroiditis. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 22(3): 268-77.
- Malerod L, Juvet LK, Hanssen-Bauer A, Eskild W, Berg T (2002). Oxysterol-activated LXRA/RXR induces hSR-BI-promoter activity in hepatoma cells and preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 299(5): 916-23.
- Mangelsdorf DJ, Borgmeyer U, Heyman RA, Zhou JY, Ong ES, Oro AE, Kakizuka A, Evans RM (1992). Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev* 6(3): 329-44.
- Mangeny M, Cardot P, Lyonnet S, Coupe C, Benarous R, Munnich A, Girard J, Chambaz J, Bereziat G (1989). Apolipoprotein-E-gene expression in rat liver during development in relation to insulin and glucagon. *Eur J Biochem* 181(1): 225-30.
- Mao Y, Desmeules M, Schaubel D, Berube D, Dyck R, Brule D, Thomas B (1995). Inorganic components of drinking water and microalbuminuria. *Environ Res* 71(2): 135-40.
- Marrapodi M, Chiang JY (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) and agonist inhibit cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) transcription. *J Lipid Res* 41(4): 514-20.
- Maruyama T, Miyamoto Y, Nakamura T, Tamai Y, Okada H, Sugiyama E, Nakamura T, Itadani H, Tanaka K (2002). Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochem Biophys Res Commun* 298(5): 714-9.
- Mascaro C, Ortiz JA, Ramos MM, Haro D, Hegardt FG (2000). Sterol regulatory element binding protein-mediated effect of fluvastatin on cytosolic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase transcription. *Arch Biochem Biophys* 374(2): 286-92.
- Mathe D, Lutton C (1984). [Cholesterol. Dynamic and metabolic aspects]. *J Physiol (Paris)* 79(2): 41-97.
- Matsuda H, Hakamata H, Kawasaki T, Sakashita N, Miyazaki A, Takahashi K, Shichiri M, Horiuchi S (1998). Molecular cloning, functional expression and tissue distribution of rat acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase. *Biochim Biophys Acta* 1391(2): 193-203.
- McDiarmid MA, Engelhardt S, Oliver M, Gucer P, Wilson PD, Kane R, Kabat M, Kaup B, Anderson L, Hoover D, Brown L, Handwerker B, Albertini RJ, Jacobson-Kram D, Thorne CD, Squibb KS (2004). Health effects of depleted uranium on exposed Gulf War veterans: a 10-year follow-up. *J Toxicol Environ Health A* 67(4): 277-96.
- McDiarmid MA, Engelhardt SM, Dorsey CD, Oliver M, Gucer P, Wilson PD, Kane R, Cernich A, Kaup B, Anderson L, Hoover D, Brown L, Albertini R, Gudi R, Squibb KS (2009). Surveillance results of depleted uranium-exposed Gulf War I veterans: sixteen years of follow-up. *J Toxicol Environ Health A* 72(1): 14-29.
- McDiarmid MA, Engelhardt SM, Oliver M, Gucer P, Wilson PD, Kane R, Cernich A, Kaup B, Anderson L, Hoover D, Brown L, Albertini R, Gudi R, Jacobson-Kram D, Squibb KS (2007). Health surveillance of Gulf War I veterans exposed to depleted uranium: updating the cohort. *Health Phys* 93(1): 60-73.

- McDiarmid MA, Engelhardt SM, Oliver M, Gucer P, Wilson PD, Kane R, Kabat M, Kaup B, Anderson L, Hoover D, Brown L, Albertini RJ, Gudi R, Jacobson-Kram D, Thorne CD, Squibb KS (2006). Biological monitoring and surveillance results of Gulf War I veterans exposed to depleted uranium. *Int Arch Occup Environ Health* 79(1): 11-21.
- McDiarmid MA, Keogh JP, Hooper FJ, McPhaul K, Squibb K, Kane R, DiPino R, Kabat M, Kaup B, Anderson L, Hoover D, Brown L, Hamilton M, Jacobson-Kram D, Burrows B, Walsh M (2000). Health effects of depleted uranium on exposed Gulf War veterans. *Environ Res* 82(2): 168-80.
- Meaney S, Heverin M, Panzenboeck U, Ekstrom L, Axelsson M, Andersson U, Diczfalusy U, Pikuleva I, Wahren J, Sattler W, Bjorkhem I (2007). Novel route for elimination of brain oxysterols across the blood-brain barrier: conversion into 7 α -hydroxy-3-oxo-4-cholestenoic acid. *J Lipid Res* 48(4): 944-51.
- Mel'nichenko EM, Kushner AN, Zafranskaia MM, Miliutin AA (1999). [The immunoglobulin content in the saliva of children living under different radioecological conditions]. *Stomatologiya (Mosk)* 78(2): 12-4.
- Melo DR, Lipsztein JL, de Oliveira CA, Bertelli L (1994). ¹³⁷Cs internal contamination involving a Brazilian accident, and the efficacy of Prussian Blue treatment. *Health Phys* 66(3): 245-52.
- Memon RA, Moser AH, Shigenaga JK, Grunfeld C, Feingold KR (2001). In vivo and in vitro regulation of sterol 27-hydroxylase in the liver during the acute phase response. potential role of hepatocyte nuclear factor-1. *J Biol Chem* 276(32): 30118-26.
- Menke JG, Macnaul KL, Hayes NS, Baffic J, Chao YS, Elbrecht A, Kelly LJ, Lam MH, Schmidt A, Sahoo S, Wang J, Wright SD, Xin P, Zhou G, Moller DE, Sparrow CP (2002). A novel liver X receptor agonist establishes species differences in the regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7a). *Endocrinology* 143(7): 2548-58.
- Métivier H, Lorthoir S (2000). Propriétés physiques et chimiques du césium. *in* Le Césium, de l'environnement à l'Homme
- Robeau D, Daburon F, Métivier H. Paris, EDP Sciences.
- Metz-Flamant C, Bonaventure A, Milliat F, Tirmarche M, Laurier D, Bernier MO (2009). [Low doses of ionizing radiation and risk of cardiovascular disease: A review of epidemiological studies.]. *Rev Epidemiol Sante Publique*.
- Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, Grimaldi PA, Kadowaki T, Lazar MA, O'Rahilly S, Palmer CN, Plutzky J, Reddy JK, Spiegelman BM, Staels B, Wahli W (2006). International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev* 58(4): 726-41.
- Mihok S (2004). Chronic exposure to gamma radiation of wild populations of meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*). *J Environ Radioact* 75(3): 233-66.
- Milgram S, Carriere M, Malaval L, Gouget B (2008a). Cellular accumulation and distribution of uranium and lead in osteoblastic cells as a function of their speciation. *Toxicology* 252(1-3): 26-32.
- Milgram S, Carriere M, Thiebault C, Malaval L, Gouget B (2008b). Cytotoxic and phenotypic effects of uranium and lead on osteoblastic cells are highly dependent on metal speciation. *Toxicology* 250(1): 62-9.
- Miller AC, Blakely WF, Livengood D, Whittaker T, Xu J, Ejnik JW, Hamilton MM, Parlette E, John TS, Gerstenberg HM, Hsu H (1998). Transformation of human osteoblast cells to the tumorigenic phenotype by depleted uranium-uranyl chloride. *Environ Health Perspect* 106(8): 465-71.
- Miller AC, Bonait-Pellie C, Merlot RF, Michel J, Stewart M, Lison PD (2005). Leukemic transformation of hematopoietic cells in mice internally exposed to depleted uranium. *Mol Cell Biochem* 279(1-2): 97-104.
- Miller AC, Brooks K, Smith J, Page N (2004). Effect of the militarily-relevant heavy metals, depleted uranium and heavy metal tungsten-alloy on gene expression in human liver carcinoma cells (HepG2). *Mol Cell Biochem* 255(1-2): 247-56.
- Miller AC, Brooks K, Stewart M, Anderson B, Shi L, McClain D, Page N (2003). Genomic instability in human osteoblast cells after exposure to depleted uranium: delayed lethality and micronuclei formation. *J Environ Radioact* 64(2-3): 247-59.
- Miller AC, Stewart M, Rivas R (2009). DNA methylation during depleted uranium-induced leukemia. *Biochimie* 91(10): 1328-30.
- Miller AC, Xu J, Stewart M, McClain D (2001). Suppression of depleted uranium-induced neoplastic transformation of human cells by the phenyl fatty acid, phenyl acetate: chemoprevention by targeting the p21RAS protein pathway. *Radiat Res* 155(1 Pt 2): 163-170.
- Miller AC, Xu J, Stewart M, Prasanna PG, Page N (2002). Potential late health effects of depleted uranium and tungsten used in armor-piercing munitions: comparison of neoplastic transformation and genotoxicity with the known carcinogen nickel. *Mil Med* 167(2 Suppl): 120-2.
- Mirzoev EB, Kobialko VO, Shevchenko TS (1999). [Assessment of lipid peroxidation and plasma membrane permeability for Ca²⁺ in the red blood cells of cattle after the long term grazing on radioactively contaminated territory]. *Radiats Biol Radioecol* 39(6): 609-12.
- Mitchel RE, Sunder S (2004). Depleted uranium dust from fired munitions: physical, chemical and biological properties. *Health Phys* 87(1): 57-67.
- Moghadasian MH, McManus BM, Nguyen LB, Shefer S, Nadji M, Godin DV, Green TJ, Hill J, Yang Y, Scudamore CH, Frohlich JJ (2001). Pathophysiology of apolipoprotein E deficiency in mice: relevance to apo E-related disorders in humans. *Faseb J* 15(14): 2623-30.
- Monleau M, Bussy C, Lestaevél P, Houpert P, Paquet F, Chazel V (2005). Bioaccumulation and behavioural effects of depleted uranium in rats exposed to repeated inhalations. *Neurosci Lett* 390(1): 31-6.

- Monleau M, De Meo M, Paquet F, Chazel V, Dumenil G, Donnadieu-Claraz M (2006). Genotoxic and inflammatory effects of depleted uranium particles inhaled by rats. *Toxicol Sci* 89(1): 287-95.
- Monte MJ, Marin JJ, Antelo A, Vazquez-Tato J (2009). Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol* 15(7): 804-16.
- Moon YJ, Lee AK, Chung HC, Kim EJ, Kim SH, Lee DC, Lee I, Kim SG, Lee MG (2003). Effects of acute renal failure on the pharmacokinetics of chlorzoxazone in rats. *Drug Metab Dispos* 31(6): 776-84.
- Moore W, Jr., Comar CL (1962). Absorption of caesium 137 from the gastro-intestinal tract of the rat. *Int J Radiat Biol* 5: 247-54.
- Mouiseddine M, Francois S, Semont A, Sache A, Demarquay C, Athias A, Gourmelon P, Gorin N, Souidi M, Chapel A (2009). Human mesenchymal stem cells (MSC) indirectly preserve liver of irradiation damage. *Open Gene Therapy Journal* 2: 45-50.
- Mouzat K, Alves G, Pommier A, Viennois E, Pihen T, Caira F, Baron S, JM AL (2009a). [Nuclear liver X receptors are involved in the biology of reproduction]. *Med Sci (Paris)* 25(2): 141-4.
- Mouzat K, Volat F, Baron S, Alves G, Pommier AJ, Volle DH, Marceau G, DeHaze A, Dechelotte P, Duggavathi R, Caira F, Lobaccaro JM (2009b). Absence of nuclear receptors for oxysterols liver X receptor induces ovarian hyperstimulation syndrome in mice. *Endocrinology* 150(7): 3369-75.
- Murao K, Bassyouni H, Taylor AH, Wanke IE, Wong NC (1997). Hepatocyte nuclear factor 4 inhibits the activity of site A from the rat apolipoprotein AI gene. *Biochemistry* 36(2): 301-6.
- Murao K, Wada Y, Nakamura T, Taylor AH, Mooradian AD, Wong NC (1998). Effects of glucose and insulin on rat apolipoprotein A-I gene expression. *J Biol Chem* 273(30): 18959-65.
- Murphy C, Parini P, Wang J, Bjorkhem I, Eggertsen G, Gafvels M (2005). Cholic acid as key regulator of cholesterol synthesis, intestinal absorption and hepatic storage in mice. *Biochim Biophys Acta* 1735(3): 167-75.
- Nagai F, Kato E, Tamura HO (2004). Oxidative stress induces GSTP1 and CYP3A4 expression in the human erythroleukemia cell line, K562. *Biol Pharm Bull* 27(4): 492-5.
- Nagoshi E, Yoneda Y (2001). Dimerization of sterol regulatory element-binding protein 2 via the helix-loop-helix-leucine zipper domain is a prerequisite for its nuclear localization mediated by importin beta. *Mol Cell Biol* 21(8): 2779-89.
- Nakanishi M, Goldstein JL, Brown MS (1988). Multivalent control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Mevalonate-derived product inhibits translation of mRNA and accelerates degradation of enzyme. *J Biol Chem* 263(18): 8929-37.
- Natarajan R, Ghosh S, Grogan WM (1996). Age-related changes in mRNA, protein and catalytic activity of hepatic neutral cholesterol ester hydrolase in male rats: evidence for transcriptional regulation. *Biochim Biophys Acta* 1302(2): 153-8.
- Natarajan R, Ghosh S, Grogan WM (1998). Molecular cloning of the promoter for rat hepatic neutral cholesterol ester hydrolase: evidence for transcriptional regulation by sterols. *Biochem Biophys Res Commun* 243(2): 349-55.
- Natarajan R, Ghosh S, Grogan WM (1999). Regulation of the rat neutral cytosolic cholesteryl ester hydrolase promoter by hormones and sterols: a role for nuclear factor- γ in the sterol-mediated response. *J Lipid Res* 40(11): 2091-8.
- Ness GC, Gertz KR, Holland RC (2001). Regulation of hepatic lanosterol 14 alpha-demethylase gene expression by dietary cholesterol and cholesterol-lowering agents. *Arch Biochem Biophys* 395(2): 233-8.
- Neufeld EB, Demosky SJ, Jr., Stonik JA, Combs C, Remaley AT, Duverger N, Santamarina-Fojo S, Brewer HB, Jr. (2002). The ABCA1 transporter functions on the basolateral surface of hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 297(4): 974-9.
- Neyfakh EA, Alimbekova AI, Ivanenko GF (1998a). Radiation-induced lipoperoxidative stress in children coupled with deficit of essential antioxidants. *Biochemistry (Mosc)* 63(8): 977-87.
- Neyfakh EA, Alimbekova AI, Ivanenko GF (1998b). Vitamin E and A deficiencies in children correlate with Chernobyl radiation loads of their mothers. *Biochemistry (Mosc)* 63(10): 1138-43.
- Nguyen LB, Xu G, Shefer S, Tint GS, Batta A, Salen G (1999). Comparative regulation of hepatic sterol 27-hydroxylase and cholesterol 7alpha-hydroxylase activities in the rat, guinea pig, and rabbit: effects of cholesterol and bile acids. *Metabolism* 48(12): 1542-8.
- Nieweg K, Schaller H, Pfrieger FW (2009). Marked differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats. *J Neurochem* 109(1): 125-34.
- Nikula KJ, Muggenburg BA, Chang IY, Griffith WC, Hahn FF, Boecker BB (1995). Biological effects of $^{137}\text{CsCl}$ injected in beagle dogs. *Radiat Res* 142(3): 347-61.
- Nikula KJ, Muggenburg BA, Griffith WC, Carlton WW, Fritz TE, Boecker BB (1996). Biological effects of $^{137}\text{CsCl}$ injected in beagle dogs of different ages. *Radiat Res* 146(5): 536-47.
- Nishio K, Megumi T, Yonesawa M (1968). Effects of ^{137}Cs and ^{90}Sr administered continuously and through generations upon mice (VI). Annual report of the Radiation Center of Osaka Prefecture 9(Sakai, Osaka): 86-93.
- Nishizawa H, Yamagata K, Shimomura I, Takahashi M, Kuriyama H, Kishida K, Hotta K, Nagaretani H, Maeda N, Matsuda M, Kihara S, Nakamura T, Nishigori H, Tomura H, Moore DD, Takeda J, Funahashi T, Matsuzawa Y (2002). Small heterodimer partner, an orphan nuclear receptor, augments peroxisome proliferator-activated receptor gamma transactivation. *J Biol Chem* 277(2): 1586-92.
- Norlin M, Chiang JY (2004). Transcriptional regulation of human oxysterol 7alpha-hydroxylase by sterol response element binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 316(1): 158-64.

- Norlin M, Toll A, Bjorkhem I, Wikvall K (2000). 24-hydroxycholesterol is a substrate for hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A). *J Lipid Res* 41(10): 1629-39.
- Norlin M, Wikvall K (1998). Biochemical characterization of the 7 α -hydroxylase activities towards 27-hydroxycholesterol and dehydroepiandrosterone in pig liver microsomes. *Biochim Biophys Acta* 1390(3): 269-81.
- Norlin M, Wikvall K (2007). Enzymes in the conversion of cholesterol into bile acids. *Curr Mol Med* 7(2): 199-218.
- Noshchenko AG, Zamostyan PV, Bondar OY, Drozdova VD (2002). Radiation-induced leukemia risk among those aged 0-20 at the time of the Chernobyl accident: a case-control study in the Ukraine. *Int J Cancer* 99(4): 609-18.
- Oda H, Yamashita H, Kosahara K, Kuroki S, Nakayama F (1990). Esterified and total 7 α -hydroxycholesterol in human serum as an indicator for hepatic bile acid synthesis. *J Lipid Res* 31(12): 2209-18.
- Odom DT, Zizlsperger N, Gordon DB, Bell GW, Rinaldi NJ, Murray HL, Volkert TL, Schreiber J, Rolfe PA, Gifford DK, Fraenkel E, Bell GI, Young RA (2004). Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* 303(5662): 1378-81.
- Ogishima T, Deguchi S, Okuda K (1987). Purification and characterization of cholesterol 7 α -hydroxylase from rat liver microsomes. *J Biol Chem* 262(16): 7646-50.
- Ohtsuki S, Ito S, Matsuda A, Hori S, Abe T, Terasaki T (2007). Brain-to-blood elimination of 24S-hydroxycholesterol from rat brain is mediated by organic anion transporting polypeptide 2 (oatp2) at the blood-brain barrier. *J Neurochem* 103(4): 1430-8.
- Ohyama Y, Meaney S, Heverin M, Ekstrom L, Brafman A, Shafir M, Andersson U, Olin M, Eggertsen G, Diczfalusy U, Feinstein E, Bjorkhem I (2006). Studies on the transcriptional regulation of cholesterol 24-hydroxylase (CYP46A1): marked insensitivity toward different regulatory axes. *J Biol Chem* 281(7): 3810-20.
- Okuda K, Masumoto O, Ohyama Y (1988). Purification and characterization of 5 β -cholestane-3 α , 7 α , 12 α -triol 27-hydroxylase from female rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 263(34): 18138-42.
- Okuda KI (1994). Liver mitochondrial P450 involved in cholesterol catabolism and vitamin D activation. *J Lipid Res* 35(3): 361-72.
- Oram JF (2003). HDL apolipoproteins and ABCA1: partners in the removal of excess cellular cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(5): 720-7.
- Ortega A, Domingo JL, Llobet JM, Tomas JM, Paternain JL (1989). Evaluation of the oral toxicity of uranium in a 4-week drinking-water study in rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 42(6): 935-41.
- Osborne TF, Gil G, Goldstein JL, Brown MS (1988). Operator constitutive mutation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase promoter abolishes protein binding to sterol regulatory element. *J Biol Chem* 263(7): 3380-7.
- Osborne TF, Goldstein JL, Brown MS (1985). 5' end of HMG CoA reductase gene contains sequences responsible for cholesterol-mediated inhibition of transcription. *Cell* 42(1): 203-12.
- Othman AI, El Missiry MA (1998). Role of selenium against lead toxicity in male rats. *J Biochem Mol Toxicol* 12(6): 345-9.
- Oyadomari S, Matsuno F, Chowdhury S, Kimura T, Iwase K, Araki E, Shichiri M, Mori M, Takiguchi M (2000). The gene for hepatocyte nuclear factor (HNF)-4 α is activated by glucocorticoids and glucagon, and repressed by insulin in rat liver. *FEBS Lett* 478(1-2): 141-6.
- P'An AY, Kennedy C (1989). Lead distribution in rats repeatedly treated with low doses of lead acetate. *Environ Res* 48(2): 238-47.
- Pagler TA, Rhode S, Neuhofer A, Laggner H, Strobl W, Hinterndorfer C, Volf I, Pavelka M, Eckhardt ER, van der Westhuyzen DR, Schutz GJ, Stangl H (2006). SR-BI-mediated high density lipoprotein (HDL) endocytosis leads to HDL resecretion facilitating cholesterol efflux. *J Biol Chem* 281(16): 11193-204.
- Pan M, Cederbaum AI, Zhang YL, Ginsberg HN, Williams KJ, Fisher EA (2004). Lipid peroxidation and oxidant stress regulate hepatic apolipoprotein B degradation and VLDL production. *J Clin Invest* 113(9): 1277-87.
- Pandak WM, Bohdan P, Franklund C, Mallonee DH, Eggertsen G, Bjorkhem I, Gil G, Vlahcevic ZR, Hylemon PB (2001). Expression of sterol 12 α -hydroxylase alters bile acid pool composition in primary rat hepatocytes and in vivo. *Gastroenterology* 120(7): 1801-9.
- Pandak WM, Hylemon PB, Ren S, Marques D, Gil G, Redford K, Mallonee D, Vlahcevic ZR (2002a). Regulation of oxysterol 7 α -hydroxylase (CYP7B1) in primary cultures of rat hepatocytes. *Hepatology* 35(6): 1400-8.
- Pandak WM, Ren S, Marques D, Hall E, Redford K, Mallonee D, Bohdan P, Heuman D, Gil G, Hylemon P (2002b). Transport of cholesterol into mitochondria is rate-limiting for bile acid synthesis via the alternative pathway in primary rat hepatocytes. *J Biol Chem* 277(50): 48158-64.
- Panin LE, Russkikh GS, Polyakov LM (2000). Detection of apolipoprotein A-I, B, and E immunoreactivity in the nuclei of various rat tissue cells. *Biochemistry (Mosc)* 65(12): 1419-23.
- Panini SR, Schnitzer-Polokoff R, Spencer TA, Sinensky M (1989). Sterol-independent regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase by mevalonate in Chinese hamster ovary cells. Magnitude and specificity. *J Biol Chem* 264(19): 11044-52.
- Paquet F, Houpert P, Blanchardon E, Delissen O, Maubert C, Dhieux B, Moreels AM, Frelon S, Gourmelon P (2006). Accumulation and distribution of uranium in rats after chronic exposure by ingestion. *Health Phys* 90(2): 139-47.

- Pare JF, Roy S, Galarneau L, Belanger L (2001). The mouse fetoprotein transcription factor (FTF) gene promoter is regulated by three GATA elements with tandem E box and Nkx motifs, and FTF in turn activates the Hnf3beta, Hnf4alpha, and Hnf1alpha gene promoters. *J Biol Chem* 276(16): 13136-44.
- Pasanen M, Lang S, Kojo A, Kosma VM (1995). Effects of simulated nuclear fuel particles on the histopathology and CYP enzymes in the rat lung and liver. *Environ Res* 70(2): 126-33.
- Patel DD, Knight BL, Soutar AK, Gibbons GF, Wade DP (2000). The effect of peroxisome-proliferator-activated receptor-alpha on the activity of the cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene. *Biochem J* 351 Pt 3: 747-53.
- Patel MD, Thompson PD (2006). Phytosterols and vascular disease. *Atherosclerosis* 186(1): 12-9.
- Paternain JL, Domingo JL, Ortega A, Llobet JM (1989). The effects of uranium on reproduction, gestation, and postnatal survival in mice. *Ecotoxicol Environ Saf* 17(3): 291-6.
- Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE, Mangelsdorf DJ (1998). Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 93(5): 693-704.
- Pellmar TC, Fuciarelli AF, Ejnik JW, Hamilton M, Hogan J, Strocko S, Emond C, Mottaz HM, Landauer MR (1999a). Distribution of uranium in rats implanted with depleted uranium pellets. *Toxicol Sci* 49(1): 29-39.
- Pellmar TC, Keyser DO, Emery C, Hogan JB (1999b). Electrophysiological changes in hippocampal slices isolated from rats embedded with depleted uranium fragments. *Neurotoxicology* 20(5): 785-92.
- Periyakaruppan A, Kumar F, Sarkar S, Sharma CS, Ramesh GT (2007). Uranium induces oxidative stress in lung epithelial cells. *Arch Toxicol* 81(6): 389-95.
- Petrescu AD, Hertz R, Bar-Tana J, Schroeder F, Kier AB (2002). Ligand specificity and conformational dependence of the hepatic nuclear factor-4alpha (HNF-4alpha). *J Biol Chem* 277(27): 23988-99.
- Pfriege FW (2003a). Outsourcing in the brain: do neurons depend on cholesterol delivery by astrocytes? *Bioessays* 25(1): 72-8.
- Pfriege FW (2003b). Role of cholesterol in synapse formation and function. *Biochim Biophys Acta* 1610(2): 271-80.
- Phung TL, Roncone A, Jensen KL, Sparks CE, Sparks JD (1997). Phosphoinositide 3-kinase activity is necessary for insulin-dependent inhibition of apolipoprotein B secretion by rat hepatocytes and localizes to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 272(49): 30693-702.
- Pikuleva IA (2006). Cytochrome P450s and cholesterol homeostasis. *Pharmacol Ther* 112(3): 761-73.
- Pinchuk VG, Nikitchenko VV, Gol'dshmid B, Andrushchak LI, Serkiz Ia I (1991). [The biological effects in animals related to the accident at the Chernobyl Atomic Electric Power Station. 4. The morphological and ultrastructural changes in the liver of rats]. *Radiobiologiya* 31(5): 648-53.
- Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Hui D, Weisgraber KH (1987). Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B, E(LDL) receptors in the brain. *J Biol Chem* 262(29): 14352-60.
- Porter FD (2008). Smith-Lemli-Opitz syndrome: pathogenesis, diagnosis and management. *Eur J Hum Genet* 16(5): 535-41.
- Post SM, Duez H, Gervois PP, Staels B, Kuipers F, Princen HM (2001). Fibrates suppress bile acid synthesis via peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-mediated downregulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase and sterol 27-hydroxylase expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21(11): 1840-5.
- Post SM, Zoetewij JP, Bos MH, de Wit EC, Havinga R, Kuipers F, Princen HM (1999). Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase inhibitor, avasimibe, stimulates bile acid synthesis and cholesterol 7alpha-hydroxylase in cultured rat hepatocytes and in vivo in the rat. *Hepatology* 30(2): 491-500.
- Pradeep K, Park SH, Ko KC (2008). Hesperidin a flavanoglycone protects against gamma-irradiation induced hepatocellular damage and oxidative stress in Sprague-Dawley rats. *Eur J Pharmacol* 587(1-3): 273-80.
- Pramfalk C, Angelin B, Eriksson M, Parini P (2007). Cholesterol regulates ACAT2 gene expression and enzyme activity in human hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 364(2): 402-9.
- Pramfalk C, Davis MA, Eriksson M, Rudel LL, Parini P (2005). Control of ACAT2 liver expression by HNF1. *J Lipid Res* 46(9): 1868-76.
- Preston DL, Kusumi S, Tomonaga M, Izumi S, Ron E, Kuramoto A, Kamada N, Dohy H, Matsuo T, Matsui T, et al. (1994). Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. *Radiat Res* 137(2 Suppl): S68-97.
- Preston DL, Shimizu Y, Pierce DA, Suyama A, Mabuchi K (2003). Studies of mortality of atomic bomb survivors. Report 13: Solid cancer and noncancer disease mortality: 1950-1997. *Radiat Res* 160(4): 381-407.
- Priest ND (2001). Toxicity of depleted uranium. *Lancet* 357(9252): 244-6.
- Priest ND, Howells GR, Green D, Haines JW (1982). Uranium in bone: metabolic and autoradiographic studies in the rat. *Hum Toxicol* 1(2): 97-114.
- Puglielli L, Ellis BC, Ingano LA, Kovacs DM (2004). Role of acyl-coenzyme a: cholesterol acyltransferase activity in the processing of the amyloid precursor protein. *J Mol Neurosci* 24(1): 93-6.
- Puglielli L, Tanzi RE, Kovacs DM (2003). Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nat Neurosci* 6(4): 345-51.
- Pukkala E, Kesminiene A, Poliakov S, Ryzhov A, Drozdovitch V, Kovgan L, Kyyronen P, Malakhova IV, Gulak L, Cardis E (2006). Breast cancer in Belarus and Ukraine after the Chernobyl accident. *Int J Cancer* 119(3): 651-8.

- Pullinger CR, Eng C, Salen G, Shefer S, Batta AK, Erickson SK, Verhagen A, Rivera CR, Mulvihill SJ, Malloy MJ, Kane JP (2002). Human cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype. *J Clin Invest* 110(1): 109-17.
- Quinn CM, Jessup W, Wong J, Kritharides L, Brown AJ (2005). Expression and regulation of sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) in human macrophages: a role for RXR and PPAR γ ligands. *Biochem J* 385(Pt 3): 823-30.
- Raaf CL, Falk R, Thornberg C, Zakaria M, Mattsson S (2004). Human metabolism of radiocaesium revisited. *Radiat Prot Dosimetry* 112(3): 395-404.
- Racine R, Grandcolas L, Grison S, Gourmelon P, Gueguen Y, Veyssiere G, Souidi M (2009a). Molecular modifications of cholesterol metabolism in the liver and the brain after chronic contamination with cesium 137. *Food Chem Toxicol* 47(7): 1642-7.
- Racine R, Gueguen Y, Gourmelon P, Veyssiere G, Souidi M (2009b). Modifications of the Expression of Genes Involved in Cerebral Cholesterol Metabolism in the Rat Following Chronic Ingestion of Depleted Uranium. *J Mol Neurosci* 38(2): 159-165.
- Racine R, Gueguen Y, Veyssières G, Grandcolas L, Grison S, Aiguerperse J, Souidi M (2007). Gene expression of cholesterol-metabolizing CYPs after chronic ingestion of 137 Cesium. international proceeding, 15th International Conference on Cytochromes P450-Biophysics and Functional Genomics, Bled, Slovenia, June 17-21. pp. 123-128.
- Radhakrishnan A, Ikeda Y, Kwon HJ, Brown MS, Goldstein JL (2007). Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: oxysterols block transport by binding to Insig. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(16): 6511-8.
- Ramaia LK, Pomerantseva MD, Chekhovich AV, Liaginskaia AM, Kuznetsov AS, Kuptsov VV (1993). [Genetic effect of incorporated 137 Cs on male mice after long-term administration of the isotope]. *Radiats Biol Radioecol* 33(4): 577-84.
- Rao YP, Vlahcevic ZR, Stravitz RT, Mallonee DH, Mullick J, Avadhani NG, Hylemon PB (1999). Down-regulation of the rat hepatic sterol 27-hydroxylase gene by bile acids in transfected primary hepatocytes: possible role of hepatic nuclear factor 1 α . *J Steroid Biochem Mol Biol* 70(1-3): 1-14.
- Raymond-Whish S, Mayer LP, O'Neal T, Martinez A, Sellers MA, Christian PJ, Marion SL, Begay C, Propper CR, Hoyer PB, Dyer CA (2007). Drinking water with uranium below the U.S. EPA water standard causes estrogen receptor-dependent responses in female mice. *Environ Health Perspect* 115(12): 1711-6.
- Reader TA, Parisi M, De Robertis E (1979). Reactivity to acetylcholine developed by artificial membranes containing a protein from *Electrophorus electricus*: the effect of uranyl ions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 53(1): 10-7.
- Redgrave TG, Small DM (1979). Quantitation of the transfer of surface phospholipid of chylomicrons to the high density lipoprotein fraction during the catabolism of chylomicrons in the rat. *J Clin Invest* 64(1): 162-71.
- Reiss AB (2005). Cholesterol and apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 20(2): 91-6.
- Remaley AT, Rust S, Rosier M, Knapper C, Naudin L, Broccardo C, Peterson KM, Koch C, Arnould I, Prades C, Duverger N, Funke H, Assman G, Dinger M, Dean M, Chimini G, Santamarina-Fojo S, Fredrickson DS, Deneffe P, Brewer HB, Jr. (1999). Human ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1): genomic organization and identification of the genetic defect in the original Tangier disease kindred. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(22): 12685-90.
- Ren S, Hylemon PB, Marques D, Gurley E, Bodhan P, Hall E, Redford K, Gil G, Pandak WM (2004). Overexpression of cholesterol transporter StAR increases in vivo rates of bile acid synthesis in the rat and mouse. *Hepatology* 40(4): 910-7.
- Ren S, Marques D, Redford K, Hylemon PB, Gil G, Vlahcevic ZR, Pandak WM (2003). Regulation of oxysterol 7 α -hydroxylase (CYP7B1) in the rat. *Metabolism* 52(5): 636-42.
- Repa JJ, Berge KE, Pomajzl C, Richardson JA, Hobbs H, Mangelsdorf DJ (2002). Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors α and β . *J Biol Chem* 277(21): 18793-800.
- Repa JJ, Buhman KK, Farese RV, Jr., Dietschy JM, Turley SD (2004). ACAT2 deficiency limits cholesterol absorption in the cholesterol-fed mouse: impact on hepatic cholesterol homeostasis. *Hepatology* 40(5): 1088-97.
- Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I, Shan B, Brown MS, Goldstein JL, Mangelsdorf DJ (2000a). Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRA α and LXRB β . *Genes Dev* 14(22): 2819-30.
- Repa JJ, Lund EG, Horton JD, Leitersdorf E, Russell DW, Dietschy JM, Turley SD (2000b). Disruption of the sterol 27-hydroxylase gene in mice results in hepatomegaly and hypertriglyceridemia. Reversal by cholic acid feeding. *J Biol Chem* 275(50): 39685-92.
- Rhainds D, Brissette L (2004). The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking. defining the rules for lipid traders. *Int J Biochem Cell Biol* 36(1): 39-77.
- Ribeiro A, Mangeney M, Cardot P, Loriette C, Rayssiguier Y, Chambaz J, Bereziat G (1991). Effect of dietary fish oil and corn oil on lipid metabolism and apolipoprotein gene expression by rat liver. *Eur J Biochem* 196(2): 499-507.
- Robeau D (2000). Impact du césium après l'accident de Tchernobyl. *in* Le Césium, de l'environnement à l'Homme. Robeau D, Daburon F, Métivier H. Paris, EDP Sciences.

- Romanenko A, Bebesko V, Hatch M, Bazyka D, Finch S, Dyagil I, Reiss R, Chumak V, Bouville A, Gudzenko N, Zablotska L, Pilinskaya M, Lyubarets T, Bakhanova E, Babkina N, Trotsiuk N, Ledoschuk B, Belayev Y, Dybsky SS, Ron E, Howe G (2008). The Ukrainian-American study of leukemia and related disorders among Chernobyl cleanup workers from Ukraine: I. Study methods. *Radiat Res* 170(6): 691-7.
- Romanenko A, Morell-Quadreny L, Lopez-Guerrero JA, Pellin A, Nepomnyaschy V, Vozianov A, Lombart-Bosch A (2004). The INK4a /ARF locus: role in cell cycle control for renal cell epithelial tumor growth after the Chernobyl accident. *Virchows Arch* 445(3): 298-304.
- Romanenko A, Morimura K, Wanibuchi H, Salim EI, Kinoshita A, Kaneko M, Vozianov A, Fukushima S (2000). Increased oxidative stress with gene alteration in urinary bladder urothelium after the Chernobyl accident. *Int J Cancer* 86(6): 790-8.
- Romanenko A, Morimura K, Wanibuchi H, Wei M, Zamarin W, Vinnichenko W, Kinoshita A, Vozianov A, Fukushima S (2003). Urinary bladder lesions induced by persistent chronic low-dose ionizing radiation. *Cancer Sci* 94(4): 328-33.
- Romero JR, Fresnedo O, Isusi E, Barrionuevo J, Ochoa B (1999). Hepatic zonation of the formation and hydrolysis of cholesteryl esters in periportal and perivenous parenchymal cells. *Lipids* 34(9): 907-13.
- Ropenga A, Chapel A, Vandamme M, Griffiths NM (2004). Use of reference gene expression in rat distal colon after radiation exposure: a caveat. *Radiat Res* 161(5): 597-602.
- Rose KA, Stapleton G, Dott K, Kienny MP, Best R, Schwarz M, Russell DW, Bjorkhem I, Seckl J, Lathe R (1997). Cyp7b, a novel brain cytochrome P450, catalyzes the synthesis of neurosteroids 7 α -hydroxy dehydroepiandrosterone and 7 α -hydroxy pregnenolone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(10): 4925-30.
- Rosen H, Reshef A, Maeda N, Lippoldt A, Shpizen S, Triger L, Eggertsen G, Bjorkhem I, Leitersdorf E (1998). Markedly reduced bile acid synthesis but maintained levels of cholesterol and vitamin D metabolites in mice with disrupted sterol 27-hydroxylase gene. *J Biol Chem* 273(24): 14805-12.
- Rouas C, Souidi M, Grandcolas L, Grison S, Baudelin C, Gourmelon P, Pallardy M, Gueguen Y (2009). Acetaminophen induces xenobiotic-metabolizing enzymes in rat: Impact of a uranium chronic exposure. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 28(3): 363-369.
- Rozhinskaia L, Marova EI, Rassokhin BM, Purtova GS, Bukhman AI, Oganov VS, Rakhmanov AS, Bakulin AV, Rodionova SS, Mishchenko BP (1994). [Osteopenic syndrome in liquidators of the aftereffects of the accident at the Chernobyl power plant]. *Probl Endokrinol (Mosk)* 40(4): 24-7.
- Rudel LL, Lee RG, Cockman TL (2001). Acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase types 1 and 2: structure and function in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 12(2): 121-7.
- Ruhm W, Konig K, Bayer A (1999). Long-term follow-up of the 137Cs body burden of individuals after the Chernobyl accident--a means for the determination of biological half-lives. *Health Phys* 77(4): 373-82.
- Russell DW (1992). Cholesterol biosynthesis and metabolism. *Cardiovasc Drugs Ther* 6(2): 103-10.
- Russell DW (2003). The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem* 72: 137-74.
- Russell DW (2009a). Fifty years of advances in bile acid synthesis and metabolism. *J Lipid Res* 50 Suppl: S120-5.
- Russell DW, Halford RW, Ramirez DM, Shah R, Kotti T (2009b). Cholesterol 24-hydroxylase: an enzyme of cholesterol turnover in the brain. *Annu Rev Biochem* 78: 1017-40.
- Ryabokon NI, Goncharova RI (2006). Transgenerational accumulation of radiation damage in small mammals chronically exposed to Chernobyl fallout. *Radiat Environ Biophys* 45(3): 167-77.
- Sabeva NS, Liu J, Graf GA (2009). The ABCG5 ABCG8 sterol transporter and phytosterols: implications for cardiometabolic disease. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 16(2): 172-7.
- Saher G, Brugger B, Lappe-Siefke C, Mobius W, Tozawa R, Wehr MC, Wieland F, Ishibashi S, Nave KA (2005). High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. *Nat Neurosci* 8(4): 468-75.
- Sanchez DJ, Belles M, Albina ML, Gomez M, Linares V, Domingo JL (2006). Exposure of pregnant rats to uranium and restraint stress: effects on postnatal development and behavior of the offspring. *Toxicology* 228(2-3): 323-32.
- Sanchez DJ, Belles M, Albina ML, Sirvent JJ, Domingo JL (2001). Nephrotoxicity of simultaneous exposure to mercury and uranium in comparison to individual effects of these metals in rats. *Biol Trace Elem Res* 84(1-3): 139-54.
- Sartori HE (1984). Cesium therapy in cancer patients. *Pharmacol Biochem Behav* 21 Suppl 1: 11-3.
- Sastry PS (1985). Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Prog Lipid Res* 24(2): 69-176.
- Saucier SE, Kandutsch AA, Gayen AK, Swahn DK, Spencer TA (1989). Oxysterol regulators of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in liver. Effect of dietary cholesterol. *J Biol Chem* 264(12): 6863-9.
- Scanff P, Souidi M, Grison S, Griffiths NM, Gourmelon P (2004). Alteration of the enterohepatic recirculation of bile acids in rats after exposure to ionizing radiation. *Can J Physiol Pharmacol* 82(2): 114-24.
- Schmitz G, Langmann T (2005). Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression. *Biochim Biophys Acta* 1735(1): 1-19.
- Schoonjans K, Annicotte JS, Huby T, Botrugno OA, Fayard E, Ueda Y, Chapman J, Auwerx J (2002). Liver receptor homolog 1 controls the expression of the scavenger receptor class B type I. *EMBO Rep* 3(12): 1181-7.
- Schroeder F, Petrescu AD, Huang H, Atshaves BP, McIntosh AL, Martin GG, Hostetler HA, Vespa A, Landrock D, Landrock KK, Payne HR, Kier AB (2008). Role of fatty acid binding proteins and long chain fatty acids in modulating nuclear receptors and gene transcription. *Lipids* 43(1): 1-17.
- Schroepfer GJ, Jr. (2000). Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol Rev* 80(1): 361-554.

