

Université de Montréal

**Différentes approches dans le traitement de
la dépression post-infarctus du myocarde :
effet de la desvenlafaxine et des probiotiques**

par

Mandy MALICK

Département de pharmacologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine en vue de l'obtention du
grade de Ph. D. ès sciences en pharmacologie

Novembre 2014

© Mandy MALICK, 2014

Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Différentes approches dans le traitement de la dépression post-infarctus du myocarde : effet de la desvenlafaxine et des probiotiques.

Présentée par :

Mandy MALICK

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Hélène Girouard, Ph. D., président rapporteur

Guy Rousseau, Ph. D., directeur de recherche

Nicole Leclerc, Ph. D., membre du jury

Hélène Plamondon, Ph. D., examinateur externe

Réjean Couture, Ph. D., représentant du doyen de la F.E.S.

Résumé

Plusieurs études ont montré que les maladies cardiovasculaires constituent un risque majeur de développement du trouble dépressif chez l'homme. Plus précisément, à la suite d'un infarctus du myocarde, 15 à 30 % des patients développent une dépression majeure dans les 6 à 8 mois suivant l'évènement cardiaque. Dans un modèle d'infarctus du myocarde chez le rat, développé dans notre laboratoire, nous avons noté la présence de comportements compatibles avec une dépression, deux semaines après l'infarctus. Nous avons également détecté des cellules apoptotiques dans le système limbique dès les premières minutes de reperfusion, nombre qui atteint son apogée à 3 jours de reperfusion. Nous avons émis l'hypothèse que l'apoptose que l'on observe dans le système limbique serait reliée à la réponse inflammatoire induite par l'infarctus du myocarde. Les comportements reliés à de la dépression ont été prévenus par l'administration d'un inhibiteur de la synthèse des cytokines pro-inflammatoires, la pentoxifylline, le célécoxib, un inhibiteur de la cyclooxygénase-2, par des probiotiques ainsi que par différents antidépresseurs. Les résultats des deux premières études de cette thèse montrent que la desvenlafaxine, un Inhibiteur de la recapture de la sérotonine et noradrénaline (IRSN) prévient les comportements dépressifs tout en diminuant l'apoptose à 3 jours post-infarctus dans le système limbique. Les comportements similaires à ceux d'une dépression que présentent les rats deux semaines après l'évènement cardiaque sont encore présents à 4 mois post-infarctus, si aucun traitement n'est entrepris. De plus, ces animaux développent des troubles d'apprentissage que la desvenlafaxine peut prévenir, et ceci même si le traitement n'est présent que pendant les 2 premières semaines post-infarctus.

Dans la troisième étude de cette thèse, nous avons voulu savoir si le nerf vague était impliqué dans les effets bénéfiques de deux probiotiques sur l'apoptose dans le système limbique après un infarctus du myocarde. Nos résultats ont démontré que les probiotiques réduisent l'apoptose dans le système limbique après un infarctus du myocarde, mais que cet effet est perdu en présence d'une vagotomie.

Les résultats obtenus démontrent que l'infarctus du myocarde induit une mort par apoptose dans le système limbique de même que des comportements dépressifs et des problèmes d'apprentissage à long terme. Ces problèmes peuvent être diminués par un traitement à la desvenlafaxine, et ceci même si le traitement n'est présent que pour les deux premières semaines post-infarctus. Finalement, nous avons observé que les probiotiques avaient des effets bénéfiques sur l'apoptose dans le système limbique par un mécanisme impliquant le nerf vague.

En conclusion, plusieurs interventions différentes sont efficaces pour limiter les conséquences de l'infarctus du myocarde sur le système limbique et un traitement court est efficace pour prévenir les problèmes à plus long terme.

Mots-clés : Infarctus du myocarde, dépression, rat, desvenlafaxine, cytokines, troubles de l'apprentissage, probiotiques

Abstract

Several studies have highlighted that disruption of the cardiovascular functions is a major risk of developing depressive disorder in humans. 15-30% of the general population develops major depression within 6 to 8 months after a myocardial infarction. To better understand the underlying mechanisms and identify therapeutic pathways, we use a rat model of post-myocardial infarction developed in our laboratory.

We have observed in these animals an increased apoptosis in the limbic system, which starts in the first minutes following reperfusion and peaks 3 days post-reperfusion. As a result, a depression-like phenotype and learning impairments appear 2 weeks after the myocardial infarction, which will persist up to 4 months after the infarct. We hypothesize that the observed apoptosis and the resulting depressive-like behavior are mediated by the inflammatory response induced after myocardial infarction. Indeed, depression-like behavior is prevented by the administration of an inhibitor of the pro-inflammatory cytokines, (pentoxifylline, celecoxib), as well as by probiotics. In this thesis, we show that desvenlafaxine, a serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor (SNRI) prevents death by apoptosis in the limbic system. Desvenlafaxine also helps to improve the depressive-like behavior in these rats as well as the learning impairments, even if the treatment is administered during the first 2 weeks post-reperfusion. Finally, we have discovered that vagotomy prevents the probiotics effect over the apoptosis appearing after myocardial infarction, highlighting the importance of the vagus nerve in the beneficial effects of probiotics.

In conclusion, several interventions are effective in limiting the consequences of myocardial infarction on the limbic system and also key to prevent the apparition of secondary psychological disorders.

Keywords : Myocardial infarction, depression, rat, desvenlafaxine, cytokines, learning disorders, probiotics

Table des matières

RESUME.....	III
ABSTRACT.....	V
TABLE DES MATIERES	VII
LISTE DES ABREVIATIONS	XIII
LISTES DE FIGURES.....	XVI
LISTE DES TABLEAUX.....	XX
REMERCIEMENTS.....	XXII
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I. L'INFARCTUS DU MYOCARDE	3
I. INTRODUCTION.....	3
1. <i>Statistiques</i>	3
2. <i>Physiopathologie</i>	3
II. ISCHEMIE.....	6
1. <i>Les conséquences de l'ischémie myocardique [16, 17]</i>	6
A. Changements réversibles.....	6
B. Changements irréversibles	7
2. <i>Intervention d'un infarctus du myocarde</i>	9
III. LA REPERFUSION	11
1. <i>Lésion de reperfusion</i>	11
2. <i>Potentiels médiateurs impliqués dans les lésions de reperfusion</i>	12
A. Paradoxe du calcium.....	12
B. Paradoxe de l'oxygène.....	13
C. L'inflammation.....	14
D. L'Apoptose	16
a. Les mécanismes de l'apoptose	18
I. La voie intrinsèque	18
II. La voie extrinsèque	19
b. Infarctus du myocarde et apoptose.....	20
IV. STRATEGIES DE PREVENTION DES LESIONS DE REPERFUSION [117]	23
1. <i>La voie RISK « Reperfusion Injury Salvage Kinase » [118]</i>	23

2.	<i>La voie SAFE « Survivor Activating Factor Enhancement » [124]</i>	25
V.	CONCLUSION DU CHAPITRE I.....	26
CHAPITRE II. DEPRESSION POST-INFARCTUS DU MYOCARDE.....		27
I.	LA DEPRESSION MAJEURE.....	27
1.	<i>Introduction</i>	27
2.	<i>Neurobiologie de la dépression</i>	28
II.	LIEN BIDIRECTIONNEL ENTRE LA DEPRESSION ET LES MALADIES CARDIOVASCULAIRES	34
1.	<i>La dépression : Un facteur de risques pour le développement de maladies cardiovasculaires</i>	34
2.	<i>Prévalence de la dépression chez les patients souffrant de maladies cardiovasculaires</i>	35
III.	HYPOTHESES NEUROBIOLOGIQUES DE LA DEPRESSION [163]	37
1.	<i>Hypothèse monoaminergique de la dépression</i>	37
2.	<i>Hypothèse neurotrophique de la dépression [172]</i>	38
3.	<i>Hypothèse du dysfonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien (HHS) [193-195]</i>	41
4.	<i>Hypothèse inflammatoire [131] [207]</i>	43
IV.	INFARCTUS DU MYOCARDE, CYTOKINES ET DEPRESSION	45
1.	<i>Généralité sur les cytokines</i>	45
2.	<i>Classification des cytokines [225]</i>	45
3.	<i>Sources de cytokines</i>	46
4.	<i>Effets neurobiologiques des cytokines pro-inflammatoires [233, 234]</i>	47
A.	<i>Dérégulation de l'axe HHS [246, 247]</i>	49
B.	<i>Altération du système monoaminergique</i>	49
C.	<i>Initiation de l'apoptose</i>	51
D.	<i>Altération de la neurogenèse</i>	52
5.	<i>Effets neurobiologiques des cytokines anti-inflammatoires</i>	53
V.	COMMUNICATION SYSTEME IMMUNITAIRE / SYSTEME NERVEUX CENTRAL.....	55
1.	<i>Passage via les organes circumventriculaires</i>	55
2.	<i>Passage via des transporteurs d'influx saturable</i>	56
3.	<i>Transduction du signal via les cellules endothéliales</i>	56
4.	<i>Passage via le nerf vague</i>	57
VI.	COMMUNICATION INTESTIN-CERVEAU	60
VII.	TRAITEMENT DE LA DEPRESSION POST-INFARCTUS DU MYOCARDE	63
1.	<i>Les probiotiques</i>	63
2.	<i>Les antidépresseurs</i>	65
VIII.	CONCLUSION DU CHAPITRE 2.....	68

CHAPITRE III. DEMARCHES EXPERIMENTALES	70
CHAPITRE IV. PARTICIPATION ET CONTRIBUTION DES AUTEURS	72
CHAPITRE V. PREMIER ARTICLE SCIENTIFIQUE MENANT A LA REDACTION DE CETTE THESE	73
I. PREFACE	73
II. OBJECTIF	73
III. HYPOTHESES	73
IV. DESVENLAFAXINE REDUCES APOPTOSIS IN AMYGDALA AFTER MYOCARDIAL INFARCTION	74
1. <i>Abstract</i>	75
2. <i>Introduction</i>	76
3. <i>Materials and Methods</i>	77
A. Experimental series and groups.....	77
B. MI surgical procedures	77
C. Experimental series.....	78
D. Infarct size and area at risk (AR) measurement.	78
E. Biochemical analysis	79
a. Caspase-3 and -8 activities	79
b. Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL)	79
F. Statistical analysis	80
4. <i>Results</i>	81
A. Infarct size.....	81
B. Caspase-3.....	81
C. Caspase-8.....	81
D. TUNEL analysis	82
E. Correlation between apoptosis and myocardial infarct size.....	82
5. <i>Discussion</i>	82
6. <i>Conclusions</i>	85
7. <i>Acknowledgments</i>	85
8. <i>Figure legends</i>	85
9. <i>References</i>	93
CHAPITRE VI. SECOND ARTICLE SCIENTIFIQUE MENANT A LA REDACTION DE CETTE THESE	100
I. PREFACE	100
II. OBJECTIFS	100
III. HYPOTHESES	100
IV. DESVENLAFAXINE REVERSES THE LONG-TERM BEHAVIORAL AND MEMORY DEFICITS AFTER MYOCARDIAL INFARCTION.....	102

1.	<i>Abstract</i>	104
2.	<i>Introduction</i>	105
3.	<i>Methods and Materials</i>	106
A.	Experimental groups.....	106
B.	Surgical procedure.....	107
C.	Scar section, area at risk measurement and brain dissection.....	107
D.	Behavioral tests.....	108
a.	Social interaction test.....	108
b.	Passive avoidance step-down test.....	108
c.	Forced swim test.....	108
d.	Morris water maze (MWM).....	109
E.	Biochemical assays : Caspase-3 and caspase-6 activity.....	109
F.	Statistical Analysis.....	109
4.	<i>Results</i>	110
A.	Ischemic damage.....	110
B.	Social interaction test, two weeks post-MI (Figure 2).....	110
C.	Passive avoidance step-down test, two weeks post-MI (Figure 3).....	110
D.	Forced swim Test, four months post-MI (Figure 4).....	110
E.	Morris Water-Maze (MWM), four months post-MI (Figure 5).....	111
F.	Caspase-3 and-6 activities.....	111
5.	<i>Discussion</i>	111
6.	<i>Limitations</i>	115
7.	<i>Conclusion</i>	115
8.	<i>Acknowledgments</i>	115
9.	<i>Financial disclosures</i>	115
10.	<i>Figure Legends</i>	116
11.	<i>References</i>	124

CHAPITRE VII. TROISIEME ARTICLE SCIENTIFIQUE MENANT A LA REDACTION DE CETTE THESE 129

I.	PREFACE.....	129
II.	OBJECTIF.....	129
III.	HYPOTHESES.....	129
IV.	VAGOTOMY PREVENTS THE BENEFICIAL EFFECT OF PROBIOTICS IN A MODEL OF POST-MYOCARDIAL INFARCTION DEPRESSION. 130	
1.	<i>Abstract</i>	132
2.	<i>Introduction</i>	133
3.	<i>Materials and Methods</i>	134

A.	Experimental groups.....	134
B.	Probiotics treatment.....	134
C.	Surgical and vagotomy procedure	135
D.	Infarct size and area at risk measurement.....	135
E.	Biochemical Analysis.....	136
a.	Caspase-3 and -8 activity	136
b.	Myeloperoxydase activity.....	136
F.	Statistical analysis	136
4.	<i>Results</i>	137
A.	Infarct size and area at risk	137
B.	Apoptosis analyses.....	137
a.	Caspase-3 and -8 activities in amygdala	137
b.	Caspase-3 and-8 in small intestine	138
c.	Myeloperoxidase activity.....	139
5.	<i>Discussion</i>	140
6.	<i>Acknowledgments</i>	143
7.	<i>Figure Legends</i>	144
8.	<i>References</i>	152
	DISCUSSION GENERALE	158
I.	LA PHYSIOPATHOLOGIE DE LA DEPRESSION POST-INFARCTUS DU MYOCARDE EST-ELLE LA MEME QU'UNE AUTRE DEPRESSION ? 158	
1.	<i>Cytokines et apoptose dans la dépression post-infarctus du myocarde</i>	158
2.	<i>Développement de la dépression post-infarctus et complication</i>	163
II.	ROLE DU NERF VAGUE DANS LA DEPRESSION POST-INFARCTUS.....	168
1.	<i>Nerf vague et apoptose dans le système limbique</i>	168
2.	<i>Le nerf vague est nécessaire à l'effet antidépresseur des probiotiques</i>	170
3.	<i>Rôle du nerf vague dans la triade intestin, infarctus du myocarde et système nerveux central</i>	171
III.	QUEL TRAITEMENT POUR SOIGNER LA DEPRESSION POST-INFARCTUS DU MYOCARDE DOIT-ON PRIVILEGIER ?	173
1.	<i>Doit-on plutôt prescrire un inhibiteur de la sérotonine et de la noradrénaline ou rester avec les antidépresseurs spécifiques de la sérotonine ?</i>	173
2.	<i>Effet antidépresseur des probiotiques</i>	176
	CONCLUSION GENERALE.....	179
	SIGNIFICATIONS SCIENTIFIQUES DES RESULTATS DE CETTE THESE.....	181
	LIMITES ET PERSPECTIVES.....	184

I.	LIMITES.....	184
II.	PERSPECTIVES	186
	REFERENCES	188

Liste des abréviations

5-HIAA : 5-hydroxyindole acetic acid

5-HT : Sérotonine

5-HTP : 5-hydroxytryptophanes

ACTH : Adrenocorticotropin hormone

ACV : Accident vasculaire cérébral

ADN : Acide désoxyribonucléique

AIF : Apoptosis inducing factor

AL : Amygdale latérale

AM : Amygdale médiane

AP 1 : Activating protein

APAF-1 : Apoptosis proteases activating factor-1

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATP : Adénosine triphosphate

ATPase : Adénosine triphosphate synthase

Bax : Bcl-2-associated X protein

Bcl-2 : B-cell lymphoma-2

BDNF : Brain derived neurotrophic factor

BHE : Barrière hématoencéphalique

Ca²⁺ : Calcium

CA1 : Corne d'Ammon 1

CA3 : Corne d'Ammon 3

ChAT : Choline acétyltransférase

CTRL : Control

CREB : cAMP-response element binding protein

CRF : Corticotropin-releasing factor

CRH : Corticotrophin releasing hormone

CRP : Protéine C réactive

CSF : Fluide cérébrospinal

DA : Dopamine

DD : Death domain

DED : Death effector domain

DISC : Death inducing signaling complex

IDO : Indoléamine 2,3 dioxygénase

EEG : Électroencéphalogramme

IFN : Interféron

ECG : Électrocardiogramme

IL : Interleukine

ELISA : Enzyme linked
immunoabsorbant assay

IL-1ra : IL-1-receptor antagonist

ERK : extracellular signal-regulated
kinase

IRSN : inhibiteur de la noradrénaline et
de la sérotonine

ERO : Espèce réactive à l'oxygène

ISRS : Inhibiteur sélectif de la recapture
de la sérotonine

FADD : Fas associated death domain

JAK/STAT : Janus Kinases / Signal
transducer activator of transcription

GD : Gyrus Dentelé

K⁺ : Ion potassium

GM-CSF : Granulocyte macrophage
colony-stimulating factor

kDa : Kilo Dalton

H⁺ : Ion hydroxyde

Kg : Kilogramme

HHS : hypothalamo-hypophysaire
surrénalien

KO : knock-out

Hp : Hippocampe

LPS : lipopolysaccharide

i.p : intrapéritonéal

MAO : Monoamine oxydase

i.v : intraveineux

MAPK : Mitogen activated protein
kinase

IAP : Inhibitors of apoptosis proteins

MDD : Major depressive disorder

ICAMs : Intercellular adhesion molecule
soluble

MI : Myocardial infarction

mPTP : Perméabilité du pore de transition mitochondrial

NA : Noradrénaline

Na⁺ : Ion sodium

Na²⁺ : sodium

NFS : Noyau du faisceau solitaire

NF-κB : Nuclear facteur Kappa B

NGF : Nerve growth factor

NMDA : N methyl D aspartate

NO : Oxyde nitrique

NPV : Noyau paraventriculaire

NTS : Noyau du tractus solitaire

O₂⁻ : Anion superoxyde

OH⁻ : Ion hydroxyde

PDGF : Platelet derived growth factor

PF : Platelet factor

PGE₂ : Prostaglandine E₂

PI3K/Akt : Voie phosphatidyl-inositol3 kinase / sérine-thréonine kinase

PKA : Protéine kinase A

PKC : Protéine kinase C

PKG : Protéine kinase G

PLC : Phospholipase

PTPm : Pore de transition de perméabilité mitochondrial

RE : Réticulum endoplasmique

SERT : Serotonin transporteur

TCA : Antidépresseurs tricycliques

TGF-β : Transforming Growth Factor-β

TNF : Tumor Necrosis Factor

TRAF : TNF receptor associated factor

TrkB : Tyrosine kinase B

TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand

Trp : Tryptophane

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nickend labelling

VEGF : Vascular endothelial growth factor

Listes de figures

Thèse : Chapitre Infarctus du myocarde

Figure 1 : Illustration des deux types d'infarctus du myocarde. a/ À gauche, un infarctus transmural recouvrant la totalité de l'épaisseur du myocarde et à droite, un infarctus non transmural. b/ Les deux sous-types d'infarctus non transmuraux : À gauche sous-épiqueur, à droite sous-endocardique (http://www.ednes.com/ecg_ex/anaim1.htm).

Figure 2 : Mécanismes se produisant lors d'une ischémie menant à des lésions réversibles ou irréversibles.

Figure 3 : Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose impliquant les caspases (d'après Clarke et coll 2009).

Figure 4 : Voies de signalisation impliquées dans la liaison de TNF- α sur son récepteur TNFR1 (d'après Micheau et coll 2003).

Figure 5 : Voie de cardioprotection Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK).

Thèse : Chapitre Dépression post-infarctus du myocarde

Figure 6 : Schéma de la structure de l'hippocampe. Communication trisynaptique.

Figure 7 : Schéma des deux voies impliquées dans la réponse émotionnelle par l'amygdale.

Figure 8 : Voies de signalisation impliquées dans la liaison de BDNF sur son récepteur TrkB (d'après Dunam et coll 2012).

Figure 9 : Mécanisme d'action de la latence des antidépresseurs.

Figure 10 : L'axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien (HHS) dans la dépression (d'après Belmaker et Agam, 2008).

Figure 11 : Schéma intégratif des interactions entre le système immunitaire et le système nerveux central (d'après Raison et coll, 2006).

Discussion générale

Figure 12 : Implication de l'amygdale dans les symptômes de la dépression.

Figure 13 : La voie cholinergique anti-inflammatoire (d'après Tracey, 2002).

Figure 14 : Schéma récapitulatif des résultats de la thèse.

Article 1

Figure 1 : Myocardial infarct size in vehicle- and desvenlafaxine (DV)-treated groups expressed as percentage of the area at risk (I/AR).

Figure 2 : Caspase-3 activity in the hippocampus and amygdala, assessed by *in vitro* spectrofluorescence after 72 h of reperfusion and expressed as percentages of sham+vehicle values.

Figure 3 : Caspase-8 activity in the amygdala, assessed by *in vitro* spectrofluorescence after 72 h of reperfusion and expressed as percentage of sham+vehicle values.

Figure 4 : Positive correlation between myocardial infarct size (I/AR * 100) and caspase-3 activity in the lateral amygdala

Article 2

Figure 1 : Experimental protocol.

Figure 2 : Social interaction test.

Figure 3 : Passive avoidance step down test.

Figure 4 : Forced swim test.

Figure 5 : Morris Water Maze. A) Time and B) number of quadrant rat cross to find the platform during 6 days.

Figure 6 : Caspase-3 activity in CA3, medial and lateral amygdala assessed by *in vitro* spectrofluorescence after 4 months of reperfusion and expressed as percentages of sham+vehicle values.

Figure 7 : Caspase-6 activities in CA1 assessed by *in vitro* spectrofluorescence after 4 months of reperfusion and expressed as percentages of sham+vehicle values.

Figure 8 : Linear regression between the time spent to find the platform at day 6 and the caspase-6 activity found in the CA1 region.

Article 3

Figure 1 : Experimental protocol.

Figure 2 : Infarct size expressed as a percentage of area at risk (I/AR).

Figure 3 : Caspase-3 activity in lateral amygdala expressed as percent of the Sham-Veh group.

Figure 4 : Caspase-8 activity in lateral amygdala expressed as percent of the Sham-Veh group.

Figure 5 : Caspase-3 activity in medial amygdala expressed as percent of the Sham-Veh group.

Figure 6 : Caspase-8 activity in medial amygdala expressed as percent of the Sham-Veh group.

Figure 7 : Left : Caspase-3 activity in small intestine expressed as percent of the Sham-Veh group. Right: Caspase-8 activity in small intestine expressed as percent of the Sham-Veh group.

Figure 8 : Estimation of the accumulation of neutrophils in the small intestine as estimated by the activity of the myeloperoxidase.

Liste des tableaux

Article 1

Tableau 1 : TUNEL-positive cells in different regions.

« (...) *science sans conscience n'est que ruine de l'âme* (...) »

François Rabelais (Pantagruel – 1542).

Remerciements

Je voudrais tout d'abord exprimer ma plus grande reconnaissance à mon directeur de thèse, Dr Guy Rousseau, Professeur titulaire au département de pharmacologie de la faculté de médecine de l'Université de Montréal pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, m'avoir soutenue et m'avoir donné sa confiance tout au long de ce travail. Ses connaissances dans le domaine scientifique, son aide, ses conseils, sa disponibilité, son encadrement, sa patience font de lui un superviseur remarquable. Par ailleurs, grâce à sa confiance j'ai développé mon indépendance ce qui m'a permis d'apprendre à m'organiser et d'acquérir beaucoup d'expériences. Merci du fond du cœur Guy !

J'aimerais également remercier les membres du jury pour le temps et l'attention qu'ils ont accordés à évaluer cette thèse.

Je suis également très reconnaissante envers les différents étudiants du laboratoire avec qui j'ai passé ces 4 années : Kim Gilbert pour m'avoir formée à mon arrivée, enseigné les chirurgies animales, les tests comportementaux ainsi que la biochimie. Ses connaissances pratiques dans le laboratoire, ses conseils m'ont beaucoup aidé dans mes débuts. Merci Kim. Merci beaucoup à Thuy Tran Quan pour sa bonne humeur, son esprit critique, sa disponibilité et son enthousiasme à m'aider lorsque j'ai eu besoin de lui. Merci aussi à Audrey-Anne Gosselin, disponible lorsque j'ai eu besoin d'un coup de main, pour avoir participé aux différentes préparations orales avant les séminaires. Je tiens aussi à remercier très chaleureusement tous les stagiaires du laboratoire qui m'ont apporté leur aide dans mes différents protocoles. Ce fut un réel plaisir pour moi de leur enseigner les techniques de laboratoires et la rédaction, et de leur apporter mes connaissances. Merci à Mathieu Barry, Mikael Phenix, Valérie Bourque-Riel et Jessica Daniel.

J'adresse également mes vifs remerciements aux étudiants du centre de recherche et plus particulièrement aux étudiants du laboratoire de Dr Roger Godbout : Madjou dont j'ai croisé le chemin, mais malgré la distance qui nous a rapidement séparés, a su répondre à mes

questions, m'a donné beaucoup de conseils pour la suite de mon parcours. Merci beaucoup Madjou. Merci aussi à Karl qui m'a moralement soutenu durant une bonne et longue session et qui a su me faire confiance pour suivre son projet et le terminer. Merci aussi à Marlène et Adeline du laboratoire de Dre Valérie Mongrain pour leur soutien et leur confiance, j'ai beaucoup aimé partager les joies et peines de la recherche ainsi que la nostalgie de notre petite France. Merci de m'avoir écoutée.

Merci à Caroline Bouchard du service technique de l'animalerie du Centre de biomédecine de l'hôpital Sacré-Cœur pour tous les conseils et le suivi concernant les chirurgies sur les animaux. Un grand merci à Louis Chicchio pour les soins sur les animaux. Après tous les tests comportementaux que j'ai faits sur les animaux, j'ai pu m'apercevoir que les rongeurs ont besoin de toi pour se sentir bien.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à tout le personnel du centre de recherche pour leur accueil, et leur collaboration tout au long de ma thèse.

Je n'oublie certainement pas les autres personnes, physiquement moins présente sur mon lieu de travail. J'adresse mes plus grandes reconnaissances à ma famille en France sans qui rien de tout cela n'aurait pu se réaliser. Merci infiniment à mes parents pour leur soutien et leurs encouragements indéfectibles tout au long de mes études. Merci encore plus pour tout le temps qu'ils m'ont consacré à venir me rendre visite. Ils ont su me changer les idées par de petits voyages, ils m'ont aidé avec mes enfants, merci pour tout.

Enfin, j'aimerais remercier vivement mon conjoint, Bertrand Gallot, pour son amour, sa présence, sa motivation, son aide. Il a toujours cru en moi et m'a toujours poussé à aller plus loin, surtout de ne jamais arrêter ni baisser les bras. Merci pour ton aide pour mes présentations, mes affiches, ton écoute lors de mes répétitions, tes corrections grammaticales. J'aimerais aussi remercier mes enfants, Malo et Lola. Ils savent si bien occuper mes journées, me changer les idées à les voir si émerveillés et m'apportent tout l'amour et la tendresse dont j'ai besoin particulièrement dans les moments plus difficiles. Je vous aime mes petits cœurs !

Finalement, je remercie tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de cette présente thèse et que j'ai omis de remercier.

Introduction

Il est clairement établi aujourd'hui qu'il existe un lien bidirectionnel entre le système cardiovasculaire et la dépression. En effet, plusieurs études ont montré que la dépression prédispose au développement de maladies cardiovasculaires, et inversement, que les maladies cardiovasculaires constituent un facteur de risques dans le développement de troubles dépressifs. Plus précisément, à la suite d'un infarctus du myocarde, 15 à 30 % des patients développent une dépression majeure dans les 6 à 8 mois suivant l'évènement cardiaque, ce qui augmente significativement le risque de mortalité [1, 2]. Plusieurs études suggèrent que la dépression est associée à une augmentation des cytokines pro-inflammatoires [3-5]. D'autres études ont démontré que cette augmentation précède l'établissement de la dépression [6-8] suggérant que l'inflammation pourrait être la cause de la dérégulation du système nerveux central aboutissant aux symptômes de la dépression.

Dans notre modèle d'infarctus du myocarde chez le rat, les comportements de dépression ainsi que l'apoptose dans certaines régions du système limbique chez les rats ayant subi un infarctus du myocarde sont associés à l'augmentation plasmatique de cytokines pro-inflammatoires suggérant un lien entre cytokine, apoptose et dépression.

Ensuite, il existe un lien bidirectionnel entre les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et les troubles de dépression. Dans notre modèle d'infarctus du myocarde chez le rat, nous avons observé qu'en plus d'induire une perturbation de la barrière hématoencéphalique, de l'apoptose dans le système limbique et des comportements de dépression chez le rat, l'infarctus du myocarde provoque aussi une augmentation de la perméabilité intestinale [9, 10] que nous supposons être la conséquence de l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires.

Les études antérieures faites dans notre laboratoire ont permis d'étudier toute la sphère biochimique et comportementale à court terme de la dépression après un infarctus du

myocarde. Il découle alors que les cytokines pro-inflammatoires se trouvent au carrefour de la problématique physiopathologique de la dépression post-infarctus du myocarde.

Dans cette perspective, cette thèse cherche à déterminer l'effet de la desvenlafaxine (un antidépresseur de la classe des inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline) sur la dépression à court et long terme après un infarctus du myocarde chez le rat et l'implication du nerf vague dans l'effet thérapeutique antidépresseur des probiotiques. Pour cela, 3 études successives ont permis de réaliser ces recherches.

Étude 1 : Le but de la première étude est d'étudier si la desvenlafaxine permet de diminuer l'apoptose dans le système limbique et si cette molécule est sécuritaire sur le plan cardiovasculaire après un infarctus du myocarde chez le rat.

Étude 2 : Le but de la seconde étude est d'étudier 1/ L'effet de la desvenlafaxine sur la dépression et les troubles de l'apprentissage à long terme après un infarctus du myocarde chez le rat, 2/ L'effet de la desvenlafaxine sur la dépression à court et long terme.

Étude 3 : Le but de la troisième étude est d'étudier l'implication du nerf vague dans l'effet thérapeutique des probiotiques.

Chapitre I. L'infarctus du myocarde

I. Introduction

1. *Statistiques*

Selon l'Organisation mondiale de la santé, les maladies cardiovasculaires sont devenues au cours du 20^e siècle la première cause de décès à l'échelle mondiale [11]. La Fondation des maladies du cœur et de l'AVC du Canada définit les maladies cardiovasculaires comme étant les maladies et les blessures infligées au système cardiovasculaire : le cœur, les vaisseaux sanguins du cœur et le système circulatoire (veines et artères) dans l'ensemble du corps et à l'intérieur du cerveau [12]. Plus spécialement, chaque année plus de 29 millions de personnes subissent un infarctus du myocarde (IM) et plus de 17 millions en décèdent [13].

Au Canada, l'incidence d'infarctus du myocarde reste encore élevée avec 3,8 % d'hospitalisations et 6,8 % de décès [14]. Aux mortalités, il faut ajouter une morbidité importante et le retentissement socio-économique qu'elle représente [15].

2. *Physiopathologie*

En clinique, l'infarctus du myocarde est une nécrose ischémique du muscle cardiaque généralement produite par l'obstruction d'une artère coronaire par un thrombus, menant à une insuffisance sévère de l'approvisionnement sanguin dans la partie du myocarde irriguée par l'artère obstruée. Le thrombus survient le plus souvent de la rupture de plaques d'athéroscléroses à la suite d'une érosion, d'une ulcération, ou d'une fissuration. La rupture de la plaque d'athérome va rompre la barrière endothéliale et exposer les constituants sous-endothéliaux (collagène, fibronectine...) aux plaquettes circulantes. Cela va mettre en jeu des mécanismes d'adhésion puis d'agrégation plaquettaire pour aboutir à la formation du thrombus plaquettaire intrac coronaire occlusif ne laissant plus passer le sang dans une certaine

région du cœur [16]. Ce phénomène est couramment désigné sous le nom de « syndrome coronarien aigu ». L'approvisionnement en oxygène et nutriments des cellules environnantes du muscle cardiaque diminue, ce qui provoque la nécrose de ces dernières.

Les autres mécanismes à l'origine d'un infarctus du myocarde sont plus rares et comprennent des spasmes sur les coronaires saines ou légèrement lésées (infarctus juvéniles secondaires au stress, efforts violents), des embolies coronariennes (migration d'un caillot de sang formé ailleurs), ou de dissection de coronaire.

Suivant l'extension anatomique, on distinguait 2 types d'infarctus du myocarde (figure 1). Tout d'abord, les infarctus transmuraux, tapissant la totalité de l'épaisseur du myocarde, entraînent une modification caractéristique sur l'électrocardiogramme (ECG) appelée « élévation du segment ST ». Ce type de crise cardiaque est appelé « infarctus du myocarde avec élévation du segment ST (STEMI) ». Puis les infarctus non transmuraux, où l'artère coronaire est partiellement obstruée par un caillot, et durant lesquels la circulation sanguine diminue sans s'interrompre. Seule une partie du muscle cardiaque est endommagée, et l'ECG n'affiche aucune élévation du segment ST. Il s'agit là d'un infarctus du myocarde sans élévation du segment ST, ou crise cardiaque sans STEMI. Ce type d'infarctus peut se produire en région « sous-épicardique » (portion externe du myocarde) et en région « sous-endocardiques » (partie interne du muscle cardiaque).

Au cours de ce chapitre, nous verrons les conséquences sur le myocarde d'une privation sanguine.

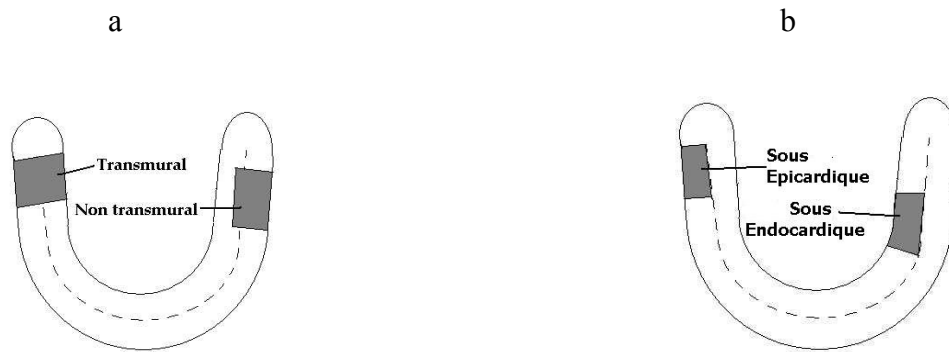


Figure 1 : Illustration des deux types d'infarctus du myocarde. a/ À gauche un infarctus transmural recouvrant la totalité de l'épaisseur du myocarde et à droite un infarctus non transmural. b/ Les deux sous types d'infarctus non transmuraux : à gauche sous-épicaudique et à droite sous-endocardique. (http://www.ednes.com/ecg_ex/anaim1.htm).

II. Ischémie

D'un point de vue dynamique, l'ischémie myocardique représente un déséquilibre entre les apports et la demande d'oxygène du myocarde. Comme nous venons de l'introduire, dans le cas de l'infarctus du myocarde, l'ischémie se traduit par une diminution de l'apport en oxygène et nutriments dans la zone irriguée par l'artère coronaire obstruée et provoque ainsi des conséquences sur le myocarde.

1. Les conséquences de l'ischémie myocardique [16, 17]

Les conséquences qui résultent de l'ischémie sont variables et sont dépendantes de la sévérité de celle-ci, du degré de l'occlusion, de sa localisation (territoire nourri par l'occlusion appelé zone à risque), de la présence ou non de vaisseaux collatéraux et du temps de l'ischémie [18, 19]. En fonction de ces variables, le maintien de conditions d'ischémie sur le myocarde entraîne rapidement des altérations biochimiques, fonctionnelles et structurales. L'évolution des altérations causées aux cellules cardiaques est généralement divisée en deux phases qui peuvent être plus ou moins rapides : une phase précoce, correspondant à des lésions réversibles, lorsque le myocarde est en reperfusion dans les 20 minutes qui suivent l'ischémie [20] et une phase tardive, lorsque l'ischémie dépasse 20 minutes où les lésions deviennent irréversibles (figure 2).

A. Changements réversibles

Dans les conditions physiologiques normales, le muscle cardiaque a un besoin énergétique de base important qui lui permet d'assurer sa fonction contractile et de subvenir aux besoins de ses systèmes cellulaires énergie-dépendants. Pour cela, le cœur soutire de 60 à 80 % de son énergie par l'oxydation des acides gras libres qui forment le substrat principal du cœur. Les 20 à 40 % restants sont acquis par la glycolyse à partir du glucose [21] .

À la suite d'une ischémie, il y a une diminution d'apport en oxygène et nutriment. La phosphorylation oxydative mitochondriale ralentit voire s'arrête à cet endroit, le métabolisme énergétique passe donc de la glycolyse aérobie vers la glycolyse anaérobie. Ceci provoque un déclin de la production d'ATP de 35 % par rapport au métabolisme aérobie [22] et résulte du dysfonctionnement de plusieurs pompes ioniques servant à l'homéostasie du calcium [23]. Tout d'abord, la pompe sodium-potassium Na^+/K^+ ATPase ralentit, et provoque une augmentation des concentrations cytoplasmiques de sodium et une diminution des concentrations de potassium [24]. De plus, le lactate et les ions H^+ (catabolisme de l'ATP) s'accumulent entraînant une acidose intracellulaire [16]. Cette acidose active l'échangeur Na^+/H^+ provoquant une entrée de Na^+ . L'augmentation de Na^+ dans les cellules est à l'origine d'un déséquilibre osmotique et à l'apparition d'un œdème intracellulaire [25]. Finalement, ces conditions favorisent l'entrée d'ions calcium (Ca^{2+}) par l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en plus du blocage de la pompe du réticulum endoplasmique $\text{Ca}^{2+}/\text{ATPase}$ conduisant progressivement à l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire ce qui diminue le potentiel membranaire [23]. Cette diminution du potentiel membranaire se traduit le plus souvent sur l'électrocardiogramme (ECG) par l'apparition d'un sus-décalage du segment ST.