- Schwarz M, Lund EG, Setchell KD, Kayden HJ, Zerwekh JE, Bjorkhem I, Herz J, Russell DW (1996). Disruption of cholesterol 7 α -hydroxylase gene in mice. II. Bile acid deficiency is overcome by induction of oxysterol 7 α -hydroxylase. *J Biol Chem* 271(30): 18024-31.
- Schwarz M, Russell DW, Dietschy JM, Turley SD (1998). Marked reduction in bile acid synthesis in cholesterol 7 α -hydroxylase-deficient mice does not lead to diminished tissue cholesterol turnover or to hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 39(9): 1833-43.
- Schwarz M, Russell DW, Dietschy JM, Turley SD (2001). Alternate pathways of bile acid synthesis in the cholesterol 7 α -hydroxylase knockout mouse are not upregulated by either cholesterol or cholestyramine feeding. *J Lipid Res* 42(10): 1594-603.
- Seliskar M, Rozman D (2007). Mammalian cytochromes P450--importance of tissue specificity. *Biochim Biophys Acta* 1770(3): 458-66.
- Semenov MA, Bolbukh TV, Krasnitskaia AA, Maleev V (1994). [Hydration and structural state of liver DNA of rats exposed to radiation in the Chernobyl AES zone]. *Radiats Biol Radioecol* 34(3): 328-35.
- Semenova TP, Medvinskaia NI, Potekhina NI, Kolomitseva IK (1997). [Behavior reactions and lipids of brain synaptic membranes of rats under chronic exposure to gamma irradiation]. *Radiats Biol Radioecol* 37(5): 756-61.
- Serougne C, Ferezou J, Rukaj A (1984). Effects of excess dietary L-cystine on the rat plasma lipoproteins. *Ann Nutr Metab* 28(5): 311-20.
- Setchell KD, Schwarz M, O'Connell NC, Lund EG, Davis DL, Lathe R, Thompson HR, Weslie Tyson R, Sokol RJ, Russell DW (1998). Identification of a new inborn error in bile acid synthesis: mutation of the oxysterol 7 α -hydroxylase gene causes severe neonatal liver disease. *J Clin Invest* 102(9): 1690-703.
- Sever N, Song BL, Yabe D, Goldstein JL, Brown MS, DeBose-Boyd RA (2003a). Insig-dependent ubiquitination and degradation of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase stimulated by sterols and geranylgeraniol. *J Biol Chem* 278(52): 52479-90.
- Sever N, Yang T, Brown MS, Goldstein JL, DeBose-Boyd RA (2003b). Accelerated degradation of HMG CoA reductase mediated by binding of insig-1 to its sterol-sensing domain. *Mol Cell* 11(1): 25-33.
- Shalan MG, Mostafa MS, Hassouna MM, El-Nabi SE, El-Refaie A (2005). Amelioration of lead toxicity on rat liver with Vitamin C and silymarin supplements. *Toxicology* 206(1): 1-15.
- Shand JH, West DW (1994). The effects of clofibrate and bezafibrate on cholesterol metabolism in the liver of the male rat. *Lipids* 29(11): 747-52.
- Shefer S, Hauser S, Bekersky I, Mosbach EH (1969). Feedback regulation of bile acid biosynthesis in the rat. *J Lipid Res* 10(6): 646-55.
- Shefer S, Hauser S, Bekersky I, Mosbach EH (1970). Biochemical site of regulation of bile acid biosynthesis in the rat. *J Lipid Res* 11(5): 404-11.
- Shibata S, Hayakawa K, Egashira Y, Sanada H (2007). Roles of nuclear receptors in the up-regulation of hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase by cholestyramine in rats. *Life Sci* 80(6): 546-53.
- Shih DQ, Screenan S, Munoz KN, Philipson L, Pontoglio M, Yaniv M, Polonsky KS, Stoffel M (2001). Loss of HNF-1 α function in mice leads to abnormal expression of genes involved in pancreatic islet development and metabolism. *Diabetes* 50(11): 2472-80.
- Shimada A, Tamai T, Oida K, Takahashi S, Suzuki J, Nakai T, Miyabo S (1994). Increase in neutral cholesteryl ester hydrolase activity produced by extralysosomal hydrolysis of high-density lipoprotein cholesteryl esters in rat hepatoma cells (H-35). *Biochim Biophys Acta* 1215(1-2): 126-32.
- Shishkina LN, Materii LD, Kudiasheva AG, Zagorskaia NG, Taskaev AI (1992). [The structural-functional disorders in the liver of wild rodents from areas of the accident at the Chernobyl Atomic Electric Power Station]. *Radiobiologija* 32(1): 19-29.
- Shkala LV (1998). [Metabolic disorders in digestive and hepatobiliary pathology in those who worked in the cleanup of the aftermath of the accident at the Chernobyl Atomic Electric Power Station]. *Lik Sprava*(7): 42-5.
- Shoda J, Toll A, Axelson M, Pieper F, Wikvall K, Sjoval J (1993). Formation of 7 α - and 7 β -hydroxylated bile acid precursors from 27-hydroxycholesterol in human liver microsomes and mitochondria. *Hepatology* 17(3): 395-403.
- Sinal CJ, Tohkin M, Miyata M, Ward JM, Lambert G, Gonzalez FJ (2000). Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell* 102(6): 731-44.
- Soccio RE, Breslow JL (2004). Intracellular cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(7): 1150-60.
- Souchkevitch G, Lyasko L (1997). Investigation of the impact of radiation dose on hormones, biologically active metabolites and immunoglobulins in Chernobyl accident recovery workers. *Stem Cells* 15 Suppl 2: 151-4.
- Souidi M, Dubrac S, Parquet M, Volle DH, Lobaccaro JM, Mathe D, Combes O, Scanff P, Lutton C, Aigueperse J (2004). [Oxysterols: metabolism, biological role and associated diseases]. *Gastroenterol Clin Biol* 28(3): 279-93.
- Souidi M, Gueguen Y, Linard C, Dudoignon N, Grison S, Baudelin C, Marquette C, Gourmelon P, Aigueperse J, Dublineau I (2005). In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on CYP3A and associated nuclear receptors PXR and CAR in the rat. *Toxicology* 214(1-2): 113-22.
- Souidi M, Parquet M, Dubrac S, Audas O, Becue T, Lutton C (2000). Assay of microsomal oxysterol 7 α -hydroxylase activity in the hamster liver by a sensitive method: in vitro modulation by oxysterols. *Biochim Biophys Acta* 1487(1): 74-81.

- Souidi M, Parquet M, Dubrac S, Lutton C (2001). [New bile acid biosynthesis pathways]. *Gastroenterol Clin Biol* 25(1): 81-92.
- Souidi M, Parquet M, Ferezou J, Lutton C (1999). Modulation of cholesterol 7 α -hydroxylase and sterol 27-hydroxylase activities by steroids and physiological conditions in hamster. *Life Sci* 64(17): 1585-93.
- Souidi M, Scanff P, Grison S, Gourmelon P, Aigueperse J (2007). Effects of ionizing radiation on the activity of the major hepatic enzymes implicated in bile acid biosynthesis in the rat. *C R Biol* 330(12): 861-70.
- Souidi M, Tissandie E, Grandcolas L, Grison S, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P, Gueguen Y (2006). Chronic contamination with 137cesium in rat: effect on liver cholesterol metabolism. *Int J Toxicol* 25(6): 493-7.
- Soutar AK, Naoumova RP (2007). Mechanisms of disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 4(4): 214-25.
- Spady DK, Kearney DM, Hobbs HH (1999). Polyunsaturated fatty acids up-regulate hepatic scavenger receptor B1 (SR-BI) expression and HDL cholesteryl ester uptake in the hamster. *J Lipid Res* 40(8): 1384-94.
- Sparks JD, Sparks CE (1990). Insulin modulation of hepatic synthesis and secretion of apolipoprotein B by rat hepatocytes. *J Biol Chem* 265(15): 8854-62.
- Squibb KS, McDiarmid MA (2006). Depleted uranium exposure and health effects in Gulf War veterans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361(1468): 639-48.
- Staels B (2007). PPAR agonists and the metabolic syndrome. *Therapie* 62(4): 319-26.
- Staels B, Auwerx J, Chan L, van Tol A, Rosseneu M, Verhoeven G (1989). Influence of development, estrogens, and food intake on apolipoprotein A-I, A-II, and E mRNA in rat liver and intestine. *J Lipid Res* 30(8): 1137-45.
- Staels B, van Tol A, Andreu T, Auwerx J (1992). Fibrates influence the expression of genes involved in lipoprotein metabolism in a tissue-selective manner in the rat. *Arterioscler Thromb* 12(3): 286-94.
- Staels B, Vu-Dac N, Kosykh VA, Saladin R, Fruchart JC, Dallongeville J, Auwerx J (1995). Fibrates downregulate apolipoprotein C-III expression independent of induction of peroxisomal acyl coenzyme A oxidase. A potential mechanism for the hypolipidemic action of fibrates. *J Clin Invest* 95(2): 705-12.
- Staudinger J, Liu Y, Madan A, Habeebu S, Klaassen CD (2001). Coordinate regulation of xenobiotic and bile acid homeostasis by pregnane X receptor. *Drug Metab Dispos* 29(11): 1467-72.
- Stearns DM, Yazzie M, Bradley AS, Coryell VH, Shelley JT, Ashby A, Asplund CS, Lantz RC (2005). Uranyl acetate induces hprt mutations and uranium-DNA adducts in Chinese hamster ovary EM9 cells. *Mutagenesis* 20(6): 417-23.
- Stojadinovic S, Jovanovic M (1966). Activity of transaminases in the rat serum after internal contamination with 137Cs and 90Sr. *Strahlentherapie* 131(4): 633-6.
- Stravitz RT, Rao YP, Vlahcevic ZR, Gurley EC, Jarvis WD, Hylemon PB (1996a). Hepatocellular protein kinase C activation by bile acids: implications for regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase. *Am J Physiol* 271(2 Pt 1): G293-303.
- Stravitz RT, Vlahcevic ZR, Russell TL, Heizer ML, Avadhani NG, Hylemon PB (1996b). Regulation of sterol 27-hydroxylase and an alternative pathway of bile acid biosynthesis in primary cultures of rat hepatocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 57(5-6): 337-47.
- Stromstedt M, Waterman MR, Haugen TB, Tasken K, Parvinen M, Rozman D (1998). Elevated expression of lanosterol 14 α -demethylase (CYP51) and the synthesis of oocyte meiosis-activating sterols in postmeiotic germ cells of male rats. *Endocrinology* 139(5): 2314-21.
- Stroup D, Chiang JY (2000). HNF4 and COUP-TFII interact to modulate transcription of the cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A1). *J Lipid Res* 41(1): 1-11.
- Stroup D, Crestani M, Chiang JY (1997). Identification of a bile acid response element in the cholesterol 7 α -hydroxylase gene CYP7A. *Am J Physiol* 273(2 Pt 1): G508-17.
- Su T, Waxman DJ (2004). Impact of dimethyl sulfoxide on expression of nuclear receptors and drug-inducible cytochromes P450 in primary rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* 424(2): 226-34.
- Sumi K, Tanaka T, Uchida A, Magoori K, Urashima Y, Ohashi R, Ohguchi H, Okamura M, Kudo H, Daigo K, Maejima T, Kojima N, Sakakibara I, Jiang S, Hasegawa G, Kim I, Osborne TF, Naito M, Gonzalez FJ, Hamakubo T, Kodama T, Sakai J (2007). Cooperative interaction between hepatocyte nuclear factor 4 α and GATA transcription factors regulates ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8. *Mol Cell Biol* 27(12): 4248-60.
- Sumner D (2007). Health effects resulting from the Chernobyl accident. *Med Confl Surviv* 23(1): 31-45.
- Sundberg J, Oskarsson A (1991). Transfer of 137cesium via rat milk: reduction with ammonium ferric hexacyanoferrate. *Pharmacol Toxicol* 69(4): 286-90.
- Sychik SI, Stozharov AN (1999). [Delayed effect of prenatal irradiation on the critical organs functional state in children after Chernobyl accident]. *Radiats Biol Radioecol* 39(5): 500-4.
- Szanto A, Narkar V, Shen Q, Uray IP, Davies PJ, Nagy L (2004). Retinoid X receptors: X-ploring their (patho)physiological functions. *Cell Death Differ* 11 Suppl 2: S126-43.
- Sztajnkrzyer MD, Otten EJ (2004). Chemical and radiological toxicity of depleted uranium. *Mil Med* 169(3): 212-6.
- Takatsuji T, Sato H, Takada J, Endo S, Hoshi M, Sharifov VF, Veselkina, II, Pilenko IV, Kalimullin WA, Masyakin VB, Kovalev AI, Yoshikawa I, Okajima S (2000). Relationship between the 137Cs whole-body counting results and soil and food contamination in farms near Chernobyl. *Health Phys* 78(1): 86-9.
- Talukdar S, Hillgartner FB (2006). The mechanism mediating the activation of acetyl-coenzyme A carboxylase- α gene transcription by the liver X receptor agonist T0-901317. *J Lipid Res* 47(11): 2451-61.

- Tamehiro N, Shigemoto-Mogami Y, Kakeya T, Okuhira K, Suzuki K, Sato R, Nagao T, Nishimaki-Mogami T (2007). Sterol regulatory element-binding protein-2- and liver X receptor-driven dual promoter regulation of hepatic ABC transporter A1 gene expression: mechanism underlying the unique response to cellular cholesterol status. *J Biol Chem* 282(29): 21090-9.
- Tang PM, Chiang JY (1986). Modulation of reconstituted cholesterol 7 alpha-hydroxylase by phosphatase and protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 134(2): 797-802.
- Tasat DR, Orona NS, Mandalunis PM, Cabrini RL, Ubios AM (2007). Ultrastructural and metabolic changes in osteoblasts exposed to uranyl nitrate. *Arch Toxicol* 81(5): 319-26.
- Taulan M, Paquet F, Maubert C, Delissen O, Demaille J, Romey MC (2004). Renal toxicogenomic response to chronic uranyl nitrate insult in mice. *Environ Health Perspect* 112(16): 1628-35.
- Theodoropoulos C, Demers C, Petit JL, Gascon-Barre M (2003). High sensitivity of rat hepatic vitamin D3-25 hydroxylase CYP27A to 1,25-dihydroxyvitamin D3 administration. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284(1): E138-47.
- Thiebault C, Carriere M, Milgram S, Simon A, Avoscan L, Gouget B (2007). Uranium induces apoptosis and is genotoxic to normal rat kidney (NRK-52E) proximal cells. *Toxicol Sci* 98(2): 479-87.
- Thomas C, Auwerx J, Schoonjans K (2008). Bile acids and the membrane bile acid receptor TGR5--connecting nutrition and metabolism. *Thyroid* 18(2): 167-74.
- Thomas RG, Thomas RL (1970). Lethality of ¹³⁷Cs and ⁹⁰Sr administered in combination to rats. *Radiat Res* 42(2): 282-91.
- Thomson AB, Cheeseman CI, Walker K (1984). Intestinal uptake of bile acids: effect of external abdominal irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 10(5): 671-85.
- Tissandie E, Gueguen Y, Lobaccaro JM, Aigueperse J, Gourmelon P, Paquet F, Souidi M (2006a). Chronic contamination with ¹³⁷Cesium affects Vitamin D3 metabolism in rats. *Toxicology* 225(1): 75-80.
- Tissandie E, Gueguen Y, Lobaccaro JM, Aigueperse J, Souidi M (2006b). [Vitamin D: metabolism, regulation and associated diseases]. *Med Sci (Paris)* 22(12): 1095-100.
- Tissandie E, Gueguen Y, Lobaccaro JM, Grandcolas L, Grison S, Aigueperse J, Souidi M (2009). Vitamin D metabolism impairment in the rat's offspring following maternal exposure to ¹³⁷cesium. *Arch Toxicol* 83(4): 357-62.
- Tissandie E, Gueguen Y, Lobaccaro JM, Grandcolas L, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P, Souidi M (2007). In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on vitamin D3 metabolism in rat. *Biochim Biophys Acta* 1770(2): 266-72.
- Tissandie E, Gueguen Y, Lobaccaro JM, Paquet F, Aigueperse J, Souidi M (2006c). Effects of depleted uranium after short-term exposure on vitamin D metabolism in rat. *Arch Toxicol* 80(8): 473-80.
- Titov LP, Kharitonov GD, Gourmanchuk IE, Ignatenko SI (1995). Effects of radiation on the production of immunoglobulins in children subsequent to the Chernobyl disaster. *Allergy Proc* 16(4): 185-93.
- Titova LD, Oradovskaia IV, Sharova NI, Iarilin AA (1996). [A comparative evaluation of the content of T-lymphocyte subpopulations, alpha 1-thymosin and autoantibodies to epithelial thymic cells in the personnel in the 30-kilometer control zone of the accident at the Chernobyl Atomic Electric Power Station]. *Radiats Biol Radioecol* 36(4): 601-9.
- Tobin KA, Steineger HH, Alberti S, Spydevold O, Auwerx J, Gustafsson JA, Nebb HI (2000). Cross-talk between fatty acid and cholesterol metabolism mediated by liver X receptor-alpha. *Mol Endocrinol* 14(5): 741-52.
- Tomasek L, Darby SC, Swerdlow AJ, Placek V, Kunz E (1993). Radon exposure and cancers other than lung cancer among uranium miners in West Bohemia. *Lancet* 341(8850): 919-23.
- Tontonoz P, Mangelsdorf DJ (2003). Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol Endocrinol* 17(6): 985-93.
- Tournier BB, Frelon S, Tournalias E, Agez L, Delissen O, Dublineau I, Paquet F, Petitot F (2009). Role of the olfactory receptor neurons in the direct transport of inhaled uranium to the rat brain. *Toxicol Lett*.
- Tracy BL, Quinn JM, Lahey J, Gilman AP, Mancuso K, Yagminas AP, Villeneuve DC (1992). Absorption and retention of uranium from drinking water by rats and rabbits. *Health Phys* 62(1): 65-73.
- Tribrat TA, Kostenko AG, Tsebrzhinskii OI (1999). [The antioxidant system of patients with chronic inflammatory liver diseases after exposure to ionizing radiation]. *Lik Sprava*(1): 23-5.
- Trivedi A, Hannan MA (2004). Radiation and cardiovascular diseases. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 23(2): 99-106.
- Twisk J, de Wit EC, Princen HM (1995). Suppression of sterol 27-hydroxylase mRNA and transcriptional activity by bile acids in cultured rat hepatocytes. *Biochem J* 305 (Pt 2): 505-11.
- Ubios AM, Guglielmotti MB, Steimetz T, Cabrini RL (1991). Uranium inhibits bone formation in physiologic alveolar bone modeling and remodeling. *Environ Res* 54(1): 17-23.
- Ubios AM, Piloni MJ, Marzorati M, Cabrini RL (1994). Bone growth is impaired by uranium intoxication. *Acta Odontol Latinoam* 8(2): 3-8.
- Uelmen PJ, Oka K, Sullivan M, Chang CC, Chang TY, Chan L (1995). Tissue-specific expression and cholesterol regulation of acylcoenzyme A:cholesterol acyltransferase (ACAT) in mice. Molecular cloning of mouse ACAT cDNA, chromosomal localization, and regulation of ACAT in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 270(44): 26192-201.
- UNEP (2002). Depleted Uranium in Serbia & Montenegro: Post-Conflict Assessment in the Federal Republic of Yugoslavia. United Nations Environment Program (UNEP). Geneva

- UNEP (2003). Depleted Uranium in Bosnia & Herzegovina : Post-Conflict Environmental Assessment. United Nations Environment Program (UNEP). Geneva
- UNSCEAR (2000). Sources and effects of ionizing radiation: United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic radiation (UNSCEAR) 2000 Report to the General Assembly, with scientific annexes - vol II: Effects. United Nations. Vienna
- Vacquier B, Rogel A, Leuraud K, Caer S, Acker A, Laurier D (2009). Radon-associated lung cancer risk among French uranium miners: modifying factors of the exposure-risk relationship. *Radiat Environ Biophys* 48(1): 1-9.
- Vance JE (2006a). Lipid imbalance in the neurological disorder, Niemann-Pick C disease. *FEBS Lett* 580(23): 5518-24.
- Vance JE, Hayashi H, Karten B (2005). Cholesterol homeostasis in neurons and glial cells. *Semin Cell Dev Biol* 16(2): 193-212.
- Vance JE, Karten B, Hayashi H (2006b). Lipid dynamics in neurons. *Biochem Soc Trans* 34(Pt 3): 399-403.
- Vejux A, Malvitte L, Lizard G (2008). Side effects of oxysterols: cytotoxicity, oxidation, inflammation, and phospholipidosis. *Braz J Med Biol Res* 41(7): 545-56.
- Venkateswaran A, Repa JJ, Lobaccaro JM, Bronson A, Mangelsdorf DJ, Edwards PA (2000). Human white/murine ABC8 mRNA levels are highly induced in lipid-loaded macrophages. A transcriptional role for specific oxysterols. *J Biol Chem* 275(19): 14700-7.
- Verrips A, van Engelen BG, ter Laak H, Gabreels-Festen A, Janssen A, Zwarts M, Wevers RA, Gabreels FJ (2000). Cerebrotendinous xanthomatosis. Controversies about nerve and muscle: observations in ten patients. *Neuromuscul Disord* 10(6): 407-14.
- Vietti KR, Lasley SM (2007). Stimulus-evoked glutamate release is diminished by acute exposure to uranium in vitro. *Neurotoxicol Teratol* 29(6): 607-12.
- Vlahcevic ZR, Eggertsen G, Bjorkhem I, Hylemon PB, Redford K, Pandak WM (2000). Regulation of sterol 12 α -hydroxylase and cholic acid biosynthesis in the rat. *Gastroenterology* 118(3): 599-607.
- Vlahcevic ZR, Jairath SK, Heuman DM, Stravitz RT, Hylemon PB, Avadhani NG, Pandak WM (1996). Transcriptional regulation of hepatic sterol 27-hydroxylase by bile acids. *Am J Physiol* 270(4 Pt 1): G646-52.
- Vlahcevic ZR, Stravitz RT, Heuman DM, Hylemon PB, Pandak WM (1997). Quantitative estimations of the contribution of different bile acid pathways to total bile acid synthesis in the rat. *Gastroenterology* 113(6): 1949-57.
- Volle DH, Mouzat K, Duggavathi R, Siddeek B, Dechelotte P, Sion B, Veysiere G, Benahmed M, Lobaccaro JM (2007). Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility. *Mol Endocrinol* 21(5): 1014-27.
- von Zallinger C, Tempel K (1998). Transplacental transfer of radionuclides. A review. *Zentralbl Veterinarmed A* 45(10): 581-90.
- Vozenin-Brotans MC, Gault N, Sivan V, Tricaud Y, Dubray B, Clough K, Cosset JM, Lefaix JL, Martin M (1999). Histopathological and cellular studies of a case of cutaneous radiation syndrome after accidental chronic exposure to a cesium source. *Radiat Res* 152(3): 332-7.
- Vrins C, Vink E, Vandenberghe KE, Frijters R, Seppen J, Groen AK (2007). The sterol transporting heterodimer ABCG5/ABCG8 requires bile salts to mediate cholesterol efflux. *FEBS Lett* 581(24): 4616-20.
- Vu-Dac N, Chopin-Delannoy S, Gervois P, Bonnelye E, Martin G, Fruchart JC, Laudet V, Staels B (1998). The nuclear receptors peroxisome proliferator-activated receptor alpha and Rev-erbalpha mediate the species-specific regulation of apolipoprotein A-I expression by fibrates. *J Biol Chem* 273(40): 25713-20.
- Vykhovanets EV, Chernyshov VP, Slukvin, II, Antipkin YG, Vasyuk A, Colos V (2000). Analysis of blood lymphocyte subsets in children living around Chernobyl exposed long-term to low doses of cesium-137 and various doses of iodine-131. *Radiat Res* 153(6): 760-72.
- Wada T, Kang HS, Angers M, Gong H, Bhatia S, Khadem S, Ren S, Ellis E, Strom SC, Jetten AM, Xie W (2008). Identification of oxysterol 7 α -hydroxylase (Cyp7b1) as a novel retinoid-related orphan receptor alpha (RORalpha) (NR1F1) target gene and a functional cross-talk between RORalpha and liver X receptor (NR1H3). *Mol Pharmacol* 73(3): 891-9.
- Wan YJ, An D, Cai Y, Repa JJ, Hung-Po Chen T, Flores M, Postic C, Magnuson MA, Chen J, Chien KR, French S, Mangelsdorf DJ, Sucov HM (2000a). Hepatocyte-specific mutation establishes retinoid X receptor alpha as a heterodimeric integrator of multiple physiological processes in the liver. *Mol Cell Biol* 20(12): 4436-44.
- Wan YJ, Cai Y, Lungo W, Fu P, Locker J, French S, Sucov HM (2000b). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha-mediated pathways are altered in hepatocyte-specific retinoid X receptor alpha-deficient mice. *J Biol Chem* 275(36): 28285-90.
- Wang DQ, Lammert F, Cohen DE, Paigen B, Carey MC (1999). Cholic acid aids absorption, biliary secretion, and phase transitions of cholesterol in murine cholelithogenesis. *Am J Physiol* 276(3 Pt 1): G751-60.
- Wang DQ, Paigen B, Carey MC (2001). Genetic factors at the enterocyte level account for variations in intestinal cholesterol absorption efficiency among inbred strains of mice. *J Lipid Res* 42(11): 1820-30.
- Wang DQ, Tazuma S, Cohen DE, Carey MC (2003). Feeding natural hydrophilic bile acids inhibits intestinal cholesterol absorption: studies in the gallstone-susceptible mouse. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285(3): G494-502.

- Wang J, Einarsson C, Murphy C, Parini P, Bjorkhem I, Gafvels M, Eggertsen G (2006). Studies on LXR- and FXR-mediated effects on cholesterol homeostasis in normal and cholic acid-depleted mice. *J Lipid Res* 47(2): 421-30.
- Wang L, Lee YK, Bundman D, Han Y, Thevananther S, Kim CS, Chua SS, Wei P, Heyman RA, Karin M, Moore DD (2002). Redundant pathways for negative feedback regulation of bile acid production. *Dev Cell* 2(6): 721-31.
- Wang N, Lan D, Chen W, Matsuura F, Tall AR (2004). ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(26): 9774-9.
- Wang N, Silver DL, Costet P, Tall AR (2000). Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1. *J Biol Chem* 275(42): 33053-8.
- Wasserman RH, Comar CL (1961). The influence of dietary potassium on the retention of chronically ingested cesium-137 in the rat. *Radiat Res* 15: 70-7.
- Waterham HR (2006). Defects of cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett* 580(23): 5442-9.
- Weber LW, Boll M, Stampfl A (2004). Maintaining cholesterol homeostasis: sterol regulatory element-binding proteins. *World J Gastroenterol* 10(21): 3081-7.
- Weisgraber KH (1994). Apolipoprotein E: structure-function relationships. *Adv Protein Chem* 45: 249-302.
- Wenner C, Lorkowski S, Engel T, Cullen P (2001). Apolipoprotein E in macrophages and hepatocytes is eegraded via the proteasomal pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 282(2): 608-14.
- WHO (1983). Selected radionuclides: Tritium, carbon-14, krypton-85, strontium-90, iodine, caesium-137, radon, plutonium. *Environmental Health Criteria* 25. World Health Organization (WHO). Geneva
- WHO (2001). Depleted Uranium: Sources, Exposure and Health Effects. Department of Protection of the Human Environment - World Health Organization (WHO). Geneva
- WHO (2006). Health Effects of the chernobyl Accident and Special care programmes - reports of the UN Chernobyl Forum Expert Group "Health". World Health Organization (WHO). Geneva
- WHO (2008). Guidelines for drinking-water quality: 3rd edition incorporating the first and second addenda. Volume 1
- Recommendations. . World Health Organization (WHO). Geneva
- Willy PJ, Mangelsdorf DJ (1997). Unique requirements for retinoid-dependent transcriptional activation by the orphan receptor LXR. *Genes Dev* 11(3): 289-98.
- Witt W, Kolleck I, Fechner H, Sinha P, Rustow B (2000). Regulation by vitamin E of the scavenger receptor BI in rat liver and HepG2 cells. *J Lipid Res* 41(12): 2009-16.
- Wolf G (2006). Is 9-cis-retinoic acid the endogenous ligand for the retinoic acid-X receptor? *Nutr Rev* 64(12): 532-8.
- Wolters H, Elzinga BM, Baller JF, Boverhof R, Schwarz M, Stieger B, Verkade HJ, Kuipers F (2002). Effects of bile salt flux variations on the expression of hepatic bile salt transporters in vivo in mice. *J Hepatol* 37(5): 556-63.
- Wong FL, Yamada M, Sasaki H, Kodama K, Hosoda Y (1999). Effects of radiation on the longitudinal trends of total serum cholesterol levels in the atomic bomb survivors. *Radiat Res* 151(6): 736-46.
- Woollett LA (2008). Where does fetal and embryonic cholesterol originate and what does it do? *Annu Rev Nutr* 28: 97-114.
- Worgul BV, Kundiye YI, Sergiyenko NM, Chumak VV, Vitte PM, Medvedovsky C, Bakhanova EV, Junk AK, Kyrychenko OY, Musijachenko NV, Shylo SA, Vitte OP, Xu S, Xue X, Shore RE (2007). Cataracts among Chernobyl clean-up workers: implications regarding permissible eye exposures. *Radiat Res* 167(2): 233-43.
- Wrenn ME, Durbin PW, Howard B, Lipsztein J, Rundo J, Still ET, Willis DL (1985). Metabolism of ingested U and Ra. *Health Phys* 48(5): 601-33.
- Wu Z, Martin KO, Javitt NB, Chiang JY (1999). Structure and functions of human oxysterol 7alpha-hydroxylase cDNAs and gene CYP7B1. *J Lipid Res* 40(12): 2195-203.
- Xie C, Lund EG, Turley SD, Russell DW, Dietschy JM (2003). Quantitation of two pathways for cholesterol excretion from the brain in normal mice and mice with neurodegeneration. *J Lipid Res* 44(9): 1780-9.
- Xiong H, Callaghan D, Jones A, Walker DG, Lue LF, Beach TG, Sue LI, Woulfe J, Xu H, Stanimirovic DB, Zhang W (2008). Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high beta- and gamma-secretase activities and Abeta production. *Neurobiol Dis* 29(3): 422-37.
- Xu PL, Kong YY, Xie YH, Wang Y (2003). Corepressor SMRT specifically represses the transcriptional activity of orphan nuclear receptor hB1F/hLRH-1. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* 35(10): 897-903.
- Yamada M, Wong FL, Fujiwara S, Akahoshi M, Suzuki G (2004). Noncancer disease incidence in atomic bomb survivors, 1958-1998. *Radiat Res* 161(6): 622-32.
- Yamauchi Y, Hayashi M, Abe-Dohmae S, Yokoyama S (2003). Apolipoprotein A-I activates protein kinase C alpha signaling to phosphorylate and stabilize ATP binding cassette transporter A1 for the high density lipoprotein assembly. *J Biol Chem* 278(48): 47890-7.
- Yancey PG, de la Llera-Moya M, Swarnakar S, Monzo P, Klein SM, Connelly MA, Johnson WJ, Williams DL, Rothblat GH (2000). High density lipoprotein phospholipid composition is a major determinant of the bi-directional flux and net movement of cellular free cholesterol mediated by scavenger receptor BI. *J Biol Chem* 275(47): 36596-604.

- Yang Y, Eggertsen G, Gafvels M, Andersson U, Einarsson C, Bjorkhem I, Chiang JY (2004). Mechanisms of cholesterol and sterol regulatory element binding protein regulation of the sterol 12alpha-hydroxylase gene (CYP8B1). *Biochem Biophys Res Commun* 320(4): 1204-10.
- Yang Y, Zhang M, Eggertsen G, Chiang JY (2002). On the mechanism of bile acid inhibition of rat sterol 12alpha-hydroxylase gene (CYP8B1) transcription: roles of alpha-fetoprotein transcription factor and hepatocyte nuclear factor 4alpha. *Biochim Biophys Acta* 1583(1): 63-73.
- Yoshikawa T, Shimano H, Yahagi N, Ide T, Amemiya-Kudo M, Matsuzaka T, Nakakuki M, Tomita S, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Takahashi A, Sone H, Osuga J, Gotoda T, Ishibashi S, Yamada N (2002). Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements. *J Biol Chem* 277(3): 1705-11.
- Yu L, Gupta S, Xu F, Liverman AD, Moschetta A, Mangelsdorf DJ, Repa JJ, Hobbs HH, Cohen JC (2005). Expression of ABCG5 and ABCG8 is required for regulation of biliary cholesterol secretion. *J Biol Chem* 280(10): 8742-7.
- Zaire R, Notter M, Riedel W, Thiel E (1997). Unexpected rates of chromosomal instabilities and alterations of hormone levels in Namibian uranium miners. *Radiat Res* 147(5): 579-84.
- Zamora ML, Tracy BL, Zielinski JM, Meyerhof DP, Moss MA (1998). Chronic ingestion of uranium in drinking water: a study of kidney bioeffects in humans. *Toxicol Sci* 43(1): 68-77.
- Zannis VI, Chroni A, Krieger M (2006). Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *J Mol Med* 84(4): 276-94.
- Zannis VI, Kurnit DM, Breslow JL (1982). Hepatic apo-A-I and apo-E and intestinal apo-A-I are synthesized in precursor isoprotein forms by organ cultures of human fetal tissues. *J Biol Chem* 257(1): 536-44.
- Zatsepin I, Verger P, Robert-Gnansia E, Gagniere B, Tirmarche M, Khmel R, Babicheva I, Lazjuk G (2007). Down syndrome time-clustering in January 1987 in Belarus: link with the Chernobyl accident? *Reprod Toxicol* 24(3-4): 289-95.
- Zhang CK, Lin W, Cai YN, Xu PL, Dong H, Li M, Kong YY, Fu G, Xie YH, Huang GM, Wang Y (2001a). Characterization of the genomic structure and tissue-specific promoter of the human nuclear receptor NR5A2 (hB1F) gene. *Gene* 273(2): 239-49.
- Zhang M, Chiang JY (2001b). Transcriptional regulation of the human sterol 12alpha-hydroxylase gene (CYP8B1): roles of hepatocyte nuclear factor 4alpha in mediating bile acid repression. *J Biol Chem* 276(45): 41690-9.
- Zhang Y, Castellani LW, Sinal CJ, Gonzalez FJ, Edwards PA (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) regulates triglyceride metabolism by activation of the nuclear receptor FXR. *Genes Dev* 18(2): 157-69.
- Zhang Y, Lee FY, Barrera G, Lee H, Vales C, Gonzalez FJ, Willson TM, Edwards PA (2006). Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(4): 1006-11.
- Zhao Y, Thorngate FE, Weisgraber KH, Williams DL, Parks JS (2005). Apolipoprotein E is the major physiological activator of lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) on apolipoprotein B lipoproteins. *Biochemistry* 44(3): 1013-25.
- Zhavoronkova LA, Gogitidze NV, Kholodova NB (1996). [The characteristics of the late reaction of the human brain to radiation exposure: the EEG and neuropsychological study (the sequelae of the accident at the Chernobyl Atomic Electric Power Station)]. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* 46(4): 699-711.