Les changements cellulaires montrent des cardiomyocytes œdémateux avec de faibles concentrations intracellulaires de glycogène. Les myofibrilles sont relâchées, le noyau montre une faible condensation de la chromatine et la membrane du réticulum sarcoplasmique est intacte [26].

Ces lésions sont appelées réversibles, car aucune séquelle permanente n'est induite si l'ischémie est levée et que la circulation sanguine est rétablie à ce moment au niveau des tissus [27].

B. Changements irréversibles

Après 20 à 25 minutes d'ischémie, le processus de nécrose myocardique irréversible débute [21]. La glycolyse anaérobie est complètement arrêtée. Ce processus est associé à l'arrêt de la

production d'ATP. À ce moment, le niveau d'ATP a diminué de 40 à 50 % [17]. L'ischémie entraîne aussi la conversion de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase, produisant des espèces réactives à l'oxygène (ERO) par oxydation de l'hypoxanthine lors de la reperfusion dans les cellules endothéliales, les cardiomyocytes et les leucocytes activés [16] (voir paradoxe de l'oxygène). Les ERO engendrent la peroxydation des lipides membranaires ainsi qu'une altération du cytosquelette qui mène à une augmentation de la perméabilité membranaire provoquant le gonflement des cellules et la mort par apoptose.

La mort par nécrose des cardiomyocytes suit une trajectoire appelée «wavefront phenomemen of ischemic cell death » (vague de front) développée par Reimer et Jennings [28]. Cela signifie que la nécrose débute dans la région sous-endocardique et s'étend vers le territoire sous-épicaire entre la troisième et sixième heure d'ischémie chez l'Homme jusqu'à l'obtention d'un infarctus transmural après la sixième heure, d'où le dogme des « 6 golden hours » [28, 29].

La taille de l'infarctus est modulée à partir de différents évènements :

Tout d'abord comme nous venons de le voir : la durée de l'occlusion coronaire. Plus la durée de l'ischémie est grande, plus il y aura de cellules en nécrose et plus la taille de l'infarctus sera grande [16, 18]. Puis le niveau auquel l'occlusion se produit définit la taille de la zone à risque [30]. Il y a une relation linéaire entre le site d'occlusion et l'étendue de la nécrose observée; la zone à risque (région nourrie par l'artère). Enfin, le débit collatéral influence aussi l'évolution et la taille de l'infarctus [31]. En effet, les patients avec des circuits collatéraux montrent une diminution de la mortalité après un infarctus du myocarde [32, 33]. La présence de collatérales se caractérise par un apport sanguin provenant d'anastomoses interreliaient des artères coronariennes entre elles et irriguant la zone à risque. Plus il y a de vaisseaux collatéraux, plus lors d'une occlusion, le territoire à risque peut être nourri par la circulation sanguine provenant de ces vaisseaux et la nécrose peut-être limitée. Seuls les patients avec maladies athérosclérotiques ou possédant des antécédents de maladies coronariennes disposent de circuits collatéraux.

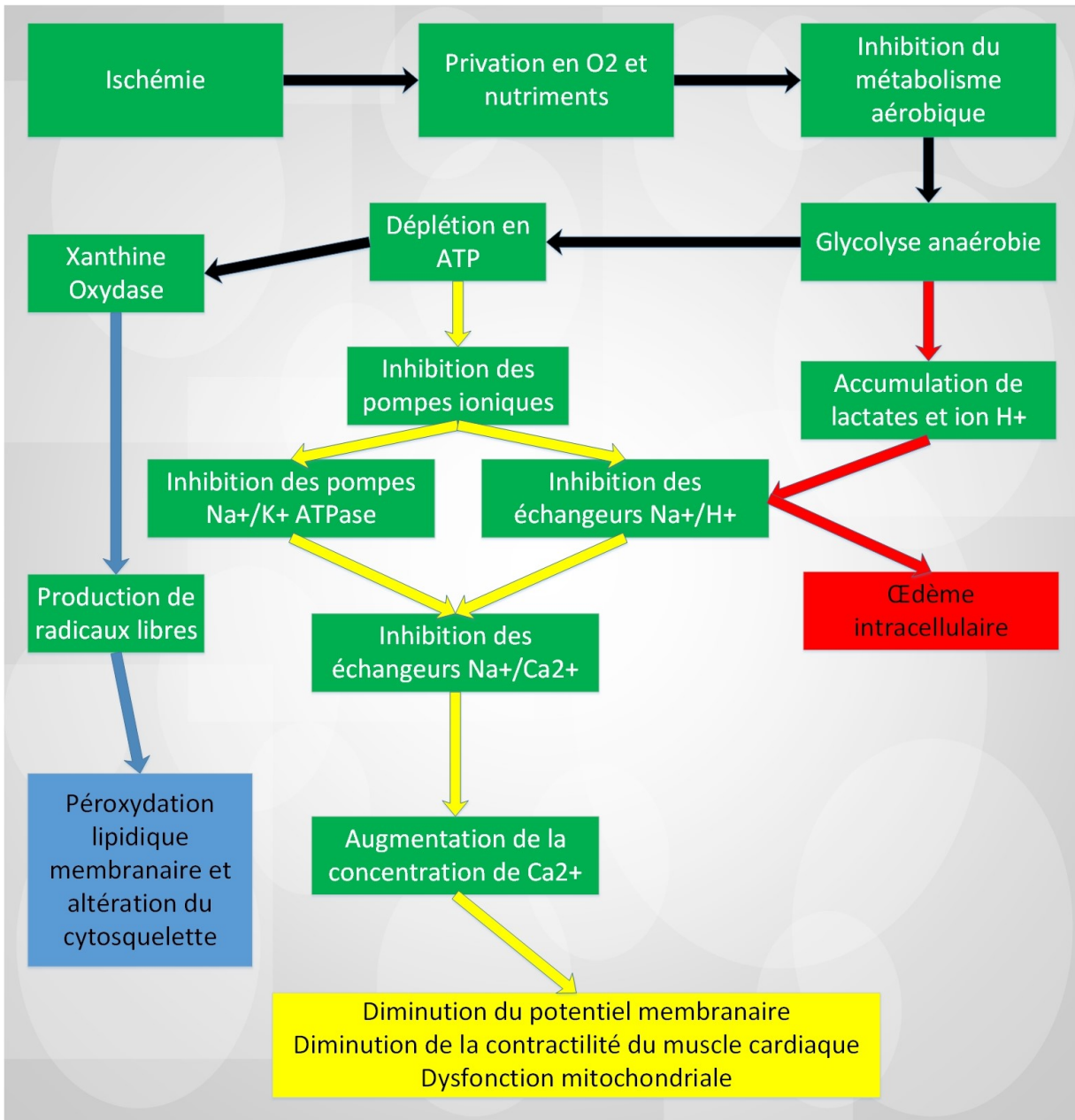


Figure 2 : Mécanismes se produisant lors d'une ischémie myocardique menant à des lésions réversibles ou irréversibles.

2. Intervention d'un infarctus du myocarde

Étant donné que la durée de l'occlusion est responsable en partie des lésions irréversibles, et que ce phénomène est contrôlable, la stratégie thérapeutique actuelle permettant de limiter

l'étendue de la taille de l'infarctus est de restaurer rapidement et durablement le myocarde ischémique en oxygène et en nutriment par une reperfusion de l'artère responsable de l'infarctus du myocarde. Les différents moyens de reperfusion comprennent :

- Le pontage aorto-coronarien qui permet au sang artériel de contourner l'obstruction grâce à un pont fabriqué par une artère provenant du bras ou des veines provenant de la jambe.
- L'angioplastie coronaire primaire permettant à l'aide d'un ballonnet de déplacer ou d'éliminer mécaniquement la plaque athéroscléreuse obstruant le vaisseau et maintenant l'artère ouverte grâce aux endoprothèses (petits tubes en métal). Cette technique peut-être pratiquée sans administration antérieure ou concomitante d'une thérapie médicamenteuse destinée à dissoudre le thrombus coronarien.
- La thrombolyse intraveineuse qui reste une alternative valable à l'angioplastie dans les trois heures suivant le début des symptômes d'infarctus du myocarde. Les thrombolitiques sont des activateurs du plasminogène tissulaire permettant de dissoudre le caillot responsable de l'obstruction. Cette méthode a l'avantage d'être applicable dans tout service des urgences. Par contre, elle présente l'inconvénient de n'être efficace que dans 60 à 80 % des cas, tout en posant un risque d'hémorragie grave. De plus, de nombreuses études randomisées ont démontré la supériorité d'une approche invasive par rapport à la thrombolyse intraveineuse dans le traitement en urgence du STEMI, en termes de restauration plus efficace du flux coronarien, de diminution du taux de récurrences d'ischémie et d'infarctus myocardiques, d'amélioration de la fonction ventriculaire gauche et de réduction de l'incidence de l'accident vasculaire cérébral (AVC) [34].

III. La reperfusion

Pour être efficace, la reperfusion doit se faire le plus rapidement possible, dans le but d'éviter le stade cellulaire irréversible et de limiter ainsi la taille de l'infarctus. Cependant, il est désormais établi que la reperfusion est à l'origine d'une extension des lésions cellulaires présentes lors de l'ischémie. Jennings et coll. en 1960 furent les premiers à émettre l'hypothèse que, chez le chien, le processus nécrotique commencé au cours de l'épisode ischémique serait accéléré lors de la reperfusion [20]. Plus tard, il a été admis que les cardiomyocytes encore viables, mais soumis à des lésions réversibles durant l'ischémie meurent lors de la reperfusion à la suite de phénomènes nommés : « lésions de reperfusion » [35].

1. Lésion de reperfusion

Les lésions de reperfusion sont définies comme étant des lésions myocardiques dues à la restauration du flux sanguin après un épisode d'ischémie prolongée et seraient responsables probablement de 40 à 50 % de la taille de l'infarctus [36]. En effet, certaines études tendent à démontrer que la reperfusion conduirait à la mort cellulaire des cardiomyocytes qui sont encore viables avant la reperfusion [37, 38]. En plus de provoquer la mort des cardiomyocytes, plusieurs dysfonctionnements cardiaques ont été identifiés après la reperfusion avant même que l'ischémie n'ait induit des altérations irréversibles [18, 39] :

- Les arythmies ventriculaires, mises en évidence par Tennant et Wiggers [40]. Ce sont des fibrillations ventriculaires précédées d'épisodes de tachycardie ventriculaire et d'extrasystoles sans doute dues aux troubles de l'homéostasie calcique. [41].
- Le phénomène de « no reflow » (ou modifications microvasculaires) est décrit pour la première fois par Kloner et coll en 1974 [42]. Il s'agit d'un retard de perfusion tissulaire malgré la disparition de l'occlusion du vaisseau coronaire conduisant à des dysfonctions endothéliales. Cela se traduit par un œdème et l'infiltration de neutrophiles [43].
- Le phénomène de « Stunning » (ou sidération myocardique) correspond à des anomalies transitoires de la fonction contractile sur le myocarde viable [44, 45].

- Le remodelage ventriculaire correspond à des modifications adaptatives progressives structurales, géométriques et fonctionnelles des cardiomyocytes provoquant un changement de la taille et de la forme du ventricule gauche. Ce phénomène se produit dans la semaine qui suit l'infarctus du myocarde à la suite de l'inflammation engendrée par celui-ci (détaillée dans le chapitre 1.III.2.C : L'inflammation) afin de pallier la défaillance contractile du myocarde. À long terme, ces modifications peuvent conduire à l'altération de la fonction globale du cœur se traduisant par une défaillance cardiaque [46, 47].

Prévenir les lésions de reperfusion permettrait de réduire les dysfonctionnements et les complications liées à l'infarctus du myocarde ainsi que la mort des cellules encore viables durant l'ischémie responsable d'une augmentation de la taille de l'infarctus.

Cela contribuerait ainsi à réduire la morbi-mortalité post-infarctus. Pour cela, il est important de connaître les mécanismes sous-jacents à ces lésions dans le but de pouvoir intervenir à ces niveaux.

2. Potentiels médiateurs impliqués dans les lésions de reperfusion

La physiopathologie des lésions de reperfusion n'est pas complètement connue. De plus, il n'est pas certain que ces lésions soient le résultat d'une amplification des dommages à la suite de l'ischémie (comme le suppose le paradoxe de calcium et de l'oxygène ci-dessous) ou qu'elles proviennent de la reperfusion seulement (paradoxe de l'inflammation). Plusieurs hypothèses semblent expliquer ce phénomène.

A. Paradoxe du calcium

La première hypothèse implique l'augmentation intracellulaire brutale de calcium lors de la reperfusion découverte par Zimmerman et al en 1967 [48].

Comme mentionné précédemment, pendant l'ischémie, le myocarde passe d'un métabolisme aérobie à un métabolisme anaérobie. Il va ainsi y avoir arrêt de la production d'ATP ce qui entraîne l'inhibition des pompes ATPase dépendantes.

Durant la reperfusion, la réoxygénation permet le rétablissement de la production d'ATP et ainsi une réactivation des pompes ATPase dépendantes. La réactivation de la pompe Ca^{2+} -ATPase entraîne l'entrée du Ca^{2+} dans le réticulum endoplasmique (RE) stocké dans le cytosol durant l'ischémie. Cependant, la concentration maximale de Ca^{2+} dans le RE est plus faible que dans le cytoplasme, le Ca^{2+} ressort du RE et un cycle calcique continu s'établit entre le cytosol et le RE. Cette boucle d'entrée et sortie du Ca^{2+} dans le RE est responsable des hypercontractures ainsi que de l'activation des myofibrilles, et des dommages aux mitochondries menant à l'apoptose [35]. En effet, le maintien de la concentration de Ca^{2+} durant la reperfusion prévient l'ouverture de la perméabilité du pore de transition mitochondrial (mPTP) ainsi que de l'apoptose (voir chapitre 1.III.2.D : L'apoptose) [13].

Rousseau et coll. ont démontré que l'administration de diltiazem, un inhibiteur des canaux calciques, 10 minutes avant le début de la reperfusion diminue la taille de l'infarctus de 40 % [49]. Et plus récemment Segawa et coll. ont observé une diminution de la taille de l'infarctus chez le porc en administrant la clévidipine (un antagoniste des canaux Ca^{2+}) 10 min avant la reperfusion. Ces résultats appuient l'hypothèse calcique dans les lésions de reperfusion [50]. Toutefois, Avellanal et coll. ont démontré, dans un modèle de cœur de lapin isolé perfusé, que l'utilisation de l'acide cyclopiazonique, un inhibiteur spécifique de la pompe Ca^{2+} -ATPase, entraînait une cardioprotection seulement si le médicament était délivré avant l'ischémie [51].

B. Paradoxe de l'oxygène

La seconde hypothèse pouvant expliquer les lésions de reperfusion implique le stress oxydatif engendré par l'oxygène lors de la réoxygénation et a été introduite en 1978 par Hearse et coll. [52].

Lors de la reperfusion, il y a une augmentation importante d'anion superoxyde (O_2^-), de radical hydroxyle (OH^\cdot) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ces molécules entrent en réaction avec l'oxygène pour former les espèces réactives à l'oxygène (ERO). Les ERO sont en partie responsables de l'ouverture du pore mPTP et provoquent la sortie du cytochrome c menant à l'initiation de l'apoptose via la voie intrinsèque [53].

L'effet cardioprotecteur, suite à l'utilisation d'antioxydant durant la reperfusion, est controversé, car plusieurs études ont effectivement montré un effet cardioprotecteur alors que d'autres non [54-56]. Par exemple, certaines études réalisées chez le chien démontrent que l'utilisation de la superoxyde dismutase bovine est cardioprotectrice [57, 58] alors que d'autres études n'ont prouvé aucun effet cardioprotecteur de cette enzyme [59, 60].

C. L'inflammation

L'inflammation est un processus réactionnel qui permet à l'organisme de se défendre contre le stresser responsable de cette inflammation. Les mécanismes de l'inflammation sont étudiés depuis bien longtemps. Au 1^{er} siècle avant J.-C. déjà, Cornelius Celsus observa que l'inflammation se traduisait par 4 signes cardinaux : « rubor, tumor, calor et dolor » (rougeur, tumeur, chaleur, douleur). Puis, Claude Galien (131 - 201 après J.-C.) ajouta un 5^e point cardinal qui précisait la perte de fonction de l'organe touché « functio laesa ». Aujourd'hui, la complexité des mécanismes est mieux connue. Simplement, le processus inflammatoire est divisé en deux phases : la phase vasculaire qui témoigne d'une vasodilatation et d'une augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins, puis la phase cellulaire qui inclut la diapédèse des leucocytes circulant vers le site de l'infection et une vasodilatation ayant pour but d'augmenter le flux sanguin afin d'évacuer les cellules mortes et les toxines, et d'apporter les éléments nécessaires à la guérison. L'exsudation du plasma qui en résulte provoque un gonflement des tissus qui, en comprimant les terminaisons nerveuses, est responsable de la douleur. Ces modifications sont également accompagnées de l'attraction par chimiotactisme des monocytes, macrophages qui produisent des cytokines-pro-inflammatoires permettant le

recrutement d'un grand nombre de cellules de l'immunité innée pour favoriser la résolution de l'inflammation.

Dans le cœur sain, les cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α (Tumor necrosis factor alpha) IL-1 β et IL-6 ne sont pas constitutivement exprimées [61]. Toutefois lors d'une ischémie, l'hypoxie, l'étirement mécanique, et le stress oxydatif produisant les changements irréversibles induisent rapidement une réponse inflammatoire [62, 63]. Les cardiomyocytes, les fibroblastes, et les cellules endothéliales produisent alors une grande quantité de cytokines pro-inflammatoires telle que TNF- α , IL-1 β et IL-6 [64, 65].

Ces cytokines sont essentielles au processus de réparation du tissu infarci [66]. Cependant, après reperfusion de l'ischémie, une seconde phase de processus inflammatoire myocardique apparaît [67] avec surproduction d'IL-1 β , TNF- α , IL-6, et de facteurs chimioattractants provoquant alors une inflammation excessive au niveau du cœur. Ce phénomène contribue certainement aux dysfonctions et remodelages ventriculaires observés dans les lésions de reperfusion [67, 68]. Plus particulièrement, TNF- α semble être la cytokine la plus impliquée dans les lésions de reperfusion. En effet, son expression est augmentée dans les cardiomyocytes infarcis et même en dehors de la zone infarctée signalant un lien entre TNF- α et lésions de reperfusion [69]. Puis, l'administration intraveineuse d'éta-nercept (un inhibiteur de TNF- α) avant le début de l'occlusion diminue l'inflammation après ischémie-reperfusion ainsi que les lésions de reperfusion chez le chien [70]. De plus, des souris TNF- α knock-out (KO) présentent une protection contre les lésions de reperfusion [71]. Enfin, un prétraitement par un anticorps spécifique anti-TNF- α dans un modèle d'infarctus du myocarde chez le lapin entraîne une diminution significative de la taille de l'infarctus [72]. Cependant, dans l'étude de Kaloustian et coll. aucune diminution de la taille de l'infarctus du myocarde n'a été observée avec l'utilisation d'un inhibiteur à TNF- α (PEG sTNFR1) chez le rat [73]. Finalement, TNF- α est en partie responsable de la diminution de la contractilité du myocarde par des altérations de la fonction de réticulum sarcoplasmique provoquant la diminution de Ca²⁺ intracellulaire [74, 75] et d'autre part contribue à l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales ce qui augmente le phénomène de « no-reflow » [76, 77]. Les neutrophiles joueraient aussi un rôle

important dans la taille de l'infarctus [78]. La première étude histologique à ce sujet démontra que la gravité de l'infarctus est proportionnelle à l'accumulation de neutrophiles [79]. L'inhibition de l'adhésion des neutrophiles par l'administration d'un anticorps monoclonal (anti-Mo1, anti CD11b) 45 min après le début de l'ischémie ainsi qu'une neutropénie conduisent à une diminution de la taille de l'infarctus dans des modèles d'ischémie-reperfusion chez le chien [80, 81]. Les mécanismes par lesquels les neutrophiles modulent la taille de l'infarctus sont incertains, mais ils pourraient agir par leur production d'ERO [63].

Ensuite, la surproduction de cytokines accélère le dépôt de collagène conduisant à la fibrose [66] et à l'activation plaquettaire [82] qui elle, participe à la taille de l'infarctus. En effet, la réduction de l'accumulation plaquettaire s'est montrée efficace à diminuer la taille de l'infarctus dans un modèle de reperfusion en présence de sténose critique [83].

Finalement, les ERO, conjointement aux cytokines pro-inflammatoires, activent le facteur de transcription nucléaire NF-kB conduisant aux lésions de reperfusion telles que l'hypertrophie cellulaire [74], ou même à l'apoptose [84, 85].

D. L'Apoptose

Il existe différents types de mort cellulaire dépendamment du type de signaux de mort, du type tissulaire ainsi que de son stade de développement et de l'environnement physiologique de la cellule. Dans cette thèse, nous allons nous concentrer essentiellement sur la nécrose et l'apoptose, car ce sont essentiellement ces deux types de mort cellulaire que l'on retrouve dans notre modèle d'infarctus du myocarde.

La nécrose est une mort cellulaire appelée « accidentelle » et comprend des groupes de cellules. La chromatine nucléaire floccule et la synthèse protéique diminue. La rupture des membranes conduit à la libération du contenu cytoplasmique dans le milieu environnant, déclenchant une réaction inflammatoire [86]. Durant ce processus, qui ne nécessite pas d'énergie, les mitochondries et le noyau restent intacts.

La mort par apoptose par contre est un processus individuel, actif, organisé temporellement, au cours duquel la cellule exprime un ensemble de gènes entraînant des modifications morphologiques, biochimiques et structurales aboutissant à sa destruction « sans traces » et complète [87]. Les changements morphologiques comprennent le rétrécissement de la cellule, la condensation de la chromatine, la condensation du cytoplasme et la formation d'invaginations des membranes plasmiques et nucléaires, donnant un aspect de bourgeon à la surface membranaire périphérique. Cela aboutit à la fragmentation de la cellule et du noyau en corps apoptotiques qui seront phagocytés principalement par les macrophages ou les cellules voisines [87]. Les changements biochimiques comprennent une modification des flux calciques responsables de l'activation des nucléases qui induisent la fragmentation de l'ADN, une activation de transglutaminases impliquées dans la réorganisation des éléments du cytosquelette menant aux invaginations membranaires et à la formation des corps apoptotiques, et une activation des protéinases cystéine-aspartate dépendantes (caspases) [88].

Le terme apoptose a été défini en 1972 par Kerr et Willie [87] du grecque signifiant « chute des feuilles ». C'est au cours des 30 dernières années seulement que la recherche sur l'apoptose a pris de l'ampleur à la suite de recherches menées par John Sulston, Sydney Brenner et Robert Horvitz. D'ailleurs en 2002 leur découverte sur la régulation génétique dans l'apoptose leur ont fait valoir le prix Nobel de Médecine et Physiologie. L'intérêt pour l'apoptose s'est encore étendu depuis une quinzaine d'années, en raison de son implication dans de nombreuses pathologies. En effet, un dysfonctionnement des mécanismes apoptotiques est retrouvé dans diverses maladies. Par exemple, une diminution de l'apoptose est responsable en partie du développement d'une néoplasie (cancer) et des maladies auto-immunes (arthrite rhumatoïde). D'autre part, une exagération du programme apoptotique semble être impliquée dans les maladies mentales comme la dépression, les troubles neurodégénératifs (Alzheimer, Parkinson), le sida et les maladies ischémiques [89-91].

Le processus apoptotique est divisé en trois étapes. L'induction qui caractérise la nature du stimulus apoptotique (intrinsèque ou extrinsèque), la détermination synonyme de l'expression

des facteurs impliqués dans l'apoptose puis l'exécution convergente vers l'activation des caspases.

L'apoptose peut être déclenchée via la voie intrinsèque (également appelée voie mitochondriale) induite par la formation d'un complexe appelé apoptosome après la libération des protéines mitochondriales et la voie extrinsèque activée par un signal extracellulaire (un ligand) à travers un récepteur inducteur de mort via un complexe de signalisation appelé DISC.

a. Les mécanismes de l'apoptose

1. La voie intrinsèque

La voie intrinsèque de l'apoptose peut être activée par l'hypoxie, le stress oxydatif ou un manque de facteur de croissance. La famille de protéines Bcl-2 régule, en partie, l'activation de l'apoptose via cette voie.

Le gène qui code pour la famille des protéines Bcl-2 a été identifié pour la première fois en raison de son implication dans des cellules B malignes (Bcl-2 représente des cellules B lymphoma/leukemia-2 gène). Les membres de la famille Bcl-2 ont été classiquement regroupés en trois classes : 1/ Anti-apoptotique avec Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, MCL1, Bcl-B, 2/ Pro-apoptotique avec Bcl-2-connexe protéine X (BAX), Bcl-2 antagonist/killer-1 (BAK) et BOK. 3/ Les *protéines BH-3 only protein* (protéines de type BH-3 seulement) dont BAD, BIM, BIK, HRK et BID. Les protéines de type BH-3 seulement sont les éléments déclencheurs de l'apoptose mitochondriale. Ils provoquent l'activation des protéines pro-apoptotiques entraînant la libération de Bax ou Bak dans la mitochondrie [92]. Le mécanisme selon lequel les protéines de type BH-3 seulement activent les protéines pro-apoptotiques n'est pas bien connu, mais différentes hypothèses sont discutées dans la littérature [93]. Lorsque les protéines de type BH-3 seulement se lient à Bcl-2, ils forment un complexe qui empêche Bcl-2 de se lier aux protéines pro-apoptotiques Bax ou Bak. Ceci permet la libération des protéines pro-apoptotiques leur permettant de venir s'ancrer dans la membrane et augmenter la perméabilité mitochondriale puis l'ouverture du pore mPTP [94]. Il va ainsi y avoir relâche de

cytochrome c ainsi que le facteur SMAC/DIABLO. Ensemble, ils vont activer le facteur apoptotique 1 (Apaf-1). Celui-ci va former avec le cytochrome c et de l'ATP l'apoptosome levant l'inhibition de la caspase-3 et -9 en inhibant IAP (inhibiteur de protéine apoptose) [95]. D'autres facteurs sont aussi relâchés par la mitochondrie facilitant l'apoptose, dont le facteur induisant l'apoptose (AIF) [96], l'endonucléase G [97] et les protéines nécessitant de hautes températures (high-temperature-requirement protein A2 : HtrA2) qui transloquent au noyau et initie l'apoptose via la fragmentation de l'ADN [98].

II. La voie extrinsèque

La voie extrinsèque est initiée par la liaison d'un ligand (le TNF- α par exemple) au récepteur de mort Fas (CD95) ou au récepteur du TNF- α (TNFR) qui comprend plusieurs membres : TNFR1, CD95 (Fas/APO-1), TRAIL-R1, TRAIL-R2, DR3, DR6. Ces récepteurs comprennent un domaine extracellulaire riche en cystéine responsable de la liaison du ligand et un domaine de mort (Death Domain ou DD) au niveau intracellulaire [99]. Après liaison d'un ligand, le récepteur subit une trimérisation et recrute des protéines adaptatrices (FADD et TRADD) via le domaine DD puis fixe les procaspases. Le complexe ainsi formé se nomme *death-inducing signaling complex* (DISC) (complexe de signalisation induisant la mort) et initie le clivage protéolytique des procaspases 2, 8, et 10 conduisant à l'activation de procaspases 3, 6 et 7 [100] qui s'autoclivent pour former les caspases correspondantes et initient l'apoptose [99].

La caspase-8 peut aussi cliver Bid faisant le lien avec la voie intrinsèque apoptotique via la mitochondrie en provoquant la relâche du cytochrome c et initiant ainsi l'apoptose [101].

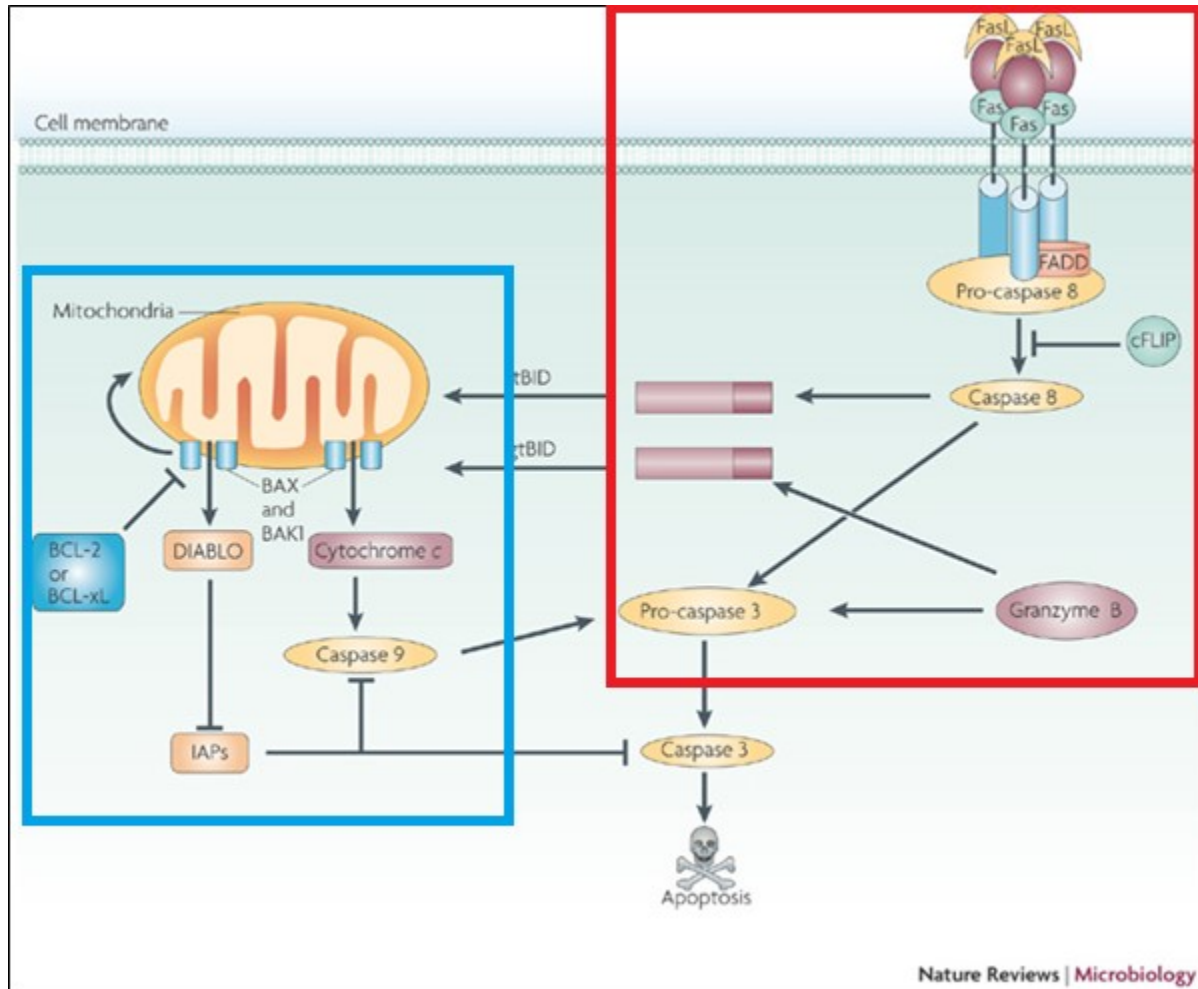


Figure 3 : Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose impliquant les caspases. La voie extrinsèque (encadré rouge) est activée via la liaison d'un ligand sur un récepteur de mort provoquant la formation du complexe DISC qui initiera l'apoptose à la suite de l'activation de la caspase-3 ou encore par Bid qui engendra l'apoptose par le sentier mitochondrial. L'activation de la voie intrinsèque (encadré bleu) implique la relâche du cytochrome c de la mitochondrie qui vient activer Apaf-1, la caspase-9, initiatrice de l'apoptose, puis la caspase-3, effectrice de l'apoptose. Le tout est régulé par les protéines de la famille BCL et les facteurs AIF, l'endonucléase g, Omi et Smac encourageant l'apoptose, tandis que IAP vient l'inhiber (d'après Clarke et coll 2009) [102].

b. Infarctus du myocarde et apoptose

Aujourd'hui encore, des études cherchent à déterminer la contribution de l'apoptose et de la nécrose au court de la reperfusion myocardique. Étant donné que l'apoptose nécessite de l'énergie qui est minimale durant l'ischémie, mais qui est restaurée durant la reperfusion, il semblerait qu'une période d'ischémie prolongée mène à une augmentation de la nécrose tandis que la reperfusion accélère la mort par apoptose [91]. Certains auteurs soutiennent en

effet l'évidence que l'apoptose s'observe essentiellement en période de reperfusion, et aurait un rôle important dans les lésions de reperfusion [103]. Il a été établi par exemple que l'apoptose se produisant durant la reperfusion affecte seulement les cellules viables de la zone à risque contribuant à une augmentation de la taille de l'infarctus [104]. De plus, l'inhibition pharmacologique des caspases durant l'ischémie et se poursuivant durant la reperfusion permet de diminuer la taille de l'infarctus [105, 106]. Puis, Chen Z, et coll. démontrèrent que la surexpression de Bcl-2 chez des souris transgéniques dans un modèle d'ischémie-reperfusion provoque une diminution des lésions de reperfusion [107].

Cependant, d'autres études soulignent que l'apoptose n'est pas seulement retrouvée lors de la reperfusion, mais qu'elle est aussi déjà présente durant l'ischémie. Par exemple, une étude prétend que l'apoptose serait initiée durant l'ischémie et exécutée pendant la reperfusion [108]. Plus récemment, Mc Cully en 2004 démontra que la contribution de nécrose dans les cardiomyocytes de lapin après la reperfusion est significativement plus grande que l'apoptose prétendant que l'apoptose n'est pas la seule cause des lésions de reperfusion [109].

Même si la contribution de l'apoptose et de la nécrose pendant la reperfusion est encore discutée aujourd'hui, certaines preuves montrent que l'apoptose contribue aux lésions de reperfusion ainsi qu'à la taille de l'infarctus. Les mécanismes d'activation de l'apoptose convergent vers l'hypothèse inflammatoire.

À la suite d'un infarctus du myocarde, il y a une augmentation de la sécrétion de TNF- α par les monocytes et macrophages provoquant une augmentation de l'expression de TNF- α dans le plasma et par les cardiomyocytes [69, 110]. TNF- α serait un composant majeur dans la mort par apoptose durant la reperfusion, mais est aussi impliqué dans la survie cellulaire [111]. En effet, une étude réalisée sur des cardiomyocytes isolés avait montré que l'utilisation du TNF- α avant l'induction de l'hypoxie entraînait une protection contre les lésions d'hypoxie-réoxygénation [112]. Ces effets contradictoires peuvent être expliqués de deux façons. Tout d'abord, il existe différents types de récepteurs au TNF- α [113]; l'activation du récepteur de type 1 TNFR1 (appartenant à la famille des récepteurs de mort) serait cardiotoxique alors que

le récepteur de type 2 TNFR2 serait responsable des effets cardioprotecteurs via la voie de cardioprotection Janus Kinases / Signal transducer activator of transcription (JAK/STAT) détaillée plus bas [114, 115]. Puis, la concentration de TNF- α semble avoir un rôle dans la détermination de son effet néfaste ou cardioprotecteur. Il a été démontré dans un modèle d'infarctus du myocarde *in vivo* chez le rat qu'une faible concentration du TNF- α administrée avant l'induction de l'ischémie-reperfusion entraîne une réduction de la taille d'infarctus, mais aucun effet n'a été observé en utilisant des doses plus élevées [116]. Ce mécanisme impliquant certainement le même récepteur est résumé dans la figure 4 ci-dessous.

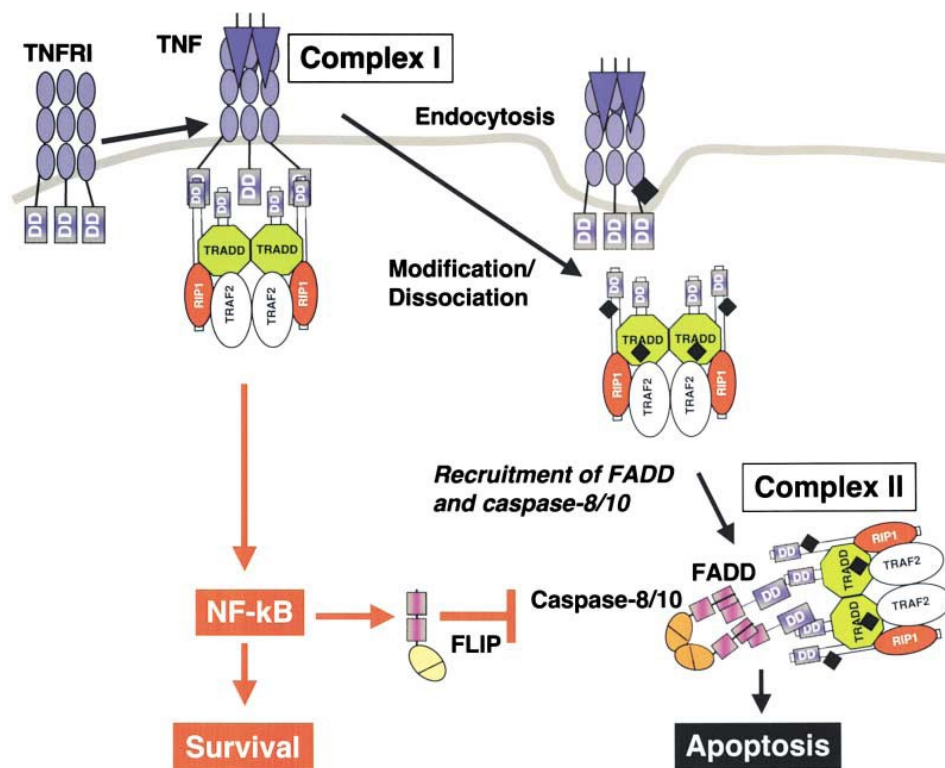


Figure 4 : Voies de signalisation impliquées dans la liaison de TNF- α sur son récepteur TNFR1. Une faible concentration de TNF- α administrée avant l'induction de l'ischémie-reperfusion entraîne une réduction de la taille d'infarctus via l'activation de NF- κ B alors qu'une forte concentration de TNF- α provoque la mort par apoptose via la formation du complexe II (d'après Micheau et coll 2003) [111].