ANNEXES

ANNEXE 1

Revue générale sur l'uranium

URANIUM : PROPRIÉTÉS ET EFFETS BIOLOGIQUES APRÈS CONTAMINATION INTERNE

M. Souidi, E. Tissandie, R. Racine, H. Bensoussan, C. Rouas, E. Grignard, I. Dublineau, P. Gourmelon, P. Lestaevel, Y. Gueguen

Ann Biol Clin 2009 ; 67 (1) : 23-38

Uranium : propriétés et effets biologiques après contamination interne

Uranium: properties and biological effects after internal contamination

M. Souidi
E. Tissandie
R. Racine
H. Ben Soussan
C. Rouas
E. Grignard
I. Dublineau
P. Gourmelon
P. Lestaevel
Y. Gueguen

Institut de radioprotection
et de sûreté nucléaire,
Direction de la radioprotection
de l'homme,
IRSN, Fontenay-aux-Roses
<maamar.souidi@irsn.fr>

Résumé. L'uranium est un radionucléide présent dans l'environnement depuis l'origine de la terre. A cet uranium d'origine naturelle viennent s'ajouter des apports plus récents résultant des activités industrielles et militaires de l'homme. La toxicité de l'uranium résulterait d'une combinaison de ses propriétés chimiques (métal lourd) et radiologiques (émission de rayonnements ionisants). La toxicité aiguë se manifeste chez l'animal par une importante perte de poids et des signes d'atteinte rénale et cérébrale. Une altération de la formation osseuse, une modification du système reproducteur et des effets carcinogènes sont également couramment observés. A contrario, les effets biologiques d'une exposition chronique à de faibles doses sont peu connus. Cependant, les résultats de différentes études récentes suggèrent que la contamination chronique à faible niveau par l'uranium induirait des effets biologiques subtils mais significatifs dans des organes qui ne sont pas connus pour être des organes sensibles à la contamination par l'uranium. C'est le cas du système nerveux central par exemple puisque, récemment, ont été montrées une altération de la mémoire à court terme et une augmentation du niveau d'anxiété, associées à la présence d'uranium dans différentes structures cérébrales chez l'animal (essentiellement rongeur). La grande nouveauté dans la connaissance des effets d'une contamination chronique par l'uranium est la mise en évidence d'effets biologiques de l'uranium sur plusieurs métabolismes majeurs de l'organisme, incluant le métabolisme des médicaments, des hormones stéroïdiennes, de la vitamine D et du fer. Ces données scientifiques récentes suggèrent que l'uranium pourrait participer à l'augmentation des risques sanitaires liés à la pollution de l'environnement.

Mots clés : uranium, contamination chronique, contamination aiguë

Abstract. Uranium is a radionuclide present in the environment since the origin of the Earth. In addition to natural uranium, recent deposits from industrial or military activities are acknowledged. Uranium's toxicity is due to a combination of its chemical (heavy metal) and radiological properties (emission of ionizing radiations). Acute toxicity induces an important weight loss and signs of renal and cerebral impairment. Alterations of bone growth, modifications of the reproductive system and carcinogenic effects are also often seen. On the contrary, the biological effects of a chronic exposure to low doses are unwell known. However, results from different recent studies suggest that a chronic contamination with low levels of uranium induces subtle but significant levels. Indeed, an internal contamination of rats for several weeks leads to detection of uranium in many cerebral structures, in association with an alteration of short-term memory and an increase of anxiety level. Biological effects of uranium on the metabolisms of xenobiotics, steroid hormones and vitamin D

Article reçu le 30 juillet 2008,
accepté le 7 octobre 2008

Tirés à part : M. Souidi

revue générale

were described in the liver, testis and kidneys. These recent scientific data suggest that uranium could participate to increase of health risks linked to environmental pollution.

Key words: uranium, chronic contamination, acute exposure

La pollution de l'environnement est devenue l'une des préoccupations majeures du public. Tous les milieux (aquatique, atmosphérique et terrestre) sont concernés par cette pollution, qu'elle soit d'origine anthropique (émissions des moteurs ou des usines, stations d'épuration, etc.) ou naturelle (éruption volcanique, érosion, etc.). La croissance démographique et l'augmentation de l'activité industrielle contribuent pour une part considérable à la contamination de l'environnement. Parmi les nombreuses causes de pollution, nous pouvons citer par exemple l'utilisation d'engrais ou d'insecticides par l'industrie agricole, les rejets d'hydrocarbures (dégazage, marée noire) ou l'émission de métaux lourds (cadmium, mercure, plomb, etc.) autour des sites d'activités liés à la métallurgie. Cette pollution incessante, à laquelle chacun est exposé, peut avoir un impact sur la santé humaine. Parmi ces polluants, certains sont des perturbateurs endocriniens et peuvent avoir un impact sur l'équilibre hormonal de l'espèce humaine. On peut citer par exemple les résidus de dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) ou le chlordane, des insecticides qui sont des agonistes des œstrogènes et de la progestérone et altèrent la fertilité ; les dithiocarbamates, des fongicides qui perturbent la synthèse de neurotransmetteurs comme l'adrénaline ; le cadmium, un métal lourd qui perturbe le métabolisme de la vitamine D ; ou les dioxines, qui diminuent le taux d'hormones thyroïdiennes. Ainsi, l'augmentation de la prévalence de certaines maladies dans les pays industrialisés soumis à cette pollution, telles que les cancers ou les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, est au cœur de l'actualité médicale et aussi sociale et médiatique. Les résultats de la recherche scientifique laissent donc à penser que ces maladies pourraient être également la conséquence d'une altération lente et progressive de notre environnement par l'utilisation de substances chimiques et radiologiques. L'exposition à l'uranium, qui possède une double toxicité (chimique et radiologique) pourrait participer à l'augmentation des risques potentiels émergents liés à une contamination éventuelle de l'environnement.

L'uranium est un radionucléide présent sur la terre depuis son origine. Il est retrouvé aussi bien dans le sol, l'air et l'eau que dans l'ensemble de la chaîne alimentaire en raison de ce dépôt naturel. A cette provenance naturelle de l'uranium s'ajoutent des apports résultant des activités

industrielles de l'homme. En effet, depuis le XX^e siècle, les sources d'exposition à l'uranium ont considérablement augmenté du fait des activités humaines (centrales nucléaires, exploitation des mines d'uranium, déchets radioactifs, etc.). En dehors des activités industrielles liées au cycle du combustible du nucléaire qui expose une population bien identifiée (les travailleurs du nucléaire), les émissions des industries de retraitement participent aussi à l'augmentation de l'exposition du public. Par ailleurs, l'utilisation d'obus contenant de l'uranium lors des derniers conflits internationaux a conduit à l'augmentation du taux de dissémination de ce radioélément dans l'environnement. Ces différentes situations peuvent donc contribuer à augmenter la probabilité d'exposition de l'homme, et induire donc d'éventuels effets délétères en termes de santé humaine.

Cette revue propose donc de faire une synthèse des connaissances sur l'uranium, en partant de ses propriétés, puis de sa dispersion dans l'environnement, suivi par sa biocinétique d'entrée et de distribution, ainsi que ses effets biologiques induits dans différents organes comme les reins, l'os, le système nerveux central, les gonades, le foie, les poumons, le système digestif, dans le cas d'une contamination aiguë puis après contamination chronique à faible dose.

Les radionucléides dans l'environnement

Les radionucléides existent naturellement ou sont produits artificiellement dans les réacteurs nucléaires. Les radionucléides naturels se divisent en deux catégories : les radionucléides primordiaux, qui étaient présents au moment de la formation de la terre, et les radionucléides cosmogéniques, produits en permanence par le bombardement des molécules gazeuses de l'atmosphère terrestre par les rayons cosmiques. Le potassium 40, l'uranium 238 et le thorium 232 sont les principaux radionucléides primordiaux. Ces éléments, ainsi que leurs descendants radioactifs, sont présents dans les roches, les sols et se retrouvent à l'état de traces dans les eaux et les végétaux. Les quatre principaux radionucléides cosmogéniques sont le carbone 14, le béryllium 7, le sodium 22 et le tritium. Ils sont déposés sur la terre par l'action du brassage atmosphérique, des précipitations et de la pesanteur. Les radionu-

cléides d'origine artificielle sont utilisés pour les activités médicales (technétium 99m, thallium 201, iode 131, etc.) et dans l'industrie nucléaire civile et militaire (plutonium 239, strontium 90, césium 137, etc.) [1].

Parmi ces radionucléides, l'uranium représente une source de contamination potentiellement importante pour la population.

L'uranium

Propriétés et utilisations

Découvert en 1789 par le chimiste allemand Martin Klaproth, l'uranium est l'élément le plus lourd présent naturellement dans les roches, les sols et l'eau. Sa propriété radioactive a été mise en évidence une centaine d'années plus tard, en 1896, par le physicien français Henri Becquerel.

La concentration moyenne de l'uranium dans la croûte terrestre est de 2 mg/kg [2]. Elle varie en fonction de la constitution des roches. On rencontre l'uranium sous différentes formes minéralogiques, aussi bien dans les terrains granitiques que sédimentaires. Il se combine, par exemple avec l'oxygène dans l'uraninite et la pechblende, deux des principaux minerais d'uranium, constitués d'oxyde uraneux (UO₂).

De symbole U, l'uranium est le dernier élément naturel du tableau périodique de Mendeleïev. Il possède le plus grand numéro atomique (Z = 92) et fait partie de la famille des actinides. L'atome d'uranium possède 6 électrons périphériques qui sont facilement extractibles. Il peut se présenter aux valences III, IV, V et VI. En solution aqueuse, l'uranium est préférentiellement à la valence VI et forme différents complexes par l'intermédiaire de l'ion uranyle UO₂²⁺. Dans les fluides biologiques, il est présent uniquement sous forme d'ion uranyle principalement complexé avec les ions carbonate ou citrate [3].

L'uranium possède 17 isotopes avec des nombres de masse compris entre 227 et 242. Parmi ces isotopes, trois seulement sont présents à l'état naturel : l'uranium 238 (²³⁸U, 99,28 %) ; l'uranium 235 (²³⁵U, 0,718 %) et l'uranium 234 (²³⁴U, 0,0054 %). Ces isotopes, tous radioactifs, se désintègrent principalement par émission de rayonnements α et possèdent des périodes très longues (tableau 1). D'autres isotopes peuvent être induits artificiellement, l'uranium 233 ou 236.

L'uranium 235 est le seul noyau naturel aisément fissible et il présente donc un intérêt énergétique et militaire. Les deux applications principales de la fission sont les réacteurs nucléaires producteurs d'électricité et les armes nucléaires. La plupart des réacteurs nucléaires utilisent de l'uranium dit enrichi (UE). L'enrichissement consiste

donc à augmenter la teneur en ²³⁵U de l'uranium naturel (UN, 0,7 % ²³⁵U) jusqu'à un niveau compris entre 3 et 5 % en vue de l'utiliser comme combustible ou jusqu'à un niveau supérieur à 90 % en vue de l'utiliser comme explosif. Le mélange restant après séparation de l'UE est appelé uranium appauvri (UA) car il contient très peu d'²³⁵U (0,3 % en moyenne). Il possède les mêmes propriétés chimiques que l'UN mais est 60 % moins radioactif (tableau 2). C'est à la fois un résidu de l'industrie nucléaire, disponible en très grande quantité et bon marché, et un matériau employé pour des utilisations non nucléaires. En effet, la fabrication d'une tonne d'UE à 3,5 % à partir d'UN entraîne la production de plus de quatre tonnes d'UA. Sa forte densité (19 g/cm³, environ 1,7 fois celle du plomb) et son prix favorisent son utilisation par rapport aux autres métaux de densité comparable comme l'iridium, l'osmium ou le tungstène, malgré sa radioactivité. Ses propriétés ont conduit à l'utiliser dans de nombreuses applications civiles et militaires : contre-poids ou lest dans les avions, boucliers de protection contre les rayonnements dans le matériel médical utilisé pour les radiothérapies et dans les conteneurs servant aux transports des matières radioactives, blindage dans les plaques de char d'assaut et plus particulièrement composant de projectile d'armes de guerre [4, 5].

Sources d'exposition

L'alimentation et l'eau potable constituent les deux principales sources d'exposition chronique à l'uranium (figure 1). L'homme ingère quotidiennement 1-2 µg d'uranium (sous forme d'uranyl) dans l'alimentation et à 1,5 µg dans l'eau de boisson [2]. Certaines régions sont naturellement riches en uranium. Ainsi, certaines populations de Finlande sont exposées à un taux d'UN dans leur eau de

Tableau 1. Caractéristiques des isotopes de l'uranium naturel.

Isotope	Périodes de décroissance	Masse relative (%)	Activité (Bq) pour 1 g d'uranium	Activité (%)
²³⁸ U	4,5 milliards d'années	99,28	12,4.10 ⁷	48,2
²³⁵ U	0,7 milliard d'années	0,72	5,8.10 ⁸	2,3
²³⁴ U	0,25 million d'années	5,40.10 ⁻³	12,5.10 ³	49,5

Tableau 2. Composition et activité des 3 types d'uranium.

	Masse d' ²³⁵ U (%)	Activité spécifique (kBq/g)
Uranium naturel	0,7	25
Uranium enrichi	3	42
Uranium appauvri	0,3	14

revue générale

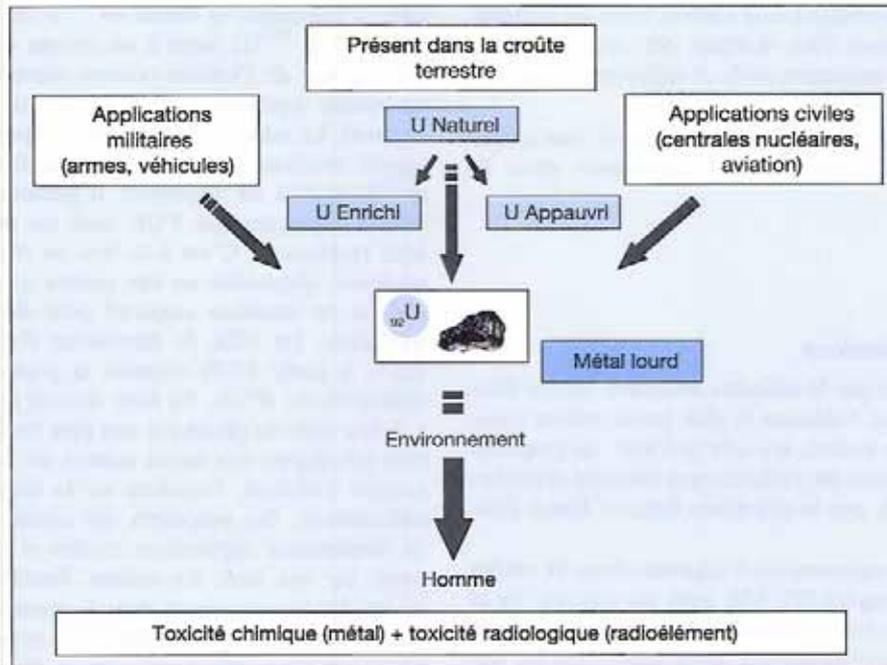


Figure 1. Sources d'exposition à l'uranium : origine naturelle et activité humaine.

boisson 100 à 1 000 fois plus élevé que la moyenne [6]. Des concentrations d'uranium de 1,2 mg/L ont été détectées dans les eaux destinées ou non à la consommation humaine au Nouveau-Mexique [7], de 0,7 mg/L au Canada [8] et atteignant 20 mg/L en Finlande [9]. La combustion du charbon et des carburants constitue l'une des principales sources de contamination de l'air par l'uranium. On a signalé les teneurs en uranium suivantes dans l'atmosphère locale : New York, 0,4 ng/m³ [10] et Royaume-Uni, 0,02 ng/m³ [11]. La fumée de cigarette (deux paquets par jour) est responsable d'un apport individuel équivalent à 0,05 µg d'uranium par jour [12]. Si l'on suppose que le volume quotidien d'air respiré atteint 20 m³ et que la concentration moyenne d'uranium dans l'air de la ville est de 0,1 ng/m³, la dose quotidienne d'uranium inspirée par l'individu s'élève à environ 2,0 ng. A cette exposition naturelle, vient s'ajouter une exposition à l'UA et beaucoup plus rarement à l'UE du fait de l'activité humaine. Les résidus miniers laissés par le broyage et le traitement du minerai d'uranium ainsi que l'utilisation d'armes à l'UA lors des derniers conflits internationaux (Bosnie, Kosovo, Afghanistan, Irak, etc.) participent à la contamination de l'environnement et augmentent les sources d'exposition des populations locales [2, 13, 14]. De plus, certains engrais phosphatés employés dans l'agriculture présentent des teneurs élevées en uranium [15, 16].

Biocinétique

Le préambule à toute étude de toxicologie est la mise en place d'étude de biocinétique et de distribution dans les tissus, permettant de connaître le devenir biologique du toxique dans l'organisme.

Absorption

Les différents modes de pénétration de l'uranium dans l'organisme sont l'ingestion, l'inhalation et la blessure cutanée [17]. La contamination par inhalation concerne principalement des personnes à leur poste de travail dans l'industrie électronucléaire, ou des soldats exposés à des projectiles contenant de l'UA. En revanche, l'ingestion est la voie la plus fréquente pour l'exposition du public ; elle est due à la consommation d'eau ou d'aliments contaminés.

Après ingestion, une faible quantité d'uranium est absorbée au niveau du tractus gastro-intestinal. Chez l'homme, le taux d'absorption intestinale est estimé à environ 1-1,5 % [18]. Les études réalisées chez l'animal montrent que ce taux varie en fonction de l'espèce, du régime alimentaire, de l'âge, de la forme physico-chimique du sel d'uranium et de la solubilité du composé [19-22]. Chez le rat, des études récentes ont montré que le taux de résorption était de 0,4 % dans le cas d'une ingestion d'eau contaminée par du nitrate d'uranyle [23].

L'intestin grêle est le lieu principal de résorption et de transfert de l'uranium depuis le bol alimentaire vers le compartiment sanguin [24]. Par ailleurs, cette étude indique que la voie de passage majoritaire est la voie transcellulaire (à plus de 80 %), ce qui pose la question des transporteurs impliqués dans le transport de l'uranium à travers l'intestin grêle. Aucune donnée expérimentale ne permet actuellement de répondre à cette question, d'autant que la nature de ces transporteurs dépend de la nature physicochimique de l'uranium dans le fluide gastro-intestinal.

Distribution et rétention

Une fois dans le sang, l'uranium est rapidement distribué aux organes cibles et majoritairement excrété par les urines. L'uranium plasmatique est associé à des molécules de faible poids moléculaire comme les ions carbonate ou citrate, ou bien lié à des protéines plasmatiques telles que la transferrine ou l'albumine [25, 26]. Quelques jours après son passage dans la circulation générale, la charge systémique d'uranium se retrouve principalement dans l'os et au niveau du cortex rénal (environ 90 %) et une partie beaucoup plus faible dans les tissus mous (poumons, rate, foie, etc.) [27] (figure 2). L'os représente le site de stockage à long terme de l'uranium qui se trouve essentiellement concentré à proximité des zones vascularisées et des zones de calcification active. Le comportement de l'uranium dans le squelette est comparable à celui

des éléments alcalino-terreux [28]. Sa fixation à la surface de l'os se fait par échange d'ions uranyle UO_2^{2+} avec les ions Ca^{2+} présents dans les cristaux d'hydroxyapatite [19, 29]. Dans les cellules tubulaires proximales du rein, l'uranium précipite sous forme de phosphate d'uranyle. Ces microprécipités insolubles sont alors déversés dans la lumière du néphron et éliminés dans les urines sous forme de grains submicroscopiques [30].

Des travaux menés sur le rat contaminé de façon chronique à l'uranium (1 mg par jour) montrent que ce radionucléide s'accumule dans la plupart des organes (reins, squelette, intestin, cerveau, muscle, foie...) selon un processus complexe [31]. L'ingestion chronique d'uranium conduit à un profil irrégulier, caractérisé par des pics d'accumulation à 3, 10 et 19 mois de contamination, entrecoupés de retour à des niveaux d'accumulation peu élevés.

Excrétion et élimination

Après ingestion, la majeure partie de l'uranium n'est pas résorbée et est éliminée *via* les fèces [32]. En revanche, l'excrétion de l'uranium solubilisé qui circule dans le sang est essentiellement urinaire. La mesure de l'uranium urinaire permet de suivre l'élimination d'une partie de l'uranium ayant été absorbé. Environ la moitié de l'uranium absorbé est éliminée dans les urines dès le premier jour, 70 % sont éliminés dans les 10 jours et 85 % après trois mois [33]. Avec une demi-vie de rétention allant de 300 à 5 000 jours, l'élimination de l'uranium stocké dans les os est beaucoup plus lente [32]. Ainsi une fraction de l'uranium absorbé reste piégée dans l'os pendant plusieurs dizaines d'années.

Toxicité

L'os et le rein étant respectivement les organes de stockage à long terme et à court terme de l'uranium, ils ont été décrits comme les premières cibles de la toxicité de l'uranium. La néphrite est effectivement le principal signe clinique dû à l'uranium mais de nombreux autres tissus sont affectés suite à la contamination par l'uranium.

L'uranium possède une double toxicité : une toxicité chimique due à sa nature de métal lourd et une toxicité radiologique due à sa nature de radioélément. La toxicité radiologique varie en fonction de son isotopie et de son degré d'enrichissement en ^{235}U . A l'inverse, quel que soit l'isotope considéré, le risque chimique reste identique. Lors d'une contamination par de l'uranium naturel ou appauvri, la toxicité chimique est prépondérante. En revanche, plus l'activité spécifique du composé uranifère est importante (comme c'est le cas pour l'uranium enrichi), plus le risque radiotoxique est à prendre en considération. Pour les risques chimiques et radiologiques, deux types d'effets sont

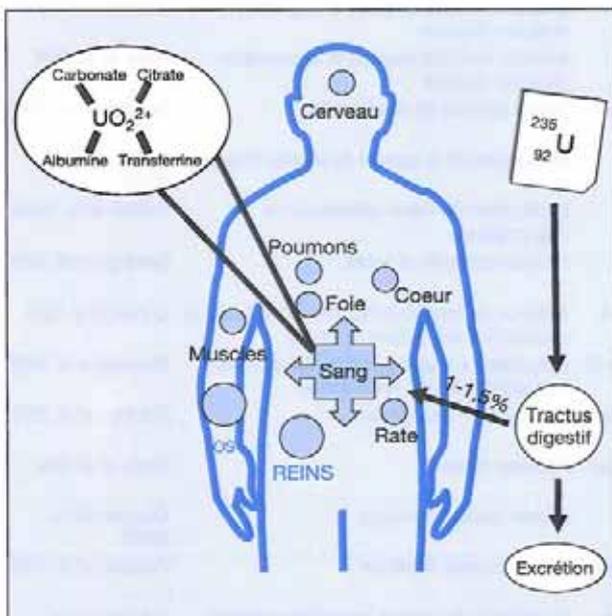


Figure 2. Distribution de l'uranium dans l'organisme.

revue générale

à distinguer : les effets de toxicité dite aiguë qui correspondent à une exposition à une forte dose pendant un temps court et les effets de toxicité dite chronique qui correspondent à une exposition à long terme mais à des doses plus faibles.

Il est généralement admis que le rein, organe de stockage à court terme, est le siège de la chimiotoxicité de l'uranium et que l'os, tissu de rétention à long terme, est la cible de la radiotoxicité. Cependant, certaines études décrivent des effets neurotoxiques, hépatotoxiques, génotoxiques et embryonnaires qui pourraient également jouer un rôle non négligeable dans la toxicité de ce radio-nucléide.

Toxicité à forte dose

Effets sur le rein

L'effet néphrotoxique de l'uranium est dû essentiellement à ses propriétés chimiotoxiques. La dose létale 50 (DL50) par voie orale est de 204 mg/kg chez le rat et de 242 mg/kg chez la souris (tableau 3). C'est la toxicité rénale (néphrite tubulaire aiguë) qui entraîne la mort de l'animal [34]. Chez l'homme, la DL50 pour une prise orale d'uranium soluble dépasse plusieurs grammes d'uranium par kg [35].

A forte dose, l'uranium est capable d'induire des néphropathies sévères affectant surtout les tubules proximaux,

Tableau 3. Synthèse des effets toxiques de l'uranium.

		Doses	Effets toxiques	Références
Reins	Données animales	120 à 240 µg d'U/kg de poids corporel (injections intrapéritonéales multiples)	Atteintes tubulaires	Diamond <i>et al.</i> 1989
		2 mg d'U/kg de poids corporel (injection intraveineuse)	Atteintes glomérulaires	Kobayashi <i>et al.</i> 1984
		10 mg d'U/kg de poids corporel (injection sous-cutanée)	Atteintes tubulaires et glomérulaires	Domingo <i>et al.</i> 1987
		10 mg d'U/kg de poids corporel (injection sous-cutanée)	Atteintes tubulaires et glomérulaires	Haley <i>et al.</i> 1982
		204 mg/kg de poids corporel (administration intragastrique)	Modifications du métabolisme de la vitamine D	Tissandré <i>et al.</i> 2006
Os	Données <i>in vitro</i>	25 mg d'U/kg de poids corporel (injection intraveineuse)	Atteintes tubulaires et glomérulaires	Blantz 1975
		Traitement de cellules ostéoblastiques humaines avec 10 à 250 µM d'U	Transformation en cellules cancéreuses	Miller <i>et al.</i> 1998
	Données animales	2 mg d'U/kg de poids corporel (injection intrapéritonéale)	Inhibition formation osseuse	Gluglielmotti <i>et al.</i> 1985
		0,2 à 2 mg d'U/kg de poids corporel (injection intramusculaire)	Inhibition formation osseuse et augmentation résorption osseuse	Fukuda <i>et al.</i> 2006
Système nerveux central	Données animales	0,8 et 2 mg d'U/kg de poids corporel (injection intrapéritonéale)	Inhibition formation osseuse et augmentation résorption osseuse	Ubios <i>et al.</i> 1991
		10 ou 210 mg d'U/kg de poids corporel (administration orale ou sous-cutanée)	Signes cliniques de neurotoxicité	Domingo <i>et al.</i> 1987
		144 µg d'U/kg de poids corporel (injection intrapéritonéale)	Abaissement de la quantité de sommeil paradoxal	Lestaevél <i>et al.</i> 2005b
Reproduction	Données animales	Implants sous-cutanés contenant 99,25% d'U	Modifications de l'électrophysiologie de l'hippocampe	Pellmar <i>et al.</i> 1999b
		5 à 50 mg d'U/kg de poids corporel/jour pendant la période de gestation (administration orale)	Toxicité maternelle et fœtale	Domingo <i>et al.</i> 1989
Foie	Données animales	10 à 80 mg d'U/kg de poids corporel/jour pendant 64 jours (administration orale)	Altération du tissu interstitiel dans les testicules et vacuolisation des cellules de Leydig	LLobet <i>et al.</i> 1991
		5 à 25 mg d'U/kg de poids corporel/jour pendant 14 à 60 jours (administration orale)	Perturbation croissance et développement et augmentation létalité embryonnaire	Patemain <i>et al.</i> 1989
		10 ou 210 mg d'U/kg de poids corporel (administration orale ou sous-cutanée)	Modifications histologiques	Domingo <i>et al.</i> 1987
		Inhalation de poussières d'U à 19±8 mg U/m ³ (6 h par jour, 5 jours par semaine pendant 1 à 11 mois)	Nécroses focales	Cross <i>et al.</i> 1981
Système gastro-intestinal	Données animales	11,5 mg d'U/kg de poids corporel (injection sous-cutanée)	Atteinte fonction hépatique	Gueguen <i>et al.</i> 2006b
		0,1 à 2 mg d'U/kg de poids corporel (administration intratrachéale)	Atteinte fonction hépatique	Pasanen <i>et al.</i> 1995
		204 mg d'U/kg de poids corporel (administration intragastrique)	Perturbation du système immunitaire intestinal	Dublineau <i>et al.</i> 2006

mais également les structures glomérulaires [28, 36, 37]. Des études histologiques et morphologiques révèlent une altération de l'architecture de l'épithélium glomérulaire [37] et une nécrose cellulaire au niveau de l'épithélium tubulaire proximal [36]. Malgré cette nécrose rénale, l'épithélium tubulaire est capable de se régénérer. Après injection répétée de fluorure d'uranyle UO_2F_2 (à une dose de 0,66 ou 1,32 mg U/kg de poids corporel), une étude histologique chez le rat révèle une nécrose massive des tubules proximaux (au niveau des segments terminaux) suivie d'une régénération de l'épithélium après l'arrêt du traitement [36]. Cependant, les cellules lésées sont apparemment remplacées par des nouvelles cellules structurellement différentes et dépourvues de certaines capacités fonctionnelles [22]. Une étude réalisée *in vitro* montre qu'à forte concentration, l'uranium peut déclencher l'apoptose par activation des caspases 3 et 9 (protéases à cystéine) activées par des signaux intrinsèques *via* la mitochondrie [38].

Une exposition aiguë à l'uranium se caractérise également par des anomalies fonctionnelles telles que la polyurie, l'enzymurie, la protéinurie et l'élévation sanguine de la créatinine et de l'urée [34, 36, 39, 40]. La sévérité et la réversibilité des lésions dépendent de la concentration d'uranium dans les reins et du temps d'exposition. En 1959, la Commission internationale de protection radiologique a recommandé une concentration maximale admissible en uranium de 3 $\mu\text{g/g}$ de rein. Cependant, cette valeur seuil est aujourd'hui très discutée. En effet, des nécroses cellulaires des tubules proximaux accompagnées d'une protéinurie et d'une enzymurie sont observées chez des animaux contenant des concentrations d'uranium dans les reins bien inférieures à la dose recommandée (0,7 à 1,4 $\mu\text{g U/g}$ de poids de rein) [36]. L'administration aiguë d'UA (204 mg/kg) à des rats perturbe également le métabolisme rénal de la vitamine D aboutissant à des variations de son taux plasmatique [41].

L'un des mécanismes de toxicité de l'uranium au niveau rénal pourrait être dû à l'acidité accrue du tubule proximal entraînant la dissociation du complexe d'uranium et les ions uranyles peuvent alors se combiner avec des composants de la membrane luminale [42, 43]. Dans la cellule, les ions uranyles s'accumulent principalement dans les lysosomes pour former des aiguilles de phosphate d'uranyle, mais également dans les mitochondries [30, 44].

Effets sur l'os

L'os étant le site de stockage à long terme de l'uranium, il est la cible potentielle de la radiotoxicité et de la chimio-toxicité. Des cancers osseux (ostéosarcomes) ont été observés chez les animaux exposés à l'uranium présentant des activités spécifiques élevées (^{232}U ou ^{233}U). En revan-

che, aucun cancer n'a été décrit chez l'animal après incorporation d'UN [22].

Des études réalisées *in vitro* ont montré que l'UA sous forme soluble transforme des cellules ostéoblastiques humaines (cellules cubiques situées à la surface externe et interne du tissu osseux en croissance et impliquées dans la formation osseuse) en cellules cancéreuses [45].

In vivo, l'uranium est capable d'inhiber la formation osseuse et d'augmenter la résorption osseuse. Ces effets sont attribués aux propriétés chimiotoxiques de l'uranium [46-48]. Ubios *et al.* observent chez le rat la diminution de la formation de l'os cortical couplée à une augmentation de la résorption osseuse, 14 jours après injection intrapéritonéale de nitrate d'uranyle (UNO_3) (2 mg/kg de poids corporel). Les auteurs suggèrent que l'uranium pourrait contribuer à l'ostéoporose ou à d'autres pathologies osseuses chez les individus exposés.

Effets sur le système nerveux central

Chez l'homme, la neurotoxicité de l'uranium n'a pas été clairement démontrée. Cependant, une étude révèle des troubles du comportement tels que des états de dépression ou d'agitation chez des travailleurs exposés à de fortes doses d'uranium [49].

Chez l'animal, l'administration orale ou sous-cutanée d'acétate d'uranium (10-210 mg U/kg) conduit à l'apparition de signes cliniques de neurotoxicité tels que tremblements, hypothermie, et un myosis [34]. De plus, un abaissement de la quantité de sommeil paradoxal est observé chez le rat après une injection subnéphrotoxique d'UA (144 $\mu\text{g/kg}$) [50]. À une dose néphrotoxique (576 $\mu\text{g/kg}$), l'injection d'uranium provoque au niveau du système nerveux central une oxydation lipidique et des dommages histopathologiques [51].

L'accumulation de l'uranium dans le cerveau est mise en évidence chez des rats implantés avec des fragments d'UA simulant des blessures d'éclat d'obus [52]. L'uranium est capable de traverser la barrière hématoencéphalique et se distribue de façon hétérogène dans les structures cérébrales [52-54]. Sa distribution est dépendante de la dose [52]. Ainsi l'uranium se concentre préférentiellement dans certaines structures, notamment au niveau du cervelet, du mésencéphale, de l'hippocampe et du cortex où il pourrait induire un effet toxique. Chez les rats portant des implants sous-cutanés d'UA, Pellmar *et al.* constatent des modifications de l'électrophysiologie de l'hippocampe et suggèrent que ces effets pourraient être une conséquence directe de l'accumulation d'uranium dans cette structure [55].

Effets sur la reproduction

La toxicité de l'uranium sur le développement et la reproduction a été observée principalement chez la souris

revue générale

lorsque l'uranium est administré par voie orale ou par injection [56]. L'ingestion d'uranium pendant l'organogénèse induit une toxicité maternelle et fœtale. En effet, Domingo *et al.* [57] rapportent une réduction de la prise de poids, une diminution de la prise alimentaire et une augmentation du poids du foie chez les souris femelles après gavage pendant la période de gestation (quantités d'uranium comprises entre 5 et 50 mg d'acétate d'uranyle/kg/jour). Chez le fœtus, ils constatent également l'apparition de malformations (palatoschisis ou fissures congénitales du palais et malformations du sternum). Les auteurs décrivent des troubles de l'ossification voire une absence d'ossification du squelette.

Aucun effet sur la fertilité n'est mis en évidence après administration d'uranium à des doses comprises entre 5 et 25 mg/kg/jour [58]. En revanche, une diminution du nombre de nouveau-nés due à une augmentation de la mortalité *in utero*, une augmentation de la létalité des embryons ainsi qu'une perturbation de la croissance et du développement des souriceaux ont été notées pour les doses d'uranium les plus élevées. Malgré l'absence d'effet constaté sur la spermatogénèse, Llobet *et al.* [59] rapportent des altérations du tissu interstitiel dans les testicules et une vacuolisation des cellules de Leydig chez les souris mâles exposées à l'uranium *via* l'eau de boisson pendant 64 jours avant l'accouplement (quantités d'acétate d'uranyle comprises entre 10 et 80 mg d'uranium/kg/jour).

Effets sur le foie

Quelques études récentes montrent que le foie serait également le siège de la toxicité de l'uranium. Des modifications histologiques telles que l'apparition de lésions après exposition à de fortes doses d'uranium sont décrites [34]. Des nécroses focales sont observées au niveau du foie chez le hamster après une exposition aiguë et à forte dose à l'uranium [60]. Une élévation des taux plasmatiques des transaminases ALAT ou TGP (alanine amino transférase ou transaminase glutamique pyruvique) et ASAT ou TGO (aspartate amino transférase ou transaminase glutamique oxalo-acétique) traduisant une altération de la perméabilité membranaire et éventuellement une nécrose hépatique est observée après injection sous-cutanée d'uranium chez le rat [34, 61]. Des anomalies fonctionnelles telles que la diminution des triglycérides sont également décrites [61]. Au niveau moléculaire, l'inhalation de dioxyde d'uranium induit une modification de l'activité d'enzymes de type cytochromes P450 (CYPs) hépatiques impliquées dans le catabolisme de la testostérone [62]. D'autre part, dans le foie, l'activité de la CYP27A1 qui assure le métabolisme du cholestérol et de la vitamine D, ainsi que l'activité et l'expression des CYP3A impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques sont aussi perturbées chez le rat quelques jours

après l'administration d'UA [61] ce qui peut conduire à l'altération du métabolisme de certains médicaments [63, 64].

Effets sur les poumons

Lors d'une contamination par inhalation, les poumons constituent la première cible biologique potentielle pour l'uranium. Divers effets ont été décrits sur les poumons après exposition aiguë par l'uranium : réaction inflammatoire, stress oxydatif, effet génotoxique, ou modification de l'expression des cytochromes P450 [62, 65, 66]. Le développement d'une réaction inflammatoire constitue l'effet majeur induit par les particules d'uranium, que ce soit après instillation intratrachéale [62] ou inhalation [66]. L'analyse histologique a pu mettre en évidence que les cellules inflammatoires sont présentes à proximité des agrégats de particules d'uranium [62, 65]. Cette réaction inflammatoire s'accompagne de l'induction de différentes cytokines pro- (IL-8, TNF α) et anti-inflammatoires (IL-10) [66]. L'induction d'une réaction inflammatoire par l'uranium peut expliquer la diminution de l'activité enzymatique de certains cytochromes P450 à trois jours post-instillation, ces enzymes étant connues comme sensibles à l'inflammation [62]. La question se pose de la réversion ou du maintien de cette réaction inflammatoire sur le long terme. D'autre part, il est à noter qu'aucune donnée n'est disponible sur les éventuels effets à court terme d'une exposition aiguë à l'uranium sur les poumons dans le cas d'autre mode de contamination, blessure ou ingestion.

Afin de décrire au mieux les mécanismes d'action de l'uranium dans les poumons, différents auteurs ont étudié l'effet de l'uranium *in vitro* sur des cultures cellulaires de macrophages impliqués dans l'épuration pulmonaire [67-71]. L'ensemble de ces résultats permet de construire une proposition de succession d'événements pour expliquer les différents effets observés de l'uranium. La première étape est l'incorporation d'uranium par les macrophages qui se fait dans les 2 heures qui suivent l'exposition [69]. Cette incorporation conduit à l'induction de la voie transcellulaire passant par la *jun* kinase impliquée dans la régulation de l'apoptose [67, 70]. L'apparition de cellules soit en apoptose, soit en nécrose pro-apoptotique est observée dès 6 heures post-exposition [68, 69]. Enfin, l'activation de la voie JNK induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF α ou IL-6 [67, 70, 71].

Par ailleurs, une étude réalisée sur une lignée de cellules épithéliales de rat a mis en évidence l'induction d'un stress oxydatif suivi par une diminution des défenses anti-oxydantes dès 30 minutes après exposition à l'uranium [72]. Cet effet oxydant de l'uranium est suivi dans les 24 heures par une diminution de la prolifération de ces cellules, qui est attribuée à une diminution des défenses antioxydantes.

Enfin, parmi les effets induits par l'uranium régulièrement cités figurent les effets génotoxiques. A notre connaissance, une seule étude a montré un effet génotoxique visualisé par un test de comet sur les macrophages alvéolaires 24 heures après inhalation aiguë, mais seulement pour la dose la plus forte [66]. Cela semble indiquer que l'uranium n'induit pas d'effet marqué en termes de génotoxicité à court terme après inhalation aiguë.

Effets sur le système digestif

Le système digestif est probablement à l'heure actuelle le système physiologique pour lequel les éventuels effets de l'uranium sont les moins bien connus, alors que ce système constitue la voie d'entrée des toxiques lors d'une exposition par ingestion. Le tractus gastro-intestinal a développé un certain nombre de mécanismes de défense immunologiques et non immunologiques afin de pouvoir répondre à l'entrée de toxiques dans l'organisme *via* la voie orale. Les éventuels effets de l'uranium sur ces deux types de défense sont très peu décrits dans la littérature, même si quelques études se sont attachées à décrire l'absorption gastro-intestinale d'uranium [18, 20, 27, 73]. Les premières études portant sur l'effet d'une exposition aiguë à forte dose d'uranium ont été réalisées en 1966 [74], puis en 1985-1986 [75, 76]. Ces études ont mis en évidence que les deux composantes principales de la paroi intestinale, à savoir l'épithélium et les muscles lisses intestinaux, étaient touchées par une contamination par l'uranium. En effet, une inhibition du transporteur de sucres dans le jéjunum de rat a été rapportée [74, 76], ainsi qu'une stimulation des contractions du muscle longitudinal d'iléon de cochon d'Inde [75]. Ces études indiquent donc que l'uranium, en tout cas à forte dose, peut avoir une action sur différents types de transporteurs présents dans l'intestin. Plus récemment, une étude a été réalisée à court terme après administration intragastrique de nitrate d'uranium afin d'évaluer la toxicité de ce radionucléide sur l'épithélium intestinal [77]. Les résultats de cette étude montrent une absence de modification dans les processus de prolifération, de différenciation et d'apoptose au niveau de l'épithélium iléal. Par ailleurs, le statut immunitaire de l'intestin a également été estimé *via* la quantification d'un certain nombre de cellules immunitaires (lymphocytes cytotoxiques, lymphocytes helper, neutrophiles) et de l'expression génique et protéique de cytokines pro- et anti-inflammatoires [77]. Une diminution du taux protéique de CCL-2, la chimiokine attractante pour les macrophages, ainsi qu'une augmentation du taux d'ARNm d'IFN γ est respectivement observée à 1 et 3 jours post-contamination. En revanche, aucune modification dans la localisation et la densité des populations cellulaires observées n'a été notée. En conclusion, cette étude montre que les propriétés de barrière et d'im-

munité mucosale de l'intestin ne sont que peu touchées à court terme par une administration orale d'uranium appauvri à forte dose, malgré le fait que le segment étudié, l'iléon, soit le site privilégié de passage de l'uranium en cas d'administration orale [24]. Cependant, les modifications induites par l'uranium sur les taux de cytokines et chimiokines de la muqueuse intestinale suggèrent qu'à long terme, et dans le cas d'une contamination chronique, des effets pourraient être observés sur le statut immunitaire de l'intestin.

In vitro, une seule étude a été effectuée [78]. Les auteurs ont comparé des cellules épithéliales de côlon à différents niveaux de différenciation, afin d'estimer la toxicité cellulaire de l'uranium sur ces cellules, ainsi que l'effet génotoxique de l'uranium. Un effet génotoxique est observé dans les cellules prénéoplastiques et hautement transformées, mais non dans les cellules normales. Il semble notamment que le gène TP53 suppresseur de tumeurs soit sensible à l'acétate d'uranium, en tout cas pour de fortes concentrations.

Toxicité à faible dose

Comparées aux connaissances acquises après exposition aiguë, peu de données sont disponibles sur les effets biologiques d'une contamination chronique à l'uranium (tableau 4). Pourtant ces expositions par ingestion chronique de faibles quantités *via* l'alimentation et l'eau de boisson constituent le principal mode d'exposition de la population.

Effets sur les deux principaux organes cibles d'uranium : l'os et le rein

Les données obtenues chez l'homme démontrent que même pour des apports quotidiens faibles, l'ingestion d'uranium peut altérer la fonction rénale. Ainsi, dans une étude canadienne (concentrations moyennes d'uranium dans l'eau de 0,71 $\mu\text{g/L}$, 16,6 $\mu\text{g/L}$ et 14,7 $\mu\text{g/L}$), une association statistiquement significative a été observée entre l'exposition à l'uranium (concentrations dans l'eau, durée d'exposition) et l'albumine urinaire, indicateur d'un dysfonctionnement rénal [79]. De plus, Zamora *et al.* [80] montrent dans une population de la Nouvelle-Ecosse (concentrations moyennes d'uranium dans l'eau de 2 à 781 $\mu\text{g/L}$), une corrélation positive des phosphatases alcalines et de la bêta-2-microglobuline urinaires avec l'augmentation d'incorporation d'uranium évoquant une atteinte des tubules proximaux. Enfin, une autre étude a permis d'observer des effets tubulaires (calciurie, phosphaturie et polyurie) associés à la présence d'uranium dans l'eau potable [81]. Cependant, aucun signe d'atteinte glomérulaire n'a été mis en évidence lors de ces études. Chez l'homme, des effets toxiques sur l'os ont été égale-

revue générale

Tableau 4. Synthèse des effets biologiques induits après contamination chronique à l'uranium chez l'homme et l'animal.

		Doses	Effets toxiques	Références
Reins	Données animales	0,96 à 600 mg d'U/l d'eau de boisson pendant 91 jours	Atteintes tubulaires et glomérulaires	Gilman <i>et al.</i> 1998a
		40 mg d'U/l d'eau de boisson	Atteintes tubulaires	Donnadieu-Claraz <i>et al.</i> 2007
	40 mg d'U/l d'eau de boisson	Modifications du métabolisme de la vitamine D	Tissandré <i>et al.</i> 2007a; 2007b	
Os	Données humaines	2 à 781 g d'U/l d'eau de boisson	Atteintes tubulaires	Zamora <i>et al.</i> 1998
		28 g d'U/l d'eau de boisson	Atteintes tubulaires	Kurtio <i>et al.</i> 2002
		0,71, 16,6 ou 14,7 g d'U/l d'eau de boisson	Atteintes tubulaires	Mao <i>et al.</i> 1995
Os	Données animales	0,125 mg de U/kg de poids corporel pendant 30 jours (implantation sous-cutanée)	Inhibition formation osseuse	Diaz Sylvester <i>et al.</i> 2002
		27 g d'U/l d'eau de boisson	Augmentation turnover osseux	Kurtio <i>et al.</i> 2005
Foie	Données animales	1 à 9 mg d'U/kg de poids corporel/jour dans eau de boisson pendant 4 semaines	Atteinte fonction hépatique	Ortega <i>et al.</i> 1989
		0,96 à 600 mg d'U/l d'eau de boisson pendant 91 jours	Lésions histologiques	Gilman <i>et al.</i> 1998b
		40 mg d'U/l d'eau de boisson	Modifications du métabolisme des xénobiotiques	Souidi <i>et al.</i> 2005 ; Gueguen <i>et al.</i> 2007
Système nerveux central	Données animales	40 mg d'U/l d'eau de boisson	Modification comportement	Houper <i>et al.</i> 2005
		40 mg d'U/l d'eau de boisson	Augmentation sommeil paradoxal	Lestaevel <i>et al.</i> 2005
	Données humaines	Soldats exposés à U à partir de fragments d'obus	Perturbation neurotransmission	Bussy <i>et al.</i> 2006
Gonades	Données animales	40 mg d'U/l d'eau de boisson	Déficits neurocognitifs	Mc Diarmid <i>et al.</i> 2000
		0,5 à 60 g U/l d'eau de boisson	Augmentation testostérone	Grignard <i>et al.</i> 2007
			Modification de la maturation folliculaire ovarienne	Raymond-Whish <i>et al.</i> 2007

ment mis en évidence. Une étude épidémiologique réalisée en Finlande révèle une association entre le taux d'uranium dans l'eau potable et l'augmentation des phases de résorption/synthèse de l'os. En effet, les auteurs observent l'augmentation d'un marqueur de la résorption osseuse (télopeptide C-terminal du collagène de type-I, CTX) et d'un marqueur de la formation osseuse (ostéocalcine) [82].

Chez l'animal, l'ingestion d'uranium pendant 91 jours à une concentration de 0,96 mg de nitrate d'uranyle (UNO₃) par litre d'eau de boisson induit des lésions au niveau du rein, caractéristiques de la toxicité de l'uranium [83]. Ces lésions concernent les tubules contournés proximaux (vacuolisation cytoplasmique, vésicule nucléaire, dilatation tubulaire) mais aussi les glomérules. Cette étude impliquant des animaux exposés à des concentrations allant de 0,96 à 600 mg/L d'uranium indique que les modifications histopathologiques observées au niveau du rein sont dépendantes de la dose ingérée. Chez le rat, l'analyse microscopique des tubules proximaux révèle une augmentation du nombre de vésicules contenant des granules d'oxyde de fer après ingestion chronique d'UA. Le nombre de ces vésicules augmente avec la durée d'exposition à l'uranium. Dans cette étude, les auteurs suggèrent que l'uranium rentrerait en compétition avec le fer,

entraînant ainsi une excréation préférentielle de l'uranium et une surcharge en fer dans la cellule tubulaire [84]. De plus, des modifications du métabolisme rénal de la vitamine D sont observées chez le rat après ingestion chronique d'UA ou d'UE contenu dans l'eau de boisson (40 mg/L) [85, 86]. Plus particulièrement, l'exposition à l'uranium modifie l'expression du récepteur à la vitamine D, VDR (*Vitamin D Receptor*), qui intervient dans la réponse biologique de cette vitamine, ainsi que le taux circulant de vitamine D dont la régulation est essentiellement rénale.

Lors d'une exposition chronique, le tissu osseux peut contenir 66 à 75 % de la charge corporelle en uranium [19, 22]. Chez le rat, la contamination chronique par implantation sous-cutanée de poudre de dioxyde d'uranium UO₂ révèle une inhibition de la formation osseuse [87], comme il a été décrit après intoxication aiguë à l'uranium. Par ailleurs, Miller *et al.* suggèrent qu'une exposition à long terme à l'UA pourrait provoquer des cancers osseux chez l'homme [88].

Effets sur le système nerveux central

Au niveau du système nerveux central, des troubles neurologiques ont été observés chez de nombreux vétérans à la suite de la guerre du Golfe ; ces troubles sont rassem-

blés sous la terminologie « Syndrome de la guerre du Golfe ». Ils sont la conséquence de facteurs multiples parmi lesquels figure l'uranium appauvri [89].

Plusieurs études expérimentales suggèrent que le cerveau constituerait une cible privilégiée de la toxicité de l'uranium. Son accumulation cérébrale est hétérogène d'une structure cérébrale à l'autre et dose-dépendante [31, 52]. Après ingestion de 40 mg/L d'UA pendant plusieurs mois (soit 1 mg/jour/rat), des perturbations des systèmes de neurotransmission dopaminergique et sérotoninergique sont observées chez le rat [90]. Dans ces conditions expérimentales (40 mg/L d'uranium), l'uranium appauvri n'induit pas d'effet sur l'anxiété ou le sommeil paradoxal chez le rat [91-93]. En revanche, l'uranium enrichi à 4,26 % en ^{235}U provoque une augmentation de la quantité de sommeil paradoxal, une baisse de la mémoire à court terme et une hausse de l'anxiété [91-93]. D'autres équipes ont démontré que l'uranium appauvri est capable d'augmenter l'activité locomotrice et de perturber la mémoire spatiale [94, 95].

Les mécanismes d'action par lesquels l'uranium exerce ces effets centraux sont totalement inconnus. Néanmoins, lors d'une étude comportementale, des auteurs ont montré chez le rat mâle une augmentation de la peroxydation lipidique dans le cerveau suggérant une atteinte des membranes cellulaires par augmentation du stress oxydant et des radicaux libres [94]. Par ailleurs, Linares *et al.* ont également démontré l'existence d'une corrélation entre la concentration en uranium dans l'hippocampe et une augmentation de l'activité enzymatique de deux enzymes anti-oxydantes, la super-oxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT) dans cette région du cerveau [96]. Ces résultats expérimentaux suggèrent que le stress oxydant jouerait un rôle important dans le mécanisme d'action neurotoxique de l'uranium, mais ce n'est sans doute pas le seul.

Effets sur les organes sexuels

Chez l'homme, et plus précisément chez les vétérans de la guerre du Golfe, présentant des fragments d'uranium dans le muscle suite à des blessures, plusieurs études n'ont pas permis de mettre en évidence, quel que soit le taux d'uranium excrété, des modifications de la fonction reproductrice (pas de modifications des taux plasmatiques hormonaux (testostérone, FSH, LH), ni des paramètres spermatiques [97-99]). En revanche, une étude épidémiologique réalisée en Namibie sur des mineurs d'uranium a montré une diminution de leur taux de testostérone [100]. Afin de mimer des situations de contamination des populations *via* l'eau de boisson, des études ont été réalisées sur des rongeurs. Chez la souris femelle, des contaminations avec des doses de 0,5 µg/L à 28 mg/L (doses retrouvées dans l'eau de boisson de certaines régions des États-

Unis) montrent que l'uranium peut être considéré comme un perturbateur endocrinien. En effet, il modifie le développement et la maturation folliculaire ovarienne, accélère l'ouverture vaginale et augmente le poids de l'utérus [101]. Ces effets sont bloqués par un anti-estrogène, montrant ainsi l'implication des récepteurs aux estrogènes. Par ailleurs, une étude récente a montré qu'une contamination de rats mâles par de l'UE (40 mg/L) perturbe le métabolisme des hormones stéroïdiennes testiculaires [102]. En effet, il a été mis en évidence une augmentation du taux de testostérone plasmatique, ainsi qu'une augmentation de l'expression des gènes codant pour des enzymes de synthèse des hormones stéroïdiennes et pour des récepteurs nucléaires modulant l'expression de ces enzymes. Cependant, une contamination identique (40 mg/L) par de l'UA n'induit aucune modification de ces paramètres. Dans cette étude, il semblerait que le métabolisme testiculaire des hormones stéroïdiennes soit plus sensible à l'UE possédant une double toxicité (chimique et radiologique) qu'à l'UA (toxicité essentiellement chimique).

Ces différents résultats semblent indiquer que le système reproducteur est sensible à des contaminations environnementales par de l'uranium. Cependant, cette sensibilité diffère en fonction de la voie de contamination, du modèle et du sexe.

Effets sur le foie

Le foie est également une cible biologique de l'uranium après une exposition chronique. Une augmentation du taux des transaminases TGO et TGP [103], ainsi que des lésions histologiques au niveau du foie [104] sont observées chez le rat lors de contaminations chroniques par ingestion d'uranium contenu dans l'eau de boisson. Tout comme lors d'une exposition aiguë, les cytochromes P450, qui sont prépondérantes dans le foie, sont des cibles d'une exposition chronique par l'UA. Récemment, il a été montré qu'après une contamination chronique de neuf mois par de l'UA (40 mg/L), l'expression de certaines enzymes de la phase I (CYP3A) est augmentée dans le foie, alors que l'expression des enzymes de la phase II (GST, UGT) et des transporteurs de la phase III (MDR1, MRP2) du métabolisme des xénobiotiques ne varient pas [105, 106]. En conséquence, il a été émis l'hypothèse que la pharmacocinétique - donc la biodisponibilité - des médicaments pourrait être modifiée et conduire à une toxicité médicamenteuse ou une inefficacité thérapeutique lors d'un traitement médicamenteux chez des individus exposés à l'uranium. Cette hypothèse a été testée avec un traitement par le paracétamol (500 mg/kg) [105], un médicament potentiellement hépatotoxique. Dans cette étude il a été décrit que les animaux contaminés par l'UA éliminaient moins rapidement le paracétamol plasmatique. De plus, l'administration de paracétamol aux rats

revue générale

contaminés par l'UA augmente les transaminases plasmatiques (TGO, TGP) plus rapidement que pour les animaux non contaminés. Dans le foie, les activités des CYPs sont également diminuées pour les animaux contaminés par rapport aux animaux témoins. Ces études confirment que le métabolisme des xénobiotiques (médicaments) est altéré lors d'une exposition chronique par l'UA.

Effets sur les poumons

Lors d'une contamination essentiellement par inhalation, les poumons constituent la première cible biologique pour l'uranium. En effet, après contamination interne les particules d'uranium insoluble s'accumulent dans les poumons et les ganglions lymphatiques [107-109]. Dans ce cas, le poumon pourrait être non seulement confronté à la toxicité chimique, mais aussi à la toxicité radiologique qui pourrait devenir non négligeable à long terme.

Après contamination interne, les particules d'uranium atteignent principalement deux cibles cellulaires au niveau pulmonaire, les macrophages et les cellules épithéliales [110]. L'interaction entre uranium et cellules épithéliales peut être directe et entraîner des dommages biologiques sur l'épithélium [110], conduisant à une altération de la fonction respiratoire. Les macrophages sont impliqués dans l'épuration des particules d'uranium et dans leur rétention dans le compartiment alvéolaire [111]. Après phagocytose de l'uranium par les macrophages, il se concentre essentiellement au niveau des lysosomes [112, 113]. Ainsi, les macrophages sont responsables de la redistribution de ce radionucléide dans le poumon et la formation de zones d'accumulation [114, 115] pouvant induire des œdèmes pulmonaires et une inflammation des bronches et des alvéoles. De plus, des études ont rapporté que des expositions chroniques de longue durée à des oxydes d'uranium induisent une prolifération cellulaire et des zones de fibrose et/ou de nécrose [107, 108, 116]. Récemment, une étude chez l'animal a mis en évidence un effet d'une contamination interne par l'uranium sur le système de détoxification des xénobiotiques au niveau pulmonaire [106]. En effet, cette étude montre qu'une contamination chronique par ingestion d'uranium induit une modification au niveau génique de l'expression de la CYP3A2 impliquée dans le métabolisme des xénobiotiques ainsi qu'un des facteurs de transcription associé CAR. Ces différentes études montrent clairement que le poumon est une cible biologique de l'uranium après contamination chronique par inhalation ou ingestion.

Chez l'homme, des études sur des mineurs d'uranium ont montré une augmentation des fibroses pulmonaires et du risque de cancer du poumon avec une relation linéaire entre le risque de cancer du poumon et la radioexposition due au radon [117-119]. Les effets cancérigènes observés sont expliqués plutôt par l'irradiation de l'épithélium

bronchique. Des études complémentaires chez l'animal et d'autres études épidémiologiques chez l'homme sont nécessaires afin de répondre plus précisément sur l'impact d'une contamination interne chronique sur le poumon.

Effets sur l'intestin

Les études effectuées à court terme sur le système digestif ont montré que l'uranium n'avait que peu d'effets sur les propriétés intestinales, excepté à forte dose et *in vitro* [74]. Le nombre d'études portant sur les conséquences (en termes de bioaccumulation et d'effets biologiques) à plus ou moins long terme d'une contamination chronique d'uranium est relativement faible. En ce qui concerne les phénomènes de bioaccumulation dans l'intestin, une étude exhaustive, réalisée à différents temps de contamination par l'uranium sur de nombreux organes, a montré qu'une ingestion chronique d'uranium appauvri conduisait à une accumulation de ce radionucléide dans l'intestin grêle dès le premier mois d'exposition, suivie par une décroissance régulière au fur et à mesure de la contamination [31]. Une étude plus précise en termes d'accumulation a mis en évidence que l'uranium était plus particulièrement localisé au niveau des plaques de Peyer, follicules lymphoïdes insérés dans la paroi intestinale [120]. Cependant, cette accumulation ne s'accompagne pas d'effets biologiques marqués, comme l'indique l'absence de modification du taux d'ARNm des cytokines dans les plaques de Peyer et des processus apoptotique et prolifératif. Paradoxalement, divers effets sont observés au niveau de la muqueuse malgré une accumulation moindre d'uranium [121]. Un des effets observés les plus significatifs en termes d'éventuelle conséquence est la modification de la densité de certaines populations de cellules immunitaires sans modifier leur localisation. Ainsi, une augmentation du nombre de neutrophiles est observée dès trois mois de contamination, effet qui se maintient à neuf mois d'exposition. Une diminution du nombre de mastocytes et de macrophages est également observée après contamination (respectivement à 6 et 9 mois). Ces changements dans la densité cellulaire de neutrophiles (augmentation) et macrophages (diminution) pourraient conduire à la suppression de certains mécanismes de défense ou à l'inverse à l'induction d'une hypersensibilité. Il est par ailleurs intéressant de noter que cette étude met en évidence une inhibition de la voie NOergique, similaire à ce qui a été observé dans le cas d'une exposition au plomb dans différents organes [122].

Conclusion

L'uranium occupe une place unique parmi les actinides. En raison de ses caractéristiques chimiques, il se comporte comme un composé néphrotoxique, indépendamment de

ses propriétés radioactives. De plus, en fonction de son isotopie ou de son degré d'enrichissement en ^{235}U , il est considéré comme un composé radiotoxique. Nos connaissances sur la toxicité de l'uranium proviennent d'observations faites chez l'homme, mais surtout d'études sur l'animal qui montrent que l'os et le rein sont les deux principaux organes cibles de l'uranium. Néanmoins, une exposition chronique à l'uranium affecte de nombreuses fonctions physiologiques (physiologie rénale et hépatique, métabolisme osseux), ainsi que le système nerveux central et le système reproducteur. De plus, des modifications de l'homéostasie phosphocalcique et de certains métabolismes (vitamine D, hormones stéroïdiennes et médicaments) sont décrites chez l'animal après contamination à l'uranium. Ainsi, l'exposition chronique à une faible quantité d'uranium est responsable d'atteintes de systèmes biologiques qui ne sont pas forcément corrélés à l'accumulation tissulaire de ce radioélément ; la question de l'effet systémique ou direct reste donc encore sans réponse.

L'exposition à l'uranium induit ainsi chez le rat adulte des modifications subtiles mais significatives de plusieurs systèmes physiologiques. La question subséquente à l'observation de ces effets est de savoir si ces modifications sont les signes précurseurs de l'apparition d'une pathologie observable sur le plan clinique, ou si elles sont plutôt le reflet d'une adaptation de la physiologie des organes à cette exposition chronique. Les études présentées étant réalisées chez un modèle rongeur représentatif d'une population adulte et 'saine', une des manières de répondre à cette interrogation serait d'évaluer les effets de l'uranium sur d'autres populations, soit chez des individus en croissance dont l'exposition à ce radionucléide se fait de façon simultanée à la mise en place des grands systèmes physiologiques, soit chez des individus ayant des prédispositions à des pathologies particulières.

Remerciements. Les auteurs de cet article ont une pensée émue pour l'amie Françoise Pluchet, qui nous a quittés prématurément.

Références

- MacKenzie AB. Environmental radioactivity : experience from the 20th century—trends and issues for the 21st century. *Sci Total Environ* 2000 ; 249 : 313-29.
- ATSDR. *US, department of health and human services. Public health service. Toxicological profile for uranium.* Atlanta : Agency for toxic Substances and Disease Registry, 1999.
- Madic C, Genet M. Propriétés physiques et chimiques de l'uranium. In : Métivier H, ed. *L'uranium de l'environnement à l'homme.* Paris : EDP Sciences, 2001 : 43-81.
- Abu-Qare AW, Abou-Donia MB. Depleted uranium—the growing concern. *J Appl Toxicol* 2002 ; 22 : 149-52.
- Bleise A, Donesi PR, Burkart W. Properties, use and health effects of depleted uranium (DU) : a general overview. *J Environ Radioact* 2003 ; 64 : 93-112.
- Auvinen A, Kurttila P, Pekkanen J, Pukkala E, Ilus T, Salonen L. Uranium and other natural radionuclides in drinking water and risk of leukemia : a case-cohort study in Finland. *Cancer Causes Control* 2002 ; 13 : 825-9.
- Hakonson-Hayes AC, Fresquez PR, Whicker FW. Assessing potential risks from exposure to natural uranium in well water. *J Environ Radioact* 2002 ; 59 : 29-40.
- Moss M. Uranium in drinking water—report on clinical studies in Nova-Scotia. In : Brown SS, Savory J, eds. *Chemical toxicology and clinical chemistry of metals.* Londres : Academic Press, 1983 : 149-52.
- Juntunen R. *Etela-Suomen Kallioporakavojen uraani-ja radon-tutkimukset (Uranium and radon in wells drilled into bedrock in southern Finland). Report of investigation 98.* Espoo : Geologian Tutkimuskeskus, 1991.
- Welford GA, Baird R. Uranium levels in human diet and biological material. *Health Phys* 1967 ; 13 : 1327.
- Hamilton EI. Uranium content of normal blood. *Nature (London)* 1970 ; 227 : 501.
- Lucas HF, Markun F. Thorium and uranium in blood, urine and cigarettes. ANL-7760, Part 2. Argonne Natl. Lab., Argonne, IL. 1970 : 47-52.
- Di Lella LA, Nannoni F, Protano G, Riccobono F. Uranium contents and (235)U/(238)U atom ratios in soil and earthworms in western Kosovo after the 1999 war. *Sci Total Environ* 2005 ; 337 : 109-18.
- Shawky S. Depleted uranium : an overview of its properties and health effects. *East Mediterr Health J* 2002 ; 8 : 432-9.
- Cantaluppi C, Degetto S. Civilian and military uses of depleted uranium : environmental and health problems. *Ann Chim* 2000 ; 90 : 665-76.
- Saucia CH, Mazzilli BP. Distribution of natural radionuclides in the production and use of phosphate fertilizers in Brazil. *J Environ Radioact* 2006 ; 89 : 229-39.
- Craft E, Abu-Qare A, Flaherty M, Garofolo M, Rincavage H, Abou-Donia M. Depleted and natural uranium : chemistry and toxicological effects. *J Toxicol Environ Health B* 2004 ; 7 : 297-317.
- Leggett RW, Harrison JD. Fractional absorption of ingested uranium in humans. *Health Phys* 1995 ; 68 : 484-98.
- Leggett RW. Basis for the ICRP's age-specific biokinetic model for uranium. *Health Phys* 1994 ; 67 : 589-610.
- Sullivan MF. Absorption of actinide elements from the gastrointestinal tract of neonatal animals. *Health Phys* 1980 ; 38 : 173-85.
- Sullivan MF, Ruemmler PS, Ryan JL, Buschbom RL. Influence of oxidizing or reducing agents on gastrointestinal absorption of U, Pu, Am, Cm and Pm by rats. *Health Phys* 1986 ; 50 : 223-32.
- Wrenn ME, Durbin PW, Howard B, et al. Metabolism of ingested U and Ra. *Health Phys* 1985 ; 48 : 601-33.
- Frelon S, Houpert P, Lepetit D, Paquet F. The chemical speciation of uranium in water does not influence its absorption from the gastrointestinal tract of rats. *Chem Res Toxicol* 2005 ; 18 : 1150-4.
- Dublineau I, Grison S, Baudelin C, et al. Absorption of uranium through the entire gastrointestinal tract of the rat. *Int J Radiat Biol* 2005 ; 81 : 473-82.

revue générale

25. Cooper JR, Stradling GN, Smith H, Ham SE. The behaviour of uranium-233 oxide and uranyl-233 nitrate in rats. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1982 ; 41 : 421-33.
26. Pellmar TC, Hogan JB, Benson KA, Laudauer MR. *Toxicological evaluation of depleted uranium in rats : six-month evaluation point*. In : Special publication. Bethesda, MD : Armed forces Radiobiology Research Institute, 1998 : 98-101.
27. La Touche YD, Willis DL, Dawydiak OI. Absorption and biokinetics of U in rats following an oral administration of uranyl nitrate solution. *Health Phys* 1987 ; 53 : 147-62.
28. Priest ND. Toxicity of depleted uranium. *Lancet* 2001 ; 357 : 244-6.
29. Priest ND, Howells GR, Green D, Haines JW. Uranium in bone : metabolic and autoradiographic studies in the rat. *Hum Toxicol* 1982 ; 1 : 97-114.
30. Galle P. Uranium. In : Galle P, ed. *Toxiques nucléaires*. Paris : Masson, 1998 : 186-205.
31. Paquet F, Houpert P, Blanchardon E, et al. Accumulation and distribution of uranium in rats after chronic exposure by ingestion. *Health Phys* 2006 ; 90 : 139-47.
32. OMS (WHO). Department of Protection of the Human Environment. Depleted uranium : sources, exposure and health effects. In : World Health Organization, ed. *Full Report. In WHO 2001 (WHO/SDE/PHE/01.1)*. Genève : WHO, 2001.
33. Leggett RW, Pellmar TC. The biokinetics of uranium migrating from embedded DU fragments. *J Environ Radioact* 2003 ; 64 : 205-25.
34. Domingo JL, Llobet JM, Tomas JM, Corbella J. Acute toxicity of uranium in rats and mice. *Bull Environ Contam Toxicol* 1987 ; 39 : 168-74.
35. Kathren RL, Burklin RK. Acute chemical toxicity of uranium. *Health Physics* 2008 ; 94 : 170-9.
36. Diamond GL, Morrow PE, Panner BJ, Gelein RM, Buggs RB. Reversible uranyl fluoride nephrotoxicity in the Long Evans rat. *Fundam Appl Toxicol* 1989 ; 13 : 65-78.
37. Kobayashi S, Nagase M, Honda N, Hishida A. Glomerular alterations in uranyl acetate-induced acute renal failure in rabbits. *Kidney Int* 1984 ; 26 : 808-15.
38. Thiebault C, Carriere M, Milgram S, Simon A, Avoscan L, Gouget B. Uranium induces apoptosis and is genotoxic to normal rat kidney (NRK-52E) proximal cells. *Toxicol Sci* 2007 ; 98 : 479-87.
39. Blantz RC. The mechanism of acute renal failure after uranyl nitrate. *J Clin Invest* 1975 ; 55 : 621-35.
40. Haley DP, Bulger RE, Dobyan DC. The long-term effects of uranyl nitrate on the structure and function of the rat kidney. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1982 ; 41 : 181-92.
41. Tissandié E, Gueguen Y, Lobaccaro JM, Paquet F, Aigueperse J, Souidi M. Effects of depleted uranium after short-term exposure on vitamin D metabolism in rat. *Arch Toxicol* 2006 ; 80 : 473-80.
42. Dounce AL, Roberts E, Wills JM. Catalasuria as a sensitive test for uranium poisoning. In : Voegtlin C, Hodge HC, eds. *Pharmacology and toxicology of uranium compounds. Volume I*. New York : Mc Graw-Hill, 1949 : 889-950.
43. Durbin PW. Metabolic model for uranium. In : Moore RH, ed. *Biokinetics and analysis in man; United States Uranium Registry; USUR 05. NEHF* 1984 ; 47 : F1-F65.
44. Leggett RW. The behavior and chemical toxicity of U in the kidney: a reassessment. *Health Phys* 1989 ; 57 : 365-83.
45. Miller AC, Blakely WF, Livengood D, et al. Transformation of human osteoblast cells to the tumorigenic phenotype by depleted uranium-uranyl chloride. *Environ Health Perspect* 1998 ; 106 : 465-71.
46. Fukuda S, Ikeda M, Chiba M, Kaneko K. Clinical diagnostic indicators of renal and bone damage in rats intramuscularly injected with depleted uranium. *Radiat Prot Dosimetry* 2006 ; 118 : 307-14.
47. Guglielmotti MB, Ubios AM, Cabrini RL. Alveolar wound healing alteration under uranyl nitrate intoxication. *J Oral Pathol* 1985 ; 14 : 565-72.
48. Ubios AM, Guglielmotti MB, Steimetz T, Cabrini RL. Uranium inhibits bone formation in physiologic alveolar bone modeling and remodeling. *Environ Res* 1991 ; 54 : 17-23.
49. Howland JW. Studies on human exposure to uranium compounds. In : Voegtlin H, Hodge C, eds. *Pharmacology and toxicology of uranium*. New York : McGraw-Hill Book Company, 1949 : 993-1017.
50. Lestaevél P, Houpert P, Bussy C, Dhieux B, Gourmelon P, Paquet F. The brain is a target organ after acute exposure to depleted uranium. *Toxicology* 2005 ; 212 : 219-26.
51. Ghosh S, Kumar A, Pandley BN, Mishra KP. Acute exposure of uranyl nitrate causes lipid peroxidation and histopathological damage in brain and bone of wistar rat. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2007 ; 26 : 255-61.
52. Pellmar TC, Fuciarelli AF, Ejniak JW, et al. Distribution of uranium in rats implanted with depleted uranium pellets. *Toxicol Sci* 1999 ; 49 : 29-39.
53. Barber DS, Ehrlich MF, Jortner BS. The effect of stress on the temporal and regional distribution of uranium in rat brain after acute uranyl acetate exposure. *J Toxicol Environ Health A* 2005 ; 68 : 99-111.
54. Lemerrier V, Millot X, Ansoberlo E, et al. Study of uranium transfer across the blood-brain barrier. *Radiat Prot Dosimetry* 2003 ; 105 : 243-5.
55. Pellmar TC, Keyser DO, Emery C, Hogan JB. Electrophysiological changes in hippocampal slices isolated from rats embedded with depleted uranium fragments. *Neurotoxicology* 1999 ; 20 : 785-92.
56. Domingo JL. Reproductive and developmental toxicity of natural and depleted uranium : a review. *Reprod Toxicol* 2001 ; 15 : 603-9.
57. Domingo JL, Paternain JL, Llobet JM, Corbella J. The developmental toxicity of uranium in mice. *Toxicology* 1989 ; 55 : 143-52.
58. Paternain JL, Domingo JL, Ortega A, Llobet JM. The effects of uranium on reproduction, gestation, and postnatal survival in mice. *Ecotoxicol Environ Saf* 1989 ; 17 : 291-6.
59. Llobet JM, Sirvent JJ, Ortega A, Domingo JL. Influence of chronic exposure to uranium on male reproduction in mice. *Fundam Appl Toxicol* 1991 ; 16 : 821-9.
60. Cross FT, Palmer RF, Busch RH, Filipy RE, Stuart BO. Development of lesions in Syrian golden hamsters following exposure to radon daughters and uranium ore dust. *Health Phys* 1981 ; 41 : 135-53.
61. Gueguen Y, Souidi M, Baudelin C, et al. Short-term hepatic effects of depleted uranium on xenobiotic and bile acid metabolizing cytochrome P450 enzymes in the rat. *Arch Toxicol* 2006 ; 80 : 187-95.
62. Pasanen M, Lang S, Kojo A, Kosma VM. Effects of simulated nuclear fuel particles on the histopathology and CYP enzymes in the rat lung and liver. *Environ Res* 1995 ; 70 : 126-33.
63. Chung W, Kim EJ, Lee I, Kim SG, Lee MG, Kim SH. Effects of recombinant human growth hormone on the pharmacokinetics of intravenous chlorzoxazone in rats with acute renal failure induced by uranyl nitrate. *Life Sci* 2003 ; 73 : 253-63.