IV. Stratégies de prévention des lésions de reperfusion [117]

Outre l'utilisation de molécules agissant en amont de la cascade apoptotique donc directement sur les médiateurs provoquant les lésions de reperfusion que nous venons de voir, l'activation de deux voies de signalisation démontrant une cardioprotection agissant avant la mort cellulaire a été décrite dans la littérature : La voie RISK (*Reperfusion Injury Salvage Kinase*) et la voie SAFE (*Survivor Activating Factor Enhancement*).

1. La voie RISK « Reperfusion Injury Salvage Kinase » [118]

Le pouvoir cardioprotecteur de la voie RISK identifié par Yallin et coll. provient de deux voies : La voie p42/44 « extracellular signal-regulated kinase » (ERK1/2) et de la voie phosphatidylinositol3 kinase (PI3K).

Tout d'abord, la voie p42/44 est constituée de sérine-thréonine-kinases membres de la famille des mitogen activated protein kinases (MAPK) impliquées dans la régulation de la prolifération, la différenciation, et la survie cellulaire. L'activation de la voie p42/44 débute par l'activation d'une protéine couplée à la guanine nucléotide (Ras) qui active Raf activant ensuite MEK1/3, elles-mêmes activant ERK1/2 pouvant diffuser dans le noyau pour la transcription de gène responsable de la survie cellulaire. Puis, la deuxième voie par laquelle la voie RISK exerce un effet cardioprotecteur passe par la voie PI3K via l'activation de la sérine-thréonine kinase (Akt) (ou protéine kinase B) [119] qui agit via différents mécanismes pour inhiber l'apoptose :

1/ Elle inhibe le changement conformationnel de la protéine pro-apoptotique Bax, l'empêchant de transloquer vers la mitochondrie et d'ainsi causer l'apoptose. 2/ Elle inhibe l'activité de la caspase-3, l'activation de la p70s6K (qui elle inhibe BAD) et l'activation de la protéine Bcl-2 anti-apoptotique [120] 3/ Elle inhibe l'ouverture du pore mPTP.

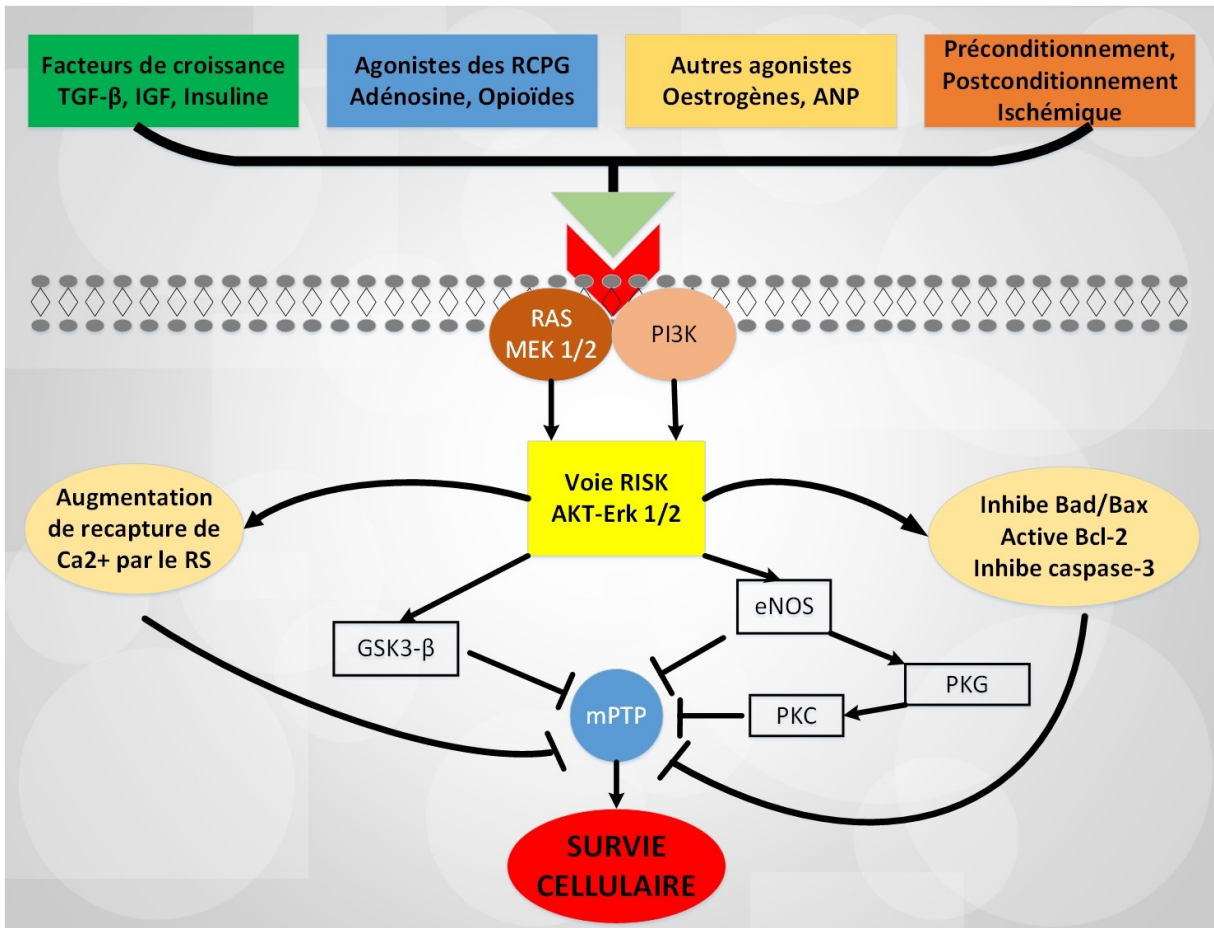


Figure 5 : Voie de cardioprotection Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK). L'activation de la voie de cardioprotection RISK médit la survie cellulaire via un mécanisme anti-apoptotique en inhibant l'ouverture du pore mPTP. [118].

Plusieurs données précliniques indiquent que l'activation de la voie RISK par des agents pharmacologiques au moment de la reperfusion peut entraîner une diminution de la taille de l'infarctus. Les activateurs connus de la voie RISK sont multiples. Certains d'entre eux ont seulement démontré des effets cardioprotecteurs précliniques alors que d'autres ont déjà fait leurs preuves lors d'études cliniques.

L'insuline en prétraitement ou administrée au moment de la reperfusion, s'avère cardioprotectrice via l'induction de la voie PI3K/Akt dans plusieurs modèles d'ischémie reperfusion sur plusieurs espèces [121]. De même, l'insuline-like growth factor-1 diminue la taille de l'infarctus chez la souris lorsque donnée au moment de la reperfusion via l'activation

de Akt, ERK1/2, la stimulation de l'expression de Bcl-2, l'inhibition de Bax et l'inhibition de l'ouverture du pore mPTP [122].

D'autres substances telles qu'un agoniste du récepteur A_{2A} de l'adénosine, le glucagon like peptide, l'œstrogène, l'érythropoïétine lorsqu'administrées au moment de la reperfusion démontrent aussi une diminution significative de la taille de l'infarctus via la voie de signalisation RISK [123].

2. La voie SAFE « Survivor Activating Factor Enhancement » [124]

Semblable à la voie RISK, la voie SAFE « Survivor Activating Factor Enhancement » [124] est composée de la protéine kinase G (PKG) [125, 126] et d'une voie de signalisation impliquant le TNF- α , la sphingosine et JAK/STAT.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'effet de TNF- α durant la reperfusion serait dépendant de la quantité ainsi que du récepteur qu'elle va stimuler.

TNF- α serait impliquée dans la voie de cardioprotection SAFE via l'activation de la voie JAK. Après la liaison du TNF- α sur son récepteur de type 2, les deux protéines JAKs adjacentes à ce récepteur se phosphorylent et provoquent l'activation des protéines STAT-3. Une fois phosphorylée, STAT-3 va engendrer la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la survie et dans la prolifération cellulaire [124]. Aussi, l'effet cardioprotecteur de STAT-3 provient de son effet anti-apoptotique en : 1/ Augmentant l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1 et Fas, 2/ Phosphorylant les facteurs pro-apoptotiques Bad pour les rendre inactifs, 3/ Diminuant l'expression de la protéine Bax.

Le candidat majeur de la voie SAFE reste le TNF- α . Toutefois, le préconditionnement et le post-conditionnement ischémique semblent aussi activer cette voie de cardioprotection [127].

V. Conclusion du chapitre I

Au Canada, l'infarctus du myocarde constitue encore une urgence cardiologique absolue dont l'incidence reste encore élevée. L'infarctus du myocarde est caractérisé par une ischémie qui se traduit par une diminution de l'apport en oxygène et nutriments dans la zone irriguée par l'artère coronaire obstruée. Les conséquences de l'ischémie dépendent de sa sévérité, du degré de l'occlusion, de sa localisation, de la présence ou non de vaisseaux collatéraux et du temps de l'ischémie.

Il est nécessaire de pratiquer la reperfusion au plus vite après l'ischémie dans le but de sauver le plus de cellules de la mort par hypoxie. Cependant, la reperfusion amène elle aussi à des lésions de reperfusion qui peuvent être amorties par différentes approches pharmacologiques ou mécaniques (préconditionnement, post-conditionnement).

À la suite de l'infarctus du myocarde, plusieurs complications peuvent donc submerger dépendamment de la durée de l'ischémie et de la reperfusion : des arythmies, de l'insuffisance cardiaque, un remodelage ventriculaire et même des symptômes de dépression majeure ont été signalés chez 15 % de la population. Dans le deuxième chapitre, nous allons expliquer en détail les hypothèses physiopathologiques de la dépression post-infarctus du myocarde.

Chapitre II. Dépression post-infarctus du myocarde

I. La dépression majeure

1. Introduction

La dépression majeure compte parmi les maladies débilitantes les plus répandues au Canada. Plus d'un million de Canadiens sont actuellement atteints de dépression majeure. La dépression majeure, aussi connue sous le nom de dépression unipolaire, est une forme de trouble dépressif. Les autres troubles dépressifs sont la dysthymie (forme de dépression chronique moins grave que la dépression majeure) et la dépression bipolaire (alternance de phase dépressive et maniaque). Le terme dépression, du latin « depressio » qui signifie « enfoncement », désigne une pathologie psychiatrique associant des symptômes psychiques et somatiques.

Les symptômes psychiques se caractérisent par une humeur triste persistante, des troubles du sommeil et de l'appétit, des difficultés à se concentrer et des troubles de la mémoire, une perte d'intérêt et de plaisir à faire des activités qui étaient appréciées avant la dépression, un sentiment de culpabilité ou de honte sur sa condition, un désespoir, une dépréciation de soi ou encore des pensées pessimistes. Les symptômes somatiques se traduisent par une fatigue, des maux de tête, des nausées.

Un système de critères diagnostics exclusivement descriptifs a été mis en place par le DSM en 1952 (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 1952). Depuis, plusieurs versions améliorées ont permis de créer la cinquième version DSM V (American Psychiatric Association (2013) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-V), APA Press). Selon cette version, le diagnostic psychique d'une dépression majeure est effectif quand cinq des neuf symptômes présents ci-dessous sont présents presque quotidiennement, pendant au moins

15 jours et dont au moins un des symptômes est soit une humeur dépressive, soit une perte d'intérêt ou de plaisir.

- Diminution de l'intérêt et du plaisir
- Humeur dépressive persistante remarquée par la personne même ou son entourage
- Perte d'appétit et de poids significative
- Insomnie ou hypersomnie persistante
- Agitation ou retard au niveau psychomoteur
- Fatigue ou perte d'énergie quotidienne
- Sentiment de culpabilité ou manque d'estime et de valorisation de soi
- Trouble de concentration
- Pensées suicidaires et de morts récurrentes

En plus de ces symptômes répertoriés qui permettent un diagnostic de la maladie, la dépression majeure affecte également de nombreux processus biologiques qui perturbent le sommeil, l'appétit, la libido, mais aussi le système nerveux autonome (SNA) [128] et le système cardiovasculaire qui est le plus documenté [129, 130].

Étant donné que la dépression et les maladies cardiovasculaires représentent deux principales causes d'invalidité dans le monde et posent un vrai problème de santé publique, le lien entre ces deux pathologies vaut la peine d'être étudié.

2. Neurobiologie de la dépression

Les études post-mortem, les études d'imagerie cérébrale chez les patients dépressifs et les études in vivo ont permis de comprendre quelles structures cérébrales sont impliquées dans les symptômes de dépression [131]. C'est essentiellement le système limbique qui regroupe les régions de l'amygdale, le thalamus, l'hypothalamus et l'hippocampe, qui est touché. Ces régions ont de multiples fonctions, dont le contrôle des émotions, de l'humeur ainsi que des commandes motrices et cognitives reliées à la motivation, à la mémoire, à la régulation de l'appétit, du sommeil et du désir sexuel. Il est clairement établi aujourd'hui qu'une altération du système limbique peut causer diverses pathologies, dont l'épilepsie, et des troubles de

l'humeur, incluant la dépression, et des troubles du sommeil [132]. En effet, les régions du système limbique et leurs fonctions associées ont toutes été retrouvées altérées chez des personnes atteintes de dépression [133]. De plus en plus de recherches ont permis de mettre en évidence que d'autres structures sont aussi impliquées dans la dépression, comme le néocortex, ou le striatum [131].

D'un point de vue général, l'hippocampe et le néocortex (principalement le cortex préfrontal) sont responsables de l'aspect cognitif de la dépression. C'est à dire les problèmes de mémoire, les troubles de la concentration, le sentiment de culpabilité et le manque d'estime de soi. Le striatum, le noyau accumbens et l'amygdale, sont ensemble impliqués dans la mémoire émotionnelles, l'anxiété (amygdale essentiellement), l'anhédonie, la perte de motivation et de plaisir (striatum). Et enfin l'hypothalamus représente les symptômes végétatifs de la dépression : le manque ou trop de sommeil, la perte ou l'augmentation de l'appétit. Toutefois, les structures du cerveau ne sont pas des organes isolés, ils sont tous interreliés entre eux. C'est l'ensemble de communications entre toutes ces structures qui peuvent être altérées dans la dépression qui donne naissance aux symptômes de dépression.

De plus certaines régions sont très complexes et sont constituées de sous-structures (hippocampe) ou de noyaux (amygdale, hypothalamus) ayant des fonctions différentes.

D'un point de vue anatomique l'hippocampe est une structure centrale du système limbique composée de sous-structures reliées entre elles formant une boucle tri-synaptique. L'hippocampe est constitué du gyrus dentelé (GD), des cônes d'Ammon (CA1, CA2, CA3), du cortex entorhinal qui correspond à la voie d'entrée et le subiculum qui correspond à la voie de sortie de l'hippocampe. Les informations entrent par le cortex entorhinal qui projette par les fibres perforantes vers le gyrus dentelé qui lui projette par les fibres mossues vers les cellules pyramidales de CA3. L'information poursuit son chemin par les collatérales de Schaffer pour se rendre dans la région CA1 et sort par le subiculum ou reprend le cortex entorhinal. Le subiculum reçoit ainsi les afférences en provenance de CA1 mais aussi des autres sous-

structures comme CA3 ou GD et il est à l'origine de la plupart des sorties de l'hippocampe (figure 6).

L'hippocampe détient des interconnexions complexes avec toutes les autres structures du système limbique [134]. A partir du subiculum, il projette vers le cortex préfrontal, le thalamus, l'hypothalamus via le fornix (circuit de papez) et le striatum. Il existe également des connexions axonales substantielles avec d'autres structures limbiques telles que l'amygdale et le cortex entorhinal (boucle tri-synaptique). Le cortex entorhinal joue un rôle dans la mémorisation en recevant les informations issues des aires corticales associatives, du cortex préfrontal, puis en les transmettant au cortex parahippocampique qui le succède et les transmettent à l'hippocampe. Ainsi, avec le cortex parahippocampique et l'hippocampe, il participe à la consolidation de la mémoire déclarative (appelée également mémoire explicite ou événementielle). L'atteinte de ces structures est responsable d'une amnésie antérograde sévère (la mémoire à long terme étant intacte). Dans la maladie d'alzheimer par exemple, plaques amyloïdes formées sont particulièrement localisées sur ces structures, notamment l'amygdale, l'hippocampe et le cortex entorhinal, ce qui expliquerait la centralisation des symptômes de cette maladie sur la mémoire.

L'autre structure complexe en étroite relation avec l'hippocampe dans les symptômes de dépression est l'amygdale. C'est une structure cérébrale essentielle au décodage des émotions, et en particulier à la reconnaissance du danger par l'organisme. Ces afférences proviennent soit directement du thalamus sensoriel, qui constitue la voie thalamo-amygdalien (voie courte de la peur, rapide et imprécise qui ne bénéficie pas la cognition) soit des différentes aires corticales ou cortex préfrontal et constitue la voie thalamo-cortico-amygdalien (voie longue, lente mais précise) (figure 7). Il est important ici de faire la distinction entre la voie courte et la voie longue. La voie courte nous permet de nous mettre en situation de danger sans même avoir analysé le danger. Le thalamus envoie l'information directement à l'amygdale latérale qui par l'entremise de son noyau central noyau central, fait naître des réactions émotionnelles avant même que l'intégration perceptuelle n'ait eu lieu et que le système puisse se représenter complètement le stimulus. Ainsi cela nous permet de prendre

la fuite sans savoir pourquoi. C'est notre instinct de survie. La voie longue en passant par le néocortex arrive dans un second temps et précise si c'est un véritable stimulus menaçant s'il n'y a pas lieu de s'inquiéter. Mais le cortex n'est pas le seul à nous permettre de préciser la nature de la peur, l'amygdale est aussi étroitement relié à l'hippocampe. En effet, c'est l'hippocampe qui permet en premier lieu l'apprentissage du caractère dangereux d'un objet ou d'une situation grâce à la mémoire explicite. L'hippocampe est aussi particulièrement sensible à l'encodage du contexte associé à une expérience aversive. C'est lui qui fait en sorte que non seulement un stimulus peut devenir une source de peur conditionnée, mais également les objets autour, la situation ou le lieu où il se trouve.

La présence imminente d'un danger poursuit alors le travail d'activation de l'amygdale et via le noyau central vont activer les structures efférentes responsables des manifestations de la peur comme la fréquence cardiaque et de la pression sanguine élevées, les mains moites, la bouche sèche, les muscles tendus, etc. Une dysfonction de l'hippocampe serait ainsi responsable d'une réponse émotionnelle inappropriée. [135] [136] .

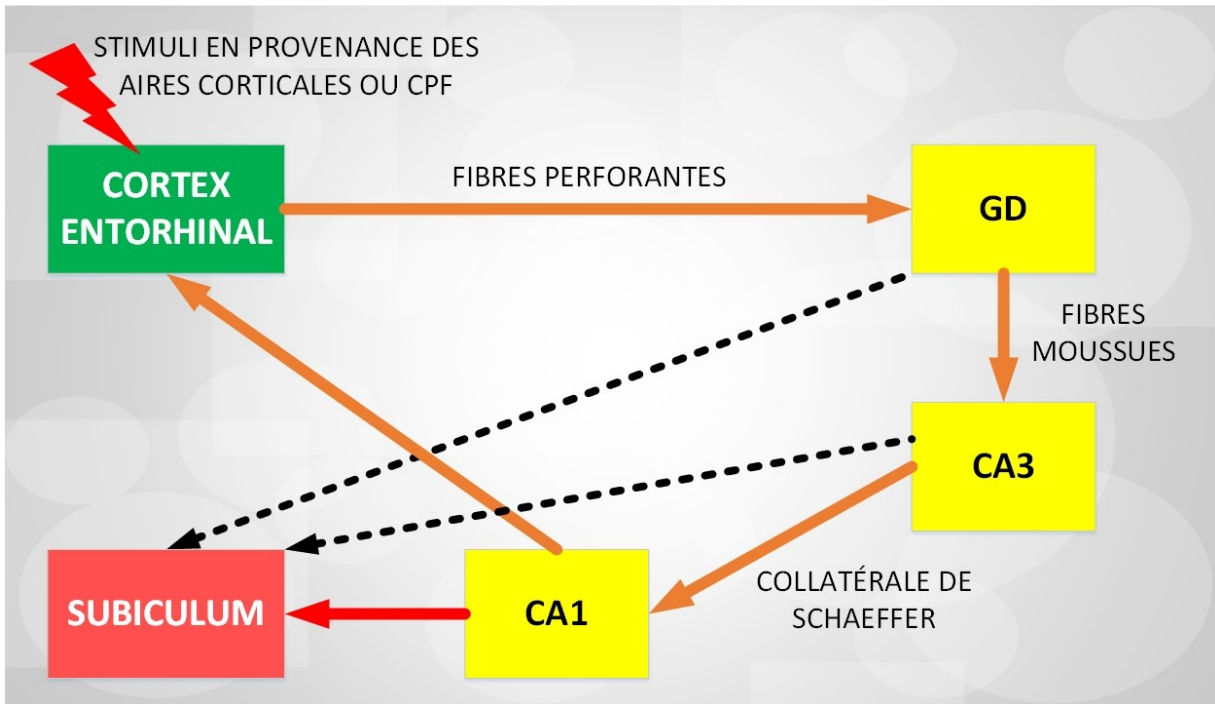


Figure 6 : Schéma de la structure de l'hippocampe. Communication trisynaptique. Les informations en provenance des aires corticales entrent par le cortex entorhinal qui projette par les fibres perforantes vers le GD qui lui projette par les fibres moussues vers les cellules pyramidales de CA3. L'information poursuit son chemin par les collatérales de schaffer pour se rendre dans la région CA1 et sort par le subiculum ou reprend le cortex entorhinal. Le subiculum reçoit ainsi les afférences en provenance de CA1 mais aussi des autres sous structures comme CA3 ou GD. Le subiculum est à l'origine de la plupart des sorties de l'hippocampe. CPF : cortex préfrontal, GD : Gyrus dentelé, CA : Cônes d'Ammon.

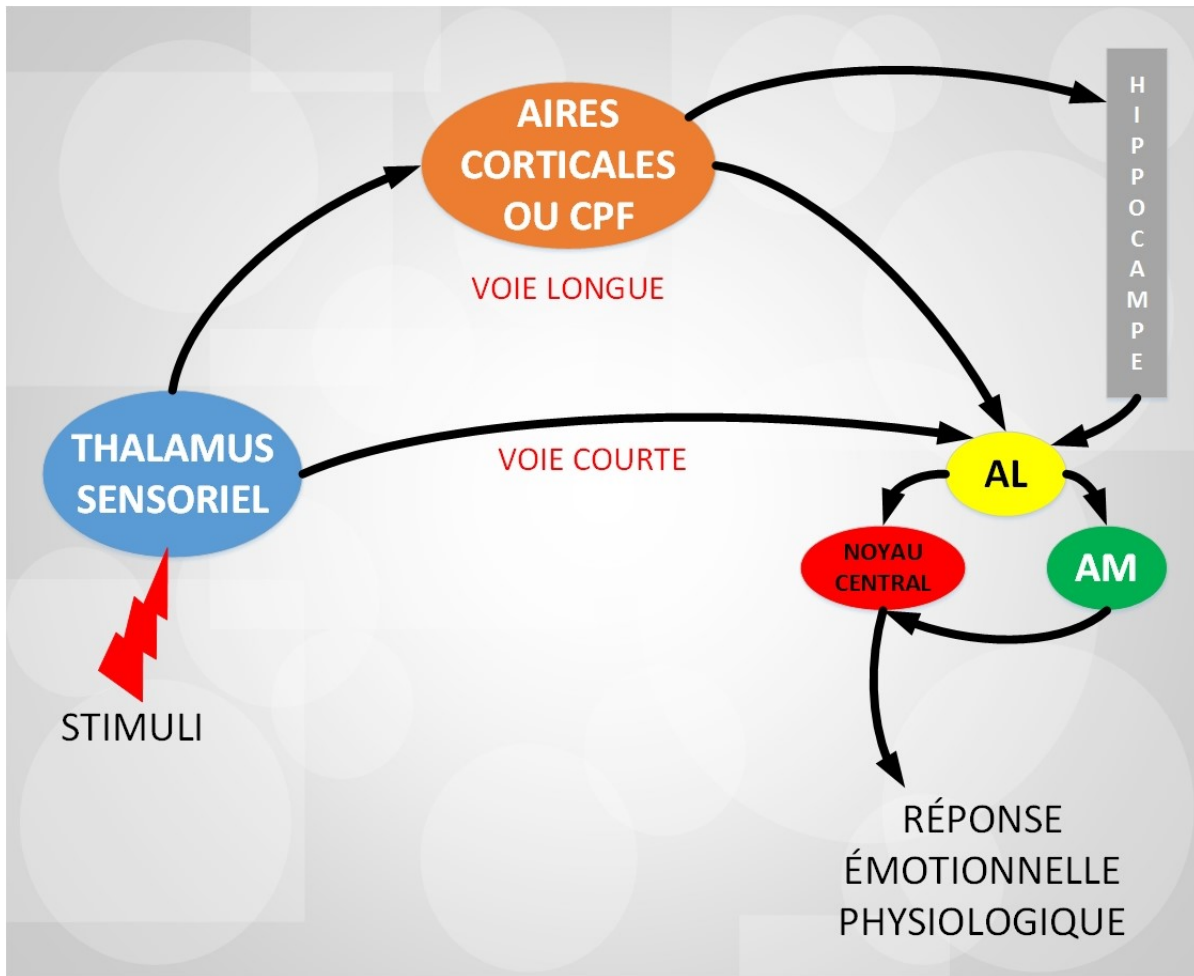


Figure 7 : Schéma des deux voies impliquées dans la réponse émotionnelle par l'amygdale. L'information émotionnelle en direction de l'amygdale provient soit directement du thalamus sensoriel, qui constitue la voie thalamo-amygdalien (voie courte de la peur, rapide et imprécise qui ne bénéficie pas la cognition) soit passe par différentes aires corticales ou cortex préfrontal et constitue la voie thalamo-cortico-amygdalien (voie longue, lente mais précise). L'information entre par l'amygdale latérale et le noyau central constitue la voie de sortie. Enfin l'hippocampe est responsable de l'encodage et des souvenirs liés aux stimuli émotionnelles pouvant en lien avec l'amygdale être la source d'anxiété. AM : amygdale médiane, AL : amygdale latérale, CPF : Cortex préfrontal.

II. Lien bidirectionnel entre la dépression et les maladies cardiovasculaires

Depuis les années 1960, les résultats de nombreuses études cliniques et épidémiologiques ont permis de prouver qu'il existe une association entre la dépression et les maladies cardiovasculaires [137]. D'une part, la dépression est reconnue comme un facteur de risques de morbidité et de mortalité cardiovasculaire et d'autre part, les maladies cardiovasculaires représentent un facteur de risques pour le développement d'une dépression.

1. La dépression : Un facteur de risques pour le développement de maladies cardiovasculaires

La dépression a été reconnue récemment comme un facteur de risques pour le développement de maladies cardiovasculaires et comme un prédicteur de la mortalité par maladies cardiovasculaires [138-140]. Dans les années 1990, plusieurs études ont démontré une augmentation significative de maladies cardiovasculaires chez les sujets dépressifs [129, 130, 141] comparés aux non-dépressifs. Lors d'une méta-analyse, il a été conclu que le risque relatif de développer une maladie cardiovasculaire chez des patients dépressifs sans antécédent cardiovasculaire est de 1.64 [142]. La dépression ne serait pas seulement un facteur de risques de développement de maladies cardiovasculaires, mais aussi un prédicteur de mortalité par évènement cardiaque [143, 144].

Les études sont concluantes et indiquent de façon convaincante que la dépression représente un facteur de risques des maladies cardiovasculaires en plus d'augmenter la mortalité chez des patients initialement sains.

2. Prévalence de la dépression chez les patients souffrant de maladies cardiovasculaires

Depuis la fin des années 1960, la présence de symptômes dépressifs a été documentée chez des patients souffrant de pathologies cardiovasculaires [145, 146]. La dépression est plus fréquemment rencontrée chez des patients atteints de maladies cardiovasculaires que chez ceux sans maladie cardiaque [147]. Il a été démontré qu'à la suite d'un infarctus du myocarde, 60 % des patients démontrent des symptômes de dépression et 20 % d'entre eux développent une dépression majeure [148, 149] comparés à 2 % de la population du même âge sans antécédent cardiovasculaire [150]. Il semble important de distinguer tout de suite les deux types de dépressions post-maladies cardiovasculaires. Tout d'abord la dépression transitoire, dont le rétablissement est observé naturellement quelques mois après l'hospitalisation puis la dépression majeure qui perdure dans le temps et qui nécessite une prise en charge spéciale que nous développerons un peu plus loin.

Dans l'étude de Schleifer et coll, le suivi des patients diagnostiqués pour une dépression post-infarctus du myocarde a démontré que 83 % des patients continuent de présenter soit une dépression majeure, soit une dépression mineure 3 mois après l'infarctus du myocarde [151]. Aussi, plusieurs études démontrent que la survenue d'une dépression après un infarctus du myocarde serait associée à une très grande mortalité et morbidité chez ces patients [1, 2, 152].

Une méta-analyse récente a montré que la dépression post-infarctus du myocarde est associée à entre 2 et 2,5 fois plus de risques de mortalité cardiovasculaire et de rechute d'évènements cardiovasculaires [153]. Frasure-Smith et coll ont analysé la prévalence de la mortalité sur une cohorte de patients souffrant de dépression majeure 6 mois et 18 mois après l'infarctus du myocarde [2, 152]. Dans la première étude, les patients ont été examinés 5 à 15 jours après l'infarctus du myocarde et recontactés 6 mois après l'infarctus du myocarde. De 5 à 15 jours post-infarctus du myocarde, 16 % des patients montraient des critères de dépression majeure. À 6 mois post-infarctus, le taux de mortalité est de 17 % pour les patients dépressifs comparé à 3 % pour les patients non dépressifs rencontrés de 5 à 15 jours [154]. De la même

façon, dans la seconde étude, à 18 mois post-infarctus du myocarde, la dépression reste prédictrice de la mortalité [155]. Une autre étude longitudinale effectuée pendant 17 ans confirme ces observations et ajoute que les patients présentant des symptômes de dépression ont 84 % plus de probabilité de mort par évènements cardiaques entre 5 et 10 ans après hospitalisation et 72 % après 10 ans comparés aux non dépressifs [143].

Enfin, en plus d'être prédictive de mortalité, la dépression post-infarctus du myocarde est une cause de mauvais pronostic, provoque un retard dans la réadaptation cardiaque ainsi qu'une mauvaise récupération après l'évènement cardiovasculaire [156, 157], et perturbe négativement la qualité de vie du patient [158]. Finalement, la dépression post-infarctus du myocarde retarde le retour dans le monde du travail et cause des enjeux économiques [159].

Les mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent l'évidence que la dépression et les maladies cardiovasculaires sont fortement liées restent mal compris. Pourtant une meilleure compréhension de ces facteurs pourrait avoir un impact significatif en termes de prévention ou de pronostic à la suite du développement de ces maladies. C'est pourquoi les travaux effectués dans le laboratoire de Dr Guy Rousseau aident à mieux comprendre la physiopathologie de la dépression post-infarctus du myocarde grâce au développement d'un nouveau modèle animal d'infarctus du myocarde chez le rat [160-162]. Différents facteurs systémiques ou neurologiques dysfonctionnels sont retrouvés autant à la suite d'un infarctus du myocarde que dans la pathologie de la dépression et pourraient servir de lien entre ces deux pathologies. Par exemple, le dysfonctionnement du système nerveux autonome (SNA), la dérégulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien (HHS), l'augmentation de l'activation plaquettaire et le processus inflammatoire sont retrouvés dans ces deux maladies. Ces différents facteurs sont à la base d'hypothèses proposées pour expliquer la dépression post-infarctus du myocarde. Dans la section suivante, nous allons détailler les hypothèses neurobiologiques de la dépression.

III. Hypothèses neurobiologiques de la dépression [163]

1. Hypothèse monoaminergique de la dépression

La théorie des monoamines dans la dépression fut la première théorie de la dépression encore valable actuellement et sur laquelle repose toute la pharmacothérapie actuelle. Cette théorie a débuté en 1954 après observation de troubles dépressifs chez des patients hypertendus traités à long terme avec la réserpine [164]. Une autre étude avec plus de patients a confirmé cette théorie en 1956 [165]. En effet, à forte dose, la réserpine provoque l'épuisement des réserves de monoamine et engendre ainsi des symptômes de dépression.

Dans les années 1960, il a été proposé que la dépression serait associée à une déficience de l'activité monoaminergique, en particulier, la sérotonine (5-HT), la noradrénaline (NA) et la dopamine (DA) [166-168]. Un peu plus tard, une réduction des concentrations en NA et 5-HT a été observée dans le liquide céphalorachidien de patients dépressifs confirmant alors cette hypothèse [169]. La théorie monoaminergique fut appuyée par la découverte que de nombreux antidépresseurs qui provoquent une augmentation rapide des niveaux synaptiques des monoamines améliorent l'état dépressif des patients atteints de troubles de l'humeur [167, 170]. L'effet thérapeutique des antidépresseurs n'est pas immédiat. En effet, même si l'effet sur le système monoaminergique se fait rapidement suivant la prise de médicaments, il faut au moins 4 à 6 semaines de traitement pour ressentir un effet antidépresseur et diminuer les symptômes de dépression. De plus, les traitements sont efficaces chez 60 à 70 % des patients seulement [163]. Finalement, diverses études sont en accord que la déplétion en monoamine n'affecte pas les patients sains, mais seulement ceux ayant une histoire familiale de dépression [171]. L'hypothèse monoaminergique ne suffit donc pas à elle seule pour expliquer la neurobiologie de la dépression.

2. **Hypothèse neurotrophique de la dépression [172]**

La seconde hypothèse suggère un déficit en facteurs neurotrophiques. Celle-ci est appuyée par l'observation post-mortem de plusieurs études qui remarquent une diminution du volume ou une perte neuronale et gliale du cortex préfrontal (CPF) et de l'hippocampe [173, 174] associée à une atrophie chez des patients dépressifs résultant certainement d'une diminution en facteurs neurotrophiques [175-177]. Les neurotrophines comprennent les neurotrophines 3 et 4 [178], le «*nerve growth factor*» (NGF) [179] et le «*brain-derived neurotrophic factor*» (BDNF) [180]. Ce sont des molécules essentielles pour la survie, la croissance neuronale, la plasticité synaptique et le processus de mémorisation. Plus spécialement, le BDNF semble impliqué dans les troubles psychiatriques et particulièrement dans la dépression [172]. Chez un individu sans dépression celui-ci est exprimé de manière abondante dans l'hippocampe et le cortex préfrontal [148] alors que chez les patients dépressifs une diminution de BDNF a été démontrée dans ces régions, dans le liquide céphalorachidien ainsi que dans le plasma [181]. Ces mêmes diminutions sont observées dans le plasma de rats dépressifs [182]. De plus, des souris knock-out (KO) pour le gène du BDNF présentent aussi des comportements dépressifs [183] suggérant l'importance de BDNF dans un bon équilibre psychique.

La synthèse de BDNF se fait via l'activation de son récepteur tyrosine kinase B (TrkB) qui permet l'activation de facteurs de transcription tels que CREB (*cAMP response element-binding*), qui cause la relâche de facteurs de croissance dont le BDNF [184]. Chez les patients dépressifs une diminution de l'activité du récepteur TrkB a été observée [181] laquelle pourrait refléter un manque de support trophique donc une diminution de la croissance et de la survie neuronale [184, 185]. Le récepteur TrkB est à la base de trois voies de signalisation (Figure 6) : 1/ La première étant la voie PI3K/Akt qui maintient la survie cellulaire, 2/ la seconde comprend la voie des MAPK, ou «*Extracellular signal Related Kinase*» (ERK1/2) responsable de la croissance cellulaire. 3/ Enfin, la voie liée à la phospholipase C (PLC) qui active la Protéine Kinase C (PKC) et provoque une augmentation du Ca^{2+} qui stimule ensuite la calmoduline puis CREB. Ce dernier mécanisme semble impliqué dans l'effet des antidépresseurs. Un traitement chronique par différentes classes d'antidépresseurs augmente l'expression de BDNF chez le

rat via l'augmentation de CREB en plus d'un accroissement du volume de l'hippocampe [186, 187]. Ce phénomène pourrait expliquer en partie l'effet thérapeutique tardif des antidépresseurs (figure 7). Des études post-mortem ont démontré qu'il y a une augmentation du taux de BDNF dans le CPF et l'hippocampe après un traitement chronique par des antidépresseurs [188]. De plus, certaines études ont observé une augmentation de BDNF plasmatique chez des patients traités à long terme avec des antidépresseurs [175, 189]. Ces observations ont été validées à la suite d'une méta-analyse qui démontra que le niveau plasmatique de BDNF est bien diminué chez les patients dépressifs et qu'un traitement antidépresseur restaure ce niveau [190].

Dans notre modèle de dépression post-infarctus du myocarde chez le rat, nous avons observé que 2 jours après l'infarctus du myocarde, le taux de BDNF était diminué dans le CPF et l'amygdale médiane et que sept jours après l'infarctus du myocarde, il y avait toujours une diminution de BDNF dans le CPF [191].

Les raisons de la diminution des monoamines et des facteurs neurotrophiques dans la dépression restent encore incertaines, mais l'hypothèse de la suractivation de l'axe HHS, l'hypothèse inflammatoire et l'hypothèse apoptotique développées ci-dessous pourraient expliquer en partie ces observations.

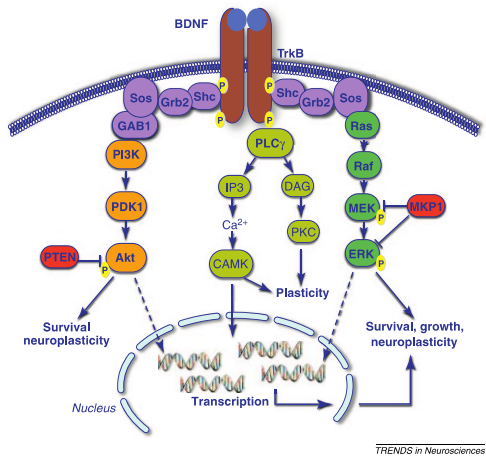


Figure 8 : Voies de signalisation impliquées dans la liaison de BDNF sur son récepteur TrkB. 1/ La première étant la voie de la phosphatidyl-inositol 3-kinase qui active une serine/thréonine kinase Akt (PI3K/Akt) qui maintient la survie cellulaire, 2/ La seconde comprend la voie des MAPK, ou Extracellular signal Related Kinase (ERK1/2) responsable de la croissance cellulaire, 3/ la voie liée à la phospholipase C (PLC) qui active la Protéine Kinase C (PKC) et provoque une augmentation du Ca²⁺ qui stimule la Calmoduline puis CREB. (D’après Dunam et coll 2012) [192].

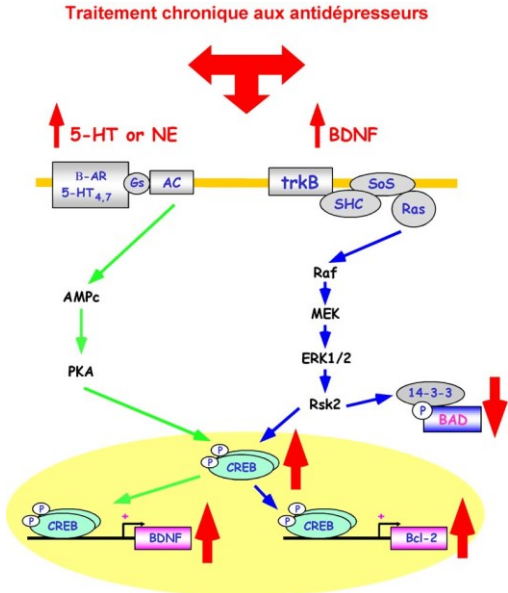


Figure 9 : Mécanisme d’action de la latence des antidépresseurs. L’augmentation des monoamines provoquée par un traitement antidépresseur provoque une augmentation de l’activation de la voie de l’AMPc, suivi de la phosphorylation de CREB menant à l’expression génique de BDNF. BDNF se lie ensuite à son récepteur TrkB initiant la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la survie et la neuroplasticité, dont le BDNF lui-même, une augmentation de Bcl-2 et une diminution de BAD.

3. Hypothèse du dysfonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien (HHS) [193-195]

L'axe HHS est un système physiologique constitué de trois importantes structures de l'organisme (l'hypothalamus, l'hypophyse et les glandes surrénales). Ce système est identifié comme le principal système de réponse au stress. Il régule un grand nombre de fonctions centrales et périphériques telles que la respiration, l'appétit, la régulation cardiovasculaire, les comportements et les troubles de l'humeur.

En réponse à un stress, les circuits corticolimbiques sont stimulés et relâchent de la NA, de la 5-HT qui vont activer les neurones du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (NPV). Ce noyau possède deux types de neurones : les neurones magnocellulaires sécrétant dans la circulation sanguine l'ocytocine et les neurones parvocellulaires sécrétant dans le système porte hypothalamo-hypophysaire, le corticotropin-released factor (CRF) et la vasopressine. Le CRF en agissant directement sur l'adénohypophyse (hypophyse antérieure) active la sécrétion de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) dans la circulation sanguine. La vasopressine, co-sécrétée agit en synergie avec le CRF en tant que sécrétagogue de l'ACTH. Finalement, l'ACTH va stimuler la sécrétion de glucocorticoïdes (GC) (le cortisol chez l'homme et la corticostérone chez les rongeurs) et de catécholamines par les glandes surrénales dans la circulation sanguine. Il a été démontré dans de nombreuses études que les patients diagnostiqués de dépression présentent une augmentation des taux plasmatiques et urinaires de cortisol, ainsi qu'une élévation marquée des concentrations de CRF dans le liquide céphalorachidien [196, 197].

Les GC, agissent sur des organes et au niveau cérébral particulièrement dans les structures du système limbique [193, 194] via les récepteurs de types I : minéralocorticoïdes [198], et les récepteurs de type II : glucocorticoïdes (GR) [199]. Dans les conditions physiologiques normales, lorsque la synthèse de GC est faible, ceux-ci se fixent sur le récepteur MR qui possède une plus grande affinité pour le cortisol que les GR et exerce en retour, une boucle de rétrocontrôle négatif sur l'hypothalamus, l'hypophyse, l'amygdale, l'hippocampe, et le CPF et

diminue ainsi leur sécrétion subséquente. Par contre, lors d'un stress chronique, la sécrétion de GC augmente et leur action peut devenir mal adaptative et se fixer sur le récepteur GR dans le but de contrôler et réduire l'hyper activation de l'axe HHS. Une dérégulation du nombre ou de l'activité des récepteurs GR semble être responsable de l'altération du rétrocontrôle négatif et ainsi favoriser les troubles dépressifs par une augmentation de cortisol. Une diminution des récepteurs GR a été observée dans le cerveau d'humain post-mortem, associée à une augmentation de glucocorticoïdes et des catécholamines [193, 200].

De plus, il a été démontré que l'hyperactivité de l'axe HHS est associée à une diminution de BDNF au niveau de l'hippocampe et pourrait alors être en partie responsable des symptômes de dépression en diminuant la neurogenèse [201].

Ensuite, il existe certaines évidences qui démontrent que l'un des mécanismes reliant les maladies cardiovasculaires et la dépression est l'élévation de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque induite par la NA [202]. En effet, la dépression est associée à une élévation de l'activité du système nerveux sympathique qui en retour pourrait conduire à la dérégulation cardiovasculaire [203]. Et inversement, lors d'un infarctus du myocarde il y a une augmentation marquée de NA périphérique pouvant agir sur les récepteurs β -adrénergiques et augmenter le rythme cardiaque et la contractilité pouvant favoriser un état dépressif via l'activation de l'axe HHS.

Le système immunitaire peut aussi venir influencer l'axe HHS. Les cytokines pro-inflammatoires pourraient venir favoriser l'hyperactivité de l'HHS en augmentant la résistance aux glucocorticoïdes de par une diminution de la fonction du récepteur GR ou une diminution de la sensibilité aux GC via l'activation de la voie P38 MAPK [204] ce qui diminue finalement l'action des hormones sur les tissus cibles et donc pourrait en retour favoriser l'activation du système immunitaire. Cela devient alors une boucle sans fin [205].

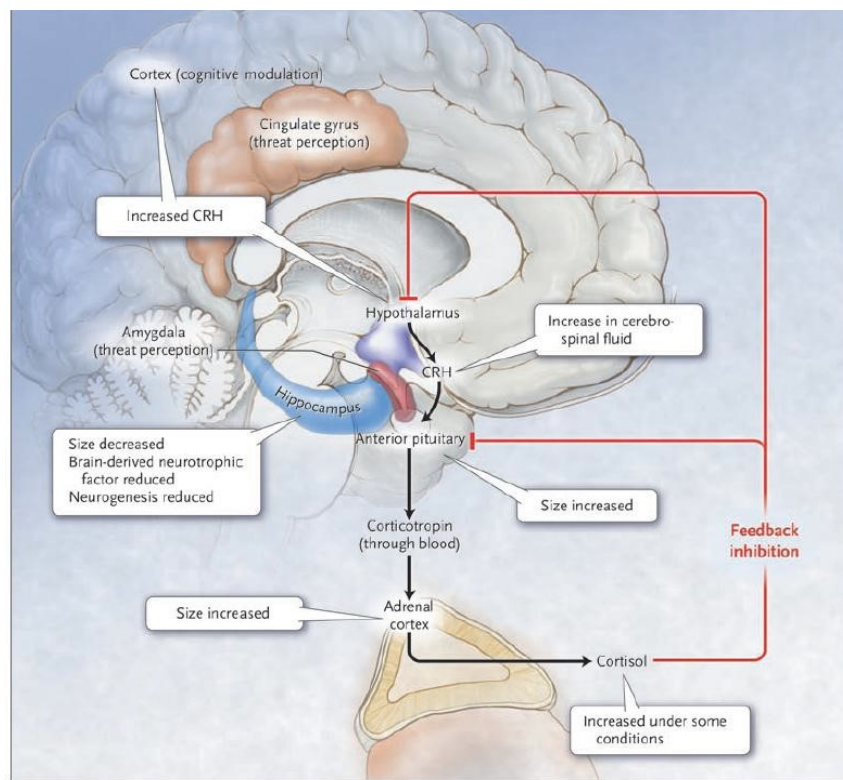


Figure 10 : L’axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien (HHS) dans la dépression. Les flèches noires représentent le mécanisme d’activation de l’axe HHS. À la suite d’un événement stressant perçu et identifié par les structures corticolimbiques, il va y avoir relâche de CRH par l’hypothalamus qui va activer l’hypophyse et libérer l’ACTH dans le système circulatoire. Cette dernière va permettre aux glandes surrénales de sécréter le cortisol. Les lignes rouges représentent le mécanisme de rétroaction négative. Elles indiquent que le cortisol, en retour, supprime la libération du CRF et du cortisol lui-même via l’hypophyse antérieure, l’hypothalamus, mais aussi d’autres structures corticolimbiques. Cependant, chez les patients atteints de dépression, les niveaux de cortisol, CRH et ACTH sont fréquemment augmentés. De plus une dérégulation des récepteurs aux glucocorticoïdes est souvent retrouvée. (D’après Belmaker et Agam, 2008) [206].

4. Hypothèse inflammatoire [131] [207]

La relation entre le système immunitaire et la dépression a fait l’objet d’un certain nombre de travaux démontrant que la dépression majeure contribue à l’affaiblissement de la fonction immunitaire [208]. Réciproquement, plusieurs études suggèrent qu’un dysfonctionnement ou une activation du système immunitaire et de la réponse inflammatoire provoquent de nombreux phénomènes pouvant jouer un rôle dans l’étiologie de la dépression [3, 209, 210]. En effet, des troubles dépressifs sont observés dans un grand nombre de pathologies comprenant une composante inflammatoire, dont le diabète, l’athérosclérose, les cancers, les

maladies coronariennes [211]. Aussi, il a été observé une augmentation des symptômes de dépression chez des patients atteints de cancers ou d'hépatite C soumis à une immunothérapie, ainsi que chez des personnes administré par de fortes doses d'interféron- α (IFN- α) [212-215]. Ces symptômes comprennent de l'irritabilité, un déficit d'attention, de l'anorexie, de la fatigue ainsi qu'un retard psychomoteur qui miment un état dépressif [216]. Par ailleurs, plusieurs études ont démontré que la dérégulation du système immunitaire précède le développement de la dépression [217]. L'administration d'infliximab ou d'éta nercept (des inhibiteurs de TNF- α) chez des patients souffrants de maladies auto-immunes diminue les symptômes de dépression avant même d'améliorer les effets reliés à la maladie [218, 219]. D'autre part, la paroxétine, inhibiteur sélectif de la recapture de la 5-HT administrée en prévention avant le début de l'immunothérapie prévient le développement des symptômes dépressifs [212]. De même, les symptômes de dépression provoqués par l'administration d'IFN- α peuvent être renversés par un traitement antidépresseur par la fluoxétine [220].

L'hypothèse de l'implication d'une défaillance du système immunitaire dans la dépression a donc émergé. Cette hypothèse est vérifiée directement sur des sujets dépressifs. Plusieurs études ont aussi observé une augmentation de la concentration de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF- α) dans le plasma et le liquide céphalorachidien de patients dépressifs [221-223]. Cette augmentation de cytokines pro-inflammatoires étant corrélée à la sévérité des troubles de l'humeur, étaye ainsi une théorie plus spécifique de l'inflammation : il y aurait une relation entre l'augmentation de cytokines inflammatoires et la pathogenèse de la dépression majeure.

IV. Infarctus du myocarde, cytokines et dépression

1. Généralité sur les cytokines

Les cytokines sont impliquées dans plusieurs processus de développement au cours de l'embryogenèse. Elles maintiennent également l'homéostasie et jouent un rôle central dans l'induction de la réponse inflammatoire en contrôlant l'inflammation. Les cytokines sont des petites molécules solubles : entre 8 et 30 kDa. Elles peuvent être classées en tant que protéines, glycoprotéines, ou peptides et sont produites par un grand nombre de types cellulaires périphériques différents incluant les macrophages et monocytes, les cellules endothéliales et les fibroblastes. Les cytokines sont aussi exprimées par le système nerveux central (SNC) et sont ainsi impliquées dans la modulation de plusieurs fonctions neurologiques [224]. Leur action est dite pléiotrope (elles agissent sur plusieurs types de cibles cellulaires) et redondante (plusieurs cytokines peuvent avoir les mêmes effets sur une même cellule). Elles se fixent sur des récepteurs membranaires spécifiques dont l'expression est souvent régulée par les cytokines elles-mêmes et ont une fonction autocrine (sur la cellule productrice), juxtacrine (sur des cellules en contact), paracrine (sur des cellules proches) ou encore endocrine (sur des cellules distantes, via la circulation sanguine).

2. Classification des cytokines [225]

Les cytokines peuvent être classées selon plusieurs critères tels que leurs activités biologiques, leurs sources cellulaires, ou leurs effets physiologiques. Nous mentionnons ici les plus populaires, car aujourd'hui nous connaissons plus de 400 cytokines différentes.

Tout d'abord une classification selon leurs activités biologiques :

- Les interférons sont impliqués dans les réponses antivirales et comprenant l'IFN- α , - β et - γ .

- Les interleukines (IL-1 β à IL-12) qui ont des fonctions différentes selon l'interleukine, mais ont une action généralement autocrine.
- Les chimiokines recrutent, activent et retiennent les leucocytes au site local de l'inflammation.
- La famille du facteur de nécrose tumorale (TNF- α et - β) a des effets cytotoxiques, ou antinéoplasiques.
- Les facteurs de croissance tumorale (TGF) comprenant le TGF- β 1, β 2 et β 3, les protéines morphogénétiques de l'os ou « Bone morphogenetic proteins (BMPs) ».
- Les « colony stimulating factors » (CSF).

Dépendamment de leur source cellulaire, les cytokines sont classées en :

- Cytokines de type 1 : produites par les cellules Th1 (Th pour T-helper) et constitue la voie cellulaire, comprennent l'IL-2, l'IL-12, l'IFN- γ , et le TNF- α . Les cytokines Th1 tendent à piloter des réponses inflammatoires cellulaires incluant l'activation des macrophages.
- Cytokines de type 2 : produites par les cellules Th2 et comprenant l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-10 et l'IL-13 favorisent la maturation des lymphocytes B et sont souvent retrouvées dans les allergies et l'asthme.

Finalement, dans ce mémoire il est important de retenir que les cytokines peuvent être simplement divisées en trois groupes selon leur effet physiologique :

- Le premier groupe implique les cytokines inflammatoires responsables de la réponse inflammatoire, telles que IL-1 β , IL-6 and IL-12, tumor necrosis factor TNF- α et IFN- γ ,
- Le second groupe correspond aux cytokines anti-inflammatoires qui regroupent IL-10, receptor antagonist of IL-1 β (IL-1Ra), IL-4, IL-13 and TGF- α servant à amortir la réponse immunitaire et d'entraver la production de cytokines supplémentaires [226].
- Le troisième groupe regroupe les cytokines hématopoïétiques incluant l'IL-3, l'IL-5, G-CSF qui sont impliquées dans la stimulation et la différenciation des cellules progénitrices.

3. Sources de cytokines

En réponse à des déclencheurs d'inflammation, le système immunitaire inné produit les cytokines principalement par les macrophages et les cellules Th1 dans le but de s'en

débarasser. Dans certaines conditions pathologiques comme l'infarctus du myocarde (détaillé dans le premier chapitre), les cardiomyocytes, les cellules endothéliales, les fibroblastes cardiaques, les monocytes et macrophages relâchent aussi des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α , IL-6 et IL-1 β [64, 68]. De plus, la brèche de l'endothélium provoque une activation plaquettaire de par l'activation de la thrombine et les plaquettes produisent IL-1 β amplifiant alors le processus inflammatoire [227].

En plus de leur sécrétion par des cellules du système périphérique, les cytokines (essentiellement, IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6 et TNF- α) et ainsi que leurs récepteurs sont constitutivement produits dans le système nerveux central principalement par les neurones, les astrocytes et la microglie [224, 228]. Leur rôle est encore discuté dans la littérature, mais ils contribuent certainement au développement neuronal, à la synaptogenèse et la réparation tissulaire ainsi qu'à la plasticité synaptique [229, 230]. La production de cytokine a été retrouvée dans plusieurs régions du cerveau incluant les régions circumventriculaires, le cervelet et les régions du système limbique tel que l'hypothalamus, hippocampe, ou encore les ganglions de la base [225, 231]. Lors d'une inflammation, la synthèse des cytokines pro-inflammatoires par les astrocytes, la microglie, les oligodendrocytes et les neurones est augmentée pouvant amener à une neuroinflammation provoquant de nombreuses altérations dans le SNC [232].

4. Effets neurobiologiques des cytokines pro-inflammatoires [233, 234]

Tout d'abord, lors d'une infection aiguë, les cytokines sont responsables de l'apparition des symptômes non spécifiques de la maladie comme la fièvre, la fatigue, l'apathie, les difficultés à se concentrer, la perte d'appétit, l'anhédonie [217, 235, 236]. L'ensemble de ces modifications représente un état motivationnel appelé comportement de maladie (sickness behavior) semblable aux symptômes de la dépression, mais est cependant de courte durée à ne pas confondre avec une dépression majeure [237]. Lors d'une inflammation chronique, l'augmentation de la concentration en cytokines pro-inflammatoires semble provoquer des

dommages neurochimiques, neuroendocriniens, neuroimmunitaires, au niveau du cerveau faisant évoluer l'état de comportement de maladie à une maladie neurobiologique : la dépression majeure [237, 238]. En effet, comme nous venons de le démontrer, dans certaines pathologies inflammatoires chroniques, où il y a une augmentation systémique accrue de cytokines pro-inflammatoires, celles-ci semblent être responsables de dommage au niveau du système nerveux central incluant les symptômes de dépression [207, 239]. De même chez les rongeurs, après administration de cytokines pro-inflammatoires ou de LPS les animaux développent des comportements de dépression similaires aux symptômes de la dépression chez l'Homme dont la diminution de l'appétit, le retrait social, la détresse comportementale, et les troubles du sommeil [217, 236]. De même chez l'Homme, il a été démontré qu'un traitement chronique par différents antidépresseurs tels que l'imipramine ou la fluoxétine atténue ou renverse les symptômes de dépression engendrés par l'administration de LPS [7, 217]. Enfin, certaines études ont montré que les antidépresseurs diminuent la concentration des cytokines pro-inflammatoires [217, 240]. Ensuite, chez les patients dépressifs sans maladie inflammatoire plusieurs études ont aussi noté une augmentation plasmatique des prostaglandines E_2 (PGE_2), des protéines du complément, des protéines de la phase aiguë et des cytokines pro-inflammatoires d'IL-1 β , du TNF- α et d'IFN- α [3, 4, 241] [242, 243]. Ces données nous permettent de confirmer qu'il existe bien une relation entre l'augmentation périphérique de cytokines proinflammatoires et les symptômes de dépression.

Finalement, les récepteurs des cytokines ont été retrouvés dans différentes régions du système limbique. Par exemple, les récepteurs de IL-1 β ont été retrouvés sur les neurones et les cellules gliales de l'hypothalamus et l'hippocampe, ceux de IL-6 dans l'hippocampe, l'hypothalamus, le gyrus dentelé (GD) [244] et les récepteurs du TNF- α , ont été retrouvés dans l'hippocampe, l'amygdale, et les noyaux de la base [228, 245]. Les cytokines peuvent ainsi via leurs récepteurs affecter le SNC en provoquant une neuroinflammation et des altérations neuroendocriniennes ou neurochimiques.

A. Dérégulation de l'axe HHS [246, 247]

Il est admis depuis quelques années qu'une inflammation chronique est accompagnée d'une suractivation de l'axe HHS qui, elle, est suspectée d'engendrer des symptômes de dépression. L'augmentation d'ACTH et de cortisol plasmatique à la suite de l'administration d'IFN- α chez des patients cancéreux précède l'apparition de symptômes de dépression [248]. D'autres études chez le rat avaient déjà démontré qu'IL-1 β , IL-6, et TNF- α augmentent les taux de CRF, d'ACTH et de corticostérone plasmatique [249, 250].

Biochimiquement, les cytokines pro-inflammatoires agissent sur l'axe HHS via la libération de GC dans la circulation sanguine et altèrent le mécanisme de régulation négative [251-254]. En effet, les cytokines pro-inflammatoires sont responsables d'une diminution de la fonction et de la sensibilité des récepteurs GR [193]. Elles agissent sur la translocation du récepteur GR ou sur la transcription des gènes induits par la translocation du récepteur sur le noyau et résultent en une dérégulation de la production de cytokines.

B. Altération du système monoaminergique

Les cytokines ont aussi des effets sur la neurotransmission monoaminergique (5H-T, NA et DA) en agissant sur la synthèse, la relâche et la recapture de ces neurotransmetteurs [255, 256]. L'administration de cytokines telles qu'IL-1 β , IL-6, TNF- α et IL-2 chez les rongeurs induit une activation des systèmes 5-HT, NA, et DA dans différentes régions du système limbique dont l'hypothalamus, l'hippocampe ou le CPF [252, 257, 258]. Par exemple, l'administration d'IL-1 β à des rongeurs est accompagnée d'une augmentation de 5-hydroxy-indoleacetic acid (5-HIAA) et de 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) dans plusieurs structures du système limbique [259, 260].

D'autres études ont quant à elles montré que les cytokines pro-inflammatoires augmentent la régulation du transporteur de la sérotonine [261] induisant une plus grande recapture de 5-HT et produisant alors une déplétion en 5-HT [262, 263].

En plus d'agir directement sur la neurotransmission monoaminergique, les cytokines pro-inflammatoires agissent sur le système kinurénine via l'enzyme indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) qui constitue un lien entre le système 5-HT et l'inflammation [264]. La voie de la kinurénine est la voie majoritaire de métabolisation non protéique du tryptophane (Trp) [265]. Elle convertit le Trp en acide kinurénique et acide quinoléique via l'enzyme IDO qui, à terme, produit la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) essentielle à la formation d'ATP. Cette enzyme est fortement exprimée dans les monocytes, les macrophages les cellules endothéliales cérébrales, les astrocytes, la microglie et les neurones [266, 267]. L'activité de l'IDO n'est pas influencée par le Trp, mais est principalement induite par les cytokines pro-inflammatoires. En condition physiopathologique inflammatoire, l'activation de l'IDO par les cytokines pro-inflammatoires provoque une diminution de la biodisponibilité du Trp pour la Trp hydroxylase qui métabolise le Trp en 5-HT. Ceci résulte en une diminution de 5-HT pouvant être à l'origine de la perturbation du métabolisme de la 5-HT et ainsi participer à la mise en place des symptômes de dépression [207, 268]

En plus de diminuer la concentration de Trp nécessaire à la biosynthèse de 5-HT, l'activation de l'IDO provoque la formation majoritaire des composés neurotoxiques, dont l'acide quinoléique [234, 268, 269]. L'acide quinoléique induit une excitotoxicité en provoquant une augmentation de la relâche de glutamate [234]. Le glutamate alors en trop grande concentration, se lie aux récepteurs NMDA des neurones et provoquent une entrée massive d'ions calcium. Le calcium active à son tour un certain nombre d'enzymes comme la phospholipase C, ou la calpaïne. Cette dernière serait responsable de l'apoptose via une inhibition des facteurs anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl XL et l'activation de la caspase 3. L'inhibition pharmacologique de l'IDO prévient la mise en place des symptômes de dépression induits lors d'une stimulation aiguë par le lipopolysaccharide (LPS) chez le rat certainement via l'augmentation de la concentration de 5-HT et via l'inhibition de l'apoptose [270].

C. Initiation de l'apoptose

Depuis une quinzaine d'années environ il a été admis que, chez l'Homme, la dépression est associée à une augmentation de l'apoptose dans certaines régions du système limbique [271, 272]. Nous avons vu que chez les patients dépressifs il y a une diminution des facteurs neurotrophiques tel le BDNF. Ces facteurs neurotrophiques sont essentiels aux neurones afin de proliférer, migrer, se différencier, mais aussi pour maintenir le fonctionnement et l'intégrité neuronale à l'âge adulte. Un manque de facteurs neurotrophiques pourrait mener à l'apoptose neuronale [184]. En 2004, Parissis et coll ont observé une augmentation du taux de cytokines pro-inflammatoires plasmatique ainsi que des médiateurs de l'apoptose chez des patients dépressifs avec problème cardiaque versus des patients sans dépression [273].

Dans notre modèle d'infarctus du myocarde chez le rat, nous avons reporté la présence de comportements de dépression deux semaines après l'infarctus du myocarde en plus d'une augmentation de l'apoptose dans certaines régions du système limbique [161, 191]. Plus précisément, il existe une cinétique d'activation de l'apoptose dans les différentes régions du système limbique : 24h après le début de la reperfusion, la région CA1 de l'hippocampe ainsi que l'amygdale médiane démontre de l'apoptose via l'activation de la caspase-3 suivie de l'amygdale latérale le deuxième jour puis à 7 jours le cortex préfrontal [191]. D'autres études nous ont permis de montrer que la région du gyrus dentelé était aussi touchée par l'apoptose [274]. La voie d'induction de l'apoptose de ces régions semble être différente. En effet, la région CA1 (région sensible à l'hypoxie) démontre une augmentation de l'activité de la caspase-9 qui traduit l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose certainement provoquée par l'ischémie. Puis les régions de l'amygdale, et l'hippocampe sont activées via la caspase-8 traduisant l'activation de la voie extrinsèque certainement par les cytokines pro-inflammatoires. En effet, l'administration intrapéritonéale de la pentoxifylline (un inhibiteur de la synthèse des cytokines) donnée avant l'ischémie diminue l'apoptose dans l'amygdale [90] en plus des comportements de dépression après un infarctus du myocarde chez le rat [275]. De la même façon, en plus de diminuer les symptômes de dépression, l'escitalopram a aussi

permis de diminuer le TNF- α , l'IL-1 β et la PGE₂ ainsi que l'apoptose dans le système limbique chez les rats ayant eu un infarctus du myocarde [276].

Puis il a été démontré que le TNF- α est augmenté dans le système limbique après un infarctus du myocarde et participerait à la mort par apoptose dans le système limbique après un infarctus du myocarde chez le rat via l'activation des récepteurs de mort de la voie extrinsèque d'apoptose [65]. TNF- α bloque aussi l'activité du transporteur au glutamate, potentialisant ainsi la neurotoxicité [277]. Le blocage du récepteur TNF- α avant le début de l'ischémie par l'administration d'un récepteur soluble TNFR1 humanisé, diminue significativement l'apoptose après 15 min et 72 heures de reperfusion dans le système limbique en particulier dans les régions GD, CA1, de l'hippocampe [73]. Cette étude est en accord avec la découverte que des rats knock-out du récepteur TNF- α sont exempts de phénotype dépressif [278].

D. Altération de la neurogenèse

Les cytokines pro-inflammatoires seraient en partie responsables de la perturbation du processus de neurogenèse et de plasticité synaptique [279-282] et seraient alors capables de provoquer un déclin cognitif, un symptôme très courant lors de dépression majeure [283]. Une atrophie de l'amygdale, du cortex préfrontal et de l'hippocampe suite à une diminution de la neurogenèse ou à l'augmentation de l'apoptose dans ces régions essentielles aux processus cognitifs fait partie des signes neuropathologiques décrits dans la dépression [284].

Comme mentionné précédemment, les récepteurs aux cytokines sont fortement exprimés dans les régions impliquées dans l'apprentissage et la mémoire telles que l'hippocampe.

L'augmentation de l'IL-1 β à la suite de l'injection de LPS dans l'hippocampe de rat serait reliée à des problèmes de cognitions [285]. L'IL-1 β a aussi des effets anti-neurogéniques, elle diminue la production de BDNF et bloque la prolifération cellulaire [286].

De nombreuses études faites chez l'animal ou sur des modèles *in vitro* humains ont démontré que l'IL-1 β bloque la neurogenèse dans l'hippocampe [233, 282, 287, 288]. Puis, l'IL-1 β et le

TNF- α inhibent la potentialisation à long terme (PLT), phénomène de sensibilisation synaptique associé aux mécanismes d'apprentissage et de mémorisation [281, 289-291] et diminue les performances dans les tests comportementaux cognitifs nécessitant un hippocampe intact chez les animaux [292, 293].

Ensuite, il a été démontré que l'IL-1 β diminue les fonctions cholinergiques dans les démences [208]. Enfin, une concentration plasmatique de l'IL-6 élevée chez l'Homme est corrélée positivement à un plus grand déficit cognitif [281, 294].

Finalement, les cytokines pro-inflammatoires provoquent une activation glutamatergique, ainsi qu'une induction de l'apoptose dans les astrocytes et les oligodendrocytes. Elles induisent aussi une dérégulation de la microglie, de l'interaction neuronale et des fonctions cognitives [234].

5. Effets neurobiologiques des cytokines anti-inflammatoires

Le rapport cytokines inflammatoires / cytokines anti-inflammatoires pourrait être un acteur plus précis dans la physiopathologie de la dépression. En effet, certaines études tendent à démontrer que l'augmentation des cytokines inflammatoires ne serait pas la seule cause pouvant favoriser un état dépressif et que certains patients dépressifs ne montrent aucune augmentation de cytokines pro-inflammatoires [223, 226].

Sutcgil et coll ont observé une diminution de la cytokine anti-inflammatoire IL-4 en plus d'une augmentation des cytokines inflammatoires IL-2, IL-12, et TNF- α chez des patients dépressifs [295]. Dans cette étude, le traitement par l'antidépresseur sertraline diminue IL-2 et augmente IL-4.

Plusieurs autres études tendent à démontrer que les antidépresseurs diminuent le rapport cytokines inflammatoires / cytokines anti-inflammatoires [296]. Les antidépresseurs (imipramine, venlafaxine, L-5 hydroxytryptophane et fluoxétine) diminuent IFN- γ et augmentent IL-10 chez des patients dépressifs [297].

IL-4 a des propriétés anti-inflammatoires : elle diminue l'expression de la cyclo-oxygénase 2 (COX2), principale voie de formation de la PGE₂ [298]. IL-4 est aussi neuroprotectrice, elle prévient l'augmentation d'IL-1 β dans l'hippocampe de rats à la suite d'une injection de LPS [299]. IL-4 agit également en diminuant l'activité de l'IDO [300], ce qui permettrait d'augmenter la synthèse de sérotonine, essentielle dans l'amélioration de l'humeur dans la dépression. IL-4 diminue aussi l'activité du transporteur de la sérotonine (SERT) ce qui diminue donc la recapture de la sérotonine et ainsi augmente sa disponibilité [301]. De plus, IL-4 diminue la neuro-inflammation provoquée par l'activation de la microglie en favorisant la mort de celles-ci [302]. Finalement, Derecki et coll. ont montré que les rats KO IL-4^{-/-} manifestaient de gros problèmes d'apprentissage en plus d'une diminution de l'expression du (BDNF) dans l'hippocampe [303]. Le BDNF semble être impliqué dans les problèmes de cognitions en favorisant la potentialisation à long terme des synapses excitatrices de l'hippocampe [304]. Un grand nombre d'études suggère que le traitement par des antidépresseurs aurait des effets neuroprotecteurs en augmentant la prolifération cellulaire ainsi que la survie de nouvelles cellules dans l'hippocampe via la neurogenèse médiée par le BDNF [305, 306].

D'après certaines données, il semble qu'une augmentation du rapport cytokines inflammatoires/cytokines anti-inflammatoires serait prédictif de troubles de l'humeur et l'effet anti-inflammatoire des antidépresseurs pourrait en partie être médié via l'augmentation des cytokines anti-inflammatoires.

V. Communication système immunitaire / système nerveux central

Suite au lien entre cytokines pro-inflammatoires et symptômes de dépression, nous avons émis l'hypothèse que dans notre modèle, l'infarctus du myocarde, la synthèse de cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α) pro-inflammatoires par les macrophages, les cardiomyocytes, et l'endothélium entraîne certainement la dérégulation du système limbique pouvant mener aux comportements de dépression chez le rat [307]. Cependant, la barrière hématoencéphalique (BHE) et ses jonctions serrées ne permettent normalement pas le passage de grosses molécules comme les cytokines. Alors, comment expliquer que les cytokines périphériques peuvent altérer le SNC ?

Les cytokines pro-inflammatoires sont constitutivement synthétisées dans le cerveau par les neurones et les cellules gliales [244, 308]. Cependant lors d'une inflammation ou lors d'une lésion d'un tissu périphérique (l'infarctus du myocarde par exemple), les cytokines sécrétées par le site inflammatoire vont provoquer l'augmentation de la synthèse des cytokines dans le SNC par les astrocytes et la microglie [239, 309, 310]. Le mécanisme par lequel les cytokines périphériques provoquent l'augmentation de la synthèse des cytokines dans le SNC n'est pas bien connu, mais différents mécanismes semblent concourir à ce phénomène.

1. Passage via les organes circumventriculaires

La première hypothèse constitue la voie humorale [311]. Les cytokines pro-inflammatoires périphériques peuvent être passivement transportées du sang vers le plexus choroïde via certaines régions du cerveau appelées organes circumventriculaires tels l'organe subfornical, la glande pinéale, ou encore l'organe vasculaire de la lamina terminalis situés en dehors de la barrière hématoencéphalique (BHE) [207, 311-313]. De plus, dans certaines conditions telles les maladies neurodégénératives ou même l'infarctus du myocarde, les cytokines pro-

inflammatoires pourraient augmenter la perméabilité de la BHE et faciliter ainsi le passage des cytokines de la périphérie vers l'encéphale [314, 315].

2. *Passage via des transporteurs d'influx saturable*

La seconde hypothèse propose que de façon similaire aux nutriments, les cytokines diffusent la BHE via des transporteurs à influx saturables [225, 311, 316]. Ce mécanisme de transport actif pourrait être une importante voie d'entrée des cytokines lorsque les concentrations de ces dernières sont très élevées [317]. Après avoir pénétré le parenchyme cérébral soit via la voie humorale ou via un transporteur d'influx, les cytokines peuvent alors se fixer sur leur récepteur spécifique présent à la surface des cellules microgliales ou des astrocytes conduisant à leur activation et provoquant alors la neuroinflammation via la production de cytokines, de prostaglandines ou de ROS [318-320].

3. *Transduction du signal via les cellules endothéliales*

Une troisième hypothèse suggère que les cytokines pro-inflammatoires périphériques induisent l'expression de COX-2 à la surface des cellules vasculaires endothéliales qui tapissent l'encéphale et provoque l'induction de la PGE₂ [321, 322]. La PGE₂ qui est liposoluble pourra traverser la BHE pour initier la neuro-inflammation via 3 voies : 1/ l'activation de NF-κB [323]. Il a été démontré qu'une inactivation de la voie de signalisation NF-κB diminue les comportements de dépression causé par l'injection de IL-1β [324] 2/ L'activation de la microglie et les astrocytes [310, 311] 3/ Provoque la mort par apoptose suite à l'activation des caspases [325]. D'ailleurs, des résultats antérieurs de notre laboratoire ont démontré une augmentation de l'apoptose après l'infarctus du myocarde dans les régions de l'amygdale et de l'hippocampe [160], correspondant à des régions où la proportion des récepteurs de PGE₂ est élevée [326]. Aussi dans une autre étude, nous avons pu observer une augmentation de la PGE₂ dans les régions où il y avait une augmentation de l'apoptose [90]. De plus, l'inhibition de

la COX-2 par le célécoxib après le début de la reperfusion dans notre modèle d'infarctus du myocarde prévient l'apoptose dans l'amygdale. [327].

4. Passage via le nerf vague

Finalement, la quatrième hypothèse représente la voie nerveuse qui constitue une voie de communication entre le système immunitaire et le SNC et met en jeu l'activation périphérique du nerf vague [311].

En effet, 90 % des fibres du nerf vague sont afférentes. Elles ont aussi pour fonction de signaler au SNC les phénomènes inflammatoires qui se produisent à la périphérie. 10 % des fibres sont efférentes et permettent au cerveau de moduler les sécrétions du tube digestif et la motricité de différents organes qu'il innerve (cœur, poumon, intestin grêle, côlon). Le centre de convergence de ces afférences est le noyau du tractus solitaire (NTS) qui projette ensuite les informations vers le noyau parabrachial, qui lui projette vers le système limbique [328, 329].

L'origine apparente du nerf vague se situe entre le nerf glossopharyngien et le nerf spinal (nerf accessoire). Il quitte ensuite le crâne via le foramen jugulaire pour cheminer dans le cou entre les artères carotides et la veine jugulaire. C'est au niveau du thorax que le nerf vague se ramifie et forme le nerf vague gauche et droit qui vont aller à destination des plexus : plexus cardiaque, plexus pulmonaire, et plexus œsophagien. Les différents plexus innervent ensuite les organes périphériques (figure 10). Chez le rat, il a été démontré que le nerf vague innerve l'ensemble du côlon [330]. En revanche, chez l'Homme, l'innervation vagale du côlon est encore discutée. Certaines études indiquent que l'innervation colique par le nerf vague se termine au niveau du côlon transverse, l'innervation parasympathique serait ensuite réalisée par le nerf parasympathique sacré, provenant de la moelle épinière sacrée [331].

Les fonctions du nerf vague sont multiples : c'est à la fois un nerf moteur, permettant aux muscles lisses de se contracter ou de se relâcher. Au niveau du cœur, le nerf vague a un effet chronotrope négative alors qu'au niveau du tube digestif, il a plutôt un effet stimulant puisqu'il

va augmenter le péristaltisme et la sécrétion gastrique. Le nerf vague est sensoriel, permettant de ressentir des sensations dans les zones qu'il traverse. Il est également végétatif, il permet la transmission des influx nerveux responsables d'activités autonomes de nombreux organes. Enfin, le nerf vague joue aussi un rôle anti-inflammatoire grâce au réflexe vago-vagal. À la suite d'une inflammation au niveau périphérique, les afférences vagales vont envoyer l'information au niveau du NTS, qui lui en retour active les efférences vagales et provoque au niveau périphérique une libération d'acétylcholine (ACH) qui aura pour conséquence la réduction de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires.