64. Moon YJ, Lee AK, Chung HC, *et al.* Effects of acute renal failure on the pharmacokinetics of chlorzoxazone in rats. *Drug Metab Dispos* 2003 ; 31 : 776-84.
65. Lang S, Kosma VM, Kumlin T, *et al.* Distribution and short-term effects of intratracheally instilled neutron-irradiated UO₂ particles in the rat. *Environ Res* 1994 ; 65 : 119-31.
66. Monleau M, De Méo M, Paquet F, Chazel V, Duménil G, Donnadiou-Claraz M. Genotoxic and inflammatory effects of depleted uranium particles inhaled by rats. *Toxicol Sci* 2006 ; 89 : 287-95.
67. Gazin V, Kerdine S, Grillon G, Pallardy M, Raoul H. Uranium induces TNF alpha secretion and MAPK activation in a rat alveolar macrophage cell line. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004 ; 194 : 49-59.
68. Lizon C, Fritsch P. Chemical toxicity of some actinides and lanthanides towards alveolar macrophages : an in vitro study. *Int J Radiat Biol* 1999 ; 75 : 1459-71.
69. Kalinich JF, Ramakrishnan N, Villa V, McClain DE. Depleted uranium-uranyl chloride induces apoptosis in mouse J774 macrophages. *Toxicology* 2002 ; 179 : 105-14.
70. Wan B, Fleming JT, Schultz TW, Saylor GS. In vitro immune toxicity of depleted uranium : effects on murine macrophages, CD4+ T cells, and gene expression profiles. *Environ Health Perspect* 2006 ; 114 : 85-91.
71. Zhou J, Zhou L, Yang J. Studies on effects of cytokine released from alveolar macrophage induced by mineral dust on lung fibroblast. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 1998 ; 32 : 336-9.
72. Periyakaruppan A, Kumar F, Sarkar S, Sharma CS, Ramesh GT. Uranium induces oxidative stress in lung epithelial cells. *Arch Toxicol* 2007 ; 81 : 389-95.
73. Tracy BL, Quinn JM, Lahey J, *et al.* Absorption and retention of uranium from drinking water by rats and rabbits. *Health Phys* 1992 ; 62 : 65-73.
74. Newey H, Sanford PA, Smyth DH. The effect of uranyl nitrate on intestinal transport of hexoses. *J Physiol* 1966 ; 186 : 493-502.
75. Fu WM, Lin-Shiau SY. Mechanism of rhythmic contractions induced by uranyl ion in the ileal longitudinal muscle of guinea-pig. *Eur J Pharmacol* 1985 ; 113 : 199-204.
76. Rodriguez-Yoldi MJ, Ponz F. Uranyl action on sugar transport across rat jejunum. *Rev Esp Fisiol* 1986 ; 42 : 359-64.
77. Dublineau I, Grison S, Linard C, *et al.* Short-term effects of depleted uranium on immune status in rat intestine. *J Toxicol Environ Health A* 2006 ; 69 : 1613-28.
78. Knobel Y, Gleis M, Weise A, *et al.* Uranyl nitrate, a stabilized salt of uranium, is genotoxic in nontransformed human colon adenoma cell line LT97. *Toxicol Sci* 2006 ; 93 : 286-97.
79. Mao Y, Desmeules M, Schaubel D, *et al.* Inorganic components of drinking water and microalbuminuria. *Environ Res* 1995 ; 71 : 135-40.
80. Zamora ML, Tracy BL, Zielinski JM, Meyerhof DP, Moss MA. Chronic ingestion of uranium in drinking water : a study of kidney bioeffects in humans. *Toxicol Sci* 1998 ; 43 : 68-77.
81. Kurttio P, Auvinen A, Salonen L, *et al.* Renal effects of uranium in drinking water. *Environ Health Perspect* 2002 ; 110 : 337-42.
82. Kurttio P, Komulainen H, Leino A, Salonen L, Auvinen A, Saha H. Bone as a possible target of chemical toxicity of natural uranium in drinking water. *Environ Health Perspect* 2005 ; 113 : 68-72.
83. Gilman AP, Villeneuve DC, Secours VE, *et al.* Uranyl nitrate : 91-day toxicity studies in the New Zealand white rabbit. *Toxicol Sci* 1998 ; 41 : 129-37.
84. Donnadiou-Claraz M, Bonnechorgne M, Dhieux B, *et al.* Chronic exposure to uranium leads to iron accumulation in rat kidney cells. *Radiat Res* 2007 ; 167 : 454-64.
85. Tissandier E, Gueguen Y, Lobaccaro JM, *et al.* In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on vitamin D(3) metabolism in rat. *Biochim Biophys Acta* 2007 ; 1770 : 266-72.
86. Tissandier E, Gueguen Y, Lobaccaro JMA, *et al.* Enriched uranium affects the expression of vitamin D receptor and retinoid X receptor in rat kidney. *J Ster Biochem Mol Biol* 2008 ; 110 : 263-8.
87. Diaz Sylvester PL, Lopez R, Ubios AM, Cabrini RL. Exposure to subcutaneously implanted uranium dioxide impairs bone formation. *Arch Environ Health* 2002 ; 57 : 320-5.
88. Miller AC, Xu J, Stewart M, Prasanna PG, Page N. Potential late health effects of depleted uranium and tungsten used in armor-piercing munitions : comparison of neoplastic transformation and genotoxicity with the known carcinogen nickel. *Mil Med* 2002 ; 167 : 54-6.
89. McDiarmid MA, Keogh JP, Hooper FJ, *et al.* Health effects of depleted uranium on exposed Gulf War veterans. *Environ Res* 2000 ; 82 : 168-80.
90. Bussy C, Lestaevel P, Dhieux B, *et al.* Chronic ingestion of uranyl nitrate perturbs acetylcholinesterase activity and monoamine metabolism in male rat brain. *Neurotoxicology* 2006 ; 27 : 245-52.
91. Houpert P, Lestaevel P, Bussy C, Paquet F, Gourmelon P. Enriched but not depleted uranium affects central nervous system in long-term exposed rat. *Neurotoxicology* 2005 ; 26 : 1015-20.
92. Lestaevel P, Bussy C, Paquet F, *et al.* Changes in sleep-wake cycle after chronic exposure to uranium in rats. *Neurotoxicol Teratol* 2005 ; 27 : 835-40.
93. Houpert P, Bizot JC, Bussy C, *et al.* Comparison of the effects of enriched uranium and 137-cesium on the behaviour of rats after chronic exposure. *Int J Radiat Biol* 2007 ; 83 : 99-104.
94. Briner W, Murray J. Effects of short-term and long-term depleted uranium exposure on open-field behavior and brain lipid oxidation in rats. *Neurotoxicol Teratol* 2005 ; 27 : 135-44.
95. Bellés M, Albina ML, Linares V, Gomez M, Sanchez DJ, Domingo JL. Combined action of uranium and stress in rat. I. Behavioral effects. *Toxicol Lett* 2005 ; 158 : 176-85.
96. Linares V, Sanchez DJ, Belles M, Albina L, Gomez M, Domingo JL. Pro-oxidant effects in the brain of rats concurrently exposed to uranium and stress. *Toxicology* 2007 ; 236 : 82-91.
97. McDiarmid MA, Engelhardt SM, Oliver M, *et al.* Health surveillance of Gulf War I veterans exposed to depleted uranium : updating the cohort. *Health Phys* 2007 ; 93 : 60-73.
98. McDiarmid MA, Engelhardt SM, Oliver M, *et al.* Biological monitoring and surveillance results of Gulf War I veterans exposed to depleted uranium. *Int Arch Occup Environ Health* 2006 ; 79 : 11-21.
99. Squibb KS, McDiarmid MA. Depleted uranium exposure and health effects in Gulf War veterans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006 ; 361 : 639-48.
100. Zaire R, Notter M, Riedel W, Thiel E. Unexpected rates of chromosomal instabilities and alterations of hormone levels in Namibian uranium miners. *Radiat Res* 1997 ; 147 : 579-84.
101. Raymond-Whish S, Mayer LP, O'Neal T, *et al.* Drinking water with uranium below the U.S. EPA water standard causes estrogen receptor-dependent responses in female mice. *Environ Health Perspect* 2007 ; 115 : 1711-6.
102. Grignard E, Gueguen Y, Lobaccaro JM, Voisin P, Gourmelon P, Souidi M. Effets de contaminations chroniques par ingestion de césium

revue générale

- 137 ou d'uranium sur la stéroïdogénèse testiculaire chez le rat. 6^e Congrès National de Radioprotection, Reims, France, du 19 au 21 Juin 2007.
103. Ortega A, Domingo JL, Llobet JM, Tomas JM, Paternain JL. Evaluation of the oral toxicity of uranium in a 4-week drinking-water study in rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 1989 ; 42 : 935-41.
104. Gilman AP, Villeneuve DC, Secours VE, *et al.* Uranyl nitrate : 28-day and 91-day toxicity studies in the Sprague-Dawley rat. *Toxicol Sci* 1998 ; 41 : 117-28.
105. Gueguen Y, Grandcolas L, Baudelin C, *et al.* Effect of acetaminophen administration to rats chronically exposed to depleted uranium. *Toxicology* 2007 ; 229 : 62-72.
106. Souidi M, Gueguen Y, Linard C, *et al.* In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on CYP3A and associated nuclear receptors PXR and CAR in the rat. *Toxicology* 2005 ; 214 : 113-22.
107. Leach LJ, Maynard EA, Hodge HC, *et al.* A five-year inhalation study with natural uranium dioxide (UO₂) dust. I. Retention and biologic effect in the monkey, dog and rat. *Health Phys* 1970 ; 18 : 599-612.
108. Leach LJ, Yuile CL, Hodge HC, Sylvester GE, Wilson HB. A five-year inhalation study with natural uranium dioxide (UO₂) dust. II. Post-exposure Retention and biologic effect in the monkey, dog and rat. *Health Phys* 1973 ; 25 : 239-58.
109. Morrow PE, Gibb FR, Leach LJ. The clearance of uranium dioxide dust from the lungs following single and multiple inhalation exposures. *Health Phys* 1966 ; 12 : 1217-23.
110. Schins RP, Borm PJ. Mechanisms and mediators in coal dust induced toxicity. *Ann Occup Hyg* 1999 ; 43 : 7-33.
111. Tasat DR, De Rey BM. Cytotoxic effect of uranium dioxide on rat alveolar macrophages. *Environ Res* 1987 ; 44 : 71-81.
112. Berry JP, Zhang L, Galle P, Ansoborlo E, Henge-Napoli MH, Donnadieu-Claraz M. Role of alveolar macrophage lysosomes in metal detoxification. *Microsc Res Tech* 1997 ; 36 : 313-23.
113. Morris KJ, Townsend KM, Batchelor AL. Studies of alveolar cell morphometry and mass clearance in the rat lung following inhalation of an enriched uranium dioxide aerosol. *Radiat Environ Biophys* 1989 ; 28 : 141-54.
114. Batchelor AL, Jenner TJ, Papworth DG. Influence of macrophages on microdistribution of inhaled UO₂ aerosol in rat lung. *Phys Med Biol* 1982 ; 37 : 249-66.
115. Morris KJ, Barker CL, Batchelor AL, Khanna P. Dosimetric implication of pulmonary macrophage clusters observed within lungs of rats that have inhaled enriched UO₂ particles. *Environ Health Perspect* 1992 ; 97 : 201-8.
116. Mitchel RE, Jackson JS, Heinmiller B. Inhaled uranium ore dust and lung cancer risk in rat. *Health Phys* 1999 ; 76 : 145-551.
117. Archer VE, Renzetti AD, Doggett RS, Jarvis JQ, Colby TV. Chronic diffuse interstitial fibrosis of the lung in uranium miners. *J Occup Environ Med* 1998 ; 40 : 460-74.
118. Baysson H, Tirmarche M, Tymen G, *et al.* Indoor radon and lung cancer in France. *Epidemiology* 2004 ; 15 : 709-16.
119. Vacquier B, Caer S, Rogel A, *et al.* Mortality risk in the French cohort of uranium miners : extended follow-up 1946-1999. *Occup Environ Med* 2008 (sous presse).
120. Dublineau I, Grison S, Grandcolas L, *et al.* Absorption, accumulation and biological effects of depleted uranium in Peyer's patches of rats. *Toxicology* 2006 ; 227 : 227-69.
121. Dublineau I, Grandcolas L, Grison S, *et al.* Modifications of inflammatory pathways in rat intestine following chronic ingestion of depleted uranium. *Toxicol Sci* 2007 ; 98 : 458-68.
122. Carnignani M, Volpe AR, Boscolo P, *et al.* Catecholamine and nitric oxide systems as targets of chronic lead exposure in inducing selective functional impairment. *Life Sci* 2000 ; 68 : 401-15.

ANNEXE 2

Revue générale sur le césium-137

CÉSIUM 137: PROPRIÉTÉS ET EFFETS BIOLOGIQUES APRÈS CONTAMINATION

INTERNE

P. Lestaevel, R. Racine, H. Bensoussan, C. Rouas, Y. Guéguen, I. Dublineau, JM. Bertho, P. Gourmelon, JR Jourdain, M. Soudi

Médecine nucléaire - (2010) 34 :108-118



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



ELSEVIER
MASSON

Disponible en ligne sur
 ScienceDirect
 www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
 EM|consulte
 www.em-consulte.com

Médecine Nucléaire 34 (2010) 108–118

**Médecine
Nucléaire**
 Imagerie Fonctionnelle et Métabolique

Mise au point

Césium 137 : propriétés et effets biologiques après contamination interne

Caesium 137: Properties and biological effects resulting of an internal contamination

P. Lestaevel, R. Racine, H. Bensoussan, C. Rouas, Y. Gueguen, I. Dublineau,
 J.-M. Bertho, P. Gourmelon, J.-R. Jourdain, M. Souidi *

*IRSN, laboratoire de radiotoxicologie expérimentale, direction de la radioprotection de l'homme,
 institut de radioprotection et de sûreté nucléaire, BP n° 17, 92262 Fontenay-aux-Roses cedex, France*

Reçu le 3 septembre 2009 ; accepté le 9 décembre 2009

Disponible sur Internet le 22 janvier 2010

Résumé

Le césium 137 (^{137}Cs) est un radionucléide retrouvé dans l'environnement suite aux essais aériens des armes nucléaires et aux accidents survenus dans des centrales nucléaires comme à Tchernobyl en 1986. Les conséquences sanitaires d'une exposition chronique à ce radionucléide restent mal connues. Après absorption, le césium se distribue de façon relativement homogène dans l'organisme, avec une charge plus importante chez l'enfant que chez l'adulte. La toxicité du ^{137}Cs résulterait essentiellement de ses propriétés radiologiques. Une contamination interne à forte dose induit une insuffisance médullaire, des troubles de la fonction de reproduction, des effets hépatotoxiques et des affections rénales. Des troubles de la minéralisation osseuse et des lésions cérébrales ont également été décrits chez l'homme. À plus faible dose, le ^{137}Cs entraîne chez l'animal des perturbations du cycle veille-sommeil, mais sans troubles comportementaux. Une atteinte du système cardiovasculaire a également été observée. Des systèmes physiologiques tels que les métabolismes de la vitamine D, du cholestérol et des hormones stéroïdiennes sont modifiés, mais sans engendrer toutefois l'apparition de pathologies avec symptomatologie clinique. Chez l'homme, le ^{137}Cs induit une atteinte du système immunitaire, des malformations congénitales et fœtales, une augmentation des cancers de la thyroïde ainsi que des troubles neurologiques. Enfin, il semblerait que les enfants soient plus sensibles aux effets toxiques du césium que les adultes. En termes de prise en charge thérapeutique des patients contaminés par le ^{137}Cs , le bleu de Prusse (Radiogardase[®]) est actuellement le seul traitement efficace pour décorporer le ^{137}Cs après ingestion. L'administration de pectine pour traiter une contamination interne au ^{137}Cs a été évoquée, notamment chez les enfants, mais son utilisation fait encore aujourd'hui débat. En conclusion, les données scientifiques actuellement disponibles, et plus particulièrement celles décrites après contamination chronique, suggèrent que le ^{137}Cs est susceptible d'affecter de nombreuses fonctions physiologiques et métaboliques. Ainsi, il pourrait contribuer, avec d'autres substances artificielles présentes dans l'environnement, à l'augmentation des risques sanitaires dans certaines régions du globe.

© 2009 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Césium 137 ; Contamination chronique ; Contamination aiguë

Abstract

Caesium-137 (Cs^{137}) is a radionuclide present in the environment mainly as the result of the atmospheric nuclear weapons testing and accidents arising in nuclear power plants like the Chernobyl accident in 1986. Nowadays, the health consequences resulting from a chronic exposure to this radionuclide remain unknown. After absorption, the caesium is distributed relatively homogeneously within the body, with a more important load in children than in adults. The toxicity of Cs^{137} is mainly due to its radiological properties. A high dose of Cs^{137} is responsible for a medullar dystrophy, disorders of the reproductive function, and effects on liver and renal functions. Disorders of bone mineralization and brain damages were also described in human beings. At lowest dose, Cs^{137} induces disturbances of wakefulness-sleep cycle, but not accompanied with behavioural disorders. The cardiovascular system was also perturbed. Biological effects of Cs^{137} on the metabolisms of the vitamin D, cholesterol and steroid hormones were described, but do not lead to clinical symptoms. In human beings, Cs^{137} leads to an immune deficiency, congenital and foetal deformations, an increased of thyroid cancer, as well as neurological disorders. It seems that children are more sensitive to the toxic effects of caesium than the adults. At present, the only effective treatment for the decorporation of the ingested Cs^{137} is the Prussian Blue (Radiogardase[®]).

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : maamar.souidi@irsn.fr (M. Souidi).

The use of pectin to decorporate the ingested Cs¹³⁷, in children notably, is sometimes proposed, but its administration still remains an open question. To conclude, the available scientific data suggest that Cs¹³⁷ could affect a number of physiological and metabolic functions and consequently, could participate in the health risks associated to the presence of other contaminants in the environment.

© 2009 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Caesium 137; Chronic contamination; Acute contamination

1. Introduction

Le césium 137 (¹³⁷Cs) est un radionucléide anthropogénique, qui a été libéré en très grande quantité dans l'environnement, essentiellement lors des essais atmosphériques des armes nucléaires ainsi qu'à la suite d'accidents survenus au sein d'installations industrielles utilisant ou pouvant libérer du ¹³⁷Cs. L'explosion du réacteur n° 4 de la centrale nucléaire de Tchernobyl le 26 avril 1986 a été à l'origine de la dispersion, parmi d'autres radionucléides, de 85 10¹⁵ Bq de ¹³⁷Cs. Les populations vivant à proximité de cet accident sont désormais exposées sur le long terme au ¹³⁷Cs, principalement en raison de l'ingestion quotidienne de produits alimentaires contaminés par ce radionucléide.

Les conséquences sanitaires de l'ingestion chronique à long terme de ce radionucléide restent à ce jour mal connues. En l'absence d'un déficit de travaux expérimentaux visant à étudier les éventuels effets, sur les grandes fonctions physiologiques, d'expositions à faibles doses de ¹³⁷Cs, des équipes nationales et internationales ont mis en place plusieurs programmes de recherche dans l'objectif de mieux connaître les effets biologiques et les conséquences sanitaires d'ingestion chronique de faibles quantités de ce radionucléide.

Cette revue se propose de faire la synthèse des connaissances actuelles sur le ¹³⁷Cs. Après une présentation de ses propriétés physicochimiques, puis de données quant à sa dispersion dans l'environnement et à sa cinétique d'absorption et de distribution chez les populations exposées, les auteurs dressent un bilan relatif à ses effets biologiques exprimés dans différents organes tels que les reins, le système nerveux central, les gonades ou le foie, après une contamination selon un mode aigu ou chronique à faible dose. Enfin, pour terminer cette revue, une mise au point est faite sur les traitements actuellement utilisés pour la décorporation du ¹³⁷Cs après contamination interne.

2. Le césium 137

2.1. Propriétés et utilisations

Le césium a été découvert en 1860 par Robert Wilhelm Bunsen et Gustave Robert Kirchhoff dans l'eau minérale de Durkheim en Allemagne, par spectroscopie d'émission de sa raie bleue à laquelle il doit son nom tiré du latin *caesium*, bleu du ciel.

De symbole Cs, le césium est un élément naturel, de numéro atomique 55. C'est le 45^e élément le plus abondant de la croûte terrestre, en moyenne 2,6 g par tonne métrique [1]. Il appartient, comme le lithium, le sodium, le potassium et le

rubidium, au groupe des métaux alcalins. Le césium présente le point de fusion (28 °C) le plus bas de la famille des alcalins. Avec le gallium et le mercure, il est l'un des rares métaux à être sous forme liquide à une température proche de la température ambiante. Chimiquement, il présente un seul degré d'oxydation correspondant à l'espèce ionique Cs (+I). Il s'agit de l'élément le plus électropositif de la classification périodique des éléments. N'existant pas à l'état élémentaire dans l'environnement, il prédomine dans l'atmosphère essentiellement sous forme d'aérosols d'oxyde ou d'hydroxyde de sodium. Très soluble dans l'eau, il présente une affinité élevée pour les minéraux, en particulier les argiles.

Le césium possède 31 isotopes de masse variant de 114 à 145. Parmi eux, seul l'isotope 133 est stable et présent à l'état naturel dans deux minerais : la pollucite et la rhodizite. Tous les autres isotopes sont radioactifs et leur production résulte d'activités industrielles. Ainsi, au sein d'un réacteur nucléaire, les isotopes radioactifs du césium sont produits par la fission des noyaux d'uranium 235 et de plutonium 239. La période de décroissance radioactive est supérieure à l'année uniquement pour les isotopes 134 (2,2 ans), 135 (2,9 10⁶ ans) et 137 (30,2 ans).

Le ¹³⁷Cs est principalement un émetteur β⁻ qui se désintègre en baryum 137. La Fig. 1 présente les principales caractéristiques physicochimiques du ¹³⁷Cs. Ce radionucléide est généré dans les réacteurs nucléaires et dans les accélérateurs pour la production de sources destinées à des applications industrielles et médicales. Les rayonnements ionisants émis par le ¹³⁷Cs sont utilisés à des fins médicales en radiothérapie et en curiethérapie dans le cadre du traitement de tumeurs cancéreuses ; ils sont également mis en œuvre pour l'irradiation des produits

Caractéristiques atomique, chimique et physique du ¹³⁷ Cs	
Numéro atomique	55
Masse atomique	132,90545 u
Masse volumique	1879 Kg/m ³
Série chimique	Métal alcalin (base forte)
Etat d'oxydation	+1
Formes chimique	CsCl, CsF
Solubilité	Très soluble
Structure cristalline	Cubique à corps centré
Etat ordinaire	Solide
Couleur	Argent-Or
Température de Fusion	301,59 K
Température de vaporisation	944 K
Période Radioactive	30,1 ans
Emissions Principales	β ⁻ , γ
Activité spécifique	1g = 3,2 10 ¹² Bq
Origine naturelle	Aucune
Origine artificielle	Fission de l'uranium dans les réacteurs nucléaires ou explosion (armes nucléaires ou accidents)

Fig. 1. Caractéristiques chimique, atomique et physique du césium 137. *Chemical, atomic and physical characteristics of caesium 137.*

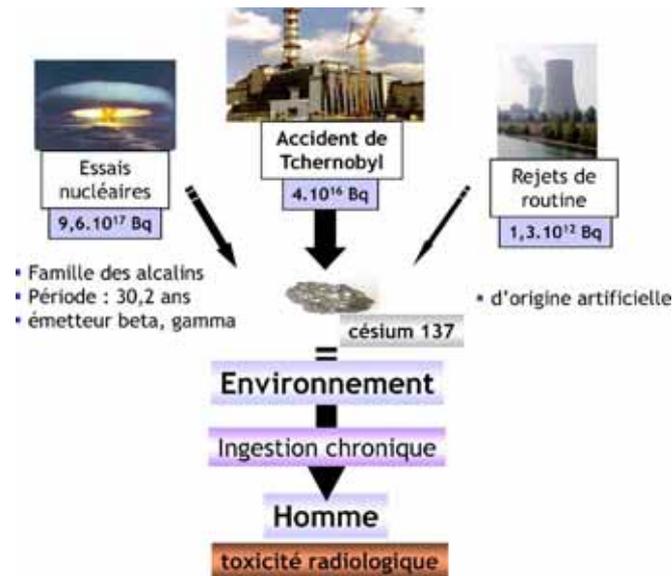


Fig. 2. Origine des sources d'exposition du césium 137. *Origin of the sources of exposure of caesium 137.*

sanguins permettant ainsi d'inhiber la division lymphocytaire afin d'éviter les risques de maladie post-transfusionnelle chez les patients immunodéprimés. Dans l'industrie, il est utilisé essentiellement dans les appareils de gammagraphie pour le contrôle de pièces, de soudures ou d'ouvrages d'art et dans les irradiateurs pour la stérilisation des aliments [2].

2.2. Sources d'exposition

Le développement des activités industrielles et militaires utilisant des matières radioactives a conduit à la libération volontaire ou accidentelle dans l'environnement de nombreux radionucléides (Fig. 2). Parmi ceux-ci, le ¹³⁷Cs doit être considéré avec beaucoup d'attention en raison de la durée de sa période physique longue (30,2 ans), de ses caractéristiques nucléaires et de son transfert jusqu'à l'homme via sa présence dans l'environnement. En effet, plusieurs centaines d'essais nucléaires atmosphériques ont été effectués par différentes nations entre 1945 (premier essai américain) et 1980 (dernier essai chinois). Au total, ces essais ont conduit à la libération dans l'environnement d'une quantité de ¹³⁷Cs estimée à 9,6 10¹⁷ Bq [3]. En termes de rejets accidentels, l'activité du ¹³⁷Cs émis dans l'environnement suite à l'explosion du réacteur n° 4 de la centrale de Tchernobyl (Ukraine) le 26 avril 1986 est estimée à 85 10¹⁵ Bq [3]. De plus, l'explosion en 1957 d'un conteneur dans un complexe de production de plutonium à Kysthym (Russie) ainsi que la rupture d'un réservoir dans un réacteur à la centrale de Windscale (Royaume-Uni) ont entraîné des rejets en ¹³⁷Cs respectivement, de 2 10¹⁴ Bq et de 2,2 10¹³ Bq [4]. Enfin, les rejets quotidiens résultant des différentes étapes du retraitement du combustible participent également dans une moindre mesure à la contamination de l'environnement. À titre d'exemple, en 1999, les rejets de ¹³⁷Cs de l'usine de retraitement de la Hague s'élevaient à 1,3 10¹² Bq et ceux de Sellafield à 7,9 10¹² Bq.

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

Fig. 3. Teneur en césium 134 + césium 137 des produits alimentaires à Korma (Biélorussie) en Bq/kg [12]. *Content in caesium 134 + caesium 137 of foodstuffs to Korma (Belarus) in Bq/kg [12].*

L'accident de Tchernobyl, qui s'accompagne d'un rejet de ¹³⁷Cs intense mais bref dans l'atmosphère est considéré comme la principale source de dispersion de ce radionucléide dans l'environnement, entraînant une contamination durable des sols principalement localisés au nord-ouest de l'Ukraine, au sud du Bélarus et dans les régions frontalières de la Russie. Le césium se dépose alors sur le sol et migre peu, particulièrement en présence d'argile [4], se concentrant ainsi principalement dans la couche superficielle du sol. Il est par ailleurs retrouvé à la lisière des forêts et dans les milieux aquatiques. L'accident de Tchernobyl est ainsi à l'origine de l'exposition au ¹³⁷Cs des populations en raison des rayonnements ionisants émis depuis les dépôts au sol, mais également du fait de l'inhalation d'air contaminé, mais surtout de l'ingestion d'aliments et d'eau contaminés [4]. En effet, le césium entre dans la chaîne alimentaire animale et humaine via la consommation d'eau, de végétaux, de champignons, de viandes, de poissons et de lait contaminés (Fig. 3).

Différentes études établissent une corrélation entre le niveau de ¹³⁷Cs contenu dans la ration alimentaire, l'ingestion

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

Fig. 4. Ingestion quotidienne de césium 137 de la population de Christinovka entre juillet et octobre 1998 [5]. *Daily Ingestion of caesium 137 of the population of Christinovka between July and October, 1998 [5].*

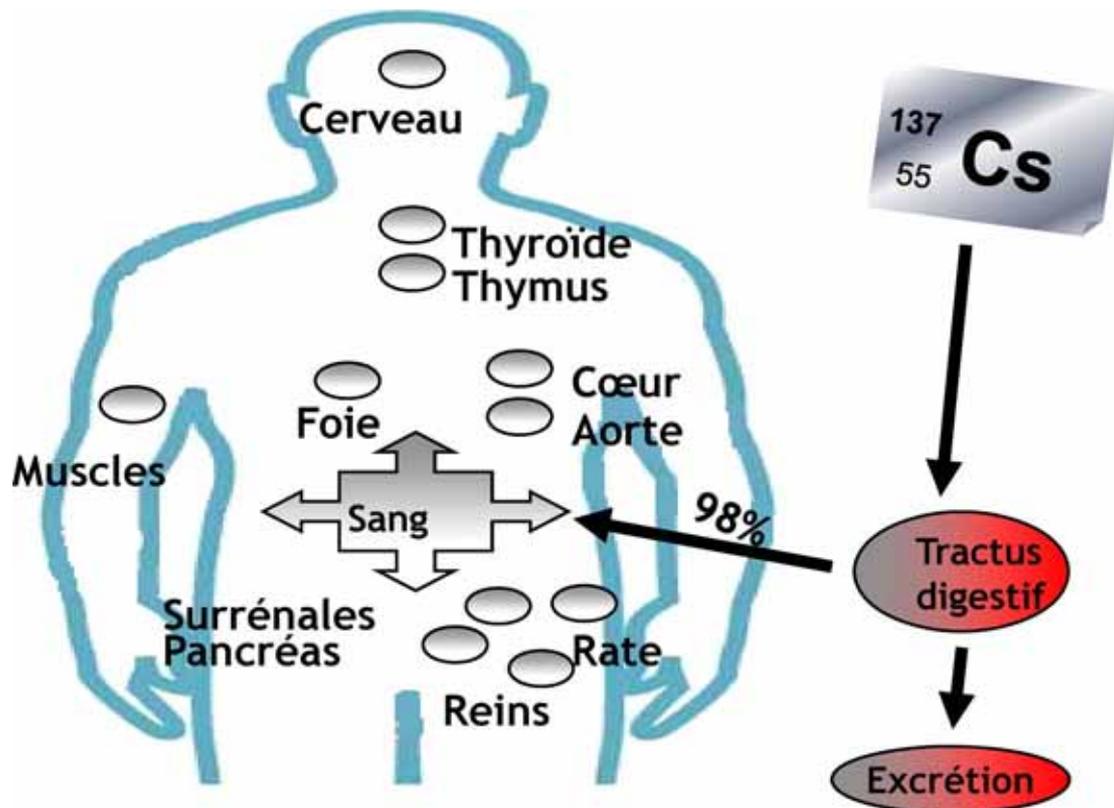


Fig. 5. Distribution du césium 137 dans l'organisme. La majeure partie du césium 137 ingéré (98 %) est absorbé au niveau du tractus gastro-intestinal. Une fois qu'il quitte le compartiment sanguin vers les organes, le césium 137 se distribue de façon relativement homogène dans l'organisme.

Distribution of some caesium 137 in the body. The major part of the ingested caesium 137 (98 %) is absorbed at the level of the gastro-intestinal tract. When it leaves the blood compartment towards organs, the caesium 137 distributes in a relatively homogeneous way within the body.

quotidienne de ^{137}Cs et la charge corporelle en ^{137}Cs [5,6]. Ainsi, une étude réalisée sur les habitants de Christinovska en Ukraine indique que la consommation de champignons et de baies sauvages représente 95 % du ^{137}Cs total ingéré. Les consommations de lait et des autres produits agricoles représentent respectivement, 3 % et 2 % de la dose ingérée [5]. Dans cette étude, les auteurs estiment à 100 Bq la quantité de ^{137}Cs ingérée quotidiennement en 1998 par la population avec des variations allant jusqu'à 2000 Bq/j pour les personnes consommant davantage de champignons (Fig. 4).

2.3. Biocinétique

Le comportement dans l'organisme de l'élément césium, qu'il soit radioactif ou stable, est proche de son analogue chimique, le potassium.

2.3.1. Absorption

Après ingestion ou inhalation, l'absorption au niveau gastro-intestinal ou pulmonaire du césium est très importante. Chez l'animal, 98 % du césium ingéré est absorbé au niveau intestinal une heure après son entrée dans l'organisme. Les données de la littérature suggèrent que le taux d'absorption intestinal du césium chez l'homme est de 100 % [7]. Cependant, ce taux d'absorption peut être moindre lorsque le césium est incorporé dans l'alimentation. En effet, dans la ration alimentaire, une

fraction du césium se complexe à des ligands organiques comme par exemple la pectine, polymère d'acide galacturonique présent dans les parois cellulaires végétales, empêchant ainsi son absorption [8]. L'absorption gastro-intestinale varie non seulement en fonction de la nature de l'aliment, mais également en fonction de la manière dont il est préparé [9]. Ainsi, un taux d'absorption moyen de 78 % a été estimé chez des volontaires ayant consommé du gibier contaminé par du ^{137}Cs et du ^{134}Cs rejetés suite à l'accident de Tchernobyl [10]. La forme physicochimique du césium et la composition de la ration alimentaire sont des facteurs importants pouvant faire varier ce taux d'absorption.

2.3.2. Distribution et rétention

Une fois qu'il quitte le sang vers les organes, le césium se distribue de façon relativement homogène dans les tissus mous de l'organisme (Fig. 5). Comme son homologue structural le potassium, il est incorporé dans le compartiment intracellulaire par transport actif. Les canaux potassium et les pompes sodium/potassium (ou Na^+/K^+ -ATP-ase) permettent son transport à travers la membrane cytoplasmique [11]. En raison de son métabolisme proche de celui du potassium, le césium est présent en plus grande quantité dans le muscle squelettique. En effet, les études réalisées chez l'animal exposé au ^{137}Cs par inhalation ou ingestion indiquent des concentrations plus élevées en césium au niveau du muscle squelettique [3].

FORTE DOSE		FAIBLE DOSE	
Rongeur	Homme	Rongeur	Homme
Insuffisance médullaire	Insuffisance médullaire	Modification du métabolisme du cholestérol et des hormones stéroïdiennes	Déficit immunitaire
Arrêt des fonctions de reproduction	Diminution de la fertilité		Malformations congénitales et fœtales
Effets hépatotoxiques	Effets hépatotoxiques	Diminution du taux de vitamine D3	Cancer du rein
Tumeurs bénignes et malignes	Atteintes du système digestif	Diminution de l'apoptose au niveau de l'épithélium intestinal	Cystites chroniques
	Lésions cérébrales	Perturbation de l'électroencéphalogramme	Désordres neurologiques
	Troubles de la minéralisation osseuse	Hypotension	Troubles de l'ECG et hypertension

Fig. 6. Toxicité du césium 137 à forte et faible dose chez l'animal et l'homme.
Toxicity of caesium 137 at weak and strong dose in animal and man.

Cependant, contrairement au potassium, certains tissus et organes tels que l'aorte, les surrénales, le foie et la rate présentent pour le césium une affinité supérieure à celle du muscle [12]. Chez le renne contaminé par ingestion de ^{134}Cs , Skuterud et al. [13] observent la présence de césium dans de nombreux tissus avec des concentrations plus élevées, non seulement au niveau des muscles, mais également dans le rein, le pancréas et les parathyroïdes. Par ailleurs, la distribution du césium semble différer en fonction de l'âge de l'individu exposé. Ainsi, une étude réalisée sur la population de Gomel (Biélorussie), région fortement touchée par les retombées de Tchernobyl, rapporte des concentrations en ^{137}Cs plus importantes chez l'enfant par rapport à l'adulte. Chez l'enfant, les charges les plus élevées sont mesurées dans la glande thyroïde, les surrénales, le pancréas, les reins et le thymus, puis dans les muscles squelettiques et cardiaque, la paroi intestinale et la rate [14]. De plus, le césium peut traverser la barrière placentaire et être mesuré dans le placenta et le fœtus.

2.3.3. Excrétion et élimination

L'excrétion du césium est principalement urinaire. D'après le modèle biocinétique développé par Leggett et al. en 2003, le césium est éliminé après ingestion à 86 % dans les urines et à 14 % dans les selles [11]. Son élimination se fait en deux temps : après ingestion chez l'homme d'aliments contaminés par du ^{134}Cs et par du ^{137}Cs , environ 6 % de la charge corporelle initiale est éliminée dès le premier jour et 94 % est éliminée plus lentement, selon une demi-vie biologique d'environ trois mois [10].

Chez l'homme, la période biologique du césium (période au bout de laquelle la moitié du césium absorbé est éliminé de l'organisme) varie de 50 à 150 jours. Différents facteurs tels que le sexe, la masse corporelle et l'âge influencent la rétention du césium. Leggett et al. [11] estiment à 97 jours la période biologique du césium chez l'homme adulte, contre 70 jours chez la femme adulte. De plus, la période augmente avec l'âge (34 jours pour un enfant de cinq ans contre 97 jours pour l'adulte) du fait de l'augmentation du poids corporel.

2.4. Toxicité

Le ^{137}Cs est chimiquement peu toxique. La DL 50 du césium stable varie entre 800 et 2000 mg/kg selon sa forme chimique [3]. Ses émissions de type β et γ et sa période biologique longue en font un élément essentiellement radiotoxique. De par sa distribution relativement homogène, les effets d'une contamination par le ^{137}Cs sont considérés comme analogues à ceux d'une irradiation globale.

Néanmoins, seules quelques études expérimentales mettent en évidence les effets du ^{137}Cs après une exposition à de fortes doses. En revanche, il existe très peu de données sur les effets d'une exposition chronique à de faibles doses sur le long terme. Seules de rares études expérimentales ainsi que quelques données épidémiologiques recueillies suite à l'accident de Tchernobyl permettent d'aborder les effets toxiques du ^{137}Cs (Fig. 6).

Du fait de sa nature physicochimique et de sa dispersion dans l'environnement, il est difficile de distinguer la part relative des différentes voies d'exposition (inhalation, ingestion, externe) au ^{137}Cs dans la toxicité exprimée chez l'homme. Néanmoins, il est couramment admis qu'à forte dose d'exposition (accidentelle), les voies d'exposition sont multiples alors qu'à faible dose, la principale voie est l'ingestion.

2.4.1. Toxicité à forte dose

2.4.1.1. Effets chez l'animal. Une exposition aiguë au ^{137}Cs entraîne dans la grande majorité des cas une insuffisance médullaire conduisant à la mort de l'individu. La DL 50/30 (dose létale 50 %, 30 jours après l'exposition) après injection intrapéritonéale est de 1 GBq de $^{137}\text{Cs}/\text{kg}$ chez le rat [15]. Le temps nécessaire pour atteindre la dose létale varie en fonction de la dose et du sexe, ce temps étant plus long chez la femelle que chez le mâle. Nikula et al. [16] observent, chez le chien « Beagle », une altération sévère des cellules hématopoïétiques entraînant la mort des animaux dans les 81 jours suivant l'injection intraveineuse de $^{137}\text{CsCl}$ (72 à 140 MBq de Cs/kg de poids corporel).

Une contamination aiguë au ^{137}Cs a pour cible également le système de reproduction et de développement. En effet, une étude a montré que l'administration d'une dose élevée de césium présente une forte toxicité pour la reproduction. Chez la souris, la contamination par administration de $^{137}\text{CsCl}$ dans l'eau de boisson à la concentration de 14,8 KBq/mL pendant plusieurs générations entraîne un arrêt des fonctions de reproduction dès la seconde génération et s'accompagne d'une forte atrophie des testicules chez les souris. Pour des doses dix fois plus faibles (1,48 KBq de $^{137}\text{CsCl}$ /mL), les souris présentent encore des troubles importants de la fonction de reproduction, mis en évidence par une réduction du nombre de petits par portée et une baisse significative de la croissance corporelle par rapport aux souris témoins. En revanche, pour des doses 100 fois plus faibles (0,148 KBq de $^{137}\text{CsCl}$ /mL), les animaux ne montrent aucune lésion avec, au contraire, une augmentation des fonctions de reproduction [17]. Les mécanismes moléculaires de cet effet d'hormesis sont encore inconnus. Une autre étude utilisant le chien « Beagle » contaminé par une injection intraveineuse de $^{137}\text{CsCl}$ (36 à 140 MBq de Cs/kg de poids corporel) décrit une altération de l'épithélium germinale et une azoospermie [16].

Il a été également montré que des tumeurs bénignes et malignes sont observées dans plusieurs tissus et organes, notamment au niveau du foie et de la cavité nasale suite à l'injection intraveineuse de $^{137}\text{CsCl}$ (allant de 36 à 140 MBq de Cs/kg de poids corporel) chez le chien [16]. Dans cette étude, une augmentation de la fréquence des cancers avec l'âge des animaux est notée. Enfin, l'absence de spécificité des cancers observés est probablement à lier à la répartition plus ou moins uniforme du césium dans l'organisme [18].

Enfin, des effets hépatotoxiques du césium ont été rapportés chez l'animal. En effet, une augmentation du taux d'ALAT

sérique, signe d'une atteinte hépatique et des dégénérescences au niveau du foie sont observées respectivement, chez le rat et le chien après une exposition à de fortes doses de ^{137}Cs [16,19]. Dans ces conditions expérimentales, des affections rénales sont également mises en évidence.

2.4.1.2. Effets chez l'homme. Chez l'homme, une exposition aiguë au ^{137}Cs entraîne dans la grande majorité des cas une insuffisance médullaire caractérisée par une baisse des globules blancs et une immunodéficience, comme cela a été rapporté lors d'un accident à Goiânia au Brésil chez 14 patients exposés au $^{137}\text{CsCl}$ contenu dans une source d'un appareil de radiothérapie contenant 50,9 TBq de $^{137}\text{CsCl}$ [20]. L'exposition à des doses élevées de ^{137}Cs se caractérise donc par le classique syndrome d'aplasie médullaire observé après une irradiation aiguë aux rayonnements ionisants.

Après l'accident de Goiânia (50,9 TBq de $^{137}\text{CsCl}$), il a été décrit chez l'homme une diminution de la fertilité se traduisant par une réduction importante du nombre de spermatozoïdes et de leur mobilité [20]. Des effets hépatotoxiques du ^{137}Cs ont également été décrits chez l'homme telle qu'une élévation des taux plasmatiques des transaminases ALAT et ASAT observée chez des patients exposés selon un mode aigu au ^{137}Cs à Goiânia [20]. Certaines études, pour la plupart réalisées dans des pays de l'Est, décrivent une augmentation des pathologies affectant divers organes dans la population des liquidateurs de Tchernobyl intervenus pour nettoyer les zones les plus fortement contaminées dans un rayon de 30 km du réacteur endommagé et ayant subi une irradiation moyenne effective de 100 millisieverts (mSv). Ainsi, des troubles de la minéralisation osseuse pouvant générer une ostéoporose, des atteintes des systèmes digestif et hépatobiliaire, ainsi que des lésions au niveau de la région sub-corticale du cerveau ont été rapportés

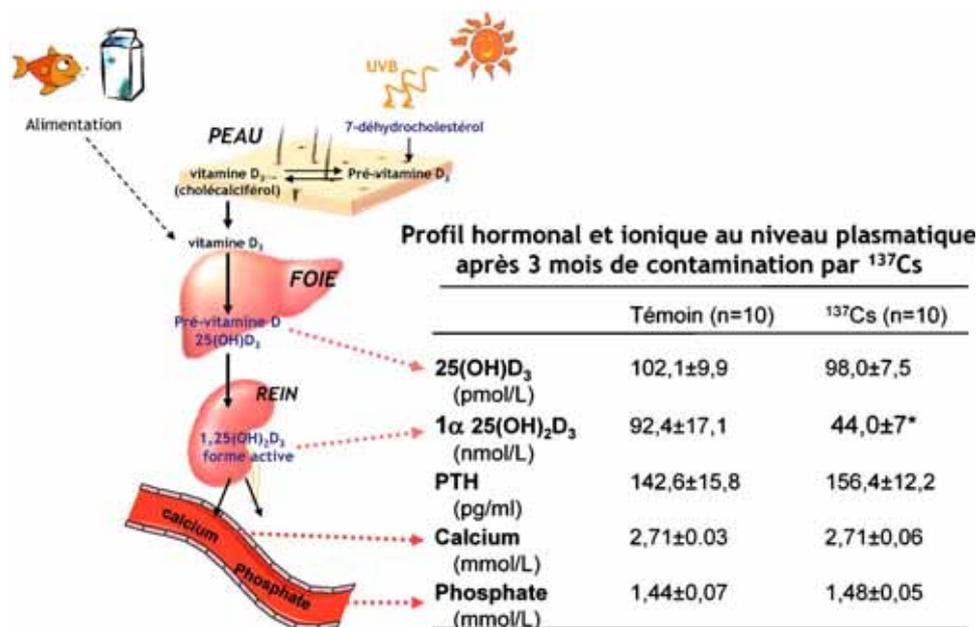


Fig. 7. Effet du césium 137 sur le métabolisme de la vitamine D après trois mois d'exposition chez le rongeur. Effect of caesium 137 on vitamin D metabolism after 3 months of exposure in rat.

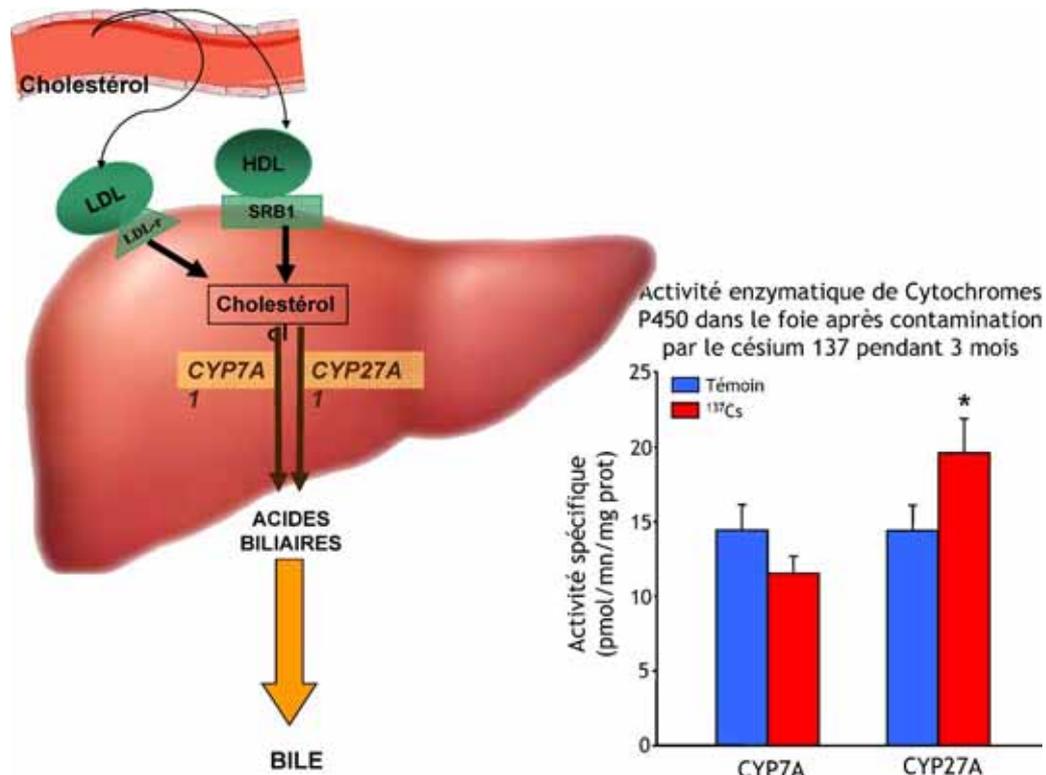


Fig. 8. Effet du césium 137 sur le métabolisme du cholestérol après trois mois d'exposition chez le rongeur.
Effect of caesium 137 on cholesterol metabolism after 3 months of exposure in rat.

[21–24]. Cependant, le suivi à long terme de cette population qui a été exposée à de fortes doses de ¹³⁷Cs en externe et en interne ne permet pas de faire un lien direct de cause à effets entre la quantité de ¹³⁷Cs ingérée et les pathologies observées.

2.4.2. Toxicité à faible dose

En raison de la persistance du ¹³⁷Cs dans l'environnement, les populations vivant sur les territoires contaminés par les retombées atmosphériques de l'accident de Tchernobyl en Ukraine, Biélorussie et Russie, sont chroniquement exposées à de faibles doses de ¹³⁷Cs via l'alimentation principalement.

2.4.2.1. Effets chez l'animal. Jusqu'à présent, très peu d'études expérimentales se sont intéressées aux effets biologiques des faibles doses de ¹³⁷Cs. Une étude réalisée chez le rat après ingestion chronique de ¹³⁷Cs contenu dans l'eau de boisson (6500 Bq/l soit 150 Bq/j par rat) indique que le césium est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique et se distribue de façon hétérogène dans les structures cérébrales [25]. Dans cette étude, les auteurs mettent en évidence l'effet neurotoxique du césium qui se traduit par des perturbations passagères du cycle veille sommeil et de l'activité électroencéphalographique. En revanche, dans ces conditions expérimentales, le césium n'induit pas d'effet sur le comportement (locomotion, mémoire) [26]. De plus, chez le rat, l'ingestion chronique de ¹³⁷Cs n'engendre pas de modification morphologique de l'épithélium intestinal, ni de son statut inflammatoire ou de sa capacité sécrétoire, à

l'exception d'une diminution de l'apoptose (mort cellulaire programmée) [27]. Enfin, différentes études expérimentales ont mis en évidence des effets biologiques du césium sur les métabolismes de la vitamine D (diminution du taux plasmatique de la vitamine D3 active, Fig. 7), du cholestérol (augmentation de l'activité enzymatique d'un cytochrome P450, la CYP27A1, qui intervient dans la transformation du cholestérol en acides biliaires, Fig. 8), des hormones stéroïdiennes et du système cardiovasculaire [28–33]. S'agissant du système cardiovasculaire, une première étude réalisée chez le rat contaminé pendant trois mois a mis en évidence une modification de marqueurs plasmatiques d'atteinte cardiaque (CK, CK-MB), de l'expression de canaux potassiques (Kir-6 et SUR) ainsi qu'une diminution de la pression artérielle, alors que les tracés des électrocardiogrammes (ECG) restaient normaux. Ces résultats suggèrent ainsi qu'une ingestion chronique de faibles doses de ¹³⁷Cs peut être responsable d'effets biologiques subtils mais significatifs, observables sur différents systèmes métaboliques. Ces modifications n'ont cependant pas de traduction clinique, dans la mesure où elles ne s'accompagnent pas de l'apparition de pathologies documentées par des symptômes observables chez les individus exposés.

2.4.2.2. Effets chez l'homme. Les données humaines montrent qu'une exposition à de faibles quantités de ¹³⁷Cs conduit à un déficit immunitaire notamment chez l'enfant. Les auteurs établissent une corrélation entre la quantité de ¹³⁷Cs mesurée

chez les enfants vivant dans les territoires contaminés après l'accident de Tchernobyl et un dérèglement du système immunitaire humoral et cellulaire, se traduisant notamment par une diminution de la teneur en lymphocytes B, une augmentation des lymphocytes T et une réduction de l'activité phagocytaire des neutrophiles, avec des valeurs de contamination les plus hautes comprises entre 2,5 Bq et 32,3 Bq [34–36].

Des troubles de la reproduction, engendrant des malformations congénitales et fœtales (duplication des reins et des uretères, polydactylie, défauts du tube neural), sont décrits sur la population de Biélorussie, notamment celle exposée à plus de 555 Bq/m² [37]. Une augmentation du cancer du rein, qui constitue l'organe principal d'excrétion du césium, est observée par ailleurs sur la population ukrainienne. Ainsi, Romanenko et al. [38] confirment le lien entre l'exposition à de faibles doses de rayonnements ionisants due au ¹³⁷Cs et le déclenchement des processus impliqués dans la carcinogenèse rénale. Le ¹³⁷Cs, à faibles doses, induit également des lésions au niveau de la vessie et provoque des cystites chroniques prolifératives [39]. De nombreux autres organes constituent également des cibles biologiques du césium. Ainsi, certains signes de neurotoxicité ont été mis en évidence dans la population habitant la zone des 150 km autour de la centrale de Tchernobyl. Gamache et al. établissent un lien entre l'exposition chronique au ¹³⁷Cs et des modifications au niveau du système nerveux central qui se traduisent par des désordres neurologiques (troubles mentaux, diminution de la mémoire cognitive, ralentissement psychomoteur) [40]. Certains auteurs ont, par ailleurs, observé des atteintes cardiaques chez les enfants. En effet, une étude épidémiologique réalisée sur des enfants de Gomel en Biélorussie (charge en ¹³⁷Cs allant de 0 à 122 Bq/kg de poids corporel) indique une augmentation de la fréquence des troubles électrocardiographiques et de l'hypertension artérielle proportionnelle à la charge de ¹³⁷Cs dans l'organisme [41]. Dans ce dernier article, l'auteur ne précise malheureusement ni le type de troubles électrocardiographiques observés, ni les valeurs d'hypertension artérielle. Enfin, la fréquence des cancers de la thyroïde, ainsi que des troubles de la vision ont été observés, notamment chez les enfants [42–44]. Pour les populations exposées aux âges adultes, une augmentation éventuelle du risque de cancers de la thyroïde est difficile à mettre en évidence. En effet, d'autres facteurs, comme de meilleures techniques de dépistage appliquées préférentiellement dans les zones contaminées durant les dix dernières années, peuvent contribuer en partie à l'excès observé pour certaines tranches d'âges chez les femmes. Chez les enfants et jeunes adolescents, l'augmentation importante des cancers de la thyroïde est due essentiellement aux iodures radioactifs relâchés durant l'accident, l'incidence de ce cancer croissant avec la dose à la thyroïde. L'effet direct du ¹³⁷Cs sur ces atteintes thyroïdiennes et oculaires n'a pas été clairement démontré.

Cette revue des données scientifiques actuellement disponibles sur les effets observés chez les populations ingérant quotidiennement de faibles quantités de ¹³⁷Cs, principalement via l'alimentation, semble indiquer une susceptibilité accrue

des enfants face à une contamination interne par ce radionucléide. Ainsi, outre une fragilité particulière du système immunitaire, les autorités sanitaires locales font régulièrement état depuis plusieurs années chez les enfants vivant sur les territoires contaminés par les retombées atmosphériques de l'accident de Tchernobyl, de troubles digestifs de type ulcères, de troubles hématologiques se traduisant en particulier par des anémies, mais également et surtout d'opacités du cristallin et de troubles du rythme cardiaque. Cependant, notamment en raison de l'absence de moyens techniques nécessaires à l'établissement d'un diagnostic de certitude, ces observations n'ont pour la plupart pas fait l'objet d'études documentées et sont par conséquent fortement remises en cause par la communauté scientifique. Elles souffrent, en particulier, de lacunes quant à une analyse approfondie de la responsabilité des cofacteurs associés dans l'apparition de telles pathologies. Ainsi, à titre d'exemple, les ulcères gastroduodénaux attribués par les médecins locaux à l'ingestion chronique de ¹³⁷Cs n'ont pas fait l'objet d'une recherche systématique de la présence de la bactérie *Helicobacter pylori*, dont la responsabilité dans le développement de ce type de pathologies chez l'enfant est aujourd'hui bien connue.

Afin de lever le doute sur ces observations et dans le but de disposer de données permettant de confirmer ou d'infirmer l'augmentation de ces pathologies non cancéreuses chez les enfants et dans l'affirmative, de rechercher l'existence d'un éventuel lien de cause à effet avec une incorporation chronique de ¹³⁷Cs, l'Institut français de radioprotection et de sûreté nucléaire (IRSN) a récemment lancé un programme de recherche dénommé EPICE, acronyme de « Étude des pathologies induites par le césium ». Associant des équipes de chercheurs en radiobiologie et en dosimétrie interne de l'IRSN aux équipes médicales du centre de diagnostic clinique et biologique de la ville de Bryansk située au sud-ouest de la Russie, ce programme a démarré en 2006 par la mise en œuvre d'une étude de faisabilité sur un groupe de 49 enfants [45]. Ces travaux ont permis notamment de discuter avec les autorités locales de la mise en place d'une future étude épidémiologique de plus grande ampleur, s'intéressant non seulement à la situation dans les territoires contaminés, mais également à celle prévalant dans les territoires non contaminés, de s'assurer de l'adhésion des populations locales à la mise en œuvre d'une telle étude et d'identifier les difficultés techniques pouvant être rencontrées sur le terrain dans la réalisation in situ des examens diagnostiques (mesure de la rétention corporelle du ¹³⁷Cs, examens cliniques, échographies, ECG, bilans biologiques, etc.). Au cours de cette période de 18 mois, les équipes de l'IRSN ont pu prendre toute la mesure des obstacles à lever préalablement : ainsi, elles ont été contraintes à renoncer à la mise en œuvre d'une étude portant sur les opacités du cristallin en raison du refus des autorités locales à délivrer une autorisation d'utilisation sur le territoire russe d'un appareillage de diagnostic de masse. Cependant, ces échanges ont été très fructueux sur le plan scientifique et ont permis d'aboutir à la définition commune d'un protocole d'étude des arythmies cardiaques chez les enfants vivant sur les territoires de la région de Bryansk située

aux confins de la Russie, à proximité immédiate des frontières biélorusse et ukrainienne.

Cette étude, démarrée en mai 2009 pour une durée prévisionnelle de quatre ans, consiste à recenser la nature et la fréquence des troubles du rythme cardiaque chez environ 10 000 enfants vivant sur les territoires contaminés versus 10 000 enfants vivant sur les territoires non contaminés de la même région. Le diagnostic posé par les médecins locaux et validé en concertation avec des experts français s'appuiera sur les résultats des ECG et échographies cardiaques réalisés à titre systématique chez les enfants intégrés à l'étude, après recueil du consentement éclairé des parents. De plus, chaque enfant bénéficiera d'une mesure anthropométrique permettant de déterminer sa concentration corporelle en ^{137}Cs . Enfin, des enregistrements sur 24 heures de paramètres électriques du cœur (Holter) et des bilans biologiques ciblés (CK, CK-MB, troponine, etc.) réalisés sur une partie des groupes étudiés compléteront les examens mis en œuvre. La mise en perspective de l'ensemble de ces résultats permettra ainsi :

- de confirmer ou d'infirmer une augmentation des troubles cardiaques chez les enfants ingérant quotidiennement du ^{137}Cs via l'alimentation ;
- de caractériser précisément la nature de ces troubles ;
- d'étudier l'existence d'un éventuel lien de cause à effet entre troubles cardiovasculaires et contamination chronique par de faibles doses de ^{137}Cs .

Par ailleurs, ces travaux contribueront à nourrir le débat ouvert depuis plusieurs années sur les effets non cancéreux qui seraient engendrés par des expositions à de faibles doses de rayonnements ionisants. Enfin, lorsque toutes les conditions seront alors réunies, il est envisagé d'entreprendre l'étude sur les mêmes populations des opacités du cristallin.

2.5. Traitements thérapeutiques (décorporation)

Les effets toxiques du ^{137}Cs peuvent être variables en fonction de la quantité relative de ce radionucléide mise en jeu, mais également des caractéristiques intrinsèques de l'individu telles que son sexe et son âge. Ainsi, lors d'une contamination interne par le césium, les cliniciens vont chercher à empêcher ou limiter les effets biologiques du ^{137}Cs en essayant essentiellement d'en contrôler l'absorption intestinale en intervenant au plus vite au niveau de la voie d'entrée. Actuellement, un seul traitement est efficace et recommandé pour la décontamination du ^{137}Cs après contamination par ingestion. Ce traitement repose sur l'utilisation du bleu de Prusse ou ferrocyanure ferrique, commercialisé en Allemagne notamment sous le nom de Radiogardase[®]. Le principe thérapeutique met en jeu le ferrocyanure insoluble, échangeur de cations complexant le ^{137}Cs dans la lumière intestinale et réduisant l'absorption intestinale de ce radionucléide en l'éliminant par les fèces. Le bleu de Prusse a été utilisé chez l'homme suite à l'accident de contamination par du ^{137}Cs à Goiânia (Brésil) en 1987 : suivant les délais d'intervention plus

ou moins rapides, la réduction de la dose fut de l'ordre d'un facteur 2 à 6 [46]. Enfin, les travaux entrepris à la recherche de nouveaux traitements ont conduit certains auteurs à recommander l'administration de la pectine ou acide polygalacturonique de la famille des oses, qui a été testée en Ukraine chez des enfants [8] suite à l'accident de Tchernobyl. Néanmoins, une étude expérimentale récente [47] réalisée chez le rat, qui a confirmé l'efficacité du bleu de Prusse administré par voie orale, n'a en revanche pas montré d'efficacité significative de la pectine. Ainsi, l'utilisation de la pectine pour la prise en charge de la contamination interne par le ^{137}Cs reste une question ouverte qui fait toujours l'objet de débat entre la communauté scientifique et les autorités sanitaires locales notamment.

3. Conclusion

Le ^{137}Cs présente une radiotoxicité potentielle élevée, compte tenu de ses caractéristiques physicochimiques et ses propriétés biologiques. Les effets toxiques radio-induits à forte dose par le ^{137}Cs sont bien connus et relativement comparables chez l'animal et chez l'homme (Fig. 6). Les accidents de contamination aiguë à forte dose ont été jusqu'ici rares. Néanmoins, en raison de la persistance de ce radionucléide dans l'environnement, les risques sanitaires associés à une contamination chronique à faibles doses, notamment après l'accident de Tchernobyl, sont aujourd'hui encore mal documentés. Dans de telles conditions d'exposition à faibles doses, les études expérimentales montrent que l'exposition au ^{137}Cs affecte certaines fonctions physiologiques et métaboliques chez les rongeurs. Chez l'homme, les effets d'une contamination chronique au ^{137}Cs restent difficiles à interpréter. En effet, de nombreux autres facteurs (autres radionucléides, pollutions chimiques) peuvent intervenir. D'un point de vue expérimental, il sera donc nécessaire de tenir compte de ces différents facteurs et d'étudier par exemple l'effet combiné du césium et du strontium. Ces deux radioéléments sont en effet présents simultanément dans l'environnement contaminé.

La question sous-jacente à l'observation de ces effets consiste à savoir si ces modifications physiologiques ou métaboliques constituent les signes précurseurs de l'apparition d'une pathologie avérée sur le plan clinique, ou si elles sont plutôt la conséquence d'une adaptation physiologique de l'organisme à cette exposition chronique. Les études expérimentales étant réalisées chez un modèle animal représentatif d'une population adulte et « saine », une des manières de répondre à cette interrogation serait d'évaluer les effets du ^{137}Cs sur d'autres modèles animaux, soit chez des individus en croissance dont l'exposition à ce radionucléide se fait de façon simultanée à la genèse des grands systèmes physiologiques, soit chez des individus ayant des prédispositions à des pathologies particulières. En outre, ces résultats expérimentaux ne présenteraient un véritable intérêt pour la société que s'ils pouvaient être corrélés à des études épidémiologiques (telles que celle mise en œuvre récemment par l'IRSN) sur des populations humaines vivant dans les territoires contaminés.

Références

- [1] Métivier H, Lorthioir S. Propriétés physiques et chimiques du césium. In: *Le Césium de l'environnement à l'homme*. Paris: EDP Sciences; 2000. p. 3–13.
- [2] Agalesdes P, Manesse D, Philippe M, Israël F, Robeau D. Inventaire des sources de césium. In: *Le Césium de l'environnement à l'homme*. Paris: EDP Sciences; 2000. p. 13–26.
- [3] ATSDR. Toxicological profile for cesium. In: *Toxicological profile*. US, department of health and human services. Public health service. Agency for toxic Substances and Disease Registry, Atlanta. 2004.
- [4] Colle C, Roussel-Debet S. Sols et végétaux. In: *Le Césium de l'environnement à l'homme*. Paris: EDP Sciences; 2000. p. 63–92.
- [5] Handl J, Beltz D, Botsch W, Harb S, Jakob D, Michel R, et al. Evaluation of radioactive exposure from ^{137}Cs in contaminated areas of Northern Ukraine. *Health Phys* 2003;84:502–17.
- [6] Takatsuji T, Sato H, Takada J, Endo S, Hoshi M, Sharifov VF, et al. Relationship between the ^{137}Cs whole-body counting results and soil and food contamination in farms near Chernobyl. *Health Phys* 2000;78: 86–9.
- [7] Després A, Métivier H. Dosimétrie des expositions aux isotopes radioactifs du césium. In: *Le Césium de l'environnement à l'homme*. Paris: EDP Sciences; 2000. p. 189–232.
- [8] Nesterenko VB, Nesterenko AV, Babenko VI, Yerkovich TV, Babenko IV. Reducing the ^{137}Cs -load in the organism of "Chernobyl" children with apple-pectin. *Swiss Med Wkly* 2004;134:24–7.
- [9] Raaf CL, Falk R, Thornberg C, Zakaria M, Mattsson S. Human metabolism of radiocaesium revisited. *Radiat Prot Dosimetry* 2004;112:395–404.
- [10] Henrichs H, Paretzke HG, Voigt G, Berg D. Measurements of Cs absorption and retention in man. *Health Phys* 1989;57:571–8.
- [11] Leggett RW, Williams LR, Melo DR, Lipsztein JL. A physiologically based biokinetic model for cesium in the human body. *Sci Total Environ* 2003;317:235–55.
- [12] Paulin R, Césium Siles S. *Toxiques nucléaires*. Paris: Masson; 1998. p. 83–104.
- [13] Skuterud L, Pedersen O, Staaland H, Roed KH, Salbu B, Liken A, et al. Absorption, retention and tissue distribution of radiocaesium in reindeer: effects of diet and radiocaesium source. *Radiat Environ Biophys* 2004;43:293–301.
- [14] Bandazhevsky YI. Chronic Cs-137 incorporation in children's organs. *Swiss Med Wkly* 2003;133:488–90.
- [15] Thomas RG, Thomas RL. Lethality of ^{137}Cs and ^{90}Sr administered in combination to rats. *Radiat Res* 1970;42:282–91.
- [16] Nikula KJ, Muggenburg BA, Chang IY, Griffith WC, Hahn FF, Boecker BB. Biological effects of $^{137}\text{CsCl}$ injected in beagle dogs. *Radiat Res* 1995;142:347–61.
- [17] Nishio K, Megumi T, Yonezawa M. Effects of ^{137}Cs and ^{90}Sr administered continuously and through generations upon mice (VI). *Annu Rep Radiat Center Osaka Prefect* 1968;9:86–93.
- [18] Daburon F, Lipsztein JL, Melo DR, Ramalho A, Valverde NJ, de Oliveira A, et al. Dosimétrie et effets biologiques. In: *Le Césium de l'environnement à l'homme*. Paris: EDP Sciences; 2000. p. 215–31.
- [19] Stojadinovic S, Jovanovic M. Activity of transaminases in the rat serum after internal contamination with ^{137}Cs and ^{90}Sr . *Strahlentherapie* 1966;131:633–6.
- [20] Brandao-Mello CE, Oliveira AR, Valverde NJ, Farina R, Cordeiro JM. Clinical and hematological aspects of ^{137}Cs : the Goiânia radiation accident. *Health Phys* 1991;60:31–9.
- [21] Kharchenko VP, Rassokhin BM, Zubovskii GA. Value of bone densitometry in the determination of vertebral mineral density in participants of the clean-up after Chernobyl accident. *Med Tr Prom Ekol* 2001;29–32.
- [22] Rozhinskaia L, Marova EI, Rassokhin BM, Purtova GS, Bukhman AI, Oganov VS, et al. Osteopenic syndrome in liquidators of the aftereffects of the accident at the Chernobyl power plant. *Probl Endokrinol (Mosk)* 1994;40:24–7.
- [23] Shkala LV. Metabolic disorders in digestive and hepatobiliary pathology in those who worked in the cleanup of the aftermath of the accident at the Chernobyl Atomic Electric Power Station. *Lik Sprava* 1998;42–5.
- [24] Zhavoronkova LA, Gogitidze NV, Kholodova NB. The characteristics of the late reaction of the human brain to radiation exposure: the EEG and neuropsychological study (the sequelae of the accident at the Chernobyl Atomic Electric Power Station). *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* 1996;46:699–711.
- [25] Lestaevel P, Dhieux B, Toulonias E, Houpert P, Paquet F, Voisin P, et al. Evaluation of the effect of chronic exposure to ^{137}Cs on sleep-wake cycle in rats. *Toxicology* 2006;226:118–25.
- [26] Houpert P, Bizot JC, Bussy C, Dhieux B, Lestaevel P, Gourmelon P, et al. Comparison of the effects of enriched uranium and ^{137}Cs on the behaviour of rats after chronic exposure. *Int J Radiat Biol* 2007;83:99–104.
- [27] Dublineau I, Grison S, Grandcolas L, Baudelin C, Paquet F, Voisin P, et al. Effects of chronic ^{137}Cs ingestion on barrier properties of jejunal epithelium in rats. *J Toxicol Environ Health A* 2007;70:810–9.
- [28] Tissandie E, Gueguen Y, Lobaccaro JMA, Grandcolas L, Grison S, Aigueperse J, et al. Vitamin D metabolism impairment in the rat's offspring following maternal exposure to ^{137}Cs . *Arch Toxicol* 2009;83:357–62.
- [29] Tissandie E, Gueguen Y, Lobaccaro JM, Aigueperse J, Gourmelon P, Paquet F, et al. Chronic contamination with ^{137}Cs affects Vitamin D3 metabolism in rats. *Toxicology* 2006;225:75–80.
- [30] Souidi M, Tissandie E, Grandcolas L, Grison S, Paquet F, Voisin P, et al. Chronic contamination with ^{137}Cs in rat: effect on liver cholesterol metabolism. *Int J Toxicol* 2006;25:493–7.
- [31] Racine RA, Grandcolas L, Grison S, Gourmelon P, Guéguen Y, Veysièrre G, et al. Molecular modification of cholesterol metabolism in the liver and the brain after chronic contamination with cesium 137. *Food Chem Toxicol* 2009;47:1642–7.
- [32] Grignard E, Guéguen Y, Grison S, Lobaccaro JM, Gourmelon P, Souidi M. In vivo effects of chronic contamination with ^{137}Cs on testicular and adrenal steroidogenesis. *Arch Toxicol* 2008;82:583–9.
- [33] Gueguen Y, Lestaevel P, Grandcolas L, Baudelin C, Grison S, Jourdain JR, et al. Chronic contamination of rats with (^{137}Cs)Cesium radionuclide: impact on the cardiovascular system. *Cardiovasc Toxicol* 2008;8: 31–40.
- [34] DeVita R, Olivieri A, Spinelli A, Grollino MG, Padovani L, Tarroni G, et al. Health status and internal radioccontamination assessment in children exposed to the fallout of the Chernobyl accident. *Arch Environ Health* 2000;55:181–6.
- [35] Mel'nichenko EM, Kushner AN, Zafranskaia MM, Miliutin AA. The immunoglobulin content in the saliva of children living under different radioecological conditions. *Stomatologiia (Mosk)* 1999;78:12–4.
- [36] Titov LP, Kharitonov GD, Gourmanchuk IE, Ignatenko SI. Effects of radiation on the production of immunoglobulins in children subsequent to the Chernobyl disaster. *Allergy Proc* 1995;16:185–93.
- [37] Lazjuk GI, Nikolaev DL, Novikova IV. Changes in registered congenital anomalies in the Republic of Belarus after the Chernobyl accident. *Stem Cells* 1997;15:255–60.
- [38] Romanenko A, Morimura K, Wanibuchi H, Wei M, Zaporin W, Vinnichenko W, et al. Urinary bladder lesions induced by persistent chronic low-dose ionizing radiation. *Cancer Sci* 2003;94:328–33.
- [39] Romanenko A, Morell-Quadreny L, Nepomnyaschy V, Vozianov A, Llombart-Bosch A. Pathology and proliferative activity of renal-cell carcinomas (RCCS) and renal oncocytomas in patients with different radiation exposure after the Chernobyl accident in Ukraine. *Int J Cancer* 2000;87:880–3.
- [40] Gamache GL, Levinson DM, Reeves DL, Bidyuk PI, Brantley KK. Longitudinal neurocognitive assessments of Ukrainians exposed to ionizing radiation after the Chernobyl nuclear accident. *Arch Clin Neuropsychol* 2005;20:81–93.
- [41] Bandazhevskaya GS, Nesterenko VB, Babenko VI, Yerkovich TV, Bandazhevsky YI. Relationship between caesium (^{137}Cs) load, cardiovascular symptoms, and source of food in 'Chernobyl' children –preliminary observations after intake of oral apple pectin. *Swiss Med Wkly* 2004; 134:725–9.
- [42] Day R, Gorin M, Eller AW. Prevalence of lens changes in Ukrainian children residing around Chernobyl. *Health Phys* 1995;68:632–42.

- [43] Likhtarov I, Kovgan L, Vavilov S, Chepurny M, Bouville A, Luckyanov N, et al. Post-Chernobyl thyroid cancers in Ukraine. Report 1: estimation of thyroid doses. *Radiat Res* 2005;163:125–36.
- [44] Sumner D. Health effects resulting from the Chernobyl accident. *Med Confl Surviv* 2007;23:31–45.
- [45] Landon G. Pathologies non cancéreuses potentiellement consécutives à une contamination interne chronique par le césium 137 : cataractes et arythmies cardiaques. Thèse de Pharmacie, Université Paris V-René Descartes (n° 2008-PA05-P074). 2008.
- [46] Farina R, Brandao-Mello CE, Pliveira CR. Medical aspects of Cs 137 decorporation. The Goiânia radiological accident. *Health Physics* 1991;60:63–6.
- [47] Le Gall B, Taran F, Renault D, Wilk JC, Ansoborlo E. Comparison of Prussian blue and apple-pectin efficacy on ¹³⁷Cs decorporation in rats. *Biochimie* 2006;88:1837–41.

ANNEXE 3

Utilisation des oxystérols en tant que biomarqueurs
d'atteinte tissulaire après irradiation accidentelle

**INITIAL EVALUATION AND FOLLOW-UP OF ACUTE RADIATION
SYNDROME IN TWO PATIENTS FROM THE DAKAR ACCIDENT**

J.M. Bertho, L. Roy, M. Souidi, M. Benderitter, E. Bey, R. Racine, T. Fagot, P. Gourmelon

Biomarkers, 2009; 14(2): 94-102

RESEARCH ARTICLE

Initial evaluation and follow-up of acute radiation syndrome in two patients from the Dakar accident

Jean Marc Bertho¹, Laurence Roy¹, Maâmar Souidi¹, Marc Benderitter¹, Eric Bey², Radjini Racine¹, Thierry Fagot³, and Patrick Gourmelon¹

¹Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire, DRPH/SRBE, Fontenay aux Roses, France, ²Service de Chirurgie, Hôpital d'Instruction des Armées Percy, Clamart, France, and ³Service d'Hématologie, Hôpital d'Instruction des Armées Percy, Clamart, France

Abstract

The aim of this work was to evaluate and follow up the evolution of radiation damage in two victims of a radiation accident. Blood samples were used for cytogenetic evaluation of radiation dose and heterogeneity. The radiation dose estimates were 1 Gy and 2.3 Gy in the two most exposed patients. Plasma was used for the measurement of the Flt3 ligand as a marker of haematopoietic aplasia, citrulline for damage to the jejunal mucosal epithelium and oxysterols for damage to the liver, the central nervous system and the vascular compartment. The use of these biological indicators demonstrated the presence of a haematopoietic syndrome and suggested the presence of subclinical radiation-induced damage to the liver in one of the two patients. These results support the interest in using these biological indicators in order to evaluate radiation damage, especially in complex accidental situations.

Keywords: Radiation accident; biological indicators; Flt3-ligand; citrulline; oxysterols

Introduction

On June–July 2006, in the city of Dakar (Senegal), an iridium 192 source was lost from an industrial radiation device. The source stayed in a guide which was stored near a workplace for 2 months, before being discovered during a transfer of material. As a result, it was suspected that 63 people received an unwanted and uncontrolled irradiation dose (Clairand et al. 2008). However, as in most cases of accidental irradiation (Nenot 1998, Goans 2002), the radiological nature of the accident was recognized late, 2 months after the initial event, i.e. the detachment of the iridium source. Moreover, the determination of circumstances demonstrated that the irradiation was protracted, at a low dose rate, and with additional localized irradiation for at least two patients (Clairand et al. 2008). In such a case, the evaluation of radiation-induced damage to vital organs remains difficult. This in turn makes the choice of a therapeutic strategy difficult.

The evaluation of radiation damage is classically based upon the radiation dose received as determined by the frequency of chromosomal aberrations (IAEA 2001, Voisin et al. 2001). However, in a case of either protracted exposure or delayed cytogenetic analysis, the radiation dose may be underestimated, due to the progressive death of cells bearing dicentrics and rings. Although this can be at least partly overcome by the determination of translocations frequency (Gregoire et al. 2006), the information provided by the radiation dose received (understood as a physic measurement) does not take into account individual parameters such as the individual radiation sensitivity or the possible presence of underlying pathologies before the accident. Thus there is a need for an estimate of radiation damage to the main, life-threatening physiological systems.

Such an evaluation is classically based upon the occurrence and severity of symptoms from the initial syndrome, i.e. nausea, vomiting, headache, hypotension,

Address for Correspondence: J. M. Bertho, IRSN, DRPH/SRBE, BP n°17, F-92262 Fontenay aux Roses cedex, France. Tel: +33(1) 58 35 95 48. Fax: +33(1) 58 35 84 67. E-mail: jean-marc.bertho@irsn.fr

(Received 12 November 2008; revised 13 January 2009; accepted 13 January 2009)

ISSN 1354-750X print/ISSN 1366-5804 online © 2009 Informa UK Ltd
DOI: 10.1080/13547500902773904

<http://www.informapharmascience.com/bmk>

hyperthermia and other described symptoms (Young 1987). Other parameters may be useful, such as the initial decrease in lymphocyte numbers (Silini & Gouskova 1991) or the modification in serum amylase (Barrett et al. 1982). However, these symptoms are either transitory or impossible to assess in a reliable way either in the case of protracted irradiation or several weeks after irradiation. Others have proposed a multiparametric approach, including numerous indicators for haematopoietic, gastrointestinal, neurological and cutaneous systems. This approach, termed METREPOL (Fliedner et al. 2001, 2007) was developed as an aid to define a therapeutic strategy adapted to each case. Nevertheless, this approach uses only blood cell counts for the evaluation of haematopoietic damage, and does not evaluate damage to other organs such as the liver and the vascular compartment.

We recently used new biological indicators in the follow-up of radiation damage after an accidental overexposure (Bertho et al. 2008), namely Flt3 ligand concentration for the haematopoietic system (Prat et al. 2006a), citrulline for the jejunum integrity (Crenn et al. 2003) and oxysterols for the lipid metabolism in the liver, the vascular compartment and the central nervous system (Souidi et al. 2004). This approach was applied to the two patients that received the highest radiation dose during the Dakar accident, namely patients (designated by their unique patient number) 06-20 and 06-23. In fact, the other potential victims did not show clinical symptoms of an irradiation and the biological dosimetric analysis confirmed that the other patients received a radiation dose below 0.4 Gy (Vaurijoux et al., 2009). The results demonstrated a haematopoietic syndrome under recovery and radiation-induced damage to the lipid metabolism in the patient who received the highest radiation dose, patient 60-20. These results support the interest in such a multiparametric approach, including cytogenetic analysis and recently validated bioindicators for the evaluation of radiation damage, especially in the case of complex overexposure.

Material and methods

Case presentation

On 3 June 2006, following the use of an industrial radiography device, an iridium source of an initial activity of 3.6 TBq detached from its support and stayed in the guide. This guide containing the source was stored for a few weeks near a workplace, until 31 July 2006. At that time, the material was sent to another site by express mail. When the radiography device was reused for the first time, the iridium source was found in the guide, suggesting the occurrence of a radiation accident (Clairand et al. 2008). Among the 63 people suspected to

have received a significant radiation dose, four patients showed cutaneous symptoms. Due to the possible occurrence of a haematopoietic syndrome, two of them (patients 06-20 and 06-23) were admitted to the haematology department of Percy Hospital (Clamart, France) and were followed up for blood parameters with their informed consent, starting on 30 August 2006.

Cytogenetic dosimetry

Blood was drawn onto heparinized tubes (Vacutainer; BD Biosciences, Le pont de Claix, France) and was treated as described elsewhere (IAEA 2001, Roy et al. 2006). Total blood was diluted 1:10 in RPMI 1640 medium supplemented with penicillin, streptomycin, glutamine, fetal calf serum (FCS) (all from BD Biosciences) and 1% PHA-M. After 46 h of culture at 37°C and 5% CO₂, colchicine (BD Biosciences) was added in order to block proliferative cells during their first division, and cultures were stopped at 48 h. After a KCl shock (0.075 M; Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), cells were then spread out onto glass slides, fixed and stained with Hoechst and Giemsa stains, as described elsewhere (IAEA 2001). Metaphases were then scored together with chromosomal aberrations. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was also performed on some slides to detect translocations as previously described (Gregoire et al. 2006). Three chromosome pairs were labelled and both total and reciprocal translocations were scored. The radiation dose received by the patient was calculated according to reference curves established in the lab, using blood samples irradiated *in vitro* with a Cobalt-60 source at a dose rate of 0.5 Gy min⁻¹ (Voisin et al. 2001).

Blood monitoring

Blood samples were drawn daily onto EDTA-coated tubes (Vacutainer, BD Biosciences). A complete blood cell count including reticulocytes was made onto an ADVIA 120 haematology counter (Siemens, Cergy Pontoise, France). Plasma was isolated by centrifugation 10 min at 800 g and frozen for later use. White blood cells (WBC) were then isolated by ammonium chloride lysis of red blood cells (RBC) and washed twice in phosphate-buffered saline solution (PBS) supplemented with 0.5% bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich). WBC were then counted and the viability assessed by trypan blue dye exclusion.