Finalement, le nerf vague serait aussi responsable en partie de véhiculer l'inflammation. Tout d'abord, il a été démontré que les neurones sensoriels du nerf vague au niveau des afférences expriment les récepteurs aux cytokines [332, 333]. Puis une vagotomie sous- diaphragmatique entraîne une suppression de l'activation des neurones responsables de la sécrétion du CRF au niveau du NPV et donc une diminution de l'activation de l'axe corticotrope [334, 335]. Puis récemment, Francis et coll ont observé que la destruction du nerf vague afférent par du phénol 30 min avant le début de l'ischémie chez le rat, prévient l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires dans le cerveau [336]. Enfin des études immunohistochimiques ont permis de révéler l'induction de cFos dans les ganglions sensoriels vagales après infection locale intestinale avec campylobacter jejuni, traduisant l'activation du nerf vague après une infection [337].

Puisque l'infarctus du myocarde implique un processus inflammatoire important au niveau du cœur lui-même et au niveau périphérique, il est concevable que les cytokines produites à ce niveau stimulent les afférences vagales via l'activation des récepteurs aux cytokines et puissent induire la production cérébrale de cytokines au niveau du NTS avec qui il forme le complexe vagal dorsal. Le NTS projette les informations au niveau du système limbique et plus particulièrement au niveau de l'amygdale et du NPV [338]. La neuro-inflammation pourrait provoquer des modifications biochimiques de ces structures et engendrer les symptômes de dépression [339, 340] (figure 9). En effet, des animaux vagotomisés présentent une diminution des comportements de dépression induite par l'injection de LPS [341].

Une étude toutefois démontre que la vagotomie subdiaphragmatique abolit seulement une partie de la réponse inflammatoire neuronale [342] ce qui sous-entend que l'augmentation de la synthèse des cytokines pro-inflammatoire dans le SNC après une inflammation systémique se produit via différente voie d'activation.

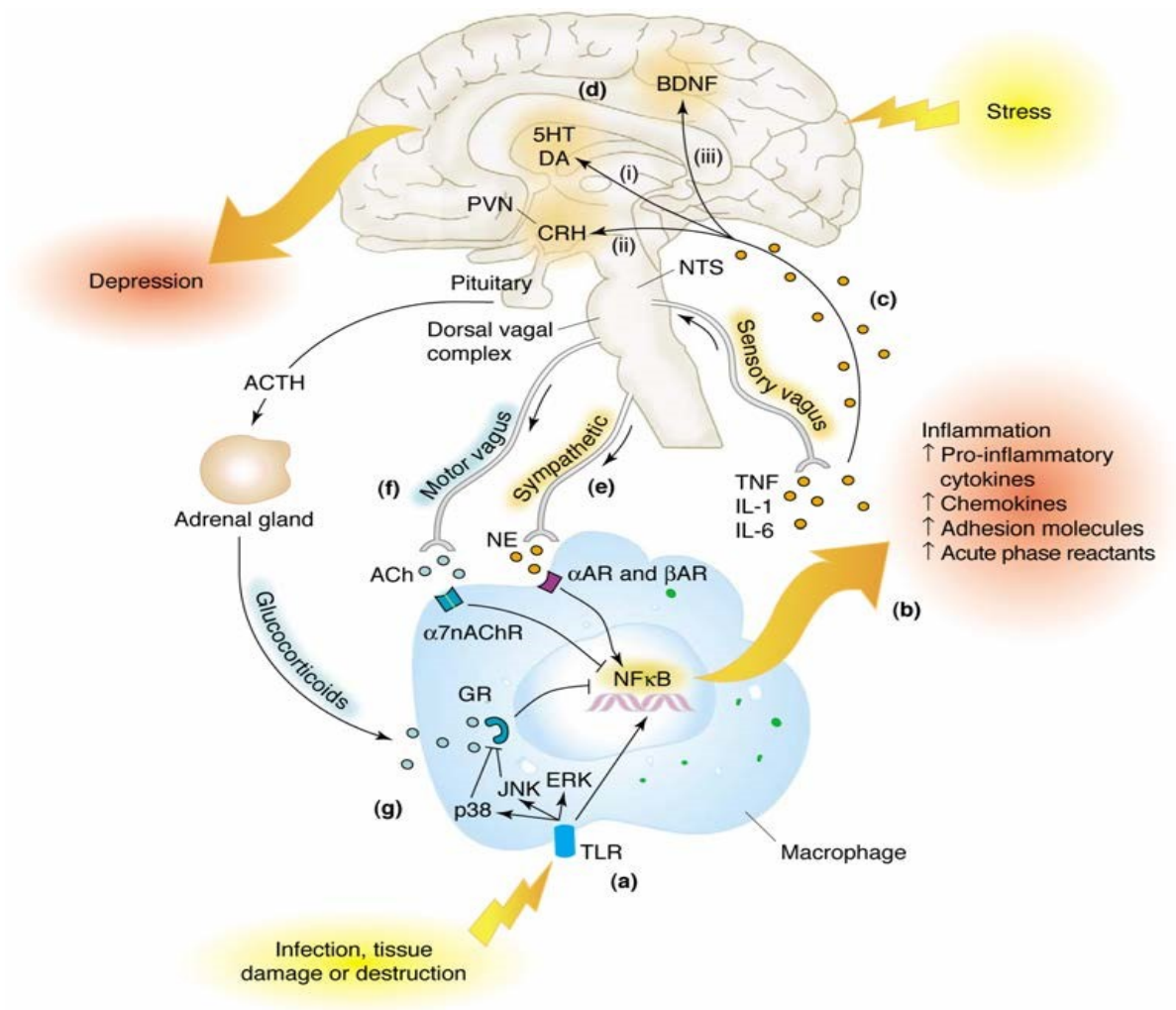


Figure 11 : Schéma intégratif des interactions système immunitaire et le système nerveux central (d'après Raison et coll, 2006). Lors d'un Infarctus du myocarde, la nécrose des cellules myocardiques provoque une augmentation de marqueurs inflammatoires pouvant activer les macrophages via les récepteurs TLR (a). Les macrophages une fois activés vont sécréter des cytokines inflammatoires dont TNF-alpha, IL-1b (b) qui vont via les organes circumventriculaire (c) ou le nerf vague (sensory vagus) se rendre dans le système nerveux central et provoquer la dérégulation de plusieurs systèmes responsable des troubles de la dépression (d). Les cytokines vont altérer les systèmes monoaminergiques (i), provoquer une baisse de la production de BDNF diminuant ainsi la plasticité synaptique (iii), et favoriser l'activation du système HHS en augmentant la production de CRH (cortico release hormon) dans le noyu périventriculaire (ii). [205].

VI. Communication intestin-cerveau

Il existe un lien bidirectionnel entre les pathologies inflammatoires de l'intestin et les troubles neurologiques. D'une part, le stress et l'anxiété prédisposent aux pathologies gastro-intestinales [343, 344]. Par exemple, suite à un stress chronique chez le rat, une dysfonction de la muqueuse intestinale a été observée [345] pouvant favoriser le développement de maladies gastro-intestinales [346]. Puis, dans un autre modèle de stress chez l'animal : la séparation maternelle, il a été démontré une augmentation de cytokines pro-inflammatoires associée au passage d'entérobactéries à travers la muqueuse pouvant être à l'origine de la dysfonction de la barrière intestinale [347]. Inversement, le syndrome du côlon irritable est associé à des troubles gastro-intestinaux, mais aussi accompagné de symptômes dépressifs [348]. Une suractivation de l'axe HHS ainsi qu'une production plus importante de cytokines inflammatoires a été observée chez les patients souffrant du syndrome du côlon irritable pouvant favorisant un état dépressif reflétant le lien entre l'intestin et le cerveau [349]. De nombreuses études animales démontrent qu'une infection par des micro-organismes engendre des comportements de dépression [350-352].

Chez la souris, il a été démontré qu'une infection de l'intestin par le parasite *Trichuris muris* résulte d'une augmentation des comportements anxieux ainsi que d'une diminution de BDNF dans la région de l'hippocampe des animaux [352]. Dans notre modèle d'infarctus du myocarde chez le rat, nous avons observé qu'en plus d'induire une perturbation de la BHE, de l'apoptose dans le système limbique et des comportements de dépression chez le rat, l'infarctus du myocarde provoque aussi une augmentation de la perméabilité intestinale [9, 10]. Nous suspectons que les cytokines pro-inflammatoires pourraient être à l'origine de cette perturbation. En effet, les cytokines pro-inflammatoires ouvrent les jonctions serrées, augmentent la perméabilité paracellulaire et affectent l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale [353, 354].

Le mécanisme de la communication entre l'intestin et le SNC est mal connu. Physiologiquement, l'hypothèse la plus probable repose sur une communication via le nerf

vague. En effet, le tube digestif est doué d'autonomie, mais il communique aussi avec le cerveau selon une relation bidirectionnelle. Cette communication se fait par l'intermédiaire du système nerveux autonome (SNA), représenté par le SNA sympathique et parasympathique, représenté par les nerfs splanchniques, les nerfs pneumogastriques (nerf vague) et le parasympathique sacré via le système nerveux entérique (SNE) qui tapisse la paroi de l'intestin, et par les organes circumventriculaires situés en dehors de la BHE. Le SNE contient plus de neurones que le SNC, sécrète au moins 20 neurotransmetteurs identiques à ceux que l'on trouve dans le SNC, produit 70 à 85 % des cellules immunitaires de l'organisme et héberge 100000 milliards de bactéries. Il est composé d'une part d'une innervation intrinsèque constituée de deux plexus : 1/ Le plexus myentérique (ou plexus d'Auerbach) entre les couches longitudinales et circulaire du muscle lisse, qui est le plus volumineux et qui contrôle principalement le système digestif via l'activité motrice, et le péristaltisme 2/ Le plexus sous-muqueux (plexus de Meissner) qui se situe dans la couche sous-muqueuse et qui est impliqué dans les sécrétions gastro-intestinales et la vascularisation. D'autre part, le SNE comprend une innervation extrinsèque dont les neurones et les corps cellulaires projettent en dehors de la paroi intestinale vers le SNA en relation avec le SNC. La communication bidirectionnelle entre ces deux organes serait donc dépendante du nerf vague. Plusieurs études confirment cette hypothèse. Dans un modèle d'infection gastro-intestinale engendrée par la bactérie *Campylobacter Jejuni*, les souris développent des comportements de dépression et d'anxiété [355, 356]. Des études ont démontré que les neurones des ganglions entériques expriment les récepteurs à $IL-1\beta$ et induisent l'expression de c-Fos après une infection gastro-intestinale laissant suggérer que les cytokines pro-inflammatoires seraient les messagers dans l'information entre l'intestin et le SNC [351, 357, 358]. Toutefois, les études de Lyne et coll, ainsi que celle de Goehler et coll, suggèrent que les troubles du comportement débutent avant le début de l'inflammation en réponse à l'infection et que le nerf vague médierait l'information infectieuse intestinale au SNC [337].

Nous pensons alors que le dysfonctionnement intestinal retrouvé après un infarctus du myocarde pourrait être relié aux comportements de dépression chez les rats et prévenir ces troubles intestinaux pourrait en partie améliorer l'état dépressif du rat.

VII. Traitement de la dépression post-infarctus du myocarde

1. *Les probiotiques*

Le premier concept de probiotiques a été abordé par le biologiste Ilya Ilitch Metchnikov. En effet, en 1908, le détenteur du Prix Nobel en médecine pour ses travaux sur la phagocytose avait émis comme hypothèse que les bactéries lactiques, retrouvées dans les produits laitiers fermentés, notamment dans le lait et le yogourt, pouvaient prolonger la vie. En 1965, Lilly et Stillwell sont les premiers à utiliser le mot « probiotiques » pour décrire des substances sécrétées par un organisme dans le but de stimuler la croissance d'un autre organisme [359]. À partir de ce moment, le terme, fût modifiée plusieurs fois pour que finalement en 2001 l'Organisation mondiale de la santé et l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) leurs donnent une définition officielle comme étant des « micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels ». La colonisation de la flore intestinale débute dès la naissance et progresse jusqu'à l'âge de 2 ans. Chez une personne en santé, on devrait retrouver dans sa flore du système digestif plus de 400 espèces de bactéries. De manière générale, les probiotiques modifient l'équilibre du microbiote intestinal en diminuant les bactéries potentiellement pathogènes et en augmentant les bactéries anaérobiques ayant des propriétés bénéfiques pour l'humain [360]. Les probiotiques les plus connus et les plus utilisés aujourd'hui sont les *Saccharomyces boulardii* (levure de bière) les *Bifidobacterium* (bifidobactéries) et les *Lactobacillus* (provenant de la fermentation d'acide lactique). Les probiotiques occupent un rôle important dans le métabolisme, la normalisation du microbiote intestinal, le maintien de la barrière intestinale et dans l'immunomodulation [361, 362]. De plus, ils auraient un effet antidépresseur.

Tout d'abord, leur rôle dans le métabolisme provient de la nature de ces bactéries. Les *Lactobacillus* sont des bactéries lactiques; impliquées dans la fermentation du lactose en acide lactique, tandis que les *Bifidobacterium* sont impliqués dans la fermentation hétérolactique

(la production de lactate, de dioxyde de carbone et de l'éthanol à partir du glucose). Ils stimulent la synthèse de la vitamine K (rôle important dans la coagulation sanguine), la dégradation des lipides et l'absorption du lactose.

Ensuite, les probiotiques jouent un rôle important dans la normalisation de la composition du microbiote intestinal [363]. En situation de stress, l'homéostasie intestinale est bouleversée et le microbiote intestinal se retrouve en dysbiose. Il est alors souvent retrouvé une augmentation des bactéries pathogènes en dépit des bactéries commensales favorisant des infections. Les probiotiques aident à retrouver cette homéostasie intestinale, en antagonisant les bactéries pathogènes par une diminution du pH luminal, en inhibant l'adhérence et la translocation des bactéries ou encore en produisant des substances antibactériennes comme les bactériocines et défensines.

Les probiotiques agissent aussi en améliorant la barrière de la muqueuse intestinale en favorisant la production de mucus, ou via les changements d'expressions des protéines impliquées dans les jonctions serrées de l'épithélium [364, 365] .

Puis les probiotiques ont des capacités immunomodulatrices. Ils agissent sur la balance des cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. Ils sont capables alors de renforcer le système immunitaire via la diminution de cytokines pro-inflammatoire (Il-12 et TNF- α) et la synthèse de cytokines anti-inflammatoire (Il-10) [366-368]. Les probiotiques sont aussi capables d'inhiber la voie NF-kB synonyme d'inflammation [353]. Enfin, un autre effet des probiotiques sur les cellules épithéliales provient de leur faculté à activer les Toll-like receptors (TLR), comme les TLR-2 et TLR-4 ce qui prévient les dommages de la barrière intestinale [369-371].

Finalement, les probiotiques auraient des effets anti-apoptotiques leur conférant un effet antidépresseur. Récemment dans notre laboratoire il a été démontré que l'administration d'une combinaison de probiotiques *Lactobacillus Helveticus* R0052 et *Bifidobacterium longum* R0175 en prophylaxie permet de diminuer l'apoptose dans certaines régions du système limbique à la suite d'un infarctus du myocarde chez le rat [372]. De plus, des résultats

de notre laboratoire ont montré, avec ces mêmes souches bactériennes données sept jours précédents l'infarctus du myocarde puis continué sept jours après l'infarctus du myocarde, une amélioration du comportement de dépression ainsi que le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale [10]. D'autres auteurs étudiant la dépression ont aussi démontré le potentiel antidépresseur des probiotiques : en effet, les probiotiques se sont montrés efficaces à une atténuation de la réponse pro-inflammatoire et à une augmentation des Trp dans le plasma chez les rats ayant subi un stress [348]. De plus, d'un point de vue, clinique les probiotiques se sont montrés efficaces dans plusieurs études : par exemple, ils ont permis d'améliorer le moral de patient atteint d'arthrite et ont permis de diminuer les effets secondaires des antidépresseurs [373, 374].

2. Les antidépresseurs

Chez les patients présentant une comorbidité dépressive et cardiovasculaire, les praticiens doivent être très prudents dans le choix du traitement à cause des risques cardiovasculaires adverses associés à la dépression. De plus, certains antidépresseurs notamment les antidépresseurs tricycliques (TCA) et les inhibiteurs de la monoamine-oxydase (IMAO) présentent de nombreux effets cardiovasculaires indésirables [375]. D'autres médicaments comme le bupropion, et la venlafaxine ont été associés à une augmentation de la pression artérielle [376, 377].

La mirtazapine cependant, un antidépresseur non tricyclique qui augmente la noradrénaline et la sérotonine avec des propriétés α_2 -antagonistes, n'a démontré aucun effet cardiotoxique et semble être bien toléré après un infarctus du myocarde. [378]

Le traitement de choix actuel après un infarctus du myocarde, repose sur la classe des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS). Ces molécules ne démontrent pas d'effets cardiovasculaires indésirables [148] et diminuent le risque de morbidité et mortalité cardiovasculaire [379].

Toutefois, un tel traitement chez les patients souffrant à la fois de dépression et de maladies cardiovasculaires ne semble pas améliorer le pronostic cardiovasculaire [380].

Jusqu'à preuve que certaines molécules peuvent affecter positivement la résilience cardiaque il est bon de traiter les patients dépressifs après un évènement cardiovasculaire, car le traitement améliore considérablement leur qualité de vie.

Biochimiquement, il a été clairement établi que les antidépresseurs exercent des effets neurotrophiques ainsi qu'une action anti-apoptotique en agissant sur Bcl-2 et la caspase-3 [381]. En effet, les antidépresseurs comme la fluoxétine (ISRS) la moclobemide (IMAO) ou la quetiapine (anti-psychotique atypique) augmentent Bcl-2 [382] sur des cultures cellulaires hippocampiques ou chez des souris transgéniques dans la maladie d'alzheimer [383]. D'autres études ont déjà démontré que les antidépresseurs présentent des effets neuroprotecteurs en augmentant Bcl-2 [384-386]. Chez l'Homme, l'apoptose induite par une diminution de Bcl2 est corrélée à une réduction de volume de certaines régions cérébrales et une perte de neurones et cellules gliales dans ces régions [387]. Ensuite, en plus de diminuer l'apoptose dans le GD, la Fluoxétine augmente la prolifération cellulaire dans un modèle de dépression de séparation maternelle chez le rat [388]. Une autre étude démontre que la fluoxétine agit aussi via un effet anti-inflammatoire en diminuant la mort par apoptose dans le GD produite par l'acide kaïnique [389] suggérant encore un lien entre apoptose et cytokines pro-inflammatoires.

Dans notre modèle d'infarctus du myocarde chez le rat, les comportements de dépression ainsi que l'apoptose observés après un l'infarctus du myocarde peuvent être renversés par un traitement par différents antidépresseurs : désipramine [390], sertraline [391], escitalopram [276]. Plus précisément, il a été démontré que l'infarctus du myocarde augmente le rapport Bax:Bcl-2 comparé aux rats témoins dans les régions du cortex préfrontal et l'hypothalamus. De plus, il existe une corrélation entre le rapport Bax/Bcl-2 et l'immobilité dans le test de nage forcée. Plus le rapport Bax/Bcl-2 augmente, plus les rats sont immobiles [390]. En plus de diminuer les comportements de dépression et l'apoptose, l'escitalopram a aussi permis de

diminuer TNF- α , IL-1 β et PGE₂ [276] appuyant l'hypothèse du lien entre les cytokines, l'apoptose et les comportements de dépression après un infarctus du myocarde chez le rat.

VIII. Conclusion du chapitre 2

La dépression est une pathologie psychiatrique multifactorielle associant symptômes psychiques et somatiques. Ces symptômes semblent être le reflet de perturbations neurobiologiques telles qu'une dérégulation du système monoaminergique, une altération de la plasticité cérébrale, une hyper-activation de l'axe HHS, ainsi qu'une perturbation du système immunitaire. De plus en plus d'études tendent à démontrer que le système immunitaire et plus particulièrement les cytokines pro-inflammatoires jouent un rôle important dans l'apparition des symptômes de dépression associés à un état inflammatoire. Dans notre modèle, l'inflammation engendrée par l'infarctus du myocarde pourrait favoriser l'hyper-activation de l'axe HHS via l'augmentation de noradrénaline circulante ou via l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires. Ces dernières seraient responsables de la mise en place des symptômes de dépression via différents mécanismes tels que : 1/ L'augmentation de la concentration de cortisol 2/ Une dérégulation du système monoaminergique 3/une diminution de facteur neurotrophique (BDNF) 4/ et encore via l'initiation de l'apoptose dans le système limbique par l'activation de la voie NF-kB ou l'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose caspase dépendante.

Les cytokines pro-inflammatoires périphériques pourraient envahir le système nerveux central via différentes voies d'entrées encore discutées dans la littérature 1/ Entrée via la voie humorale. 2/ Entrée grâce à des transporteurs d'influx saturable 3/ Activation de la synthèse des PG par les cellules endothéliales vasculaires suite à la liaison des cytokines sur des récepteurs spécifiques situés sur ces cellules endothéliales 4/ Passage via le nerf vague qui constitue la voie nerveuse.

Un traitement antidépresseur serait un traitement de choix pour soigner voir prévenir les lésions dans le système limbique après un infarctus du myocarde ainsi que les symptômes de dépression. Cependant, beaucoup de personnes ne répondent pas au traitement par les antidépresseurs, et le traitement n'est pas toujours bien toléré. Étant donné le lien entre le système nerveux central et le système nerveux entérique, les probiotiques, par leurs actions

sur le maintien de la barrière intestinale et le maintien de la balance cytokines anti-inflammatoires / cytokines pro-inflammatoires ainsi que leur action anti-apoptotique leur confère certainement un bon pouvoir antidépresseur naturel.

Chapitre III. Démarches expérimentales

Afin d'éviter les redondances, voici un résumé des méthodes expérimentales utilisées tout au long des travaux de cette thèse.

Nous avons utilisé des rats mâles adultes d'environ 350g de souche Sprague-Dawley provenant de chez Charles Rivers (St-Constant, Québec, Canada). Ces rats ont été gardés en cage individuelle sans enrichissement de milieu à une température constante de 22 degrés Celsius et d'humidité de 40-50%. La nourriture et l'eau étaient disponibles *ad libitum*.

Après trois jours d'acclimatation, nous avons provoqué un infarctus du myocarde par l'occlusion de l'artère coronaire gauche pendant 40 minutes, suivi d'une reperfusion de 3 jours pour l'étude I et III, de 2 semaines et 4 mois pour l'étude II. Les rats témoins ont subi la même chirurgie sans occlusion. Le traitement pharmacologique par la desvenlafaxine (Pfizer, Canada) dans les études I et II a été administré directement 5 min après le début de la reperfusion par voie sous-cutanée (3 mg/kg) et cela pendant 3 jours chaque matin puis la desvenlafaxine a été mélangée à l'eau jusqu'au jour du sacrifice. Le traitement pharmacologique par les probiotiques L.Helveticus R0052 et B.Longum R0175 (Probio'Stick, de l'Institut Rosell-Lallemand, Montréal, QC, Canada) (109 bactéries quotidiennement) dans l'étude III a été donné dans l'eau des animaux débutant deux semaines avant l'infarctus du myocarde puis jusqu'au jour du sacrifice. À la fin des expériences, les animaux ont été sacrifiés par décapitation. Le cœur a été rapidement excisé pour déterminer la taille de l'infarctus et différentes régions du système limbique ont été prélevées dans les trois études. Des échantillons sanguins ont été prélevés et le plasma a été collecté pour le dosage biochimique des cytokines à trois jours de reperfusion, ainsi que de la corticostérone, les catécholamines et du BDNF à 4 mois de reperfusion.

Les tests biochimiques réalisés à partir des tissus du système limbique comprennent pour les 3 études : l'analyse de l'activité des caspases 3 et 8 (étude I et III) caspases 3, 8 et 6 (étude II) par spectrofluorométrie, ainsi qu'une analyse des cellules TUNEL positives pour l'étude I

seulement. Pour l'étude III, l'analyse des caspases 3 et 8 par spectrofluorométrie a été mesurée dans le petit intestin ainsi qu'une mesure de l'activité des myéloperoxidases dans le petit intestin.

Les tests comportementaux utilisés dans l'étude II à 14 jours de reperfusion ont été le test de socialisation traduisant un retrait social et le test d'évitement passif traduisant une anxiété face à un stimulus aversif. Le test de la nage forcée a été utilisé à 4 mois de reperfusion mettant en exergue la détresse comportementale, et le test de la piscine de Morris permettant de déterminer un problème d'apprentissage d'origine spatiale.

Chapitre IV. Participation et contribution des auteurs

Tout au long des travaux de cette thèse, j'ai contribué à toutes les expériences énumérées ci-dessous.

Chirurgie pour l'induction de l'infarctus du myocarde,

Injection des médicaments,

Surveillance et suivi des animaux postopératoire,

Planification et conduite des tests comportementaux et biochimiques,

Collecte, analyse et interprétation des données recueillies,

Rédaction, révision et correction des manuscrits.

En tant que directeur de cette thèse de doctorat, Dr Guy Rousseau a supervisé les travaux, a participé à l'analyse et l'interprétation des données ainsi qu'à la correction des manuscrits. De ce fait, il est coauteur sénior sur tous les manuscrits issus de cette thèse. Les autres coauteurs ont participé à différentes étapes des expériences et sont présentés dans les différents manuscrits en fonction de leur contribution.

Chapitre V. Premier article scientifique menant à la rédaction de cette thèse

I. Préface

La première étude a conduit à l'article « **Desvenlafaxine reduces apoptosis in amygdala after myocardial infarction** » acceptée dans le journal « *Brain Research Bulletin* ».

II. Objectif

Étudier l'effet de la desvenlafaxine débutant dès le début de la reperfusion sur l'apoptose dans le système limbique après trois jours de reperfusion.

III. Hypothèses

Les cerveaux des rats ayant subi un infarctus du myocarde présentent de l'apoptose dans le système limbique trois jours après reperfusion se traduisant par une augmentation de l'activité des caspases-3 et 8 et de cellules TUNEL positives. L'apoptose est prévenue par un traitement par la desvenlafaxine débutant tout de suite après la reperfusion.

IV. Desvenlafaxine reduces apoptosis in amygdala after myocardial infarction

Mandy Malick^{1,2}, Kim Gilbert^{1,2}, Mathieu Barry¹, Roger Godbout^{1,3}, Guy Rousseau^{1,2}

¹ : Research Center, Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, Montréal, Québec, Canada

² : Department of Pharmacology, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

³ : Department of Psychiatry, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Running Head : Desvenlafaxine in a rat model of post-myocardial infarction depression

Conflicts of interest : This study was funded by Pfizer Canada

Corresponding author :

Guy Rousseau, Ph.D.

Centre de recherche

Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal

5400, boul. Gouin Ouest

Montréal (Québec) Canada H4J 1C5

Telephone: 514-338-2222 Extension 3421

Fax: 514-338-2694

1. Abstract

This study was designed to determine if desvenlafaxine (DV), a serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor, can attenuate apoptosis observed in the limbic system after myocardial infarction (MI). MI was induced in rats by occlusion of the left descending artery for 40 min followed by reperfusion. Another group of sham (control) rats was similarly manipulated, but without occlusion. Half of the full cohort received DV (3 mg/kg/day intraperitoneal), starting 5 min after the onset of reperfusion; the other half received the vehicle (0.5 ml of 0.9% saline). Rats were sacrificed after 3 days for biochemical analyses and MI size measurements. Infarct size was significantly smaller in DV- compared to vehicle-treated rats. At 3 days post-MI, caspase-3 and -8 activities and terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-end labeling-positive cells were decreased in the amygdala of DV-treated rats compared to MI-vehicle controls. No difference was observed between the sham groups. The data indicates that DV given immediately after an acute MI event can reduce MI size and apoptosis in amygdala when measured three days post-MI.

Highlights :

- Apoptosis is observed in amygdala after myocardial infarction
- Infarct size was significantly smaller with Desvenlafaxine as compared to vehicle
- Desvenlafaxine reduces apoptosis in the amygdala following MI

Key Words : Myocardial infarction, desvenlafaxine, reperfusion, apoptosis, caspase-3

2. Introduction

A substantial number of patients present depressive symptoms soon after myocardial infarction (MI)[20], and 15% of them incur major depression[28]. Untreated depression results in 4 times greater risk of cardiac death during the first months post-episode[17], and this increased risk will still be present years after MI[29].

To better understand the mechanism of post-MI depression, we developed a rat model[41] with biochemical and behavioral data. We documented the presence of apoptosis 1 to 14 days after MI, in different regions of the extended limbic system, including the prefrontal cortex, the anterior hypothalamus, the amygdala and the hippocampus [8, 41, 45]. We hypothesized that apoptosis in these structures is due to the inflammatory response induced by MI-dependent release of pro-inflammatory cytokines.

Behavioral tests performed 2 weeks after MI revealed that experimental rats displayed symptoms of depression, including anhedonia (sucrose preference test), behavioral despair (forced swimming test), contextual and emotional memory (passive avoidance step-down test), poor socialization and sleep disorders [4, 5, 19, 46]. Various antidepressants tested in our model, including the tricyclic desipramine and selective serotonin re-uptake inhibitors (SSRIs) [4, 46] were found to reduce early apoptosis in the limbic system and behavioral signs of depression suggesting the validity of this model. In clinical practice, however, the use of tricyclic antidepressants such as desipramine is counter-indicated because of undesirable and severe cardiovascular side-effects[6]. More recently, a study has reported that maprotiline, a selective noradrenaline reuptake blocker antidepressant, presented pro-apoptotic activity [21].

Desvenlafaxine (DV) is a serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor (SNRI) with proven antidepressant properties in humans [14, 30, 37, 40]. Long-term treatment with SNRIs like DV is not accompanied by adverse effects on cardiovascular, cerebrovascular and hepatic functions[2], although worsening of hypertension has been reported in one case[32]. Anti-

apoptotic activity of DV has not been tested yet but a related molecule, venlafaxine, showed anti-apoptotic activity in cultured human brain microvascular endothelial cells[31]. The aim of the present study was thus to test the apoptotic activity of DV in the limbic system of rats following an acute MI and to assess its effect on cardiac tissue.

3. *Materials and Methods*

A. *Experimental series and groups*

All animal care and handling procedures were approved by the Animal Care Committee of Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal Research Center, in accordance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care. A total of 129 adult (10 weeks old), male Sprague-Dawley rats (Charles River, St-Constant, Québec, Canada) were purchased and housed individually under constant temperature (22°C) and humidity (40-50%). Food and water were available ad libitum; the duration of lighting was 12 h, starting at 8:00 a.m.

The rats were randomly assigned to 1 of 4 groups: MI rats with no active post-MI treatment, MI rats treated with DV (Pfizer, Canada) as active post-MI treatment, sham rats with no active treatment, and sham rats treated with DV. Details are given after the section on MI surgical procedures.

B. *MI surgical procedures*

Anesthesia was induced with ketamine/xylazine (50 mg/kg and 5 mg/kg, i.m., respectively) and maintained with 1.5% isoflurane ventilation. ECG and heart rate were monitored during surgery. After left thoracotomy, the left coronary artery was occluded with 4-0 silk suture and plastic snare. Ischemia was confirmed by ECG changes and the presence of epicardial cyanosis. After 40 min of occlusion, the ligature was removed to initiate reperfusion. The first intraperitoneal injection of DV was administered 5 min after the onset of reperfusion. The thorax was closed, and the rats were returned to their cages. Antibiotic (15,000 IU penicillin G,

s.c.) and analgesic (2 mg/kg, 0.2 ml buprenorphine, s.c.) were given to all animals. The animals received a second burprenorphine dose the next morning.

C. Experimental series

DV treatment consisted of 3 mg/kg dissolved in 0.5 ml of 0.9% saline, administered daily via the i.p. route. This dose was chosen because it is intermediate to the one used in humans[15, 25] and the one successfully used in mice[3]. The first injection was given 5 min after the onset of reperfusion and then on each of the next 2 mornings. Rats with no active treatment received daily injections of 0.5 ml of 0.9% saline. Three days after MI surgery, the animals were secured in a cone bag and rapidly decapitated, and the heart was rapidly excised for infarct size measurement (see below). The brain was rapidly placed in a dish standing on crushed ice. Brain regions were identified according to the atlas of Paxinos and Watson [36]: the lateral and medial amygdala (LA, MA) and hippocampus (CA1 and CA3 regions) were dissected out, snap-frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until required.

D. Infarct size and area at risk (AR) measurement.

Immediately upon removal, the heart was washed in saline and the left anterior coronary artery was occluded at the same site as during MI surgery. Two ml of 0.5% Evans Blue was infused through the aorta to delimitate the area at risk (red) from the none-ischemic area (blue). The heart was then frozen at -80°C, and 4 2-mm transverse slices were cut; each slice was stained at 37°C for 5 min in 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride solution (TTC 1%, pH 7.4) to identify areas of necrosis (I). Each slice was carefully drawn on a glass, photocopied and the surface of the different regions (I, AR and LV) were measured. The AR was expressed as a percentage of left ventricle (LV) area ($AR/LV \times 100$). MI size was expressed as the percentage of necrosed AR ($I/AR \times 100$). In terms of appearance, each area was examined according to morphological properties intensified by exposure to TTC: necrotic tissue appeared white

whereas healthy tissue in the AR presented in red. Evans Blue identified areas spared from ischemia (in blue).

E. Biochemical analysis

Apoptosis was measured 3 days after MI.

a. Caspase-3 and -8 activities

Caspase-3 and -8 activities were measured as described previously[22]. Briefly, cytosolic proteins were extracted in lysis buffer (1% Triton X-100, 0.32 M Sucrose, 10 mM Tris (pH 8.0), 5 mM EDTA, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Pepstatin A, 10 µg/ml Aprotinin). Enzymatic reactions were induced in reaction buffer (50 mM Tris (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.1% CHAPS, 1 mM DTT) with 25 µg of proteins and the fluorogenic substrate Ac-DEVD-AMC for caspase-3 and Ac-IETD-AMC for caspase-8 (40 µM). The reactions were incubated at 37°C for 3 h and stopped with the addition of 0.4 M NaOH and 0.4 M glycine buffer. Fluorescence was quantified by spectrofluorometer (Photon Technology International, Lawrenceville, NJ, USA) at excitation wavelength 365 nm and emission wavelength 465 nm for caspase-3 and 430 nm for caspase-8.

b. Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL)

Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-end labeling was undertaken as per Wann et al.[47], in accordance with the manufacturer's protocol (Oncogene, La Jolla, CA, USA). Cryostat sections 10 µ thick of multiple samples from the same group were permeabilized after fixation in paraformaldehyde (4%), rinsing and drying, and labeling reactions were induced for 1.5 h at 37°C after washing. The reactions were stopped, and the samples stained with 1 µg/mL propidium iodide (PI) for 10 min at room temperature to evaluate total number of cells. After 2 washes, they were viewed by Leica epi-illumination microscopy. All sections were first photographed by Leica DFC425C camera with specific filters

to quantify the total number of propidium iodide-positive cells at the same magnification (x400). A second picture was taken with filter to count the total number of TUNEL-positive cells. ImageJ software (version 1.33u) ascertained TUNEL-positive cell number and total cell number. Each region accounted for about 2,500 cells.

F. Statistical analysis

Data are reported as mean (\pm standard error of the mean). MI size and AR were compared by Student's t-test. Biochemical data were subjected to 2-way factorial ANOVA, unless otherwise specified, with MI and treatment serving as factors. If interaction between MI and treatment was significant, simple effects were analyzed according to Field[16]; otherwise, main effects were reported when significant. TUNEL data were evaluated by the Chi-square test, followed by portioning according to Siegel and Castellan [42]. $p < 0.05$ was considered significant.

4. Results

A. Infarct size

No significant group differences were detected for AR, approximating 60% of the LV and indicating that the occlusion site was similar in all groups. Infarct size, expressed as a proportion of necrotic AR ($I/AR * 100$), was significantly reduced in the DV- compared to the vehicle-treated group at 3 days post-MI (Figure 1; $p < 0.05$).

B. Caspase-3

Compared to sham controls, caspase-3 activity in MI rats was significantly increased in the CA1 region (MI factor: CA1 ($F(1,27)4,6$; $p < 0.05$), MA ($F(1,24)10,1$; $p < 0.05$) and LA ($F(1,24)13,4$; $p < 0.05$) (Figure 2). Compared to saline-treated rats, both groups of DV-treated rats (MI and sham) showed lower caspase-3 activity in the LA (treatment factor: $F(1,24)8,4$; $p < 0.05$) and MA ($F(1,24)4,9$; $p < 0.05$) but not in the CA1. Significant MI x DV interaction was observed in the LA ($F(1,24)5,1$; $p < 0.05$), and simple effects indicated that DV significantly reduced caspase-3 activity in MI rats ($F(1,25)7,3$; $p < 0.05$). No difference was observed whatsoever in the CA3 region.

C. Caspase-8

Compared to sham controls, caspase-8 activity was increased in the LA and MA of MI rats (MI factor: LA: $F(1,23)=11.1$; $p < 0.05$; MA: $F(1,21)=9.3$; $p < 0.05$) (Figure 3). DV significantly reduced caspase-8 activity in the same regions (treatment factor: LA: $F(1,23)=4.5$; $p < 0.05$; MA: $F(1,21)=5.1$; $p < 0.05$). No significant interactions in these regions and no significant effects were observed in the hippocampus.

D. TUNEL analysis

TUNEL-positive cells were significantly more abundant in the LA and MA of MI+vehicle-treated rats compared to the other 3 groups ($p < 0.05$) (Table 1). This was reversed by DV compared to Sham-Vehicle. In the CA1, both MI groups (vehicle and DV) had significantly more TUNEL-positive cells compared to the sham groups.

E. Correlation between apoptosis and myocardial infarct size

We tested the possibility of a correlation between caspase activities and myocardial infarction. We found an almost significant correlation between caspase-3 activity in AL and I/AR, $r^2 = 0.27$; $p = 0.059$ (Figure 4). The correlation between other parameters was clearly non-significant.