Phenotypic analysis of WBC

The following directly labelled antibodies were used: IgG1-FITC, -PE and Cy5, anti-CD2-Cy5, anti-CD8-FITC, anti-CD11b-FITC and -PE, anti-CD14-PC5, anti-CD16-FITC

(all from Beckman-Coulter, Marseille, France), anti-CD4-PE, anti-CD20-PerCP, anti-CD34-PE and anti-CD56-PE (all from BD Biosciences). WBC (1×10^5) were resuspended in 100 μ l PBS 0.5% BSA, and the antibodies were added at predefined concentrations. After 20 min incubation at 4°C, the cells were washed twice in PBS 0.5% BSA, and 7-amino-actinomycin D was added at a final concentration of 1 μ g ml⁻¹ in order to exclude dead cells from the analysis. Cells were then analyzed on a FACScalibur (BD Biosciences), with the acquisition of at least 10 000 events per point.

Colony-forming assay

WBC were resuspended in minimum essential medium alpha at a cell concentration of 2×10^6 cells ml⁻¹, and 300 μ l was mixed into 3 ml methylcellulose medium (Stem Cell Technologies, France) supplemented with the following recombinant human cytokines: 20 ng ml⁻¹ interleukin-3, 50 ng ml⁻¹ granulocyte-colony stimulating factor, 5 ng ml⁻¹ granulocyte macrophage-colony stimulating factor, 50 ng ml⁻¹ stem cell factor and 3 U ml⁻¹ erythropoietin. Cultures were then incubated at 37°C and 5% CO₂, and colony-forming units-granulocyte-macrophages (CFU-GM) and burst-forming units-erythroids (BFU-E) were counted on day 12 of culture.

Flt3-ligand measurement

Flt3-ligand (FL) was measured using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system (R&D Systems, Abingdon, UK), according to the manufacturer's recommendations. The sensitivity of the assays was less than 7 pg ml⁻¹.

Citrulline measurement

Twice a week, a blood sample was taken in heparinized tubes. Plasma was isolated by centrifugation at 800 g for 10 min and frozen. Citrulline was measured by chromatographic methods, as described elsewhere (Lutgens et al. 2004).

Oxysterols analysis and biochemical parameter measurements

Creatinine, urea, alanine aminotransferase (ALT), aspartate transferase (AST), total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoproteins (LDL), apolipoproteins (ApoA1 and ApoB), triglycerides, creatine kinase (CK and CK-MB) were measured starting from plasma samples on a Konelab 20 biochemical automatic device using specific kits (Thermo Fischer Scientific, Illkirch, France) and following the manufacturer's recommendations.

Oxysterols were analyzed as described elsewhere (Gueguen et al. 2006) with a minor modification. Briefly, an alkaline hydrolysis was carried out on a 0.5 ml EDTA plasma sample. Oxysterols were extracted by hexane and were then treated by cholesterol oxidase. Samples were then analyzed by high-performance liquid chromatography at 240 nm, by comparison with plasma samples containing known quantities of each of the analyzed oxysterols, namely 24S-hydroxycholesterol (24S-OH-Chol), 27-hydroxycholesterol (27-OH-Chol) and 7 α -hydroxycholesterol (7 α -OH-Chol).

Statistical analysis

Unless otherwise indicated, the data are presented as individual measurements. The mean \pm SD was used for reference values when indicated.

Results

Biological dosimetry

At admission, a cytogenetic analysis was made in order to determine the radiation dose received by the two patients (06-20 and 06-23). Results (Table 1) indicated a mean radiation dose to the whole body of 2.6 Gy (95% confidence interval (CI) 2.3–2.9) for patient 06-20 and 1 Gy (95% CI 0.8–1.1) for patient 06-23 (Table 1). Moreover, as the two patients showed localized radiation burns, an estimation of radiation heterogeneity was made based upon the Qdr method (Sasaki & Miyata 1968). This indicated that 84% of the blood of patient 06-20 received a mean radiation dose of 3.4 Gy (95% CI 2.8–3.9), and that 56% of the blood of patient 06-23 received a mean radiation dose of 1.6 Gy (95% CI 1.4–2.6).

However, as the irradiation took place over several weeks, the dose could be underestimated due to the disappearance of cells bearing complex chromosomal aberrations such as dicentrics and centric rings (Gregoire et al. 2006). Thus, an analysis of translocations (total and reciprocal) by FISH was made on the cells of patient 06-20. Based upon the reference curve from

Table 1. Results of biological dosimetry performed onto blood lymphocytes from patients 06-20 and 06-23.

Patient number	Type of aberration	Number of cells	Number of aberrations	Radiation dose (Gy)	95% confidence interval
06-20	Dicentrics and rings	246	115	2.6	2.3–2.9
	Reciprocal translocations	698	47	3.2	2.9–3.5
	Total translocations	698	115	3.1	2.7–3.8
06-23	Dicentrics and rings	494	42	1.0	0.8–1.1

the lab (Voisin et al. 2001), a dose estimate of 3.15 Gy (95% CI 2.9-3.5) was obtained for total translocations and a dose of 3.06 Gy (95% CI 2.68-3.78) for reciprocal translocations (Table 1).

Monitoring of blood cell counts

At the onset of hospitalization, patient 06-20 showed a pan-cytopenia with 0.5×10^9 WBC l^{-1} blood, 0.14×10^9 neutrophils l^{-1} blood and 0.33×10^9 lymphocytes l^{-1} blood (Figure 1A). Moreover, the patient showed a severe thrombopenia with 6×10^9 platelets (Plt) l^{-1} blood and a mild anaemia with 3.2×10^{12} RBC l^{-1} blood (Figure 2A). Overall, this was indicative of a severe pan-cytopenia with high risks of haemorrhages and opportunistic infections.

The blood cell count of patient 06-23 did not show such signs of pan-cytopenia (Figure 1B). In fact, although the number of WBC was slightly below the normal range (2.9×10^9 WBC l^{-1} blood compared with $3.1 - 10.3 \times 10^9$ WBC l^{-1}) (Cheng et al. 2004) and the lymphocyte number was decreased to 0.33×10^9 l^{-1} blood, patient 06-23 did not show thrombopenia, anaemia or neutropenia.

The two patients were monitored for blood cell count over 25 days. During this period, the blood cell counts of patient 06-23 did not vary significantly (Figure 1B),

indicating that this patient either did not develop a pan-cytopenia or recovered from it before admission. By contrast, patient 06-20 was rapidly treated with platelet transfusions and cytokine injections, (T. Fagot, personal communication), in order to avoid bleeding and haemorrhages and to sustain a rapid recovery. The cytokine treatment was the same as that previously used during the treatment of another radiation accident victim (Fagot et al. 2006). In fact, as soon as 24 h after the beginning of the treatment, patient 06-20 showed an increase in WBC, neutrophils and lymphocytes (Figure 1A). The progressive recovery of platelet numbers appeared later, from day 15 of monitoring (Figure 1C). Also, the increase in reticulocyte percentage started on day 10, peaking on day 22 of follow-up (Figure 1D). Overall, after a period of hyperplasia due to cytokine treatment, patient 06-20 showed a return to a normal blood cell count by day 25 of the follow-up.

Radiation damage to the haematopoietic system

Damage to the bone marrow was evaluated in these two patients by plasma Flt3 ligand concentration, number of circulating progenitors (CFU-GM and BFU-E) and absolute number of circulating CD34⁺ cells. At the onset of admission, patient 06-23 had a plasma Flt3 ligand concentration of 107 pg ml⁻¹, slightly above the normal

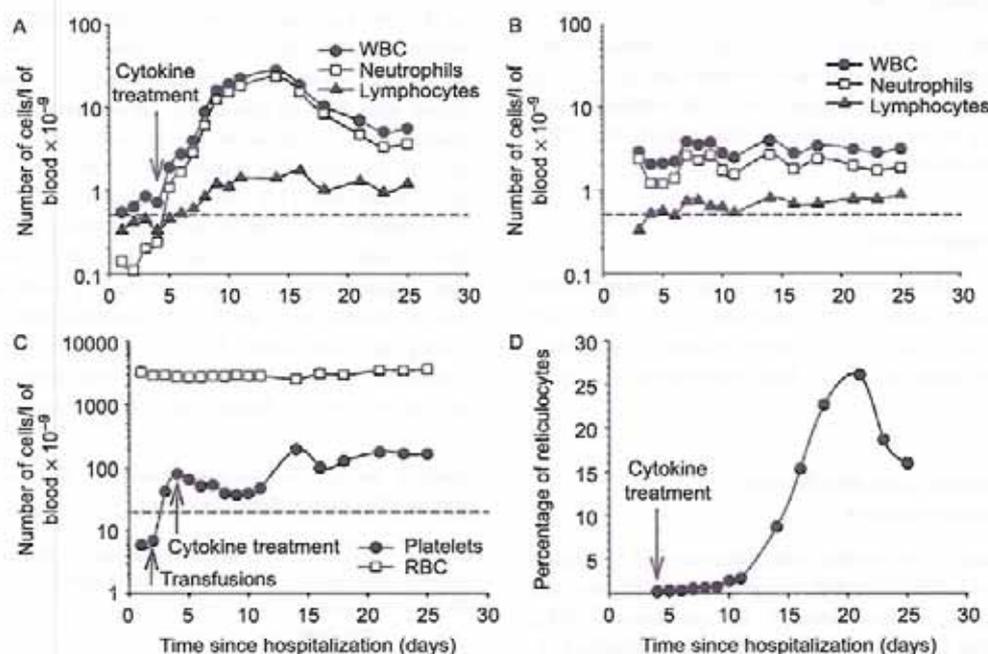


Figure 1. Follow-up of white blood cells (WBC; closed circles), neutrophils (open squares) and lymphocytes (closed triangles) (A) in patient 06-20 and (B) in patient 06-23. Horizontal dotted lines indicate the upper limit for severe neutropenia. The beginning of cytokine treatment for patient 06-20 is indicated by an arrow. (C) Follow-up of platelets (closed circles) and red blood cells (RBC; open squares) in patient 06-20. The horizontal dotted line indicates the upper limit for a severe thrombopenia. (D) Percentage of reticulocytes according to the time in the blood of patient 06-20.

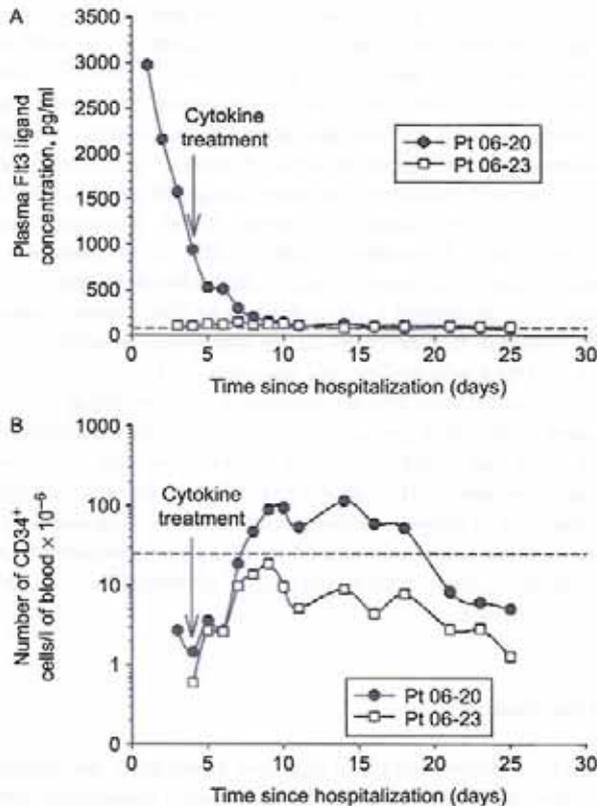


Figure 2. Evaluation of bone marrow damage by the mean of (A) plasma Flt3 ligand concentration follow-up and (B) absolute number of circulating CD34⁺ cells follow-up in patients 06-20 (closed circles) and 06-23 (open squares). The arrow indicates the beginning of cytokine treatment for patient 06-20. Horizontal dotted lines indicate mean normal values for these two parameters.

Flt3 ligand concentration for an African population ($78.8 \pm 27.7 \text{ pg ml}^{-1}$, as defined in 33 healthy donors) (J. M. Bertho, personal communication). Progenitor frequency in the blood was lower than the normal range ($3.6 \times 10^4 \text{ l}^{-1}$ of blood compared with $1.4 \times 10^5 \pm 0.9 \times 10^5$ for CFU-GM and $4.0 \times 10^4 \text{ l}^{-1}$ of blood compared with $2.4 \times 10^5 \pm 1.0 \times 10^5$ for BFU-E), and the number of circulating CD34⁺ cells was below normal values ($0.6 \times 10^6 \text{ CD34}^+ \text{ cells l}^{-1}$ blood compared with $25.1 \times 10^6 \pm 13.5 \times 10^6 \text{ CD34}^+ \text{ cells l}^{-1}$ in a control population; see Figure 2). Flt3 ligand concentration did not change significantly during the follow-up period, and both progenitor frequency and CD34⁺ cells increased up to the normal range. Overall, these results indicated that no significant radiation-induced bone marrow damage could be demonstrated in patient 06-23 during the hospitalization period or alternatively that the patient fully recovered before admission. As a result, patient 06-23 did not receive any specific treatment for a haematopoietic syndrome.

In contrast, patient 06-20 had a plasma Flt3 ligand concentration of 2975 pg ml^{-1} (almost 40-fold above the

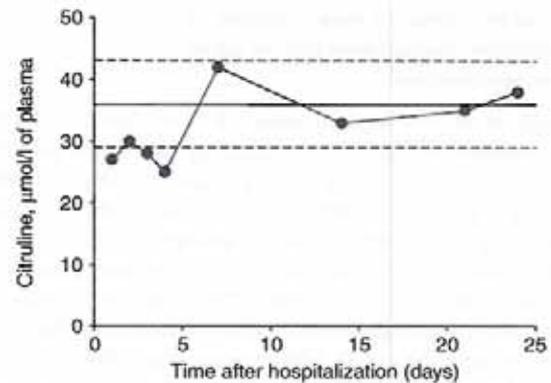


Figure 3. Citrulline plasma concentration as a bioindicator of enterocyte mass. Horizontal lines indicate the mean \pm 1 SD of citrulline concentration in a control group of males aged between 20 and 40 years.

normal range value in the African population), in the range of a severe bone marrow aplasia, and the number of circulating CD34⁺ cells was below the normal range ($2.7 \times 10^6 \text{ CD34}^+ \text{ cells l}^{-1}$; see Figure 2). The number of circulating CFU-GM and BFU-E were also decreased compared with normal values ($4.3 \times 10^4 \text{ l}^{-1}$ of blood compared with $1.4 \times 10^5 \pm 0.9 \times 10^5$ for CFU-GM and $1.2 \times 10^4 \text{ l}^{-1}$ of blood compared with $2.4 \times 10^5 \pm 1.0 \times 10^5$ for BFU-E). The Flt3 ligand concentration decreased rapidly, before the beginning of the cytokine treatment, strongly suggesting that patient 06-20 was in the bone marrow recovery phase at the onset of admission. This was confirmed by the rapid increase in both WBC numbers, circulating progenitors and circulating CD34⁺ cells, especially after the beginning of cytokine injection.

Radiation damage to the gastrointestinal system

Neither of the two patients described nausea and vomiting within hours following irradiation. Moreover, neither of these patients showed classical signs of a gastrointestinal syndrome such as haemorrhagic diarrhoea and loss of water and electrolytes. However, as these patients were hospitalized 1 month after irradiation and as the irradiation has been demonstrated to be heterogeneous, the occurrence of a discrete gastrointestinal syndrome was not excluded. Mucosal denudation of the intestine was then evaluated with plasma citrulline concentration in patient 06-20, as previously described (Crenn et al. 2003, Lutgens et al. 2004).

Citrulline concentration was between 29 and $43 \mu\text{mol l}^{-1}$ of plasma for both patients (Figure 3). These concentrations were within the normal range of citrulline concentration for a male in the 20–40-years-old age bracket ($36 \pm 7 \mu\text{mol l}^{-1}$ plasma as previously defined (Lutgens et al. 2004)), except during the first 3 days of follow-up. This demonstrated the absence of significant mucosal damage to the small bowel.

Use of oxysterols as bioindicators of radiation damage and follow-up of liver metabolism

Three oxysterols were followed in the plasma: 27-OH-Chol which is mainly produced by the lungs and the vascular compartment (Harik-Khan & Holmes 1990, Rajappa & Sharma 2005), 24S-OH-Chol which is produced by the central nervous system (Lutjohann et al. 2000) and 7 α -OH-Chol, which is exclusively produced by the liver (Oda et al. 1990). These oxysterols may be used as a damage bioindicator, particularly for liver metabolism (Oda et al. 1990, Souidi et al. 2004).

27-OH-Chol consistently decreased in the plasma of the two patients compared with the normal range (defined as 4.1–10.1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ in previous studies; Figure 4A) (Hari-Khan et al. 1990, Bertho et al. 2008). This suggested a perturbation of lipid metabolism in the cardiovascular system (Rajappa & Sharma 2005). However, both creatinine kinase (CK) and CK-MB concentration were within normal values (data not shown) and no sign of a cardiovascular pathology was observed. 24S-OH-Chol concentration was also consistently below 133 \pm 24 ng ml^{-1} , the normal range values (Lutjohann et al. 2000) in the two patients, with the exception of one time point (Figure 4B). However, no specific sign of a

cerebrovascular disease was observed and 24S-OH-Chol concentration returned to normal values by the end of the monitoring period. In patient 06-20, 7 α -OH-Chol concentration was increased 7-fold on day 5 of follow-up compared with the normal range ($244 \pm 42 \text{ ng ml}^{-1}$ in the normal physiological situation; Figure 5A). At that time AST and ALT, two liver enzymes classically used to assess liver integrity showed a normal blood concentration (Figure 5C). Thereafter, while 7 α -OH-Chol concentration returned to normal values, an increase in both AST and ALT indicated a perturbation of liver metabolism. By contrast, in patient 06-23, no significant modification in 7 α -OH-Chol, AST or ALT was detected.

Overall, these results indicated that ionizing radiations induced a perturbation in the lipid metabolism of both the central nervous system and the vascular compartment, although no clinical consequences were observed in these two patients. Moreover, this also suggested that a perturbation of 7 α -OH-Chol metabolism is indicative, and might be predictive of radiation-induced liver damage.

Discussion

Each radiation accident appears as unique, according to the circumstances, the delay between irradiation and detection of the accident, the radiation dose, dose rate and quality, and the fractionation of irradiation. Thus, health consequences are specific for each radiation accident victim. For instance, for a Belgium victim of accidental irradiation (Bertho et al. 2008) the radiation dose was elevated (4.5 Gy) with a high dose rate, raising mainly a haematopoietic syndrome. By contrast, in the present case, the recognition of the accident was delayed by 2 months, the irradiation was protracted with a low dose rate and mainly raising radiological burns for the two most severely irradiated patients. Thus, although these two radiation accidents appeared similar in the biological follow-up, they were managed in different ways, and in fact, each radiation accident must be considered as an orphan pathology.

In the present case of accidental overexposure, the global radiation doses were in the mild range (1.2 Gy and 2.3 Gy), as determined by cytogenetic dosimetry. However, the irradiation was complex, with a combination of protracted low dose rate irradiation with localized high dose rate irradiation. This was confirmed by the use of the Qdr method (Sasaki & Miyata 1968) applied to the frequency of dicentric chromosomes in these two patients, which showed that only a fraction of blood cells was irradiated to higher doses. Thus, given that in such complex situations with a long-lasting period between irradiation and cytogenetic analysis, the frequency of dicentric chromosomes may underestimate the radiation dose (Gregoire et al. 2006).

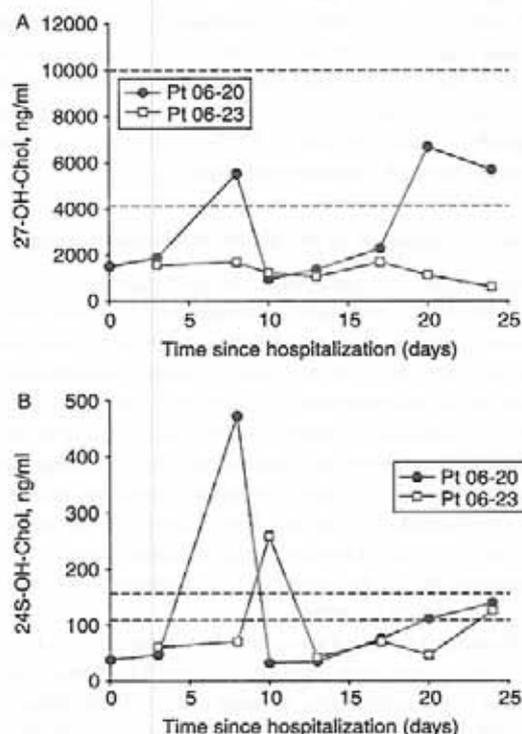


Figure 4. Evolution of (A) 27-OH-Cholesterol and (B) 24S-OH-Cholesterol in patients 06-20 (closed circles) and 06-23 (open squares). Horizontal dotted lines indicate the normal range for each of these two oxysterols.

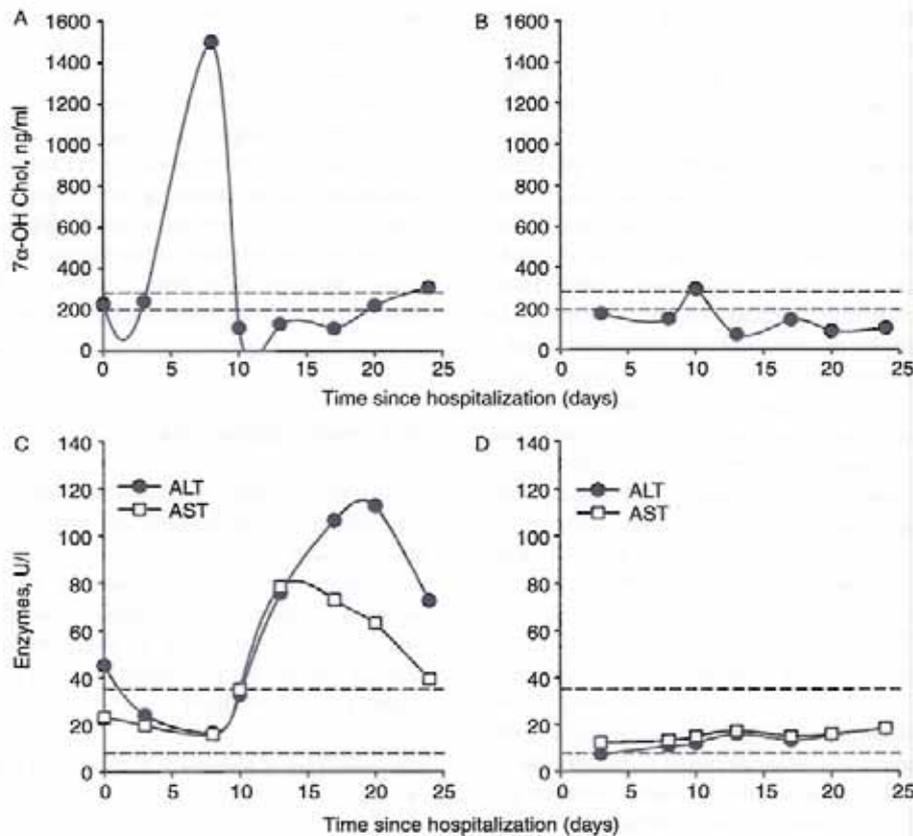


Figure 5. Variations in 7α-OH-cholesterol (A, B) and in plasma AST and ALT (C, D) in patient 06-20 (A, C) and in patient 06-23 (B, D). Horizontal dotted lines indicate the normal range for each of these parameters.

Therefore an analysis by translocation frequency was made for patient 06-20. Results indicated a good agreement between dicentric frequency and translocation frequency, with a mean radiation dose of 3.4 Gy (95% CI 2.8–3.9) for dicentrics and 3.15 Gy (95% CI 2.9–3.5) for total translocations. This suggests that it might be useful to evaluate the radiation dose by several methods in cases of delayed analysis or protracted overexposure (Wojcik et al. 2004).

Although the radiation doses received by the two patients were not life-threatening, an evaluation of radiation damage to the haematopoietic system was made, based on the use of Flt3 ligand concentration as a biological indicator of marrow function (Huchet et al. 2003, Prat et al. 2006a). Patient 06-23 showed a normal blood formula at the onset of hospitalization, suggesting the absence of a haematopoietic syndrome. This was confirmed by both circulating CFU-GM and BFU-E, circulating CD34⁺ cells and Flt3 ligand concentration which were within the normal ranges for humans (Huchet et al. 2003). By contrast, at the onset of hospitalization, blood cell counts of patient 06-20 were suggestive of a severe haematopoietic syndrome, with both neutropenia, lymphopenia and severe thrombopenia. This was confirmed

by an elevated Flt3 ligand concentration, indicative of severe radiation-induced bone marrow damage compared with previous studies in humans (Huchet et al., 2003, Prat et al., 2006b). However, the presence of circulating CD34⁺ progenitors, circulating CFU-GM and BFU-E and the rapid decrease of blood Flt3 ligand concentration in the following days strongly suggested that patient 06-20 was in a haematopoietic syndrome recovery phase, compared with previous results obtained in haematopoietic stem cell transplanted patients (Prat et al. 2006b). In fact, as soon as cytokine treatment was started, patient 06-20 rapidly recovered a normal blood cell count. Overall, these results indicated that Flt3 ligand concentration in the blood allowed the prediction of haematological recovery in patient 06-23, supporting the interest in using Flt3 ligand concentration in the management of radiation-accident victims (Bertho et al. 2008).

A recent analysis of past radiation accidents (Fliedner et al. 2005) suggested that the acute radiation syndrome must be considered as a multiple organ dysfunction syndrome (MODS) rather than the addition of specific diseases from one physiological system. According to this view, radiation doses as low as those observed here may induce some modifications in the physiology

of specific organs, even in the absence of any clinical symptoms. We thus evaluated radiation damage to other organs using specific biological indicators. Although the two patients did not show signs of a gastrointestinal syndrome, the integrity of the jejunum mucosal epithelium was tested in patient 60-20 by measurement of citrulline concentration, as previously described (Crenn et al. 2003, Lutgens et al. 2004). Citrulline concentration was in the normal range for 20-40-year-old males as previously defined (Lutgens et al. 2004), indicating that there was no significant radiation damage to the mucosal epithelium. Although no clinical sign of a specific pathology was observed, we used plasma oxysterols as bioindicators of lipid metabolism in several organs. Results indicated that there was a perturbation of lipid metabolism mainly in the most severely irradiated victim, and mainly in association with liver physiology. Interestingly, the increase in plasma concentration of 7α -OH-Chol, which is specifically produced by the liver (Oda et al. 1990, Kuroki et al. 1995), preceded an increase of ALT and AST, two classical markers of liver pathology. The occurrence of a radiation-induced damage to the liver was in accordance with the physical dosimetry reconstruction of radiation doses received by patient 06-20 (Clairand et al. 2008). In contrast, 7α -OH-Chol remained below the normal range in patient 06-23 and the two liver enzyme values remained within the normal range. In a previous radiation accident (Bertho et al. 2008), an increase in plasma 7α -OH-Chol also preceded a perturbation of lipid metabolism, and a decrease in 27 -OH-Chol preceded an increase in CK-MB above normal values, suggesting a cardiovascular perturbation. Such association between variations in plasma oxysterol concentration and either liver (Oda et al. 1990, Kuroki et al. 1995), cardiovascular (Harik-Khan & Holmes 1990) or central nervous system pathology (Lutjohann et al. 2000) have already been demonstrated in humans. Moreover, a severe liver disease was also observed during the course of a high-dose radiation-induced MODS (Uozaki et al. 2005). However, in the two present cases, perturbations in plasma oxysterols were limited and no specific pathology appeared. This suggested that a variation in oxysterol concentration in patients suffering from an acute radiation syndrome should be considered as a sign of a potential pathology to a specific physiological system, but not necessarily requiring specific treatment in the present case. Of course, this conclusion should be adapted to each individual case. Therefore, although needing some experimental confirmation in either animal models or in clinical studies, the present work confirms previous results (Fliedner et al. 2005, Konchalovsky et al. 2005, Bertho et al. 2008) suggesting that accidental irradiation induces a mixed pathology involving not only the haematopoietic system, the digestive tract and the skin,

but also other organs and systems such as the liver and the cardiovascular system, even in the range of sublethal radiation doses.

Overall, this work also supports the interest in using these new biological indicators for the evaluation of radiation damage, in association with the evaluation of radiation dose and heterogeneity by classical cytogenetic analysis. Such a multiparametric approach, included in a more general evaluation score such as the METREPOL score (Fliedner et al. 2001) is essential for the evaluation of radiation damage and the choice of a therapeutic strategy adapted to each case of accidental irradiation.

Acknowledgements

The authors wish to thank the medical staff of the Hematology Department of Percy Hospital for the efforts made in the management of blood samples, C. Demarquay and L. Grandcolas for helpful technical assistance and invaluable advice, and the team from the Biological dosimetry lab for their expert work. The secretarial assistance of S. Quernée and K. Médiana is also warmly acknowledged.

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest.

References

- Barrett A, Jacobs A, Kohn J, Raymond J, Powles RL. 1982. Changes in serum amylase and its isoenzymes after whole body irradiation. *Br Med J (Clin Res Ed)* 285:170-171.
- Bertho JM, Roy L, Souidi M, Benderitter M, Gueguen Y, Lataillade JJ, Prat M, Fagot T, De Revel T, Gourmelon P. 2008. New biological indicators to evaluate and monitor radiation-induced damage: an accident case report. *Radiat Res* 169:543-550.
- Cheng CK, Chan I, Cembrowski GS, van Assendelft OW. 2004. Complete blood count reference interval diagrams derived from NHANES III: stratification by age, sex, and race. *Lab Hematol* 10:42-53.
- Clairand I, Huet C, Trompier F, Bottollier-Depois JF. 2006. Physical dosimetric reconstruction of a radiological accident due to gammagraphy equipment that occurred in Dakar and Abidjan in summer 2006. *Radiat Meas* 43:698.
- Crenn P, Vahedi K, Lavergne-Slove A, Cynober L, Matuchansky C, Messing B. 2003. Plasma citrulline: A marker of enterocyte mass in villous atrophy-associated small bowel disease. *Gastroenterology* 124:1210-1219.
- Fagot T, Bottollier-Depois JF, Roy L, Samson T, Desangles E, Lataillade JJ, Bertho JM, Cailliot C, Gourmelon P, De Revel T. 2006. A pure hematological syndrome secondary to an accidental radiation exposure treated with G-CSF, EPO and SCF. *Exp Hematol* 34(9 Suppl. 1):76.
- Fliedner TM, Frieseke I, Beyrer K. 2001. Medical management of radiation accidents/manual on the acute radiation syndrome. London: The British Institute of Radiology.
- Fliedner TM, Dorr HD, Meineke V. 2005. Multi-organ involvement as a pathogenetic principle of the radiation syndromes: a study involving 110 case histories documented in SEARCH and classified as the bases of haematopoietic indicators of effect. *BJR (Suppl. 27):1-8*.

- Fliedner TM, Graessle D, Meineke V, Dorr H. 2007. Pathophysiological principles underlying the blood cell concentration responses used to assess the severity of effect after accidental whole-body radiation exposure: an essential basis for an evidence-based clinical triage. *Exp Hematol* 35(4 Suppl. 1):8-16.
- Goans RE. 2002. Clinical care of the radiation accident patient: Patient presentation, assessment, and initial diagnosis. In: Ricks RC, Berger ME, O'Hara FM, editors. *The medical basis for radiation-accident preparedness*. Lancaster, U.K.: Parthenon Publishing, p. 11-22.
- Gregoire E, Sorokine-Durm I, Bertho JM, Jacquet N, Delbos M, Demarquay C, Voisin P, Roy L. 2006. Follow-up of stable chromosomal aberrations in gamma-ray irradiated non-human primates. *Int J Radiat Biol* 82:493-502.
- Gueguen Y, Souidi M, Baudelin C, Dudoignon N, Grison S, Dublineau I, Marquette C, Voisin P, Gourmelon P, Aigueperse J. 2006. Short-term hepatic effects of depleted uranium on xenobiotic and bile acid metabolizing cytochrome P450 enzymes in the rat. *Arch Toxicol* 80:187-195.
- Harik-Khan R, Holmes RP. 1990. Estimation of 26-hydroxycholesterol in serum by high-performance liquid chromatography and its measurement in patients with atherosclerosis. *J Steroid Biochem* 36:351-355.
- Huchet A, Belkacemi Y, Frick J, Prat M, Muresan-Kloos I, Altan D, Chapel A, Gorin NC, Gourmelon P, Bertho JM. 2003. Plasma Flt-3 ligand concentration correlated with radiation-induced bone marrow damage during local fractionated radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 57:508-515.
- IAEA. 2001. Cytogenetic analysis for dose assessment: a manual. Vienna: International Atomic Energy Agency.
- Konchalovsky MV, Baranov AE, Kolganov AV. 2005. Multiple organ involvement and failure: selected Russian radiation accident cases re-visited. *BJR (Suppl. 27):26-29*.
- Kuroki S, Okamoto S, Naito T, Oda H, Nagase S, Sakai H, Nawata H, Yamashita H, Chijiwa K, Tanaka M. 1995. Serum 7 alpha-hydroxycholesterol as a new parameter of liver function in patients with chronic liver diseases. *Hepatology* 22:1182-1187.
- Lutgens LC, Deutz N, Granzier-Peeters M, Beets-Tan R, De Ruyscher D, Gueulette I, Cleutjens J, Berger M, Wouters B, von Meyenfeldt M and others. 2004. Plasma citrulline concentration: a surrogate end point for radiation-induced mucosal atrophy of the small bowel. A feasibility study in 23 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 60:275-285.
- Lutjohann D, Papassotiropoulos A, Bjorkhem I, Locatelli S, Bagli M, Oehring RD, Schlegel U, Jessen F, Rao ML, von Bergmann K and others. 2000. Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients. *J Lipid Res* 41:195-198.
- Nenot JC. 1998. Radiation accidents: lessons learnt for future radiological protection. *Int J Radiat Biol* 73:435-442.
- Oda H, Yamashita H, Kosahara K, Kuroki S, Nakayama E. 1990. Esterified and total 7 alpha-hydroxycholesterol in human serum as an indicator for hepatic bile acid synthesis. *J Lipid Res* 31:2209-2218.
- Prat M, Demarquay C, Frick J, Dudoignon N, Thierry D, Bertho JM. 2006a. Use of flt3 ligand to evaluate residual hematopoiesis after heterogeneous irradiation in mice. *Radiat Res* 166:504-511.
- Prat M, Frick J, Laporte JP, Thierry D, Gorin NC, Bertho JM. 2006b. Kinetics of plasma FLT3 ligand concentration in hematopoietic stem cell transplanted patients. *Leuk Lymphoma* 47:77-80.
- Rajappa M, Sharma A. 2005. Biomarkers of cardiac injury: an update. *Angiology* 56:677-691.
- Roy L, Gregoire E, Durand V, Buard V, Delbos M, Paillole N, Sorokine-Durm I, Gourmelon P, Voisin P. 2006. Study of the tools available in biological dosimetry to estimate the dose in cases of accidental complex overexposure to ionizing radiation: the Lilo accident. *Int J Radiat Biol* 82:39-48.
- Sasaki MS, Miyata H. 1968. Biological dosimetry in atomic bomb survivors. *Nature* 220:1189-1193.
- Silini G, Gousskova A. 1991. Biological dosimetry at Chernobyl. In: Gledhill BL, Mauro F, editors. *New Horizons in Biological Dosimetry*. New York: Wiley-Liss, p. 129-144.
- Souidi M, Dubrac S, Parquet M, Volle DH, Lobaccaro JM, Mathe D, Combes O, Scanff P, Lutton C, Aigueperse J. 2004. Oxysterols: metabolism, biological role and associated diseases [In French]. *Gastroenterol Clin Biol* 28:279-293.
- Uozaki H, Fukayama M, Nakagawa K, Ishikawa T, Misawa S, Doi M, Mackawa K. 2005. The pathology of multi-organ involvement: two autopsy cases from the Tokai-mura criticality accident. *BJR (Suppl. 27):13-16*.
- Vaurijoux A, Gruel G, Pouzoulet E, Grégoire E, Martin C, Roch-Lefèvre S, Voisin P, Voisin P, Roy L. 2009. Strategy for population triage based on dicentric analysis. *Rad Res (In Press)*.
- Voisin P, Benderitter M, Claraz M, Chambrette V, Sorokine-Durm I, Delbos M, Durand V, Leroy A, Paillole N. 2001. The cytogenetic dosimetry of recent accidental overexposure. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 47:557-564.
- Wojcik A, Gregoire E, Hayata I, Roy L, Sommer S, Stephan G, Voisin P. 2004. Cytogenetic damage in lymphocytes for the purpose of dose reconstruction: a review of three recent radiation accidents. *Cytogenet Genome Res* 104:200-205.
- Young RW. 1987. Acute radiation syndrome. In: Conklin JC, Walker RL, editors. *Military Radiobiology*. New York: Academic Press, p. 165-190.

ANNEXE 4

Effet d'une contamination interne chronique par l'UA sur
un modèle de souris prédisposées à la maladie d'Alzheimer

**EFFECT ON GENE EXPRESSION OF ACETYLCHOLINE AND CHOLESTEROL
METABOLISMS AFTER EXPOSURE TO DEPLETED URANIUM IN ALZHEIMER'S DISEASE
MODEL**

H. Bensoussan, R. Racine, F. Airault, I. Dublineau, P. Gourmelon, M. Souidi, P. Lestaevel

J Mol Neurosci

À soumettre

**Effect on gene expression of acetylcholine and cholesterol metabolisms
after exposure to depleted uranium in Alzheimer's disease model**

H. BENSOUSSAN, R. RACINE*, F. AIRAULT, I. DUBLINEAU, P. GOURMELON, M. SOUIDI, and P. LESTAEVEL

*: the first two authors contributed equally to this work

Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Direction de la Radioprotection de l'Homme, Service de RadioBiologie et d'Epidémiologie, Laboratoire de Radiotoxicologie Expérimentale. BP n°17, F-92262 Fontenay-aux Roses Cedex, France.

Running title: Chronic ingestion of depleted uranium and cerebral metabolisms of acetylcholine and cholesterol in the Tg2576 mouse

Keywords: depleted uranium, brain, chronic contamination, neurodegenerative disease, Alzheimer?

***Corresponding author:** P. LESTAEVEL, Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Direction de la Radioprotection de l'Homme, Service de RadioBiologie et d'Epidémiologie, Laboratoire de Radiotoxicologie Expérimentale. BP n°17, F-92262 Fontenay-aux Roses Cedex, France.

Tel: +33 1 58 35 82 84; Fax: +33 1 58 35 84 67

E-mail address: philippe.lestaevel@irsn.fr

ABSTRACT

Populations could be chronically exposed to depleted uranium (DU) through drinking water or food. Previous studies have demonstrated that DU modulates the cholinergic system and the brain cholesterol metabolism in rats, but without neuro-pathological consequence. The aim of this study was to determine what happens in organisms that will/are developing? a neurodegenerative disorder, the Alzheimer disease (AD). This study was thus performed on a transgenic mouse model for human APP, the Tg2576 mouse. The possible effects of DU through drinking water (20 mg/L) over an 8-month period were analyzed on acetylcholine and cholesterol metabolisms at gene level in the cerebral cortex. Chronic exposure of Tg2576 mice to DU increased mRNA levels of choline acetyl transferase (ChAT, +189%, $p < 0.05$), vesicular acetylcholine transporter (VACHT, +120%, $p < 0.05$) and ATP-Binding Cassette transporter A1 (ABC A1, +52%, $p < 0.05$) compared to control Tg2576 mice. The mRNA levels of ChAT, VACHT and ABC A1 decreased in control Tg2576 mice in comparison with wild-type mice (respectively -89%, -86% and -44%, $p < 0.05$). Overall, these modifications on acetylcholine and cholesterol metabolisms did not lead to increased disturbances that are characteristic of AD, suggesting that chronic DU exposure did not aggravate the pathology with this experimental model.

1. INTRODUCTION

Uranium is used primarily as fuel material in nuclear power plants. However, most reactors require uranium in which the ^{235}U content is enriched from its naturally occurring concentration. The uranium remaining after removal of the enriched fraction is referred to as depleted uranium (DU). DU is not only a radiotoxicant as regards its radionuclide properties but also a heavy metal with chemotoxicant properties (Priest, 2001). DU is weakly radioactive and a radiation dose from it would be about 60% of that from purified natural uranium with the same mass. Because of its high density, DU is widely used in military as well as in civilian applications. Its utilization spreads almost worldwide. For population, the main exposure pathway is ingestion of DU incorporated in drinking water and the food chain through migration from the soil or direct deposition on vegetation. Little information is available concerning the potential health hazard of chronic ingestion of low DU quantities. Chronic ingestion of DU may result in the manifestation of toxicity in many parts of the body (Craft et al., 2004). Actually, the most serious concern is DU toxicity in the kidneys (Leggett, 1989), but more recently the central nervous system appeared also as a sensitive target organ to DU exposure (Lestaevel et al., 2005).

Some studies suggested that chronic contamination by metals could be responsible for the development of neurodegenerative disorders. For example, increased levels of mercury have been found in patients suffering from Alzheimer's disease (AD) (Hock et al., 1998). Furthermore, other studies suggested that the risk of developing AD was higher in areas where drinking water contains a high concentration of aluminium (between 0.1 and 0.2 mg/L), (Martyn et al., 1989; Flaten, 2001).

AD is the most common neurodegenerative disorder in senile dementia. AD brains are characterized by β -amyloid peptide (BA) accumulation. This is a consequence of the cleavage of APP (Amyloid Precursor Protein) by α and β -secretases. Besides, loss of the cholinergic system plays an important role in AD. Postmortem studies of AD patients consistently have demonstrated the loss of cortical cholinergic neurons and the decrease of the enzymatic activity of choline acetyltransferase (ChAT), the enzyme responsible for acetylcholine (ACh) synthesis (Mesulam, 1996). This decrease of cholinergic function contributes to the severity of the cognitive and behavioral deficits, especially in the brain areas of memory and attention. Numerous factors seemed to be involved in the development of AD, such as cholesterol metabolism and in particular the apolipoprotein E (ApoE) that plays a role in the formation of BA burden (Dartigues et al., 2002; Chauhan, 2003).

Previous studies have demonstrated that DU modifies the cholinergic system (Abou-Donia et al., 2002; Bussy et al., 2006; Bensoussan et al., 2009) and the brain cholesterol metabolism (Racine et al., 2009) in rats, but without neuro-pathological consequence. The aim of this study was to determine if DU chronically ingested can aggravate the development of the pathology in organisms that will develop a neurodegenerative disorder, the Alzheimer disease (AD). Most studies of AD are performed on a transgenic mouse model for human APP, the Tg2576 mouse (Hsiao et al., 1996). The effects of chronic ingestion of DU through drinking water (20 mg/L) over an 8-month period were analyzed on acetylcholine and cholesterol metabolisms at gene expression level in the cerebral cortex of APP transgenic mice. The main actors of these metabolisms have been examined: biosynthesis, catabolism, transport and the regulation pathways controlling the other three.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Animals and contamination procedure

The transgenic APP mice used in this study contain the APP695 human gene which was inserted into a hamster prion protein cosmid vector (Hsiao et al., 1996). This gene with the Swedish mutation is known to be responsible for a familial form of AD (Rossor et al., 1993). The mice were supplied by Taconic US (Germantown, NY).

Tg2576 (n=16) male mice, aged 12-13 weeks, were housed 4 per cage for a period of 8 months. The animals were kept on a 12h/12h light/darkness cycle at $21\pm 2^\circ\text{C}$, with food and mineral water *ad libitum*. After a one-week acclimatization period, animals were distributed in two groups of 8 mice. One group of Tg2576 mice were exposed to depleted uranyl nitrate hexahydrate (98.74% ^{238}U , 0.26% ^{235}U , 0.001% ^{234}U , specific activity $1.4\cdot 10^4$ Bq/g, AREVA-NC, France) at a dose of 20 mg/L (280 Bq/L) in their drinking water for 8 months. The second group of Tg2576 mice ("control") received mineral water. A third group, the wild-type mice (n=8) has been constituted and drank mineral water for 8 months.

The water DU content was close to maximum uranium levels found naturally in some countries, such as southern Finland (Juntunen, 1991). At the end of exposure, mice were 10.5 months old, corresponding to the time when behavioral impairments are just beginning to set in (King, 2002). All groups were fed a regular rodent chow, with water and food *ad libitum*.

Throughout the experiment, body weight gain and food and water intake were measured weekly. After the contamination, the animals were anaesthetized and decapitated. The brain was removed and frontal cortex was dissected on ice. Samples were immediately deep-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until analysis.

All experiments were approved by the IRSN Animal Care Committee and complied with French legislation concerning animal experimentation (Ministry of Agriculture Act No. 87-848, October 19, 1987, amended May 29, 2001).

2.2 Real-time PCR

Total RNA was extracted with the RNeasy Lipid Tissue Mini-Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). The cDNA was produced from 1 µg of total RNA by reverse transcription with BD Sprint PowerScript PrePrimed 96 plate (BD Biosciences Clontech, Erembodegem, Belgium). Real-time PCR was performed on an AbiPrism 7 900 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) using SYBR Green technology, with 16ng of template cDNA for each reaction. Thermoprofile conditions were: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min and 40 cycles at 95°C for 15s and 60°C for 1 min. PCR assays were done in duplicate. The comparative $\Delta\Delta C_T$ -method was used for relative mRNA quantification (Brink et al., 2000). Samples were normalized to hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT). Primer sequence of HPRT was found in the study of Ropenga et al., 2004 and the other sequences were designed with PrimerExpress software and fold-inductions calculated relative to the Tg2576 control group. Sequences for the primers are indicated in Table 1.

2.3 Statistical analysis

Results are reported as means \pm SEM. Statistical analyses were performed with Student's t-test. Differences were considered significant when $p < 0.05$, $p < 0.01$ or $p < 0.001$.

3. RESULTS AND DISCUSSION

This study showed, for the first time, that chronic exposure with low doses of DU induced disturbances in the mRNA level of some genes implicated in acetylcholine and cholesterol metabolism in Tg2576 mice. These mRNA modifications showed an absence of significant neurotoxicity following chronic DU exposure in AD mice.

The cholinergic system is particularly involved in the phenomena of memorization (Mishima et al., 2000) which are disturbed in AD. Indeed, cholinergic neurons are gradually destroyed in an irreversible way, ending in the definitive loss of the mental functions. In the Tg2576 transgenic mouse model of AD, ACh release is decreased (Watanabe et al., 2009). Considering that DU modifies ACh metabolism in the brain (Abou-Donia et al., 2002; Bussy et al., 2006; Bensoussan et al., 2009) and that this metabolism is particularly affected in AD, it is allowed to wonder if a chronic exposure to DU could modify the evolution of this pathology.

In Tg2576 mice exposed to DU, the mRNA levels of the biosynthesis enzyme of acetylcholine (ChAT) and the transporter (VACHT) are increased (+189% and +120% respectively, $p < 0.05$) in comparison with the control Tg2576 mice (Fig. 1). The results obtained in the present study suggest

for the first time that chronic ingestion of DU in Tg2576 mice induces modifications of the cholinergic pathway. This hypothesis must be confirmed in the future.

Two enzymes participate to the catabolism of acetylcholine: acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE). The exposure of Tg2576 mice to DU did not induce significant modifications of mRNA levels of AChE and BuChE, but their enzymatic activities remain to be determined (Fig. 1). Earlier studies performed on rats produced apparently contradictory results. An increase of AChE activity was observed after a 1 mg/kg/day intramuscular injection of DU over a 7-day period (Abou Donia et al., 2002), whereas a decrease of AChE activity was shown in entorhinal cortex (Bensoussan et al., 2009) and no modification in the hippocampus (Bussy et al., 2006) after chronic contamination of drinking water with DU (40 mg/L). The different contamination protocols (specific uranium salts, dose, exposure, duration, cerebral structure) used in these studies may explain this discrepancy.

Concerning the gene expression of cholinergic receptors ($\alpha 5nAChR$, $B2nAChR$ and $m1AChR$), none was significantly modified in Tg2576 exposed mice in comparison with control Tg2576 mice (Fig. 1). Nevertheless, few investigations showed genic modulations of nicotinic and muscarinic receptors by heavy metals, such as mercury chloride and zinc exposures (Hsiao et al., 2001; Mirzoian et al., 2002; Bonfante-Cabarcas et al., 2002).

Conversely to the cholinergic system which appears as a consequence of the disease, the cholesterol metabolism seems more and more evidently involved in the genesis of AD (Shobab et al., 2005). The cerebral cholesterol is independent from the body pool since cholesterol cannot cross the blood-brain barrier. Therefore, brain must produce its own cholesterol endogenously and maintain its homeostasis. In the present study, a chronic internal contamination with DU during 8 months induced no significant effect on gene expression of two biosynthesis enzymes, 3-hydroxy-3-methylglutamyl Coenzyme A Synthase (HMGCoA Synthase), and HMGCoA Reductase (Fig. 2). To prevent its excessive accumulation of cholesterol in the brain, cholesterol is converted into 24(S)-hydroxycholesterol by cholesterol-24-hydroxylase (CYP46A1), a brain-specific enzyme. This oxysterol being more hydrophilic than cholesterol, it can cross the blood-brain barrier more rapidly and join the general bloodstream (Bjorkhem, 2006). A strong relationship between CYP46A1 and AD has been demonstrated (Bogdanovic et al, 2001). After DU exposure, gene expression of CYP46A1 was unchanged in Tg2576 mice in comparison to control (Fig. 2). This result is not in accordance with a previous study that demonstrated a significant increase of the mRNA level of CYP46A1 in rat exposed to DU during 9 months (Racine et al., 2009). All these results suggest that the global homeostasis of cholesterol in the brain is maintained in Tg2576 mice after DU exposure.

Although cholesterol cannot cross the blood-brain barrier, there is an intracerebral transport of cholesterol between glial and neuronal cells. Among the proteins involved in this transport, the mRNA level of ABC A1 increased significantly (+52%, $p < 0.05$) in Tg2576 mice exposed to DU in comparison with control Tg2576 mice (Fig. 2). This increase of ABC A1 is in agreement with a previous study performed on rats after 9 months of exposure to DU (Racine et al., 2009).

Gene expression of low-density-lipoprotein receptor (LDLr) and scavenger receptor class B type 1 (SR-B1), which both take up the cholesterol into the cell, were not modified in Tg2576

exposed mice compared to control Tg2576 mice (Fig. 2). A previous work has demonstrated a significant increase of mRNA level of SR-B1 after chronic exposure in rat (Racine et al., 2009). Further studies are necessary since this discrepancy between our data and those of Racine et al. cannot be explained by the only difference of species.

Cholesterol metabolism is submitted to a very fine and intricate regulation at transcriptional level implying a number of nuclear receptors. In Tg2576 mice, a chronic exposure to DU increased mRNA levels of Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c (SREBP 1c) by 27% ($p < 0.05$) compared to non-exposed Tg2576 mice (Fig. 2). This result is in accordance with previous studies showing that some nuclear receptors are affected by DU chronic internal exposure (Souidi et al., 2005; Tissandie et al., 2007). In our experimental conditions, other nuclear receptors, *i.e.* RXR α and PPAR γ , were not significantly modified in Tg2576 exposed mice in comparison with control Tg2576 mice (Fig. 2).

AD is a neurodegenerative pathology characterized by several changes in the brain and notably an amyloidogenesis disturbance with an increase in toxic β -amyloid (β A) synthesis, which the precursor is the amyloid precursor protein (APP). Cleavage of APP occurs *via* two paths. Cleavage of APP by α -secretase (or ADAM 10) precludes β A production whereas cleavage by β -secretase (or BACE 1) leads to the production of β A, which is involved in the pathophysiology of AD. The relative mRNA quantity of BACE 1 and ADAM 10 was not significantly different between Tg2576 mice exposed to DU and control Tg2576 mice (Fig. 3). The herein study has been performed on cerebral cortex and it has been previously demonstrated that the gene expression of BACE 1 in Tg2576 mice was lower in the cortex than other cerebral structures, such as the hippocampus (Irizarry et al., 2001). The effect of DU exposure on gene expression of both secretases must be performed in other cerebral structures.

In the present study, we have demonstrated that the gene expression of some actors of cholinergic and cholesterol metabolisms (ChAT, VAcHT, ABCA1 and SREBP 1c) were increased after exposure to DU in Tg2576 mice. The next step has been to identify if these genes are also modified in transgenic mice in comparison to wild-type mice. In control Tg2576 mice, the mRNA levels of ChAT, VAcHT and ABC A1, but not SREBP 1c, are lowered (decrease of respectively 89%, 86% and 44%, $p < 0.05$) in comparison with the wild-type mice (Fig. 4). This result on ChAT is coherent with a previous study on the cholinergic system in AD, which described a decrease of the enzymatic activity of ChAT (Quirion et al., 1993). Previous studies showed no significant difference between transgenic and wild-type mice for VAcHT, but these results are not at gene expression level (Gau et al., 2002; Klingner et al., 2003). The gene expression modulation of ABC A1 relates to the work of Wahrle et al showing that an over-expression of ABC A1 protein decreases the precipitation of β A peptides (Wahrle et al., 2008). All these results suggest that ChAT, VAcHT and ABC A1 seem to be target genes in AD because their expression is modified both in the pathological phenotype and after DU exposure.

In conclusion, this study demonstrated for the first time that a chronic exposure by ingestion of a low dose of DU induces changes in the expression of genes implicated in the physiopathology of AD. ChAT, VAcHT and ABC A1 are lowered in pathologic model and are

modulated by uranium exposure. Nevertheless, these modulations did not lead to increased disturbances that are characteristic of AD, suggesting that chronic DU exposure did not amplified this pathology. All these results were obtained from gene expression analyses only and must be confirmed by protein dosages and enzymatic activities. In order to conclude more definitively on the harmlessness of low-dose chronic uranium contamination on the development of the disease, it appears necessary to launch further experiments with longer contamination times.

Acknowledgements

The authors thank Karine Ser-le-Roux, Cédric Baudelin, Thierry Loiseau, and Frédéric Voyer for their technical help. This work is part of the ENVIRHOM-Health research program supported by the Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety.

REFERENCES

- Abou-Donia M. B., Dechkovskaia A. M., Goldstein L. B., Shah D. U., Bullman S. L. and KHAN W. A. (2002). Uranyl acetate-induced sensorimotor deficit and increased nitric oxide generation in the central nervous system in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 72, 881-90.
- Apelt J, Kumar A, Schliebs R. (2002). Impairment of cholinergic neurotransmission in adult and aged transgenic Tg2576 mouse brain expressing the Swedish mutation of human beta-amyloid precursor Protein *Brain Res.* 953, 17-30.
- Bensoussan H, Gandcolas L, Dhieux-Lestaevel B, Delissen O, Vacher CM, Dublineau I, Voisin P, Gourmelon P, Taouis M, Lestaevel P. (2009). Heavy metal uranium affects the brain cholinergic system in rat following sub-chronic and chronic exposure. *Toxicology* 261, 59-67.
- Bjorkhem I. (2006). Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain. *J. Intern. Med.* 260, 493-508.
- Bogdanovic N, Bretillon L, Lund EG, Diczfalusy U, Lannfelt L, Winblad B, et al. (2001). On the turnover of brain cholesterol in patients with Alzheimer's disease. Abnormal induction of the cholesterol-catabolic enzyme CYP46 in glial cells. *Neurosci. Lett.* 314, 45-8.
- Bonfante-Cabarcas R., Bravo I., Nello C., Gutiérrez-Reyes E., Loureiro Dos Santos N.E., et al. (2002). Pharmacological doses of Zn²⁺ induce a muscarinic cholinergic supersensitivity. *J. Biomed. Sci.* 9, 639-44.
- Brink N., Szamel M., Young A.R., Wittern K.P., Bergemann J. (2000). Comparative quantification of IL-1 β , IL-10, IL-10r, TNF- α and IL-7 mRNA levels in UV-irradiated human skin in vivo. *Inflamm. Res.* 49, 290-96.
- Bussy C., Lestaevel P., Dhieux B., Amourette C., Paquet F., Gourmelon P., et al. (2006). Chronic ingestion of uranyl nitrate perturbs acetylcholinesterase activity and monoamine metabolism in male rat brain. *Neurotoxicology* 27, 245-52.
- Chauhan N.B. (2003). Membrane dynamics, cholesterol homeostasis, and Alzheimer's disease. *J. Lipid. Res.* 44, 2019-29.
- Craft E., Abu-Qare A., Flaherty M., Garofolo M., Rincavage H., Abou-Donia M. (2004). Depleted and natural uranium: chemistry and toxicological effects. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 7, 297-317.
- Dartigues J.F., Berr C., Helmer C. and Letenneur L. (2002). Epidémiologie de la maladie d'Alzheimer. *Med. Sci.* 18, 737-43.
- Dineley K.T., Xia X., Bui D., Sweatt J.D., Zheng H. (2002). Accelerated plaque accumulation, associative learning deficits, and up-regulation of alpha 7 nicotinic receptor protein in transgenic

- mice co-expressing mutant human presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *J. Biol. Chem.* 277, 22768-80.
- Flaten T.P. (2001). Aluminium as a risk factor in Alzheimer's disease, with emphasis on drinking water. *Brain Res. Bull.* 55, 187-96.
- Gau J.T., Steinhilb M.L., Kao T.C., D'Amato C.J., Gaut J.R., Frey K.A., et al. (2002). Stable beta-secretase activity and presynaptic cholinergic markers during progressive central nervous system amyloidogenesis in Tg2576 mice. *Am. J. Pathol.* 160, 409-11.
- Hock C., Drasch G., Golombowski S., Muller-Spahn F., Willershausen-Zonnchen B., Schwarz P., et al. (1998). Increased blood mercury levels in patients with Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* 105, 59-68.
- Hsiao B., Dweck D., Luetje C.W. (2001). Subunit-dependent modulation of neuronal nicotinic receptors by zinc. *J. Neurosci.* 21, 1848-56.
- Hsiao K., Chapman P., Nilsen S., Eckman C., Harigaya Y., Younkin S., et al. (1996). Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274, 99-102.
- Irizarry M.C., Locascio J.J. (2001). Hyman BT. beta-site APP cleaving enzyme mRNA expression in APP transgenic mice: anatomical overlap with transgene expression and static levels with aging. *Am. J. Pathol.* 158, 173-7.
- Juntunen R. (1991). Etelä-Suomen kallioporakaivojen uraani- ja radontukimukset (Uranium and radon in wells drilled into bedrock in southern Finland. Report of Investigation, Geological Survey of Finland 98.
- King, D.L., Arendash, G.W. (2002). Behavioral characterization of the Tg2576 transgenic model of Alzheimer's disease through 19 months. *Physiol. Behav.* 75, 627-42.
- Klingner M., Apelt J., Kumar A., Sorger D., Sabri O., Steinbach J., et al. (2003). Alterations in cholinergic and non-cholinergic neurotransmitter receptor densities in transgenic Tg2576 mouse brain with beta-amyloid plaque pathology. *Int. J. Dev. Neurosci.* 21, 357-69.
- Leggett R.W. (1989). The behavior and chemical toxicity of U in the kidney: a reassessment. *Health Phys.* 57, 365-83.
- Lestaevel P., Houpert P., Bussy C., Dhieux B., Gourmelon P., Paquet F. (2005). The brain is a target organ after acute exposure to depleted uranium. *Toxicology* 212, 219-26.
- Martyn C.N., Barker D.J., Osmond C., Harris E.C., Edwardson J.A., Lacey R.F. (1989). Geographical relation between Alzheimer's disease and aluminum in drinking water. *Lancet* 14, 59-62.
- Mesulam M.M. (1996). The systems-level organization of cholinergic innervation in the human cerebral cortex and its alterations in Alzheimer's disease. *Prog. Brain Res.* 109, 285-97.
- Mirzoian A., Luetje C.W. (2002). Modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by mercury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302, 560-7.
- Mishima K., Iwasaki K., Tsukikawa H., Matsumoto Y., Egashira N., Abe K., et al. (2000). The scopolamine-induced impairment of spatial cognition parallels the acetylcholine release in the ventral hippocampus in rats. *Jpn J. Pharmacol.* 84, 163-73.
- Priest N.D. (2001). Toxicity of depleted uranium. *Lancet* 357, 244-6.
- Quirion R. (1993). Cholinergic markers in Alzheimer disease and the autoregulation of acetylcholine release. *J. Psychiatry Neurosci.* 18, 226-34.
- Racine R., Gueguen Y., Gourmelon P., Veyssiere G., Souidi M. (2008). Modifications of the Expression of Genes Involved in Cerebral Cholesterol Metabolism in the Rat Following Chronic Ingestion of Depleted Uranium. *J. Mol. Neurosci.* [Epub ahead of print].
- Ropenga A., Chapel A., Vandamme M. and Griffiths N. M. (2004). Use of reference gene expression in rat distal colon after radiation exposure: a caveat. *Radiat. Res.* 161, 597-602.
- Rossor M.N., Newman S., Frackowiak R.S., Lantos P., Kennedy A.M. (1993). Alzheimer's disease families with amyloid precursor protein mutations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 695, 198-202.

Shobab L. A., Hsiung G. Y. and Feldman H. H. (2005). Cholesterol in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 4, 841-52.

Souidi M., Gueguen Y., Linard C., Dudoignon N., Grison S., Baudelin C., et al. (2005). In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on CYP3A and associated nuclear receptors PXR and CAR in the rat. *Toxicology* 214, 113-22.

Tissandié E., Guéguen Y., Lobaccaro J.M., Grandcolas L., Voisin P., Aigueperse J., et al. (2007). In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on vitamin D3 metabolism in rat. *Biochim. Biophys. Acta.* 1770, 266-72.

Wahrle S. E., Jiang H., Parsadanian M., Kim J., Li A., Knoten A., et al. (2008). Overexpression of ABCA1 reduces amyloid deposition in the PDAPP mouse model of Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* 118, 671-82.

Watanabe T., Yamagata N., Takasaki K., Sano K., Hayakawa K., Katsurabayashi S., et al. (2009). Decreased acetylcholine release is correlated to memory impairment in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1249, 222-8.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1: Gene expression of biosynthesis and catabolism enzymes, transporters and receptors involved in cholinergic system within cerebral cortex.

Results are expressed as a ratio to HPRT mRNA level. The levels of control Tg2576 mice were arbitrarily set at 1. Data are expressed as means \pm SEM (n=8 for each group), with **p<0.01, significantly different from control Tg2576 mice; DU: depleted uranium.

Figure 2: mRNA levels of biosynthesis and catabolism enzymes, transporters, lipoprotein receptors and transcription factors/nuclear receptor involved in cerebral cholesterol metabolism. (changer le titre de la figure)

Results are expressed as a ratio to HPRT mRNA level. The levels of control Tg2576 mice were arbitrarily set at 1. Data are expressed as means \pm SEM (n=8 for each group), with *p<0.05, significantly different from control Tg2576 mice; DU: depleted uranium.

Figure 3: mRNA levels of secretases in the cerebral cortex.

Results are expressed as a ratio to HPRT mRNA level. The levels of control Tg2576 mice were arbitrarily set at 1. Data are expressed as means \pm SEM (n=8 for each group); DU: depleted uranium.

Figure 4: Gene expression of ChAT, VACHT and ABC A1

Results are expressed as a ratio to HPRT mRNA level. The levels of wild-type mice were arbitrarily set at 1. Data are expressed as means \pm SEM (n=8 for each group), with **p<0.01 and ***p<0.001, significantly different from wild-type mice.

FIGURE 1

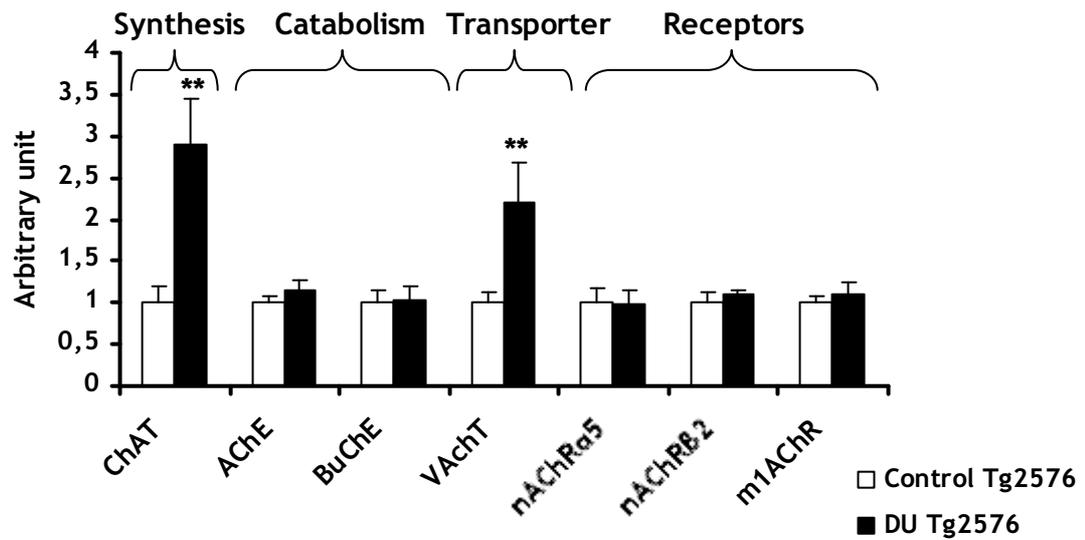


FIGURE 2

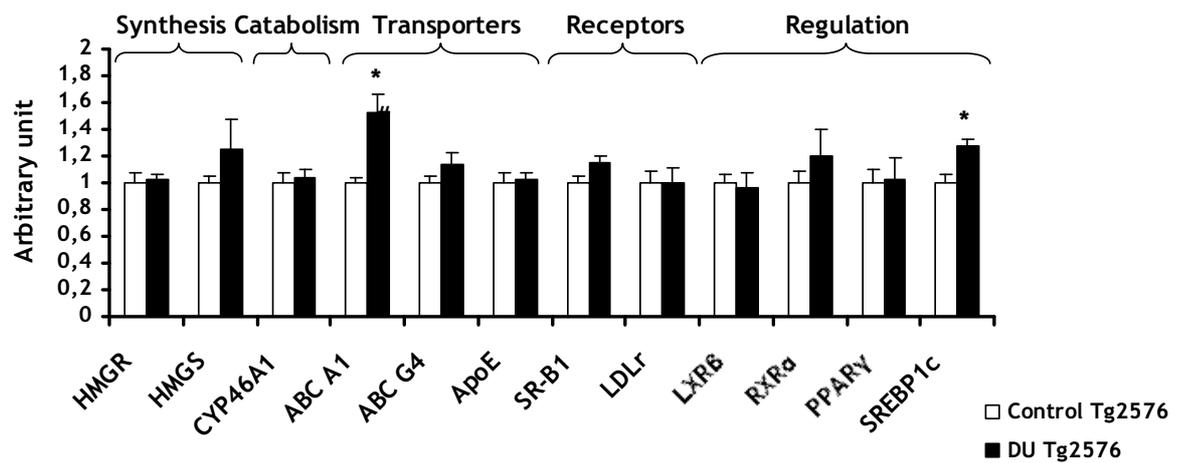


FIGURE 3

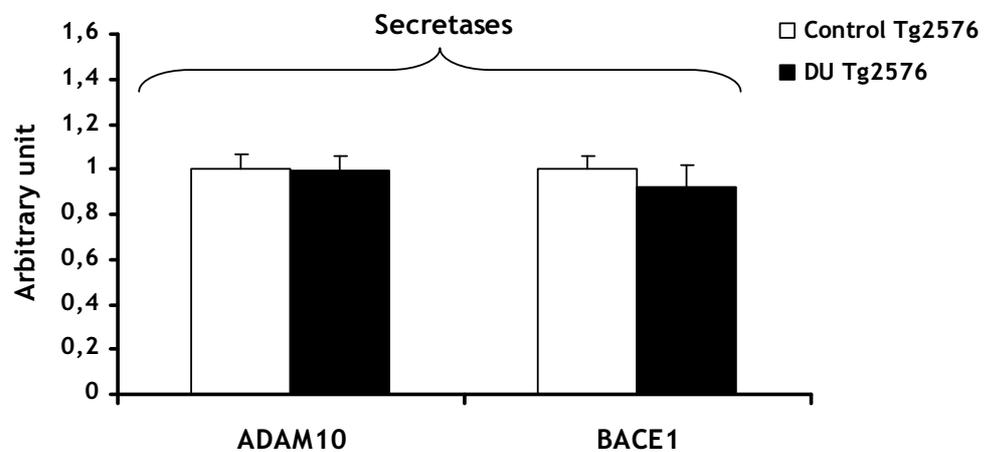


FIGURE 4

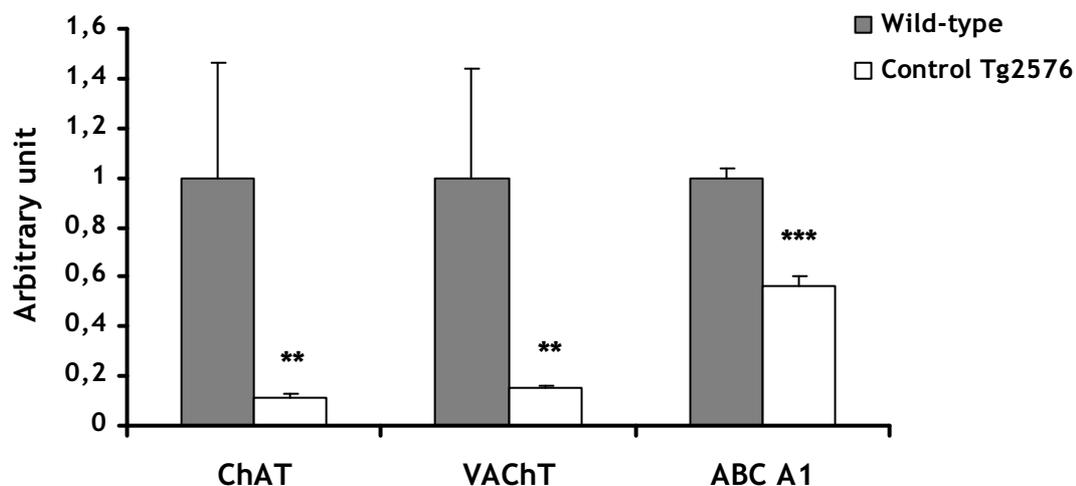


TABLE 1: Oligonucleotide sequences of primers used for real-time qPCR

Gene	Foward	Reverse	Length (bp)	Gene accession #
HPRT	AAACTTTGCTTTCCTGGTTA	AGGCTTTGTATTTGGCTTTTC	225	NM013556.2
HMGR	TCGCTGGATAGCTGATCCTTCT	TTCGTCCAGACCCAAGGAAAC	73	NM008255
HMGS	TACCTGCGGGCCTGGAT	GAGGGTGAAGGCTGGTTGTT	93	NM008256
CYP46A1	CTGCATCGGCCAACAGTTT	CAATGGCTTGAGCGTAGCC	130	NM010010
α -secretase	CGCCACAGCCCATTCAG	TGCATGTGTCCCATTTGAT	68	NM_007399
β -secretase	CATTGCTGCCATCACTCAAT	CAGTGCCTCAGTCTGGTTGA	208	NM_011792
LXR β	GATCGGATCCATGTCTTCTTCCCCACAAGTTC	GATCCTCGAGTAAGATGACCACGATGTAGG	159	NM009473
RXR α	CGCAAAGACCTGACCTACACC	TCTCCTGCACAGCTTCCC	134	NM011305
PPAR γ	TCATGACCAGGGAGTTCCTCA	TCATCTAATTCCAGTGCATTGAACTT	103	NM011146
SREBP 1c	CCAGAGGGTGAGCCTGACAA	CACTAAGGTGCTACAGAGCAAGAG	116	NM011480
ApoE	TGGCTACCAACCCATCATC	TTGAGGACAGGAGAAGGATACT	69	NM009696
ABC A1	ATCTCATAGTATGGAAGAATGTGAAGCT	CGTACAACATTTGTATAACCATCTCCAAA	132	NM_013454
ABC G4	GGCCACCACTCCAATCC	TCTATCCAGACCGAAGGCTTAGG	79	NM138955
SR-B1	GTTGGTCACCATGGGCCA	CGTAGCCCCACAGGATCTCA	61	NM016741
LDLr	TCTGCCAGGTTCTGTTTTAT	CAAGGAAATGAAGATGGGAGAAA	118	NM010700
ChAT	GAGCGAATCGTTGGTATGACAA	AGGACGATGCCATCAAAAGG	72	NM_009891
VACHT	GGGTGCGCTCGGTCAATC	CAAATAGCACGCTATCTTCACAT	146	NM_021712
nAChR α 5	CAACATCCACCACCGCTCTT	TTTGGGAAGCTTGTGGAGAAAT	81	NM_176844
nAChR β 2	TCGTCGAAACCGCTCTT	GATGGCCAGCGAGGTGAT	69	NM_009602
m1AChR	CCCCTGGGTCACCTTCT	TTCCCCGGGTTTCACTCTCT	100	NM_001112697
AChE	CCTGGATCCCTCGTGAA	CCTGTGCGGGCAAAATTG	65	NM_009599
BuChE	GTTTTCTGCAGTGAGTGACAGGTATT	CAGAATCTGGATGCTGAAGTAGATAA	89	NM_009738

RESUME

Certains radionucléides sont dispersés dans l'environnement du fait d'accidents, d'incidents ou de leur utilisation industrielle. L'Homme est donc susceptible d'être exposé à de faibles concentrations de radionucléides *via* des aliments contaminés. L'impact d'une ingestion chronique d'uranium appauvri (UA) ou de césium-137 (^{137}Cs) a été étudié sur le métabolisme hépatique et cérébral du cholestérol. En effet, le cholestérol est un composé essentiel en tant que constituant des membranes cellulaires et précurseur de nombreuses molécules physiologiques (acides biliaires, neurostéroïdes...). La perturbation de son métabolisme est associée à de nombreuses pathologies (athérosclérose, maladie d'Alzheimer...). Des rats ont ingéré quotidiennement une faible concentration d'UA ou de ^{137}Cs pendant 9 mois. Pour chaque radionucléide, le modèle de référence (contaminé depuis l'âge adulte) et un modèle plus sensible (hypercholestérolémique ou contaminé depuis la vie foetale) ont été étudiés. Les effets affectent en majorité l'expression génique ou l'activité enzymatique. L'UA affecte une enzyme de catabolisme dans les deux modèles, ainsi que des transporteurs membranaires et des facteurs de régulation. Le ^{137}Cs affecte principalement l'enzyme de stockage dans les deux modèles, ainsi que des apolipoprotéines, des enzymes de catabolisme et des facteurs de régulation. Aucun changement du bilan biochimique sanguin ni du taux de cholestérol tissulaire (foie/cerveau) n'est observé, quels que soient le modèle et le radionucléide. Ainsi, une contamination interne chronique par l'UA ou le ^{137}Cs induit des effets biologiques de niveau moléculaire sur le métabolisme du cholestérol, sans affecter son homéostasie ni l'état général de tous nos modèles expérimentaux.

Mots-clés : métabolisme du cholestérol, uranium appauvri, césium-137, contamination interne, contamination chronique, faible dose, foie, cerveau

ABSTRACT

Depleted uranium (DU) and cesium-137 (^{137}Cs) are radionuclides spread in the environment due to industrial activities, incidents or accidents. This pollution sets a risk of human exposure to low levels of radiations through contaminated foodstuff. The impact of a chronic ingestion of DU or ^{137}Cs on cholesterol metabolism in the liver and the brain has been studied. Indeed, cholesterol is crucial in physiology, being a component of cell membranes and a precursor to numerous molecules (bile acids...). Disruption of its metabolism is associated to many pathologies such as atherosclerosis or Alzheimer's disease. Rats daily ingested a low level of DU or ^{137}Cs over 9 months. For each radionuclide, a reference model (rats contaminated since adulthood) and a more sensitive model (hypercholesterolemic or contaminated since fetal life) were studied. The effects mainly consist of changes in gene expression or enzymatic activity of various actors of cholesterol metabolism. DU mainly affects one catabolism enzyme in both models, as well as membrane transporters and regulation factors. ^{137}Cs mainly affects the storage enzyme in both models as well as catabolism enzymes, apolipoproteins, and regulation factors. No change in the plasma profile or in the tissue concentration of cholesterol (hepatic/cerebral) is recorded, whatever the model and the radionuclide. Thus, a chronic internal contamination with DU or ^{137}Cs induces molecular modifications in cholesterol metabolism in the rat, without affecting its homeostasis or the general health status in all of our experimental models.

Keywords: cholesterol metabolism, depleted uranium, cesium-137, internal contamination, chronic contamination, low dose, liver, brain