5. Discussion

The results of the present study indicate that peripheral administration of DV attenuates apoptosis in the limbic system following an acute MI [4, 19, 46]. Unexpectedly, we also found that DV significantly reduced infarct size by 18%, as measured 3 days post-MI.

Our previous studies have disclosed that MI triggers a wave of apoptosis in the limbic system, including the CA1 region of the hippocampus and the amygdala, as early as 1 day post-MI [8, 41, 45]. The present investigation demonstrated definite signs of apoptosis in these structures, 3 days post-MI. As in previous studies [23, 45, 47], we did not find apoptosis in the CA3 region of the hippocampus at 3 days post-MI. In another study [22], however, we observed a small but significant increase in the activity of caspase-8 in the same region without any increase in caspase-3 activity or number of TUNEL-positive cells. These results suggest that, 3 days post-MI, the CA3 region is either at the beginning of the apoptotic process or that the apoptosis is too weak in this region to permit detecting any increase in caspase-3 activity.

The present results also show that DV attenuated apoptosis in the amygdala, but not in the CA1 region of the hippocampus. Indeed, DV reduced caspase-3 and caspase-8 activities as well

as the number of TUNEL-positive cells in the amygdala, indicating that this antidepressant molecule has similar effects to those of SSRIs, such as sertraline[46] and escitalopram[4], after 3 days of post-MI treatment. Reperfusion after acute MI is also linked with increased plasma concentrations of multiple pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β , IL-6, and tumor necrosis factor-alpha (TNF α) [11, 51]. Interestingly, elevated plasma concentrations of IL-1 β , IL-6 and TNF α can induce apoptosis and are coupled with clinical signs of depression [1, 13, 34], which could explain the link between MI and depression. In spite of the dual properties of DV (SSRI and SNRI), we hypothesized that the potential effect of DV on pro-inflammatory cytokines is rather due to the SSRI property of DV instead of the SNRI property. Indeed, as observed by different authors [38, 43], SNRIs seems to have no or minor effect on the production of pro-inflammatory cytokines whereas SSRIs present significant anti-inflammatory activity.

DV, however, had no significant effect on apoptosis in the CA1 region of the hippocampus. As we have suggested previously, the CA1 region is more susceptible to ischemia, and the mechanism responsible for apoptosis is related to its intrinsic pathway, triggered by ischemia, as opposed to the amygdala where apoptosis is related to the extrinsic pathway, triggered by exterior signals[22]. MI seems to be responsible for triggering apoptosis in CA1 whereas other mechanisms, such as the release of pro-inflammatory cytokines, could be the cause of apoptosis observed in the amygdala. Based on the reviewed evidence linking inflammation and apoptosis, we hypothesize that such properties could explain at least partly the anti-apoptotic effects of DV in our model.

The favorable effect of DV, a molecule that inhibits the re-uptake of both serotonin and norepinephrine, on infarct size was unexpected. Since our previous studies with SSRIs such as escitalopram and sertraline [4, 46] have shown no effect on infarct size, we hypothesized that its beneficial action is mainly related to inhibition of norepinephrine re-uptake rather than serotonin. Indeed, even though SSRIs can decrease platelet activation and the development of coronary heart disease[48] and reduce MI risk in the long-term[24], no data prove that SSRIs can reduce MI size, even our own[4, 46]. Richardt et al.[39], however, have reported that desipramine, a tricyclic antidepressant with norepinephrine uptake inhibition properties, has

a dose-related cardioprotective effect on MI size. Moreover, Wu et al.[49] observed that administration of desipramine before ischemia resulted in significant reduction of MI whereas treatment during ischemia had no significant outcome. These authors hypothesized that desipramine could act as a pharmacological pre-conditioning agent to induce cardioprotection. As a matter of fact, the timing of norepinephrine uptake inhibition relative to MI onset is critical for its cardioprotective effect since norepinephrine accumulates in the extracellular space rapidly after ischemia onset [18], which enhances cardiac work[52] and can be harmful to the ischemic myocardium. Indeed, Naumenko et al.[33] observed that desipramine administration at the onset of reperfusion is associated with a significant increase in infarct size. We speculate that DV could have better cardioprotective properties than desipramine, even when treatment is started after the onset of reperfusion. Cardioprotective agents target biochemical pathways such as the reperfusion injury salvage kinase pathway[10] and the survivor activating factor enhancement pathway[27]. The impact of DV on these pathways is unknown, but it has been observed that venlafaxine itself may modulate PI3K/Akt pathway[44] and, thus, could partly explain the beneficial outcome in the present study. According to different studies, activation of Akt leads to the inactivation of different proteins such as caspase-9 or BAD, involved in apoptosis (for review see [9]). Further work is needed to confirm this hypothesis and to determine the mechanism by which DV could activate PI3K/Akt pathway. It should be noted, however, that infarct size usually exhibits 30-40% reduction with cardioprotective agents compared to placebo [7, 26]. The beneficial effect of DV reported in the present study is lower than 20%, and optimal parameters still need to be established.

We observed a correlation trend ($p=0.059$) between infarct size and caspase-3 activity in the lateral amygdala suggesting a link between the two parameters. Other correlation coefficients were clearly non-significant. It could thus be possible that the reduction of infarct size induced by DV contributed to the attenuation of apoptosis observed in the lateral amygdala of the DV-treated group, but not in the other regions where a significant reduction of apoptosis was also observed. Up to now the mechanisms linking MI to apoptosis in the lateral amygdala are unknown but we speculate that they are related to a signal triggered by the ischemic

myocardium reaching the CNS. Indeed, it is known that the amygdala modulates heart rate[50] and heart rate variability [12], suggesting a central link between both tissues. Nervous signal is clearly a potential mechanism but other authors have claimed that heart rate variability can be related to inflammatory biomarkers such as pro-inflammatory cytokines (for review see [35]). Other studies are needed to clarify this relation.

6. Conclusions

DV has no adverse effects on myocardial infarct size in our model, while it reduces apoptosis in the amygdala.

7. Acknowledgments

We thank Caroline Bouchard for her technical support with rat surgeries and for her field expertise as well as Louis Chiocchio for his assistance in animal care. We also thank Pfizer for providing funding and study drug (desvenlafaxine). K.G. holds a Ph.D. studentship from Fonds de recherche du Québec – Santé.

8. Figure legends

Figure 1 : Myocardial infarct size in vehicle- and desvenlafaxine (DV)-treated groups expressed as percentage of the area at risk ($I/AR * 100$). Infarct size was significantly reduced in the DV group ($*p < 0.05$ vs the vehicle group) despite similar AR (expressed as percentage of the left ventricle: $AR/LV * 100$). Results are expressed as mean \pm standard error of the mean ($n=26$ in MI-Veh group and $n=28$ in the MI-DV group).

Figure 2 : Caspase-3 activity in the hippocampus and amygdala, assessed by in vitro spectrofluorescence after 72 h of reperfusion and expressed as percentages of sham+vehicle values. DV: desvenlafaxine; CA1: hippocampal CA1; CA3: hippocampal CA3; MA: medial amygdala; LA: lateral amygdala. * indicates significant difference ($p < 0.05$) for the MI factor in

this region; # denotes significant difference ($p < 0.05$) for the treatment factor in this region; \$ shows a significant interaction and indicates that the caspase-3 activity is higher in this group as compared to the MI-DV group ($p < 0.05$). Results are expressed as mean \pm standard error of the mean (n= 6-7 per group).

Figure 3 : Caspase-8 activity in the amygdala, assessed by in vitro spectrofluorescence after 72 h of reperfusion and expressed as percentage of sham+vehicle values. DV: desvenlafaxine; CA1: hippocampal CA1; CA3: hippocampal CA3; MA: medial amygdala; LA: lateral amygdala. * indicates significant difference ($p < 0.05$) for the MI factor; # denotes significant difference ($p < 0.05$) for the treatment factor. No significant difference was detected in the CA1 and CA3 regions. (n=5/7 per group). Results are expressed as mean \pm standard error of the mean

Figure 4 : Positive correlation between myocardial infarct size ($I/AR * 100$) and caspase-3 activity in the lateral amygdala ($r^2=0.27$; $p = 0.059$). A larger infarct size results in higher casapse-3 activity in the lateral amygdala.

Figure 1

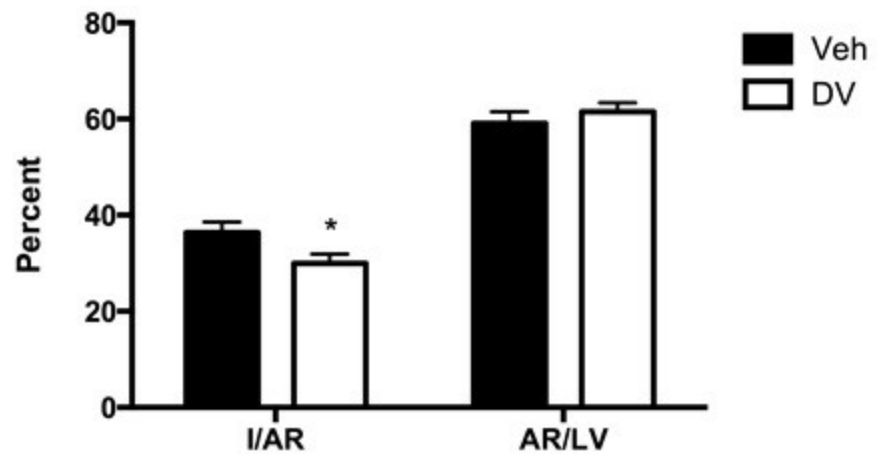


Figure 2

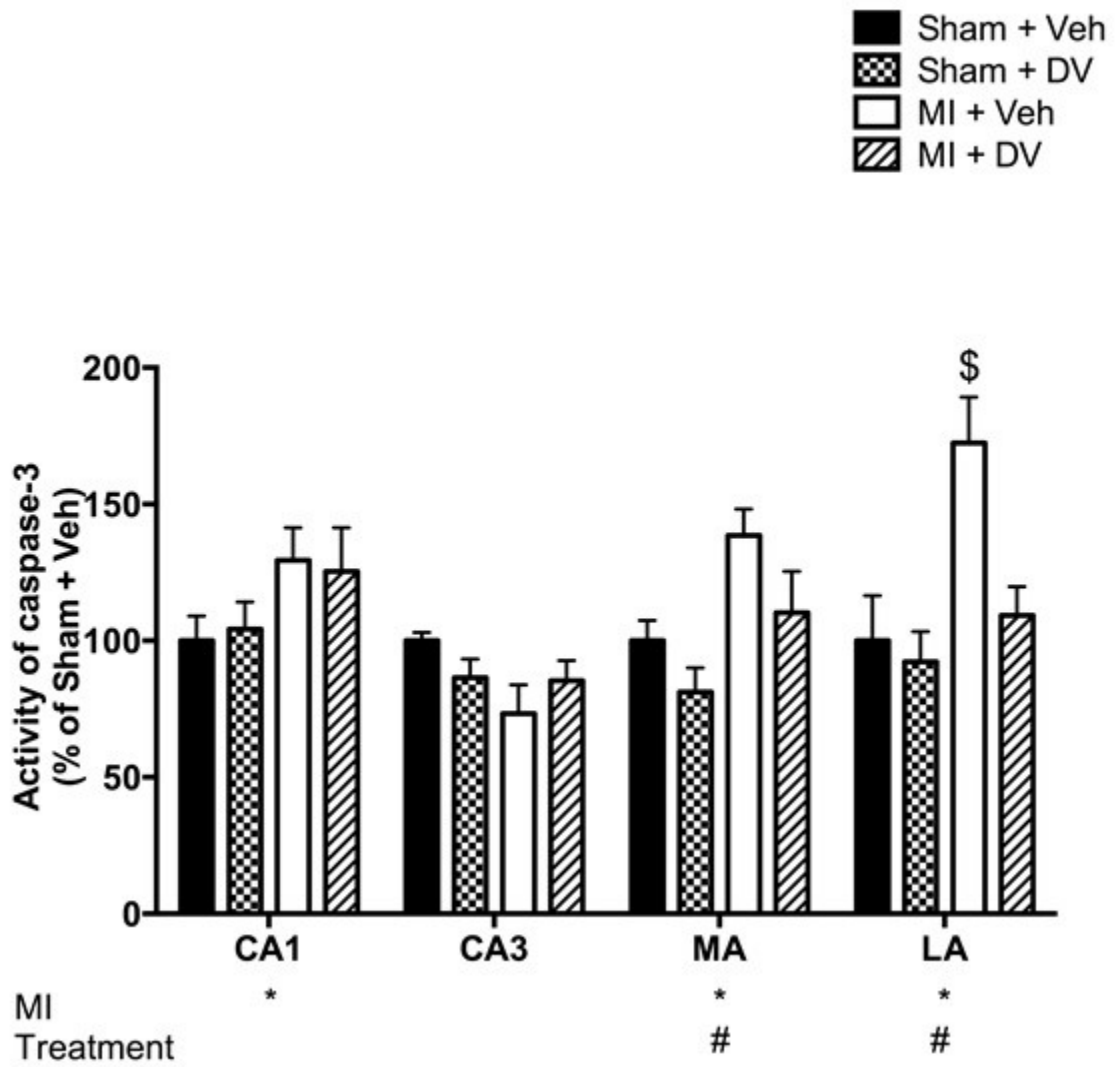


Figure 3

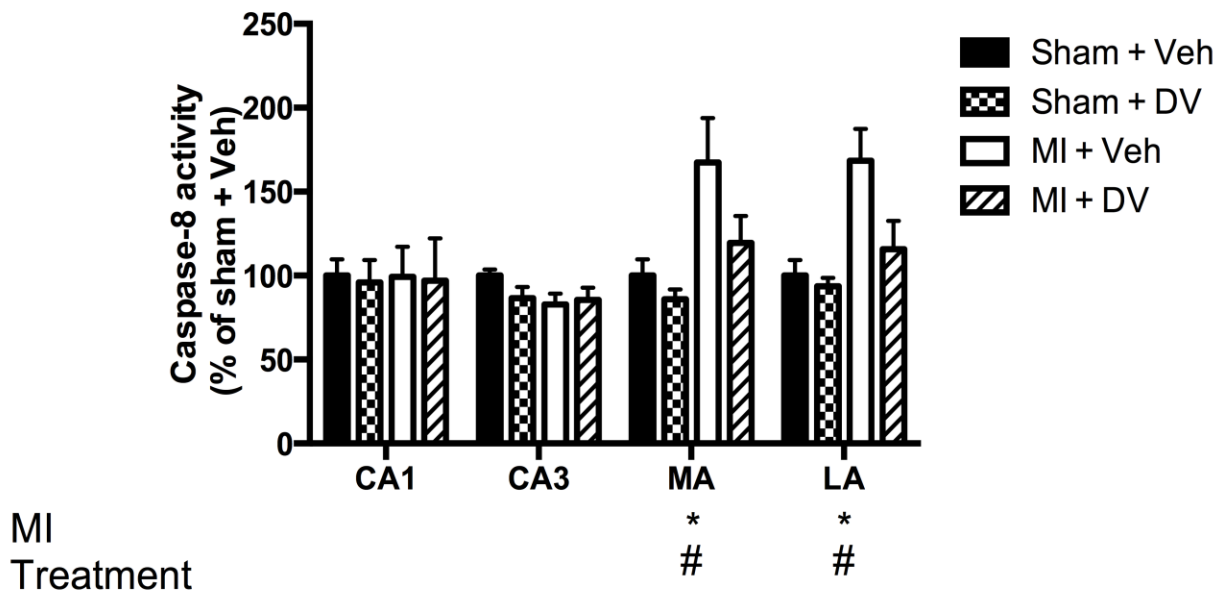


Figure 4

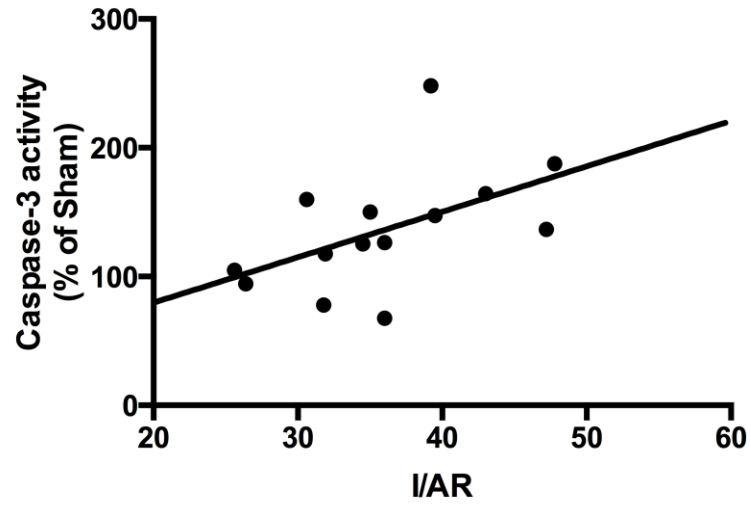


TABLE 1. TUNEL positive cells in the different regions

	Positive/Total	%	
CA1			
Sham – Veh	12/3065	0,39	
Sham – DV	14/2950	0,47	
MI – Veh	29/3226	0,90	*
MI – DV	28/2380	1,18	*
CA3			
Sham – Veh	12/3838	0,31	
Sham – DV	16/4589	0,35	
MI – Veh	7/2273	0,31	
MI – DV	12/4428	0,27	
Lateral Amygdala			
Sham – Veh	5/2282	0,22	
Sham – DV	1/1680	0,06	
MI – Veh	18/2363	0,76	\$
MI – DV	6/2290	0,26	
Medial Amygdala			
Sham – Veh	3/2654	0,11	
Sham – DV	4/2511	0,16	
MI – Veh	30/3689	0,81	\$
MI – DV	9/2614	0,34	

“Positive” is the number of positive TUNEL cells; “Total” is the total number of cells counted; % is the percentage of TUNEL-positive cells relative to the total number of cells. * indicates

that the numbers of TUNEL-positive cells in the MI groups are significantly higher ($p < 0.05$) than in the sham groups. \$ indicates a significant interaction by which the number of TUNEL-positive cells is higher in this group compared to the MI-DV group ($p < 0.05$).

9. *References*

- [1] H. Anisman, Z. Merali, M.O. Poulter, S. Hayley, Cytokines as a precipitant of depressive illness: animal and human studies, *Current pharmaceutical design*, 11 (2005) 963-972.
- [2] D.F. Archer, J.V. Pinkerton, C.J. Guico-Pabia, E. Hwang, R.F. Cheng, Cardiovascular, cerebrovascular, and hepatic safety of desvenlafaxine for 1 year in women with vasomotor symptoms associated with menopause, *Menopause (New York, N.Y.)*, 20 (2013) 47-56.
- [3] A. Asokan, A.R. Ball, C.D. Laird, L. Hermer, B.K. Ormerod, Desvenlafaxine may accelerate neuronal maturation in the dentate gyri of adult male rats, *PloS one*, 9 (2014) e98530.
- [4] T.M. Bah, M. Benderdour, S. Kaloustian, R. Karam, G. Rousseau, R. Godbout, Escitalopram reduces circulating pro-inflammatory cytokines and improves depressive behavior without affecting sleep in a rat model of post-cardiac infarct depression, *Behavioural brain research*, 225 (2011) 243-251.
- [5] T.M. Bah, F. Laplante, B.P. Wann, R. Sullivan, G. Rousseau, R. Godbout, Paradoxical sleep insomnia and decreased cholinergic neurons after myocardial infarction in rats, *Sleep*, 33 (2010) 1703-1710.
- [6] J. Bostwick, The heart of depression: Treating patients who have cardiovascular disease. , *Curr. Psychiatry*, 10 (2011) 31-34.
- [7] M. Boucher, S. Pesant, S. Falcao, C. de Montigny, E. Schampaert, R. Cardinal, G. Rousseau, Post-ischemic cardioprotection by A2A adenosine receptors: dependent of phosphatidylinositol 3-kinase pathway, *Journal of cardiovascular pharmacology*, 43 (2004) 416-422.
- [8] M. Boucher, B.P. Wann, S. Kaloustian, R. Cardinal, R. Godbout, G. Rousseau, Reduction of apoptosis in the amygdala by an A2A adenosine receptor agonist following myocardial infarction, *Apoptosis*, 11 (2006) 1067-1074.

- [9] S.R. Datta, A. Brunet, M.E. Greenberg, Cellular survival: a play in three Akts, *Genes & development*, 13 (1999) 2905-2927.
- [10] S.M. Davidson, D. Hausenloy, M.R. Duchon, D.M. Yellon, Signalling via the reperfusion injury signalling kinase (RISK) pathway links closure of the mitochondrial permeability transition pore to cardioprotection, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38 (2006) 414-419.
- [11] M. Debrunner, E. Schuiki, E. Minder, E. Straumann, B. Naegeli, R. Mury, O. Bertel, J. Frielingsdorf, Proinflammatory cytokines in acute myocardial infarction with and without cardiogenic shock, *Clin Res Cardiol*, 97 (2008) 298-305.
- [12] M. Desseilles, T.D. Vu, S. Laureys, P. Peigneux, C. Degueldre, C. Phillips, P. Maquet, A prominent role for amygdaloid complexes in the Variability in Heart Rate (VHR) during Rapid Eye Movement (REM) sleep relative to wakefulness, *Neuroimage*, 32 (2006) 1008-1015.
- [13] T.G. Dinan, Inflammatory markers in depression, *Curr Opin Psychiatry*, 22 (2009) 32-36.
- [14] B.W. Dunlop, S. Reddy, L. Yang, S. Lubaczewski, K. Focht, C.J. Guico-Pabia, Symptomatic and functional improvement in employed depressed patients: a double-blind clinical trial of desvenlafaxine versus placebo, *Journal of clinical psychopharmacology*, 31 (2011) 569-576.
- [15] J. Endicott, R.W. Lam, M.A. Hsu, R. Fayyad, M. Boucher, C.J. Guico-Pabia, Improvements in quality of life with desvenlafaxine 50mg/d vs placebo in employed adults with major depressive disorder, *Journal of affective disorders*, 166 (2014) 307-314.
- [16] A. Field, *Discovering statistics using SPSS*, Third ed., SAGE Publications Ltd, London, 2009.
- [17] N. Frasure-Smith, F. Lespérance, M. Talajic, Depression following myocardial infarction. Impact on 6-month survival, *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 270 (1993) 1819-1825.

- [18] T. Fujii, T. Yamazaki, T. Akiyama, S. Sano, H. Mori, Extraneuronal enzymatic degradation of myocardial interstitial norepinephrine in the ischemic region, *Cardiovascular research*, 64 (2004) 125-131.
- [19] K. Gilbert, J. Arseneault-Breard, F. Flores Monaco, A. Beaudoin, T.M. Bah, T.A. Tompkins, R. Godbout, G. Rousseau, Attenuation of post-myocardial infarction depression in rats by n-3 fatty acids or probiotics starting after the onset of reperfusion, *The British journal of nutrition*, 109 (2013) 50-56.
- [20] T.P. Guck, M.G. Kavan, G.N. Elsasser, E.J. Barone, Assessment and treatment of depression following myocardial infarction, *American family physician*, 64 (2001) 641-648.
- [21] C.R. Jan, J.A. Su, C.C. Teng, M.L. Sheu, P.Y. Lin, M.C. Chi, C.H. Chang, W.C. Liao, C.C. Kuo, C.T. Chou, Mechanism of maprotiline-induced apoptosis: role of $[Ca^{2+}]_i$, ERK, JNK and caspase-3 signaling pathways, *Toxicology*, 304 (2013) 1-12.
- [22] S. Kaloustian, T.M. Bah, I. Rondeau, S. Mathieu, L. Lada-Moldovan, P. Ryvlin, R. Godbout, G. Rousseau, Tumor necrosis factor-alpha participates in apoptosis in the limbic system after myocardial infarction, *Apoptosis*, 14 (2009) 1308-1316.
- [23] S. Kaloustian, B.P. Wann, T.M. Bah, S.A. Girard, A. Apostolakis, S. Ishak, S. Mathieu, P. Ryvlin, R. Godbout, G. Rousseau, Apoptosis time course in the limbic system after myocardial infarction in the rat, *Brain research*, 1216 (2008) 87-91.
- [24] S.E. Kimmel, H. Schelleman, J.A. Berlin, D.W. Oslin, R.B. Weinstein, J.L. Kinman, W.H. Sauer, J.D. Lewis, The effect of selective serotonin re-uptake inhibitors on the risk of myocardial infarction in a cohort of patients with depression, *British journal of clinical pharmacology*, 72 (2011) 514-517.
- [25] S.G. Kornstein, A. Clayton, W. Bao, C.J. Guico-Pabia, Post hoc analysis of the efficacy and safety of desvenlafaxine 50 mg/day in a randomized, placebo-controlled study of

perimenopausal and postmenopausal women with major depressive disorder, *Menopause* (New York, N.Y.), (2014).

[26] L. Lada-Moldovan, S. Kaloustian, T.M. Bah, S.A. Girard, M.A. Dery, G. Rousseau, Chronic Pretreatment With Celecoxib Reduces Infarct Size, *Journal of cardiovascular pharmacology*, 54 (2009) 31-37.

[27] S. Lecour, Multiple protective pathways against reperfusion injury: a SAFE path without Aktion?, *Journal of molecular and cellular cardiology*, 46 (2009) 607-609.

[28] F. Lespérance, N. Frasure-Smith, M. Talajic, Major depression before and after myocardial infarction: its nature and consequences, *Psychosomatic medicine*, 58 (1996) 99-110.

[29] F. Lespérance, N. Frasure-Smith, M. Talajic, M.G. Bourassa, Five-year risk of cardiac mortality in relation to initial severity and one-year changes in depression symptoms after myocardial infarction, *Circulation*, 105 (2002) 1049-1053.

[30] M.R. Liebowitz, A.L. Manley, S.K. Padmanabhan, R. Ganguly, R. Tummala, K.A. Tourian, Efficacy, safety, and tolerability of desvenlafaxine 50 mg/day and 100 mg/day in outpatients with major depressive disorder, *Current medical research and opinion*, 24 (2008) 1877-1890.

[31] Q. Lv, C. Gu, C. Chen, Venlafaxine protects methylglyoxal-induced apoptosis in the cultured human brain microvascular endothelial cells, *Neuroscience letters*, 569 (2014) 99-103.

[32] R.N. Munoli, S.K. Praharaaj, R.P. Bhandary, A.G. Selvaraj, Desvenlafaxine-induced worsening of hypertension, *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*, 25 (2013) E29-30.

[33] S.E. Naumenko, T.V. Latysheva, M.A. Gilinsky, Ischemic postconditioning and size of myocardial infarction during inhibition of norepinephrine reuptake, *Bulletin of experimental biology and medicine*, 152 (2011) 192-194.

- [34] S.M. O'Brien, L.V. Scott, T.G. Dinan, Cytokines: abnormalities in major depression and implications for pharmacological treatment, *Human psychopharmacology*, 19 (2004) 397-403.
- [35] V. Papaioannou, I. Pneumatikos, N. Maglaveras, Association of heart rate variability and inflammatory response in patients with cardiovascular diseases: current strengths and limitations, *Front Physiol.*, 4: (2013) 10.3389/fphys.2013.00174.
- [36] G. Paxinos, C. Watson, *The rat brain in stereotaxic coordinates*, Academic Press, San Diego, 1986.
- [37] R. Perry, M. Cassagnol, Desvenlafaxine: a new serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor for the treatment of adults with major depressive disorder, *Clin Ther*, 31 Pt 1 (2009) 1374-1404.
- [38] J.E. Piletz, A. Halaris, O. Iqbal, D. Hoppensteadt, J. Fareed, H. Zhu, J. Sinacore, C.L. Devane, Pro-inflammatory biomarkers in depression: treatment with venlafaxine, *World J Biol Psychiatry*, 10 (2009) 313-323.
- [39] D. Richardt, A. Dendorfer, R. Tolg, P. Dominiak, G. Richardt, Inhibition of nonexocytotic norepinephrine release by desipramine reduces myocardial infarction size, *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 84 (2006) 1185-1189.
- [40] J.Z. Rosenthal, P. Boyer, C. Vialet, E. Hwang, K.A. Tourian, Efficacy and safety of desvenlafaxine 50 mg/d for prevention of relapse in major depressive disorder: a randomized controlled trial, *The Journal of clinical psychiatry*, 74 (2013) 158-166.
- [41] G. Rousseau, T.M. Bah, R. Godbout, Post-myocardial infarction depression, in: U. Lakshmanadoss (Ed.) *Novel Strategies in Ischemic Heart Disease*, InTech, Rijeka, Croatia, 2012, pp. 333-362.
- [42] S. Siegel, N.J.J. Castellan, *Nonparametric statistics*, 2nd ed., McGraw-Hill, Boston, Mass, 1988.

- [43] R.J. Tynan, J. Weidenhofer, M. Hinwood, M.J. Cairns, T.A. Day, F.R. Walker, A comparative examination of the anti-inflammatory effects of SSRI and SNRI antidepressants on LPS stimulated microglia, *Brain, behavior, and immunity*, 26 (2012) 469-479.
- [44] H. Wang, X. Zhou, J. Huang, N. Mu, Z. Guo, Q. Wen, R. Wang, S. Chen, Z.P. Feng, W. Zheng, The role of Akt/FoxO3a in the protective effect of venlafaxine against corticosterone-induced cell death in PC12 cells, *Psychopharmacology*, (2013).
- [45] B.P. Wann, T.M. Bah, M. Boucher, J. Courtemanche, N. Le Marec, G. Rousseau, R. Godbout, Vulnerability for apoptosis in the limbic system after myocardial infarction in rats: a possible model for human postinfarct major depression, *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN*, 32 (2007) 11-16.
- [46] B.P. Wann, T.M. Bah, S. Kaloustian, M. Boucher, A.M. Dufort, N. Le Marec, R. Godbout, G. Rousseau, Behavioural signs of depression and apoptosis in the limbic system following myocardial infarction: effects of sertraline, *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)*, 23 (2009) 451-459.
- [47] B.P. Wann, M. Boucher, S. Kaloustian, S. Nim, R. Godbout, G. Rousseau, Apoptosis detected in the amygdala following myocardial infarction in the rat, *Biological psychiatry*, 59 (2006) 430-433.
- [48] G. Wozniak, A. Toska, M. Saridi, O. Mouzas, Serotonin reuptake inhibitor antidepressants (SSRIs) against atherosclerosis, *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 17 (2011) RA205-214.
- [49] X. Wu, H. Jiang, L. Yu, X. Hu, W. Liu, Desipramine pretreatment improves sympathetic remodeling and ventricular fibrillation threshold after myocardial ischemia, *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2012 (2012) 732909.

[50] T.T. Yang, A.N. Simmons, S.C. Matthews, S.F. Tapert, A. Bischoff-Grethe, G.K. Frank, E. Arce, M.P. Paulus, Increased amygdala activation is related to heart rate during emotion processing in adolescent subjects, *Neuroscience letters*, 428 (2007) 109-114.

[51] M. Zhang, L. Chen, Status of cytokines in ischemia reperfusion induced heart injury, *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 8 (2008) 161-172.

[52] W. Zhou, Y. Ko, P. Benharash, K. Yamakawa, S. Patel, O.A. Ajijola, A. Mahajan, Cardioprotection of electroacupuncture against myocardial ischemia-reperfusion injury by modulation of cardiac norepinephrine release, *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 302 (2012) H1818-1825.

Chapitre VI. Second article scientifique menant à la rédaction de cette thèse

I. Préface

La deuxième étude a donné naissance à l'article intitulé "**Desvenlafaxine reduces depressive behavior and memory deficit in a rat model of myocardial infarction at long-term**" soumise dans le journal "*Psychopharmacology*"

II. Objectifs

1/ Investiguer si la dépression après un infarctus du myocarde chez le rat perdure dans le temps et si 4 mois après l'évènement cardiovasculaire les rats démontrent des troubles d'apprentissage. 2/ Déterminer l'effet de la desvenlafaxine à court et long terme.

III. Hypothèses

Les rats ayant eu un infarctus du myocarde présentent des comportements de dépression deux semaines après la reperfusion. Dans le test d'interaction sociale les rats ayant subi un infarctus du myocarde démontrent un retrait social et dans le test d'évitement passif ils montrent une anxiété exagérée face à un stimulus aversif.

Les comportements de dépression sont renversés par un traitement par la desvenlafaxine débutant tout de suite après la reperfusion.

Les rats qui ont subi un infarctus du myocarde et qui n'ont pas été traités par la desvenlafaxine sur les quatre mois de reperfusion adoptent des stratégies plus passives (immobilité) que les rats témoins lors du test de nage forcée reflétant ainsi un comportement de dépression. De plus le test de la piscine de Morris permet de démontrer que les rats non traités par la

desvenlafaxine présentent des troubles de l'apprentissage. De plus les analyses biochimiques sur différentes régions du système limbique montrent une éventuelle activation des caspases que nous supposons être une cause des comportements de dépression chez les rats n'ayant jamais été traités par la desvenlafaxine après l'infarctus du myocarde. La desvenlafaxine est en mesure de prévenir tout dommage apoptotique à long terme au niveau du système limbique.

IV. Desvenlafaxine reverses the long-term behavioral and memory deficits after myocardial infarction.

Mandy Malick^{1,2}, Kim Gilbert^{1,2}, Judith Bernier¹, Roger Godbout^{1,3}, Guy Rousseau^{1,2}

¹ : Research Center, Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

² : Department of Pharmacology, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

³ : Department of Psychiatry, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

Corresponding author :

Guy Rousseau, Ph.D.

Centre de recherche

Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal

5400, boul. Gouin Ouest

Montréal (Québec) Canada H4J 1C5

Phone: 514-338-2222 Extension 3421

Fax: 514-338-2694

Key words : Myocardial Infarction, desvenlafaxine, depression, memory deficits, apoptosis, behavioral tests

Number of words :

Abstract : 230, Article: 3125

Number of figures : 8

1. Abstract

Background : Myocardial infarction (MI) in rats is frequently followed in two weeks by depression-like behavioral and cognitive deficits that can be prevented by antidepressant treatments. This study examines the effects of desvenlafaxine (DV), an antidepressant with serotonin and norepinephrine reuptake inhibition properties on long-term behavioral and memory deficits induced by MI.

Methods : MI was induced in rats and sham-operated rats served as controls. Behavioral testing occurred two weeks (social interaction, passive avoidance step-down test) and 16 weeks (forced swimming, Morris Water Maze) later. Vehicle (saline) or DV (3 mg/kg, i.p.) was administered to thirds of groups according to one of three possible schedules: 1- two weeks post-MI, 2- for the last 14 weeks before behavioral testing or 3- for the full 16 post-MI weeks before testing; sham operated rats were treated according this last schedule.

Results : Vehicle-treated MI rats showed impairments in the behavioral tests compared to sham rats and DV-treated MI rats at 2- and 16 weeks. Biochemical analyses showed that untreated MI rats had higher caspase-3 activity in the amygdala and the CA3 region of the hippocampus while caspase-6 activity was higher in the CA1 region of the hippocampus. Caspase-6 activity showed a positive correlation with deficits on the Morris Water Maze.

Conclusions : This study indicates that MI induces long-term deficits in behavior and memory and that impairments may be prevented with short-term and long-term treatment with DV.

2. Introduction

Depressive symptoms are frequently observed following myocardial infarction (MI) (1) and antidepressant drugs could alleviate these symptoms, particularly selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) due to their low cardiotoxic effect in contrast to tricyclics (2-4). We have replicated these observations by treating rats with sertraline and escitalopram in a rat model of post-myocardial depression (5-7).

At the biochemical level, previous data obtained with our experimental model show that apoptosis can be detected in the limbic system 3 days after MI, mainly in the hippocampus and the amygdala (8), possibly due to an post-MI inflammatory response (9-11). Since limbic apoptosis is detected before the observation depressive-like symptoms, it is possible that apoptosis contributes to the behavioral impairments as suggested by others (12, 13).

Desvenlafaxine (DV) is a serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor with proven antidepressant properties in human patients (14). DV is not accompanied by adverse cardiovascular or cerebrovascular effects (15) and could represent an interesting alternative for MI patients with depression. The present study was designed to determine if 1- DV could attenuate the depressive-like symptoms in rats after MI; 2- a short or a delayed treatment with DV could be efficient to attenuate post-MI depression; 3- memory is affected after MI and 4- DV could attenuate the memory deficit following MI.

3. *Methods and Materials*

A. *Experimental groups*

A total of 78 young adult male Sprague-Dawley rats (4 months old, at the start of the protocol) were acquired through regular trade (Charles River, St-Constant, Québec, Canada). They were housed individually under constant temperature (22°C) and humidity (40-50%); food and water were available ad libitum. The light period was 12h long, starting at 8:00 a.m.

Rats were first randomly assigned to the MI (n=39) or the sham (n=39) group. In MI rats, the left anterior coronary artery was occluded for 40 min (see details on the surgical procedure below). Sham operated rats were submitted to the same protocol except that the coronary artery was not occluded.

After surgery, MI and sham rats were distributed randomly into one of two treatment groups, receiving either DV or saline (vehicle). In MI rats, either treatment was delivered according to one of three possible schedules : 1) during the first two weeks post-MI; 2) starting two weeks post-MI and up to 16 weeks post MI; 3) during 16 weeks post-MI (see Figure 1). Sham rats received treatment according to schedule 3 only. The final number of rats per group is reported in the results section. The following abbreviations will be used: Sham-Veh = Sham treated with saline; Sham-DV = Sham treated with Desvenlafaxine; MI-Veh = Myocardial infarction rats treated with saline; MI-DV = Myocardial infarction rats treated with desvenlafaxine; MI-Veh-DV = Myocardial infarction rats treated with saline during two weeks then with desvenlafaxine; MI-DV-Veh = Myocardial infarction rats treated with desvenlafaxine during two weeks then with saline.

The first three days, DV was administered i.p. (3 mg/kg, diluted in 0.5 ml of saline) every morning; on the following days DV was diluted in drinking water; quantity of water drunk was calculated every morning.

Animal care and handling procedures were approved by the Local Animal Care Committee and followed the guidelines of Canadian Council for Animal Care.

B. Surgical procedure

Anesthesia was induced with ketamine/xylazine (50 mg/kg and 5 mg/kg, i.m., respectively) and maintained with 1.5% isoflurane ventilation. ECG and heart rate were monitored during surgery. After left thoracotomy, the left coronary artery was occluded with 4-0 silk suture and plastic snare. Ischemia was confirmed by ECG changes and the presence of epicardial cyanosis. After 40 min of occlusion, the ligature was removed to initiate reperfusion. The first injection of DV was administered five min after the onset of reperfusion. The thorax was closed, and the rats were returned to their cages. Antibiotic (15,000 IU penicillin G, s.c.) and analgesic (2 mg/kg, 0.2 ml buprenorphine, s.c.) were given. The animals received a second buprenorphine dose the next morning.

C. Scar section, area at risk measurement and brain dissection

Four months after the surgery, the animals were restrained in a cone bag and rapidly sacrificed by decapitation. The brains and hearts were then rapidly removed and placed in a dish kept on crushed ice. The heart was washed in saline and the left anterior coronary artery was occluded at the same site as during MI surgery, and infused with 2 ml of 0.5% Evans Blue through the aorta. The heart was then frozen at -80°C, and four 2-mm transverse slices were cut; scar section (SS) were clearly visible. SS was expressed as the percentage of AR ($SS/AR*100$), estimating the degree of damage due to ischemia. AR was also expressed as a percentage of left ventricle (LV) area ($AR/LV*100$). Lateral and medial amygdala (LA, MA) and hippocampus (CA1 CA3 regions) were rapidly isolated, snap frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until needed.

D. Behavioral tests

Rats were tested in the morning.

a. Social interaction test

This test was conducted at day 13 post-MI. Two rats were placed together in a clean cage for 10 min. During this period, two observers (blinded to the experimental conditions) each monitored one of the animals. Interactions were scored when one rat smelled, touched the nose or groomed the other rat. The duration of interactions with the other rat was quantified.

b. Passive avoidance step-down test

This test was performed at day 14 post-MI. Rats were placed individually in a test chamber (14 cm x 33 cm) on a plexiglass platform (14 cm x 19 cm). An electrifiable grid (14 X 14 cm) is alongside and 2.5 cm lower than the plexiglass platform. To be successful on this test, the animals needed to stay on the top platform for 60 seconds over three consecutive trials. If a rat stepped down onto the lower platform, resting all 4 paws on the grid, it received a mild shock to the feet (one second, 8 mA) and was then returned to its cages for 30 seconds. The number of trials needed to meet the test criteria and the time needed to learn the test were noted.

c. Forced swim test

Four months post-MI, rats were placed individually in a transparent 25-cm diameter pool filled to a depth of 30 cm with 22-25°C water, with no possible escape. Two observers without knowledge of the experimental condition used identical chronometers to measure the time being immobile, swimming and trying to escape from the pool. The test was conducted on two days: day one comprised 15 minutes of habituation, and day two entailed the actual five-minute test. Behavioral despair has been positively correlated with immobility time on day two.

d. Morris water maze (MWM)

Four months post-surgery, rats were placed in a pool (150 cm diameter, 50 cm deep) filled to 25 cm with water maintained at 22°C–25°C and made opaque with powdered milk. A submerged platform was placed just below the surface of the water. The rats were tested on six trials each day, five minutes apart, for six consecutive days. During day 6, rats underwent probe testing. The platform was removed and time spent in the quadrant where the platform was and opposite quadrant was calculated. During day seven, the platform remained visible. The number of quadrants crossed and the time taken to reach the platform were noted.

E. Biochemical assays : Caspase-3 and caspase-6 activity

Cytosolic proteins were extracted in lysis buffer (1% Triton X-100, 0.32 M Sucrose, 10 mM Tris (pH 8.0), 5 mM EDTA, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Pepstatin A, 10 µg/ml Aprotinin). Enzymatic reactions were performed in reaction buffer (50 mM Tris (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.1% CHAPS, 1 mM DTT) with 25 µg of proteins and fluorogenic substrate, Ac-DEVD-AMC (40 µM) for caspase-3 and Ac-VEID-AMC (40 µM) for caspase-6. Reactions were incubated at 37°C for 180 minutes for caspase-3 and 90 minutes for caspase-6 and stopped with the addition of 0.4 M NaOH and 0.4 M glycine buffer. Fluorescence was quantified with a spectrofluorometer (Photon Technology International, Lawrenceville, NJ, USA) at an excitation wavelength of 365 nm (caspase-3) or 325 nm (caspase-6) and an emission wavelength 465 nm (caspase-3) and 435 nm (caspase-6).

F. Statistical Analysis

Data are reported as mean (\pm standard error of the mean). Statistical analyses were performed by an ANOVA followed by a post-hoc (Dunnett) when significant. The Sham-Veh group was used as the control group. Linear regression coefficient was calculated with SPSS, version 19. P <0.05 was considered significant.

4. Results

A. Ischemic damage

Scar sections and AR/LV percentages were similar between groups, with values around 30 % and 65 % respectively.

B. Social interaction test, two weeks post-MI (Figure 2)

ANOVA showed a significant difference between groups ($F_{(3,47)}=5.61$; $p < 0.05$). MI-Veh rats spent less time interacting with congeners compared to Sham-Veh rats ($p < 0.05$). MI-DV rats were not different from sham rats ($n=10-18$ /group).

C. Passive avoidance step-down test, two weeks post-MI (Figure 3)

ANOVA indicated a significant difference between groups ($F_{(3,53)}$; 4.94; $p < 0.05$). Posthoc analysis revealed MI-Veh rats needed more time to learn the test compared to Sham-Veh rats ($p < 0.05$). This is also reflected in the number of trials needed to learn the test, which was significantly higher in the MI-Veh rats compared to the Sham-Veh rats ($p < 0.05$). There were no other group differences, indicating that DV can improve the performance of MI rats in this test ($n=9-16$ /group).

D. Forced swim Test, four months post-MI (Figure 4)

ANOVA indicated a significant difference in immobility time between the groups ($F_{(5,56)}$ 4.92; $p < 0.05$). Post-hoc analysis revealed that MI-Veh rats were more immobile than sham-veh rats ($p < 0.05$). All other groups performed similarly to Sham-Veh rats. ANOVA also indicated a significant difference between groups on swimming time ($F_{(5,56)}$ 4.37; $p < 0.05$) and escape trial duration ($F_{(5,56)}$ 3.65; $p < 0.05$). Post-hoc tests indicated that the difference was between Sham-DV and the MI-DV groups against Sham-Veh group ($p < 0.05$).

E. Morris Water-Maze (MWM), four months post-MI (Figure 5)

ANOVA indicated a significant difference between groups at day six ($F_{(5,53)}=3.72$; $p < 0.05$). Animals in the MI-Veh group spent more time to find the platform compared to the Sham-Veh group at day six ($p < 0.05$). No other difference was observed among groups compared to the Sham-Veh group. No other difference was observed among groups. No difference was observed in the probe test among groups.

F. Caspase-3 and-6 activities

Activity of caspase-3 was significantly different between groups in CA3, lateral amygdala and medial amygdala, four months after MI (CA3: ($F_{(5,34)}=4.47$; $p < 0.05$); medial amygdala ($F_{(5,26)}=5.65$; $p < 0.05$); lateral amygdala ($F_{(5,30)}=6.30$; $p < 0.05$)). Post hoc analysis indicated that MI-Veh rats showed a significantly higher caspase-3 activity compared to the Sham-Veh for the three regions. There were no differences between MI-DV rats and the Sham-Veh group, indicating that DV reverses the increased observed in vehicle-treated MI rats.

In contrast, caspase-6 activity in these regions was similar among groups. In the CA1 region, however, caspase-6 activity was significantly different among groups ($F_{(5,38)}=3.56$; $p < 0.05$) and further analysis indicated that the difference is between MI-Veh and Sham-Veh group ($p < 0.05$). No other significant differences were observed among the other groups.

Linear regression analysis indicated a significant, positive correlation between the time taken to find the platform in the MWM at day six and caspase-6 activity in the CA1 region of the hippocampus ($r^2 = 0.29$; $p = 0.0024$).

5. Discussion

The present data confirm our previous results that signs of behavioral impairment are observed 14 days post-MI and now they extend the impaired period to up to 16 weeks after MI. In previous studies, we have documented that MI induces a behavioral syndrome that is

compatible with clinical signs of depression in humans (7, 9, 16, 17). This was confirmed in the present study using two of these tests at two weeks post-MI : untreated MI rats (MI-Veh) socialized less and were impaired in the passive avoidance step-down test compared to the other groups. When tested 16 weeks later, we now also show that untreated MI rats (MI-Veh) still presented depressive-like behavior based on the forced swim test. Indeed, in the forced swim test, MI-Veh rats were more immobile than Sham-Veh rats and in the forced swim test behavioral despair since it is correlated with immobility (18).

Treatment with DV reverses the depressive-like symptoms at both time points of behavioral measures and under the three treatment schedules, i.e., two weeks post-MI, for the last 14 weeks before behavioral testing, and for the full 16-week protocol. However in the forced swim test, we showed that DV increased swimming time and decreased escape time when compared Sham-DV with Sham-Veh or MI-DV with Sham-Veh. Prior studies showed that serotonergic antidepressants, such as sertraline (5) or fluoxetine (19), increased swimming time without altering escape time and tricyclic antidepressant (such as desipramine; noradrenergic effect) increased escape time without altering swimming time (17). Antidepressants that are both serotonergic and noradrenergic seem to be able to show an increase in both swimming and escape time that is different which was not shown with DV (20, 21). It is possible that old rats used in this study react differently in the forced swim test than young rodents after antidepressant administration. Clinical studies showed that DV is an effective antidepressant (22-24). Although the antidepressant mechanisms involved are still not well defined, those involved in the present study might extend beyond the serotonin and norepinephrine reuptake blockade properties of DV, including anti-apoptosis or anti-inflammatory effects (5, 6).

It has been reported that some antidepressants can possess anti-apoptotic as well as neurotrophic effects (25). For example, fluoxetine decreased apoptosis in the dentate gyrus and increased cell proliferation in a model of depression induced by maternal separation (26). Moreover, in our model of post-myocardial infarction depression in the rat, we showed that

depression behavior as well as apoptosis are associated with proinflammatory cytokines synthesis, which can be reversed by desipramine, sertraline and escitalopram (5, 6, 17).

The protocol used permitted us to assess short- and long-term behavioral effects of MI and its treatment with DV. We found that treatment with DV for 14-16 weeks post-MI prevented depressive behavior four months later compared to saline (vehicle)-treated MI rats. Interestingly, we observed that treatment with DV during the first two weeks post-MI is also efficient, showing that early subchronic treatment with DV can have longer term effects in our rat model. This could challenge the necessity of using long-term protocols to treat post-MI depression with antidepressants.

We also found that MI-veh rats were impaired on the time taken to find the platform in the Morris Water Maze not on the number of quadrants visited on day six, the final marker of the learning process. It suggests that: a) swimming capacity per se is not involved in the deficits observed in the Forced swim tests; b) referential spatial memory may be impaired following MI induced in young adult rats that are tested 16 weeks later, a finding that is contrary to what was observed in three-month-old rats tested two weeks post MI (17). In the present study, rats were eight months old and this could possibly reflect a long-term effect of MI on cognitive performance, which needs to be further investigated. Preliminary data we have recently obtained suggests that it may be the case (27). The fact that each treatment schedule with DV could prevent this late-onset behavioral effect of MI on a hippocampus-dependant task (28) could be related to the caspases results obtained in this region.

Caspase-3 activity was higher in saline MI rats compared to the other groups in the amygdala (medial and lateral) and the CA3 region of the hippocampus while caspase-6 activity was higher in the CA1 region of the hippocampus. Caspase-6 activity showed a positive correlation with deficits in the Morris Water Maze test.

Reduction of cerebral blood flow due to MI could be a part of the mechanism involved in the deficit in memory, as shown by studies reporting cerebral blood flow reduction in dementia (29, 30). In addition, chronic cerebral hypoperfusion may be responsible for neuronal

apoptosis and behavioral impairment (31). Following MI, apoptosis is detected in the limbic system, peaking at three days post-MI (8). In different models, it seems that the first wave of apoptosis is often followed by a second wave of apoptosis (32). This second wave may be due to a loss of neuronal activity or trophic support for other neurons (33, 34). The data obtained in this study indicate that caspase-3 activity is increased in the CA3 region, a region where we are unable to detect apoptosis during the first days of reperfusion (8). This result is in agreement with the hypothesis related to the importance of the contact with other neurons to survive. In the same instance, we also documented an increase in activity of caspase-3 in the amygdala. The amygdala is one of the regions presenting apoptosis early after the onset of reperfusion and we have been unable to detect any caspase-3 activity at 14 days post-MI in this region (8). The longer term data in this study support the hypothesis of a second wave of apoptosis, four months post-MI.

However treatment with DV, immediately at the onset of reperfusion or two weeks post-MI, was sufficient to prevent this second wave of apoptosis. The mechanism by which DV can prevent apoptosis remains speculative at this moment.

We also observed an increase in caspase-6 activity in the CA1 region, at four months post-MI. Caspase-6 is an enzyme widely expressed in brain and according to recent studies activation seems to be sufficient to cause memory deficit, especially in the CA1 region (35). Knock-in mice expressing a self-activated caspase-6 in the CA1 region developed age-dependent spatial and episodic memory impairment (35). Caspase-6 has also been associated with different models of neurodegeneration such as Alzheimer's disease (36, 37). There was a weak but significant correlation between activity of the caspase-6 in the CA1 and the performance at day six in the Morris Water Maze test, suggesting a relation between the performance in this test and the activity of caspase-6. Interestingly, treatment with DV improved the performance in the Morris Water Maze test to a level similar to a sham animal and reduces the activity of the caspase-6.

6. Limitations

DV was administered sequentially via two routes in the early treatment schedule group (i.e., for two weeks immediately following MI): i.p. for the first three days and then in the drinking water, for the remaining 16 weeks. This was necessary because anesthesia and surgery lead to decreased water intake during the first post-operative 24 hours. However, all rats were treated the same way, including saline treated rats.

7. Conclusion

In conclusion, DV attenuated post-MI depressive-like behavior using either an immediate, short-term (2-week) treatment or a longer-term protocol (14 or 16 weeks).

8. Acknowledgments

We thank Caroline Bouchard for her technical support with rat surgeries and for her field expertise as well as Louis Chiocchio for his assistance in animal care. We thank Pfizer Canada for providing funding and study drug (desvenlafaxine). This study was also partly supported by a Discovery Grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC 122762-2010). K.G. holds a studentship from Fonds de recherche du Québec – Santé.

9. Financial disclosures

MM declares no conflict of interest. KG declares no conflict of interest, JB declares no conflict of interest; RG declares no conflict of interest; GR reports having received lecture fees from Forest Laboratories.

10. Figure Legends

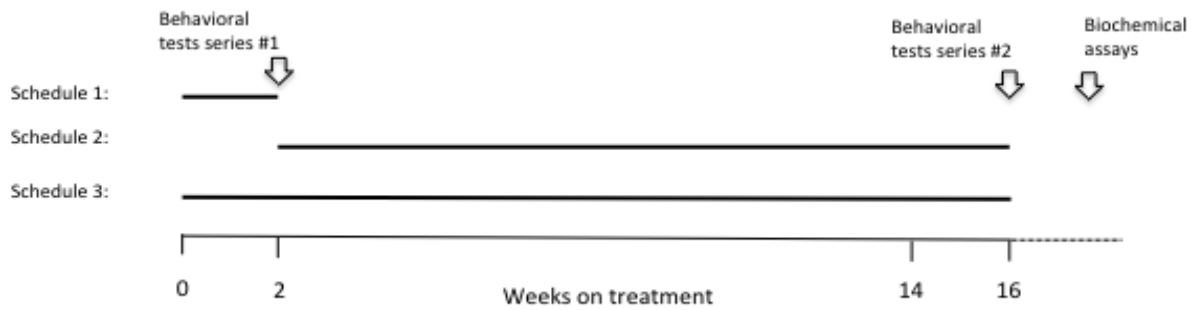


Figure 1 : Schematic representation of the treatment protocol. MI rats treated with DV were distributed into schedules 1, 2 and 3. Sham rats treated with DV were distributed into schedule 3 only. Other MI and sham rats received only vehicle. Behavioral test series #1: social interaction and passive avoidance step-down test; behavioral test series #2: forced swimming and Morris Water Maze.

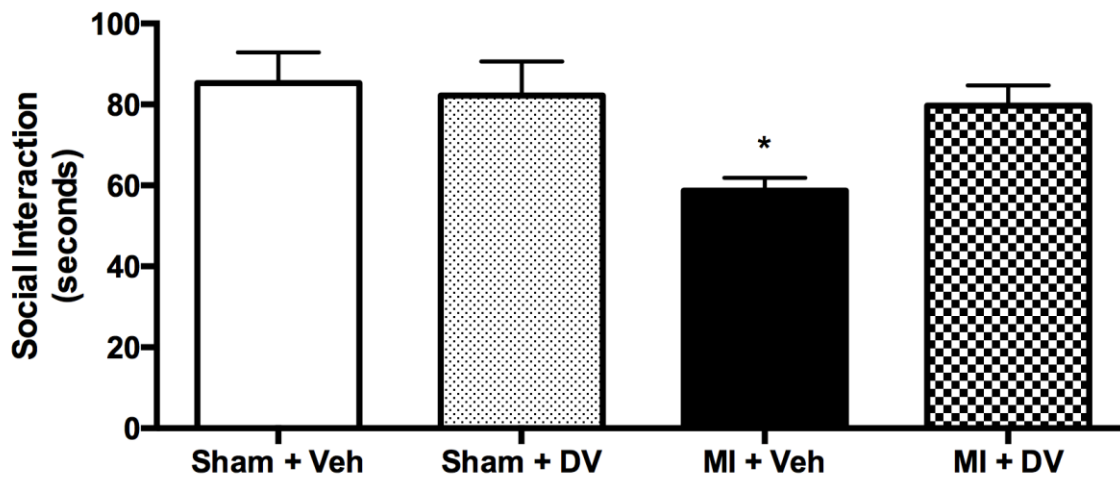


Figure 2 : Social interaction. MI-Veh rat interacted less with other rats than Sham-Veh; n=10-18/group. *: $p < 0.05$. MI: myocardial infarction; Veh: vehicle; DV : Desvenlafaxine.

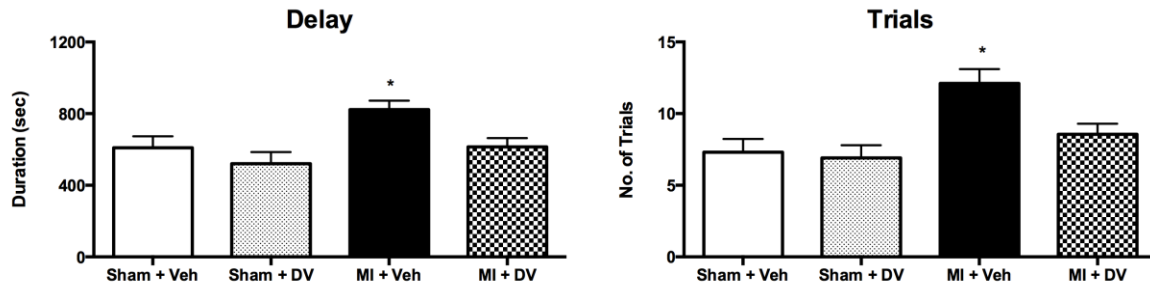


Figure 3 : Passive avoidance step down test. (Left) Time taken to succeed and (Right) number of trials required were higher in MI-Veh than Sham-Veh rats; n = 9-16 per group. *: p < 0.05. MI: myocardial infarction; Veh: vehicle; DV : Desvenlafaxine.

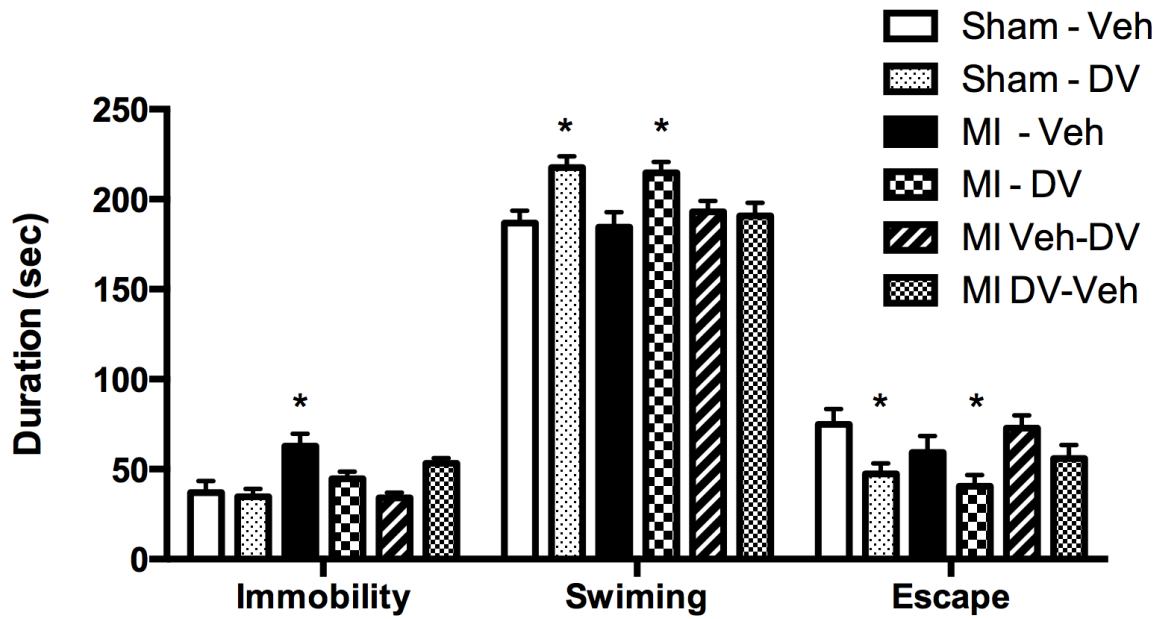


Figure 4 : Forced swim test. Immobility time was significantly higher in MI-Veh rats than Sham-Veh; swim time was significantly lower in MI-Veh rats than Sham-Veh and Sham-DV; escape trial duration was significantly higher in MI-Veh rats than Sham - DV and MI - DV; n = 9-12 per group. *: p < 0.05. MI: myocardial infarction; Veh: vehicle; DV : Desvenlafaxine.

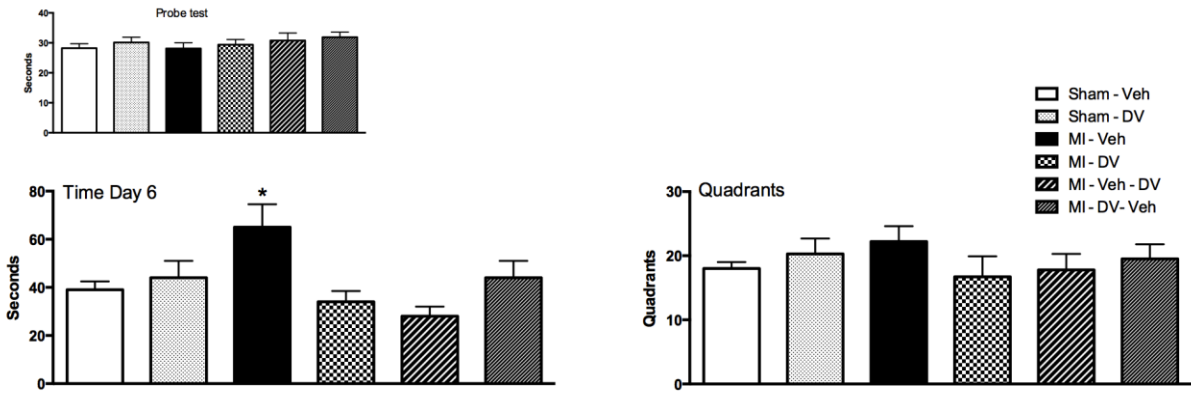


Figure 5 : Morris Water Maze. Time and number of quadrants crossed on day 6 to find the platform. On Day 6, MI-Veh rats took more time to find the platform compared to the other groups; No difference was observed between groups for the probe test. n = 9-14 per group. (*: p < 0.05). MI: myocardial infarction; Veh: vehicle; DV : Desvenlafaxine.

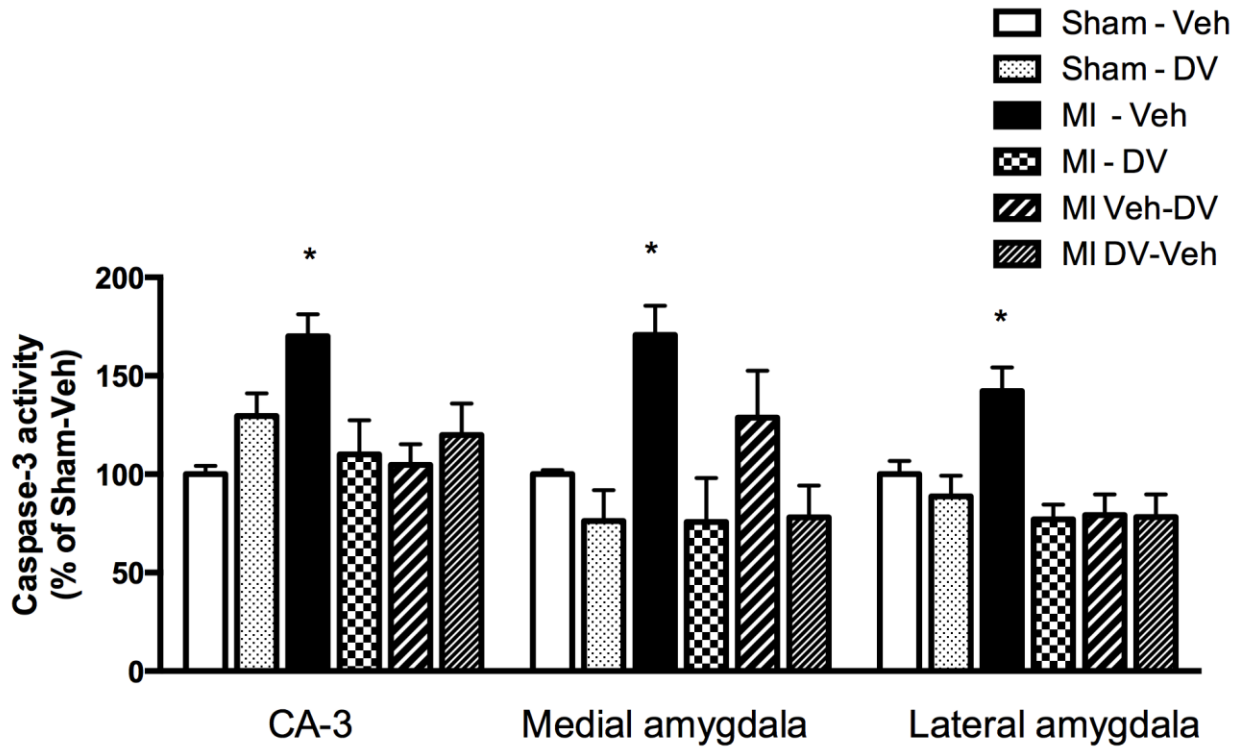


Figure 6 : Caspase-3 activity. Levels were higher in the MI-Veh group compared to the Sham-Veh group in CA3, medial amygdala and lateral amygdala; n = per group. *: p<0.05.

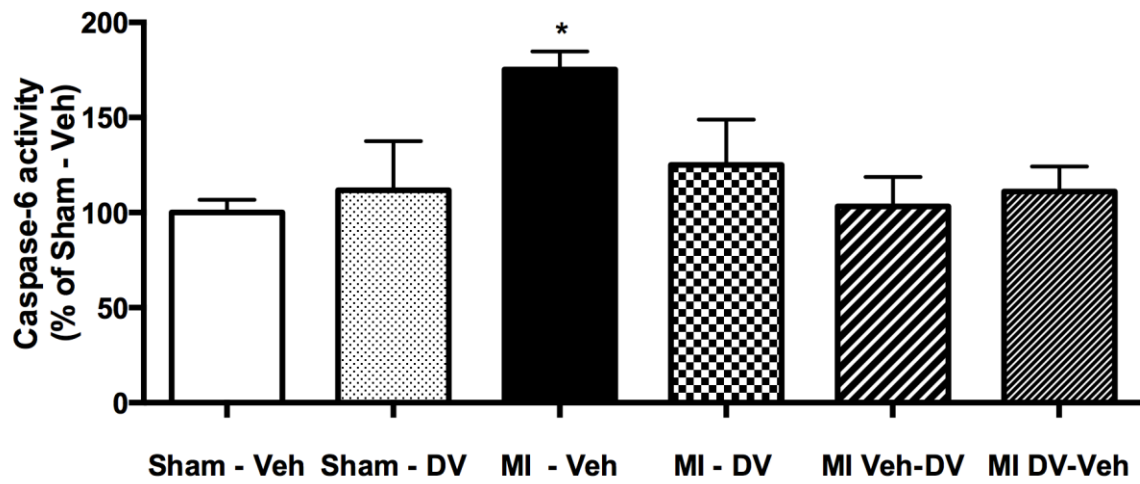


Figure 7 : Caspase-6 activity in the CA1 region of the hippocampus. Levels were higher in the MI-Veh group compared to the Sham-Veh group (* $p < 0.05$).

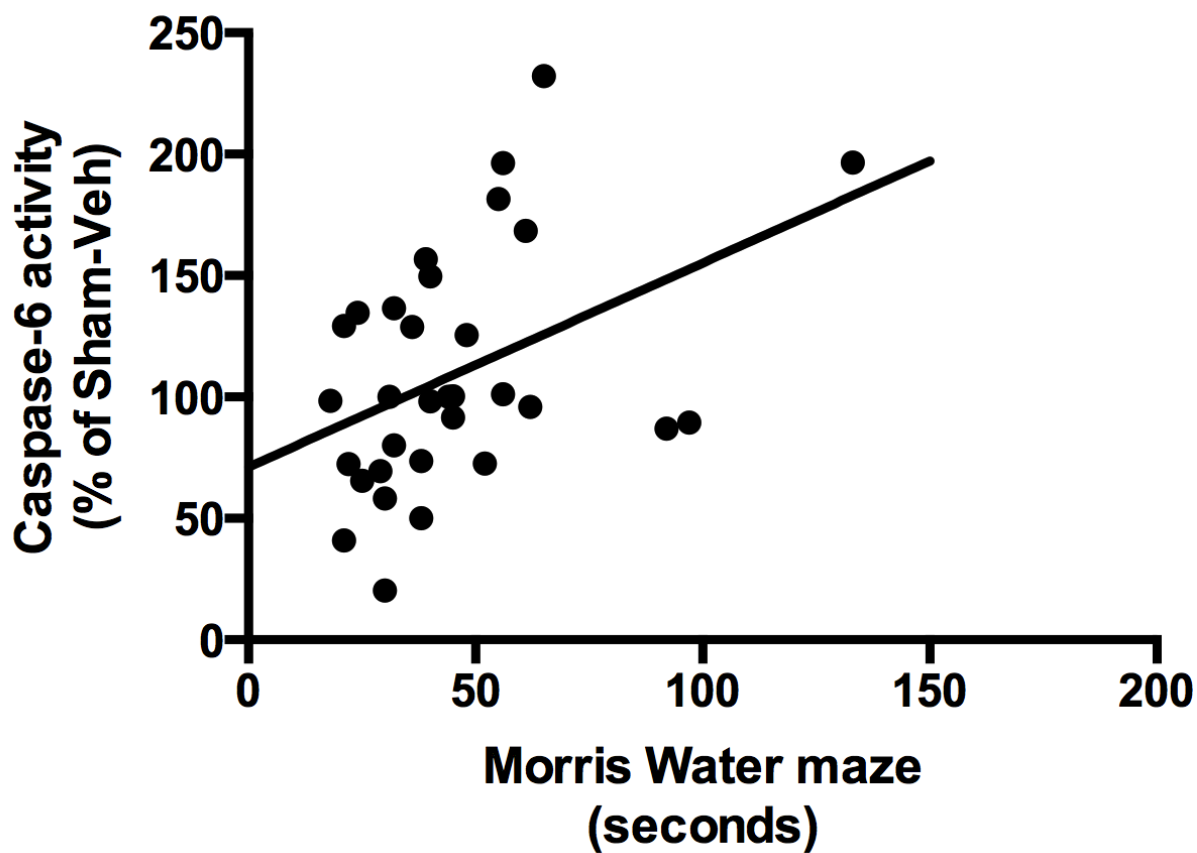


Figure 8 : Linear regression between the time spent to find the platform in the Morris Water Maze at day 6 and caspase-6 activity in the CA1 region of the hippocampus, independently of the treatment status. n= per group $r^2 = 0.29$; $p = 0.0024$.

11. References

1. Guck TP, Kavan MG, Elsasser GN, Barone EJ (2001): Assessment and treatment of depression following myocardial infarction. *Am Fam physician* 64:641-648.
2. Mavrides N, Nemeroff C (2013): Treatment of depression in cardiovascular disease. *Depress Anxiety* 30:328-341.
3. Brymer C, Winograd CH (1992): Fluoxetine in elderly patients: is there cause for concern? *J Am Geriatr Soc* 40:902-905.
4. Feighner JP (1995): Cardiovascular safety in depressed patients: focus on venlafaxine. *J Clin Psychiatry* 56:574-579.
5. Wann BP, Bah TM, Kaloustian S, Boucher M, Dufort AM, Le Marec N, et al. (2009) : Behavioural signs of depression and apoptosis in the limbic system following myocardial infarction: effects of sertraline. *J Psychopharmacol (Oxford, England)*. 23:451-459.
6. Bah TM, Benderdour M, Kaloustian S, Karam R, Rousseau G, Godbout R (2011): Escitalopram reduces circulating pro-inflammatory cytokines and improves depressive behavior without affecting sleep in a rat model of post-cardiac infarct depression. *Behav Brain Res*. 225:243-251.
7. Rousseau G, Bah TM, Godbout R (2012): Post-myocardial infarction depression. In: Lakshmanadoss U, editor. *Novel Strategies in Ischemic Heart Disease*. Rijeka, Croatia: InTech, pp 333-362.
8. Kaloustian S, Wann BP, Bah TM, Girard SA, Apostolakis A, Ishak S, et al. (2008): Apoptosis time course in the limbic system after myocardial infarction in the rat. *Brain Res*. 1216:87-91.
9. Arseneault-Breard J, Rondeau I, Gilbert K, Girard SA, Tompkins TA, Godbout R, et al. (2012): Combination of *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 reduces

post-myocardial infarction depression symptoms and restores intestinal permeability in a rat model. *Br J Nutr.* 107:1793-1799.

10. Bah TM, Kaloustian S, Rousseau G, Godbout R (2011): Pretreatment with pentoxifylline has antidepressant-like effects in a rat model of acute myocardial infarction. *Behav Pharmacol.* 22:779-784.

11. Kaloustian S, Bah TM, Rondeau I, Mathieu S, Lada-Moldovan L, Ryvlin P, et al. (2009): Tumor necrosis factor-alpha participates in apoptosis in the limbic system after myocardial infarction. *Apoptosis.* 14:1308-1316.

12. McKernan DP, Dinan TG, Cryan JF (2009): "Killing the Blues": a role for cellular suicide (apoptosis) in depression and the antidepressant response? *Prog Neurobiol* 88:246-263.

13. Kubera M, Obuchowicz E, Goehler L, Brzeszcz J, Maes M (2011): In animal models, psychosocial stress-induced (neuro) inflammation, apoptosis and reduced neurogenesis are associated to the onset of depression. *Prog neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 35:744-759.

14. Perry R, Cassagnol M (2009): Desvenlafaxine: a new serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor for the treatment of adults with major depressive disorder. *Clin Ther* 31 Pt 1:1374-1404.

15. Archer DF, Pinkerton JV, Guico-Pabia CJ, Hwang E, Cheng RF (2013): Cardiovascular, cerebrovascular, and hepatic safety of desvenlafaxine for 1 year in women with vasomotor symptoms associated with menopause. *Menopause (New-York, NY).* 20:47-56.

16. Gilbert K, Arseneault-Breard J, Flores Monaco F, Beaudoin A, Bah TM, Tompkins TA, et al. (2013): Attenuation of post-myocardial infarction depression in rats by n-3 fatty acids or probiotics starting after the onset of reperfusion. *Br J Nutr* 109:50-56.

17. Wann BP, Bah TM, Boucher M, Courtemanche J, Le Marec N, Rousseau G, et al. (2007): Vulnerability for apoptosis in the limbic system after myocardial infarction in rats: a possible model for human postinfarct major depression. *J Psychiatry Neurosci* : JPN. 32:11-16.
18. Porsolt R, McArthur RA, Lenegre A (1993): *Psychotropic screening procedures*. Amsterdam: Elsevier.
19. Szewczyk B, Poleszak E, Wlaz P, Wrobel A, Blicharska E, Cichy A, et al. (2009): The involvement of serotonergic system in the antidepressant effect of zinc in the forced swim test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33:323-329.
20. Detke MJ, Rickels M, Lucki I (1995): Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology*. 121:66-72.
21. Rénéric J-P, Bouvard M, Stinus L (2002): In the rat forced swimming test, chronic but not subacute administration of dual 5-HT/NA antidepressant treatments may produce greater effects than selective drugs. *Behav Brain Res*. 136:521-532.
22. Iwata N, Tourian KA, Hwang E, Mele L, Vialet C (2013): Efficacy and safety of desvenlafaxine 25 and 50 mg/day in a randomized, placebo-controlled study of depressed outpatients. *J Psychiatr Prac* 19:5-14.
23. Ninan PT, Shelton RC, Bao W, Guico-Pabia CJ (2014): BDNF, interleukin-6, and salivary cortisol levels in depressed patients treated with desvenlafaxine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 48:86-91.
24. Papakostas GI, Culpepper L, Fayyad RS, Musgnung J, Guico-Pabia CJ (2013): Efficacy of desvenlafaxine 50 mg compared with placebo in patients with moderate or severe major depressive disorder: a pooled analysis of six randomized, double-blind, placebo-controlled studies. *Int Clin Psychopharmacol*. 28:312-321.

25. Drzyzga LR, Marcinowska A, Obuchowicz E (2009): Antiapoptotic and neurotrophic effects of antidepressants: a review of clinical and experimental studies. *Brain Res Bull* 79:248-257.
26. Lee HJ, Kim JW, Yim SV, Kim MJ, Kim SA, Kim YJ, et al. (2001): Fluoxetine enhances cell proliferation and prevents apoptosis in dentate gyrus of maternally separated rats. *Mol psychiatry* 6:610, 725-618.
27. Parent M, Bah TM, Rousseau G, Godbout R (2013): Myocardial infarct in middle age rats is followed by mild cognitive impairment compatible with neurodegenerative diseases of aging. Society for Neuroscience 43rd Annual Meeting, San Diego (CA) 9-13 novembre 2013.
28. Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J (1982): Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*. 297:681-683.
29. Schuff N, Matsumoto S, Kmiecik J, Studholme C, Du A, Ezekiel F, et al. (2009): Cerebral blood flow in ischemic vascular dementia and Alzheimer's disease, measured by arterial spin-labeling magnetic resonance imaging. *Alzheimer's dementia* 5:454-462.
30. Firbank MJ, He J, Blamire AM, Singh B, Danson P, Kalaria RN, et al. (2011): Cerebral blood flow by arterial spin labeling in poststroke dementia. *Neurology*. 76:1478-1484.
31. Bennett SA, Tenniswood M, Chen JH, Davidson CM, Keyes MT, Fortin T, et al. (1998): Chronic cerebral hypoperfusion elicits neuronal apoptosis and behavioral impairment. *Neuroreport*. 9:161-166.
32. Lipton P (1999): Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev*. 79:1431-1568.
33. Deckwerth TL, Elliott JL, Knudson CM, Johnson EM, Jr., Snider WD, Korsmeyer SJ (1996): BAX is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. *Neuron*. 17:401-411.
34. Jacobson MD, Weil M, Raff MC (1997): Programmed cell death in animal development. *Cell*. 88:347-354.

35. Leblanc AC, Ramcharitar J, Afonso V, Hamel E, Bennett DA, Pakavathkumar P, et al. (2014): Caspase-6 activity in the CA1 region of the hippocampus induces agedependent memory impairment. *Cell death Diff.*
36. Guo H, Albrecht S, Bourdeau M, Petzke T, Bergeron C, LeBlanc AC (2004): Active caspase-6 and caspase-6-cleaved tau in neuropil threads, neuritic plaques, and neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 165:523-531.
37. Graham RK, Ehrnhoefer DE, Hayden MR (2011): Caspase-6 and neurodegeneration. *Trends Neurosci* 34:646-656.

Chapitre VII. Troisième article scientifique menant à la rédaction de cette thèse

I. Préface

Finalelement la troisième étude intitulée "**Vagus nerve is the beneficial effect of probiotics on post-MI apoptosis in the limbic system**" est soumise dans le journal "*Neurogastroenterology and Motility*"

II. Objectif

Déterminer l'implication du nerf vague dans l'effet antidépresseur des probiotiques.

III. Hypothèses

L'augmentation des marqueurs apoptotiques (caspases 3 et 8) que nous observons dans le système limbique trois jours après le début de la reperfusion chez les rats ayant subi un infarctus du myocarde, peut-être prévenue par l'administration en prophylaxie de probiotiques deux semaines avant l'évènement cardiovasculaire. Toutefois, en présence de vagotomie, l'effet anti-apoptotique des probiotiques est perdu ce qui suggère que le nerf vague est essentiel à l'effet bénéfique des probiotiques sur le système limbique. Les probiotiques sont aussi capables de prévenir des dommages au niveau de l'intestin induits par l'infarctus du myocarde.

IV. Vagotomy prevents the beneficial effect of probiotics in a model of post-myocardial infarction depression.

Mandy Malick^{1,2}, Kim Gilbert^{1,2}, Jessica Daniel^{1,2}, Jessica-Arseneault-Breard^{1,2}, Thomas A. Tompkins⁴, Roger Godbout^{1,3}, Guy Rousseau^{1,2}

¹ : Centre de biomédecine, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal 5400 Boul. Gouin Ouest, Montréal Québec Canada, H4J 1C5

² : Département de pharmacologie, Université de Montréal, CP Centre-Ville, Montréal Québec Canada, H3C 3J7

³ : Département de psychiatrie, Université de Montréal, CP Centre-Ville, Montréal Québec Canada, H3C 3J7

⁴ : Lallemand Health Solutions inc., 6100 Royalmount, Montréal, QC, Canada H4P 2R2

Running head : Vagus nerve and probiotics

Address for correspondence and reprints :

Guy Rousseau, Ph. D.

Centre de biomédecine

Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal

5400 boul. Gouin Ouest

Montréal (Québec) Canada H4J 1C5

Phone : +1-514-338-2222 ext. 3421

Fax : +1-514-338-2694

Number of pages : 27

Number of Figures : 8

1. Abstract

Myocardial infarction (MI) is associated with the presence of apoptosis in the amygdala and ultimately to clinical signs of depression. To prevent depression, different treatments have been proved to be beneficial, including the combination of two probiotics *Lactobacillus helveticus* and *Bifidobacterium longum* in prophylaxis. We have speculated that the benefit of these probiotics was due to their anti-inflammatory properties and some data suggest that an intact vagus nerve is important for this effect. The present study was designed to determine the involvement of the vagus nerve in the beneficial role of probiotics in our post-MI model of depression. Probiotics or vehicle were administered daily in adult rats, 14 days before ischemia and until euthanasia. After that, vagotomy was induced in designed groups of rats before 40 min of myocardial ischemia to produce myocardial infarction. After 3 days of reperfusion, the animals were sacrificed and myocardial infarct size was determined as well as the activity of the caspase-3 or -8 in the amygdala. Probiotics have no effect on infarct size but vagotomy provokes an increase in myocardial infarct size. In presence of MI, activity of caspase-3 and -8 is higher in the amygdala as compared to sham-operated rats where probiotics reduce the activity of these caspases. This beneficial effect is abolished in presence of vagotomy. In small intestine, probiotics have no effect on the activity of the caspase-3 and -8 but MI or vagotomy reduce these activities. Meanwhile, probiotics reduce the number of neutrophils present in the small intestine whereas vagotomy increases it.

In conclusion, our data indicate that the effect of probiotics on apoptosis observed in the amygdala after myocardial infarction is dependent on an intact vagus nerve. However, in the small intestine, probiotics have no effect on the activity of the caspase-3 or -8 where vagotomy reduces the activity.

2. Introduction

Post-myocardial depression has been shown to occur in more than 20% of patients suffering from myocardial infarction (1-3). These patients have a higher risk of mortality during the next months following the episode of ischemia (2). In our laboratory we developed a rat model to study the post-myocardial depression as well as the interaction between heart and brain (4, 5). We have shown that myocardial infarction is followed both by an increase in apoptosis in the limbic system of rats 3 days after the cardiac event(6) and developed behavior compatible with clinical signs of depression at 2 weeks post-MI(5, 7).

Apoptosis as well as depressive-like behavior can be prevented by administration of antidepressants (7, 8) or pentoxifylline (a proinflammatory cytokine inhibitor) (9), suggesting a link between inflammation, apoptosis and depression (6). Moreover, probiotics are among the treatments that present a beneficial effect in our model of post-MI depression (10, 11). Indeed, the combination of *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* R0175 can reduce both apoptosis observed in the limbic system and depressive-like behavior after MI (12). We have hypothesized that this beneficial effect is related to the action of probiotics on the balance between anti- and pro-inflammatory cytokines.

The cholinergic pathway, via the vagus nerve, is one of the physiological mechanisms that could modulate the inflammatory response. When stimulating, the vagus nerve regulates immune function and inhibits excessive pro-inflammatory cytokine production (13, 14). In an effort to determine the pathway by which the probiotics could have an anti-inflammatory effect, some studies have revealed that the vagus nerve participate in this action (15, 16), though this is not universally observed (17).

The present study was designed to determine if the vagus nerve participates in the beneficial effect of the combination of *L. helveticus* and *B. longum* on the apoptosis observed in the limbic system, mainly the amygdala, following myocardial infarction.

3. *Materials and Methods*

A. *Experimental groups*

Adult male Sprague-Dawley rats were housed individually under constant temperature (22°C) and humidity (40-50%); food and water were available ad libitum. Light period was 12h long started at 8:00 a.m. Forty-nine rats were randomly assigned to one of eight groups (sham-vehicle; sham-probiotics; sham-vehicle-vagotomy; sham-probiotics-vagotomy; MI-vehicle; MI-probiotics; MI-vehicle-vagotomy; MI-probiotics-vagotomy; see figure 1). In MI rats, the left anterior coronary artery was occluded for 40 min where the sham rats were submitted to the same protocol without the coronary occlusion. Animals in the probiotic groups received *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 and the animals in the vehicle groups received maltodextrin, the vehicle used for the probiotics administration. In twenty-four rats, before the thoracotomy (sham or MI), a laparotomy was performed, after which the left vagal trunks were cut to induce subdiaphragmatically vagotomized rats (vagotomy).

Animal care and handling procedures were approved by the Local Animal Care Committee and followed the guidelines of Canadian Council for Animal Care.

B. *Probiotics treatment*

The commercial probiotics given were a combination of *L. helveticus* R0052 and *B. longum* R0175 (Probio'Stick, provided by Lallemand Health Solutions, Montréal, QC, Canada). They were administered by dissolving freeze-dried cultures in maltodextrin or vehicle (maltodextrin) in 150 ml of tap water. For 14 days before surgery and until euthanasia, half of the MI and sham rats had access to one billion live bacterial cells of *L. helveticus* R0052 and *B. longum* R0175 per day dissolved in water, while the remaining animals received only the vehicle (maltodextrin). The drinking solution was prepared every day for the duration of the experiments.

C. Surgical and vagotomy procedure

Anaesthesia was induced with ketamine/xylazine (35-50mg/kg and 5mg/kg, i.m. respectively) and then maintained on isoflurane (1.5% ventilation). In the rats assigned to the vagotomy groups, a midline laparotomy was performed, after which the left vagal trunk was cut to induce a subdiaphragmatic vagotomy. Then a left thoracotomy was performed to induce the myocardial infarction in MI rats. The left coronary artery was occluded using a 4-0 silk suture and a plastic snare. ECG and heart rate were monitored during the surgery. After 40 min of occlusion, the ligature was loosed and the myocardial tissue was reperfused. Then the thorax was closed and the animal returned to its cage. Sham rats underwent the same surgical procedure without coronary occlusion. Antibiotic (15 000 IU penicillin G, 0.1ml sc) and analgesic (2mg/kg 0.2ml buprenorphine sc) were given 10 min after the surgery and the next morning after the surgery. After 72h of reperfusion, each animal was secured in a cone bag and rapidly decapitated. The brain was placed on a dish standing on crushed ice in order to dissect out the amygdala, rapidly snap frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until used. The heart was rapidly excised to determine infarct size and a portion of the small intestine was rapidly snap frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until needed.

D. Infarct size and area at risk measurement

The area at risk (AR) and the infarct size were determined in the following manner: upon sacrifice, the heart of MI rats was removed and the left anterior descending coronary artery was occluded at the same site as originally. In order to determine AR, Evans Blue (0.5%) was infused into the aorta by retrograde perfusion. The heart was then frozen (-80°C for 5 minutes) and four 2-mm transverse sections were sliced out. Each section was bathed at 37°C for 5 minutes in a 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride solution (TTC 1 %, pH 7.4) in order to delimitate necrotic tissue surface (I). Myocardial infarction was expressed as the percentage of necrotic AR ($[I/AR] \times 100$). AR was further expressed as a percentage of left ventricle (LV) area ($[AR/LV] \times 100$).

E. Biochemical Analysis

a. Caspase-3 and -8 activity

Caspase-3 and -8 activity was determined as previously described(6). Briefly, cytosolic proteins were extracted in lysis buffer (1 % Triton X-100, 0.32 M Sucrose, 10 mM Tris (pH 8.0), 5 mM EDTA, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Pepstatin A, 10 µg/ml Aprotinin). Enzymatic reactions were performed in reaction buffer (50 mM Tris (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.1% CHAPS, 1 mM DTT) with 25 µg of proteins and fluorogenic substrate, Ac-DEVD-AMC for caspase-3 and Ac-IETD-AMC for caspase-8 (40 µM). Reactions were incubated at 37°C for 3 h and stopped with the addition of 0.4 M NaOH and 0.4 M glycine buffer. Fluorescence was quantified with a spectrofluorometer (Photon Technology International, Lawrenceville, NJ, USA) at an excitation wavelength of 365 nm and an emission wavelength of 465 nm for caspase-3 and 430 for caspase-8.

b. Myeloperoxidase activity

Small intestine tissues were first weighed and added to hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) buffer (0.5% HTAB 50 mM potassium phosphate, pH 6.0) and pulverized using sonication. The lysates went through three freeze/thaw cycles and were centrifuged at 10 000g for 15 min. To measure the activity, 0.1 ml of supernatant is added to 2.9 ml of 50mM sodium phosphate, pH 6.0, with 0.167 mg/ml of o-dianisidine hydrochloride and 0.0005% hydrogen peroxide. The absorbance of the orange product is then measured every 10 s at 460 nm using a spectrophotometer for 2 min. The difference between the maximum and the minimum divided by 2 is generated for quantifying neutrophil activity.

F. Statistical analysis

Data are reported as mean (\pm standard error of the mean). Groups were compared with a three-way factorial ANOVA, using diet, probiotics and vagotomy as main factors. If interaction

between main factors was significant, simple effects were analysed according to Field (18) (<http://twu.seanho.com/08fall/cpsy501/field/ContrastsUsingSyntax.pdf>). MI size and AR were compared using a two-way ANOVA, using probiotics and vagotomy as main factors. $P < 0.05$ was considered significant.

4. Results

A. Infarct size and area at risk

Area at risk (AR) was similar among groups, representing approximately 70% of the left ventricle (figure 2). Infarct size, expressed as percent of the area at risk, is significantly higher in presence of vagotomy ($F_{(1,21)} 13.48$; $p < 0.05$). No other difference was detected for the interaction or main factor probiotics.

B. Apoptosis analyses

a. Caspase-3 and -8 activities in amygdala

In the lateral amygdala (figure 3), results indicated that MI increases the activity of caspase-3 ($F_{(1,37)} 14.96$; $p < 0.05$). Interestingly, whereas no significant effect of the main factors probiotics and vagotomy were observed, significant interactions between MI and probiotics ($F_{(1,37)} 8.32$; $p < 0.05$) and MI and vagotomy ($F_{(1,37)} 9.39$; $p < 0.05$) were detected. Simple effects analysis of these significant interactions indicated that in the presence of MI, probiotics prevent the increase in activation of caspase-3. In contrast, the activity of caspase-3 is increased in the combined presence of MI and vagotomy vs vagotomy only. Independently of MI, interaction of probiotics and vagotomy is also observed ($F_{(1,37)} 29.38$; $p < 0.05$). Simple effects analysis indicated that the activity of caspase-3 is increased in the presence of vagotomy.

In our 3-way ANOVA, we observed a significant result for the two main factors MI and probiotics for caspase-8 activity in the lateral amygdala (figure 4). In the presence of MI, the activity of caspase-8 is significantly increased whereas probiotics reduced the level of caspase-8 activity in the lateral amygdala. No significant difference was observed for the vagotomy or any other interaction except for the MI*Prob*Vgx. Overall, these data indicate that MI increased the activity of caspase-8 and probiotics reduced it.

In the medial amygdala (figure 5), MI also increased the activity of caspase-3 ($F_{(1,32)}9.49$; $p < 0.05$). No significant result was observed for the other main factors (probiotics and vagotomy). Interaction between MI, probiotics and vagotomy was observed, indicating that our interventions modulated the activity of caspase-3. As in the lateral amygdala, significant interaction between MI and probiotics was observed ($F_{(1,32)}4.61$; $p < 0.05$); simple effects analysis revealed that the increase of caspase-3 activity with MI is abolished in the presence of probiotics. Significant interaction between probiotics and vagotomy was also observed ($F_{(1,32)}4.28$; $p < 0.05$); simple effects analysis indicated that caspase-3 activity is increased in the presence of vagotomy and probiotics as compared to probiotics alone.

MI increases caspase-8 activity in the medial amygdala ($F_{(1,29)}30.62$; $p < 0.05$; figure 6) whereas probiotics reduce this activity ($F_{(1,29)}6.67$; $p < 0.05$). Interactions between MI and probiotics ($F_{(1,29)}5.07$; $p < 0.05$) and MI and vagotomy ($F_{(1,29)}6.55$; $p < 0.05$) are significant. Simple effects analysis of these interactions indicated that probiotics reduce the activity of caspase-8 in the presence of MI whereas caspase-8 activity is increased in the presence of MI and vagotomy. Interaction between probiotics and vagotomy is also significant ($F_{(1,29)}17.87$; $p < 0.05$). Simple effects analysis indicated that probiotics, in the presence of a vagotomy, increase the activity of caspase-8.

b. Caspase-3 and-8 in small intestine

Results indicates that MI ($F_{(1,41)}26.51$; $p < 0.05$) and the vagotomy ($F_{(1,41)}28.01$; $p < 0.05$) decrease the activity of caspase-3 whereas no significant effect was observed for the main

factor probiotics (figure 7, left). Interaction between MI and vagotomy is also significant ($F_{(1,41)} 13,13$; $p < 0.05$) and the simple effects analysis indicates that in the absence of MI, vagotomy reduces the activity of caspase-3 ($p < 0.05$) whereas in the presence of MI vagotomy has a non-significant effect.

Similar effects were also observed for the caspase-8 activity in the small intestine (figure 7, right). MI ($F_{(1,40)} 95.57$; $p < 0.05$) and vagotomy ($F_{(1,40)} 25.74$; $p < 0.05$) reduce the activity of caspase-8 whereas no effect of probiotics was observed for the main factor. A significant interaction between MI and vagotomy was also observed ($F_{(1,40)} 40.98$; $p < 0.05$); simple effects analysis reveals that in the absence of MI vagotomy reduces the activity of caspase-3 ($p < 0.05$) whereas in the presence of MI vagotomy has a non-significant effect. We also observed a significant interaction between probiotics and vagotomy ($F_{(1,40)} 7.00$; $p < 0.05$); simple effects analysis indicated that probiotics decrease the activity of caspase-8 in the presence of vagotomy whereas no effect of probiotics was observed without vagotomy.

c. Myeloperoxidase activity

Statistical analysis of the activity of myeloperoxidase revealed a significant difference for the main factors probiotics ($F_{(1,39)} 276.74$; $p < 0.05$) and vagotomy ($F_{(1,39)} 218.11$; $p < 0.05$; figure 8). In the presence of probiotics, the activity of myeloperoxidase in the small intestine is significantly reduced whereas in the presence of vagotomy the level is increased ($p < 0.05$). Significant differences were also observed for the interactions between MI and probiotics ($F_{(1,39)} 15.41$; $p < 0.05$), MI and vagotomy ($F_{(1,39)} 5.18$; $p < 0.05$) and probiotics and vagotomy ($F_{(1,39)} 120.59$; $p < 0.05$). Whereas analysis of the simple effects for the interaction between MI and probiotics and MI and vagotomy were not significant, simple effects analysis of the interaction between probiotics and vagotomy indicated that probiotics reduce significantly the level of myeloperoxidase activity in the small intestine in the presence of vagotomy.

5. *Discussion*

The results obtained in the present study confirmed that the combination of *L. helveticus* and *B. longum* had no effect on infarct size, as we have previously reported (10, 11). However, animals under vagotomy exhibited a modest though significant increase of infarct size. In the literature, this increase of infarct size has not been universally observed; some studies have reported an increase of infarct size (19) whereas other studies reported no significant effect on infarct size (20, 21). The stimulation of the vagus nerve affords cardioprotection whereas vagotomy abolishes the protection observed with preconditioning (22). This observation suggests the importance of this neural pathway in the context of cardioprotection. Yet other studies have observed that vagotomy induces a non-significant increase in infarct size (21). This discrepancy could be due to the model, species, anaesthesia and other factors that could modulate the intensity of this parasympathetic pathway, or could depend on the localisation of the vagotomy (before or after the heart). We decided to perform the vagotomy below the heart and the nearest part of the intestine to avoid any effect on infarct size, but this turned out not to have been the case. In contrast, vagotomy performed at the level of the cervical vagi has no influence on infarct size (21), suggesting that the localisation of the vagotomy may affect the infarct size. Overall, most of the studies observed, whether significant or not, a 10% increase of infarct size after vagotomy, which is similar to what we obtained in the present study.

MI induces a significant increase of the activity of caspase-3 and caspase-8 in the amygdala, by three days after the onset of the reperfusion, as we have previously reported (5, 23). This augmentation can be prevented by the combination in prophylaxis of *L. helveticus* and *B. longum*, confirming our previous results (11). We have hypothesized that this increase of apoptosis in the amygdala following MI might be due to the anti-inflammatory effect of the probiotics in this context (11). Probiotics alter the pro/anti-inflammatory balance and the present study indicates that the vagus nerve may participate in this effect probably by cholinergic anti-inflammatory pathway (24, 25). Indeed, in the presence of MI and vagotomy, probiotics are unable to reduce the activity of caspase-3 and -8 as observed in the absence of

vagotomy, suggesting the importance of the vagus nerve to allow a reduction of apoptosis in the amygdala by probiotics. It has been known for a while that stimulation of the vagus nerve results in a reduction of proinflammatory cytokines produced by immune cells (for review, (26)) and thus it seems possible that the anti-inflammatory effect of probiotics is related to the stimulation of the vagus nerve. Recently, it has been shown that this same probiotic formulation treatment was able to modulate central neuronal activation neurogenesis induced by chronic stress and ameliorate functional recovery of such synaptic plasticity (27). They also observed an attenuation of plasma concentration of noradrenaline and adrenaline that increased following exposure to stressor, suggesting that the regulation of autonomic nervous system response is probiotic dependant. Blocking the effects of activation of the sympathetic nervous system with β -adrenergic receptor antagonist propranolol blocked the stressor-induced increase in pro-inflammatory cytokines (28). Regarding the importance of vagus nerves in maintaining sympatho-adrenal system homeostasis (29), we can speculate that this probiotic treatment can modulate the communication along the gut-brain axis via the enteric-to-vagus signaling route. The probiotic *B. longum* is known to modulate enteric neuron excitability involving the vagal pathways in the brain-gut interaction (30). A central effect of probiotics has also been reported with *L. rhamnosus* on anxiety and the expression of both central GABA receptors (31). This effect is related to the vagus nerve since vagotomy prevents the effects of probiotics. Similarly, *B. longum* reduces the anxiety in a model of chronic colitis with an intact vagus nerve, where vagotomy abolished it (32). In another study it was observed that the augmentation of multiple discharge responses to an intraluminal distension detected with *L. rhamnosus* (JB-1) was prevented in the presence of vagotomy (16). The probiotics elicit a rapid frequency facilitation of the vagal afferents, which carry the information from the body to the brain (13). Overall these data indicate that some of the central effects of probiotics require an intact vagus nerve. However the link between the vagus nerve and the probiotics needs to be defined to have a better understanding of this relation.

The results are different in the small intestine. In the presence of myocardial infarction or vagotomy, we observed a reduction in the activity of caspase-3. We have previously observed

that following myocardial infarction, intestinal barrier is impaired (12). Similar observations were reported in patients with MI, suggesting that MI may directly affect the intestine (33). However, some data in the literature report that lesion in the central nervous system also results in a decrease in apoptosis in the small intestine(34). For instance, it has been observed that lesion of the ventromedial hypothalamus is related to a reduction of apoptosis in the intestine (35). These data also suggest that the effect of MI on limbic system integrity may affect the apoptosis observed in the intestine. However since our combination of probiotics reduces the effect of MI on the limbic system but has no effect on the apoptosis observed in the intestine, we believe that a direct effect of MI on the small intestine is more probable but not exclusive.

Although probiotics have no effect on apoptosis observed in the intestine after MI, our data reveal that the combination of *L. helveticus* and *B. longum* reduces the number of leucocytes in the intestine as estimated by the dosage of myeloperoxidase. Some studies reported a reduction of neutrophils accumulation with probiotics (36) while another study indicates a non-significant reduction of neutrophils with probiotics (37). The effect of probiotics on neutrophils accumulation may depend on the model used as well as the time when the treatment was started after the challenge. The reduction of neutrophils observed in our model may reflect the beneficial effect of probiotics on the integrity of the intestinal barrier that we have previously reported (12), which could be due to the presence of the lactobacillus(38). Although the number of neutrophils is elevated in the presence of vagotomy, we observed that the combination of probiotics used in the present study is able to reduce this number, suggesting a local anti-inflammatory role of probiotics that can counteract the effect of vagotomy in the small intestine.

In conclusion, our data indicate that the beneficial effect of the combination of *L. helveticus* and *B. longum* observed after MI is dependent, at least in part, on the vagus nerve.

6. Acknowledgments

We thank Caroline Bouchard for her technical support with rat surgeries and for her field expertise as well as Louis Chiocchio for his assistance in animal care. We also thank Lallemand Health Solutions for providing the probiotics and the vehicle. Dr Afifa Ait-Belgnaoui of Lallemand for her input in the discussion. K.G. holds a Ph. D. studentship from *Fonds de recherche du Québec – Santé*.

7. **Figure Legends**

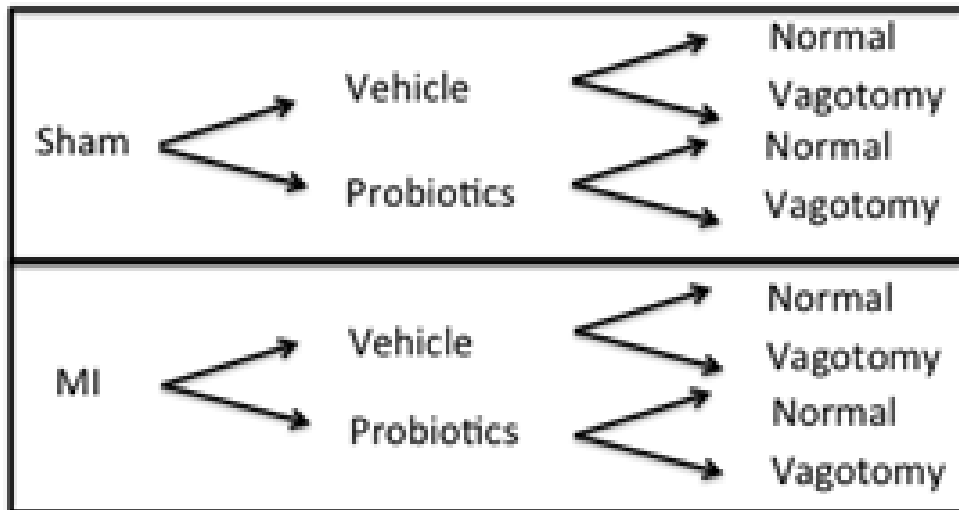


Figure 1 : Experimental protocol. Half of the rats have been included in sham-operated group whereas MI was induced in the other half. Sham and MI animals have been further divided in two: vehicle or probiotics. Finally, an other subdivision was performed; half of the animals have been included in the normal group (no vagotomy) whereas the other half, vagotomy has been performed.

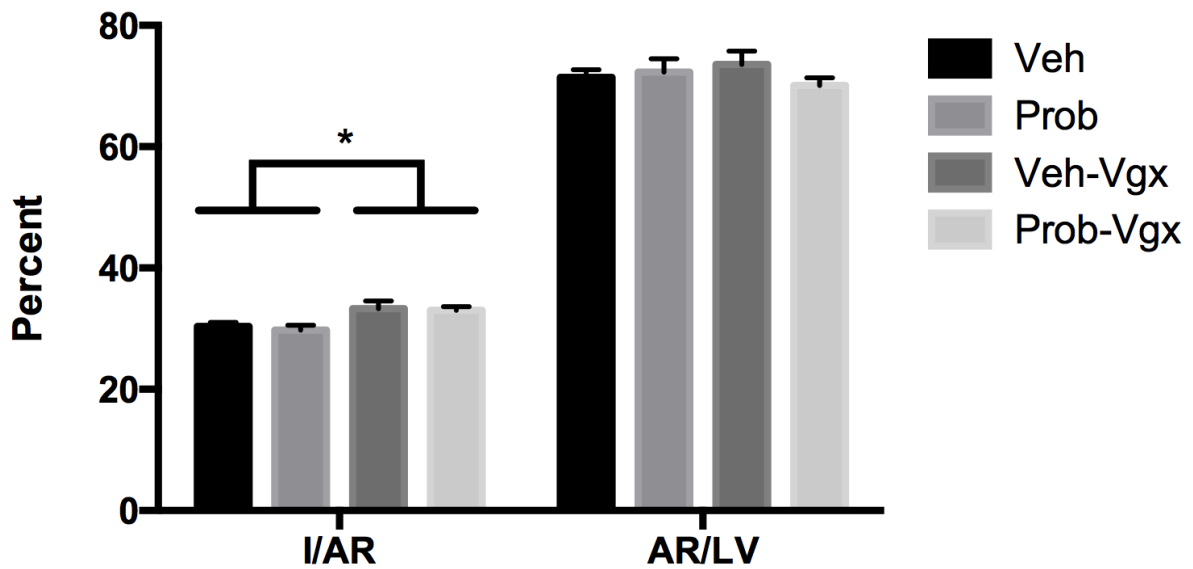
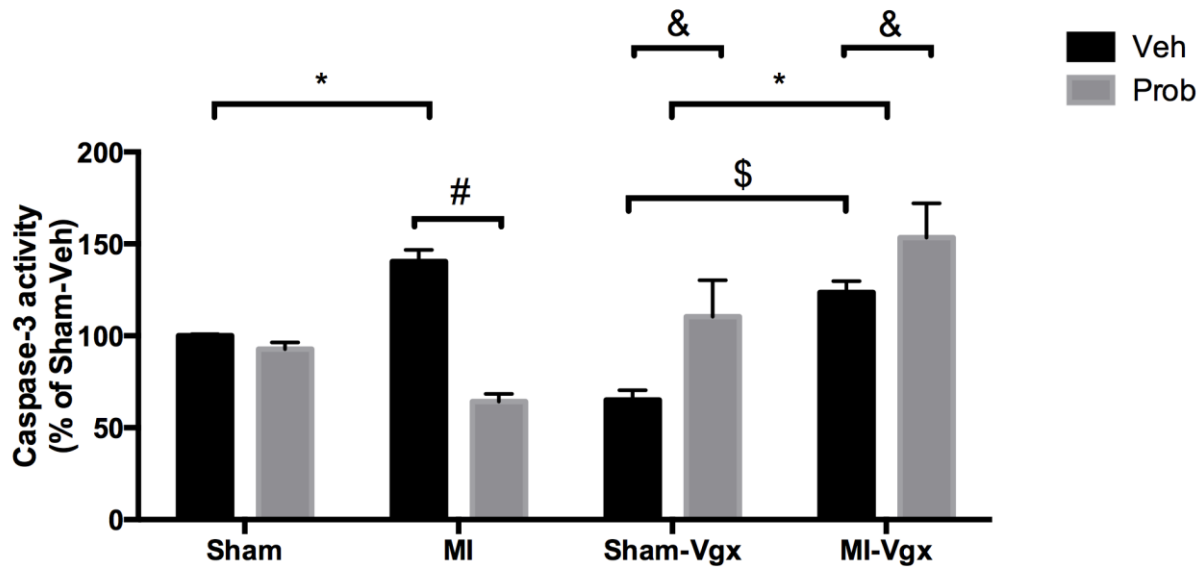
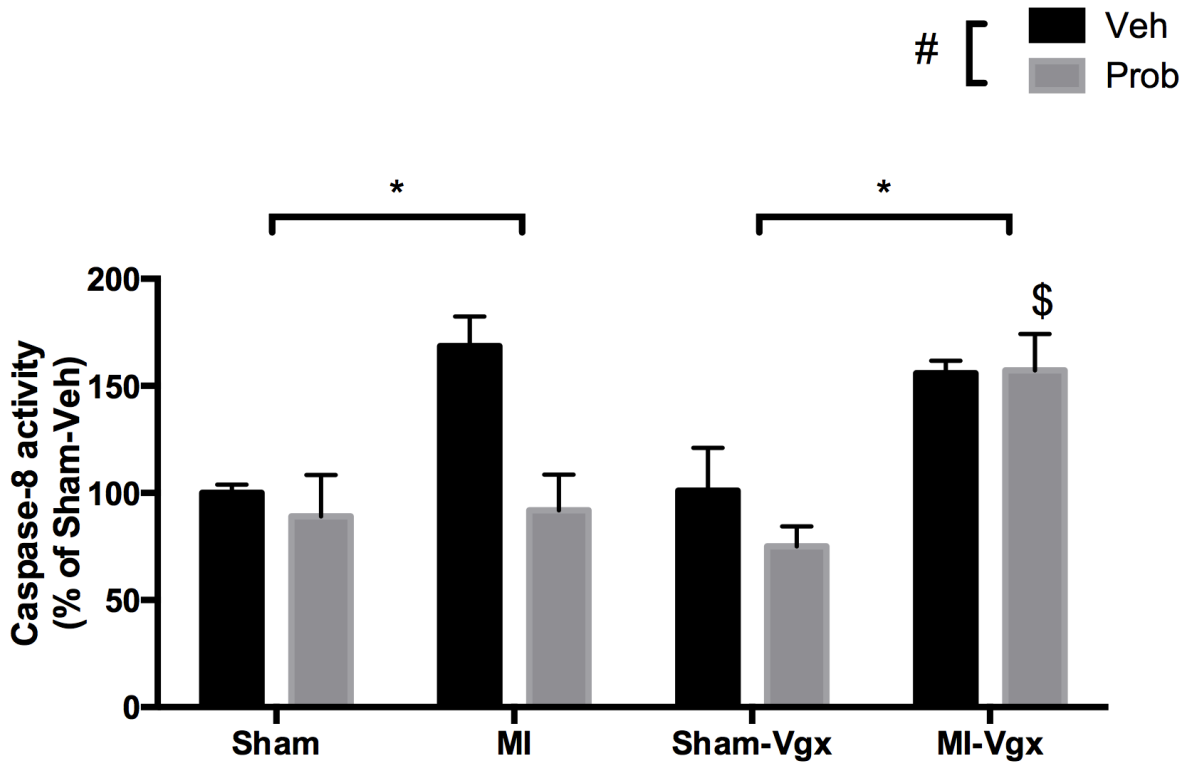


Figure 2 : Infarct size expressed as a percentage of area at risk (I/AR). Significant increase of infarct size (* $p < 0.05$) was observed in the vagotomy groups in comparison to groups without vagotomy in spite of similar area at risk (expressed as percent of the left ventricle; AR/LV). Veh : vehicle; Prob: probiotics; Vgx : vagotomy (n=6/7 per group).



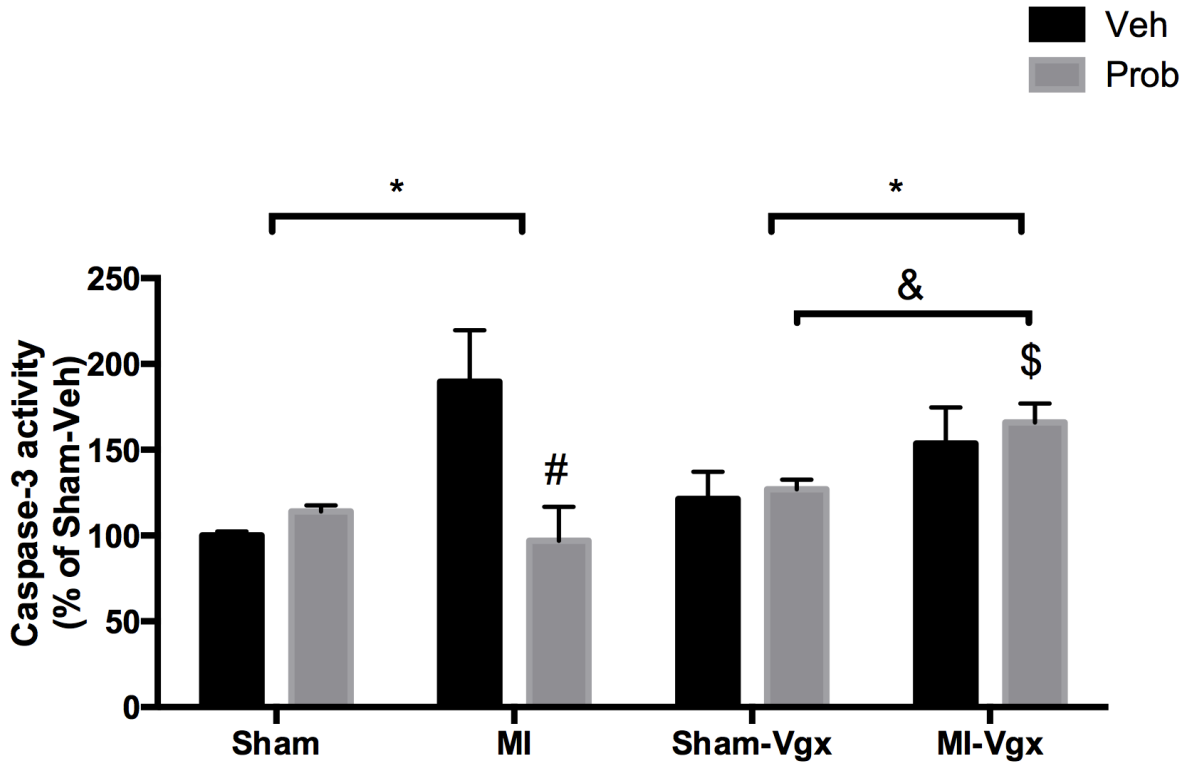
Factor or interactions	
MI	*p < 0.05
Prob	NS
Vgx	NS
MI*Prob	#p < 0.05
MI*Vgx	\$p < 0.05
Prob*Vgx	&p < 0.05
MI*Prob*Vgx	NS

Figure 3 : Caspase-3 activity in the lateral amygdala expressed as percent of the Sham-Veh group. Significant differences were observed in the main factor MI and for the interactions between MI*Prob, MI*Vgx and Prob*Vgx (*p<0.05). These data indicate that in the presence of MI, probiotics reduce the caspase-3 activity in the lateral amygdala. This beneficial effect is lost in the presence of vagotomy. Veh : vehicule; Prob: probiotics; Vgx : vagotomy; NS : not significant.



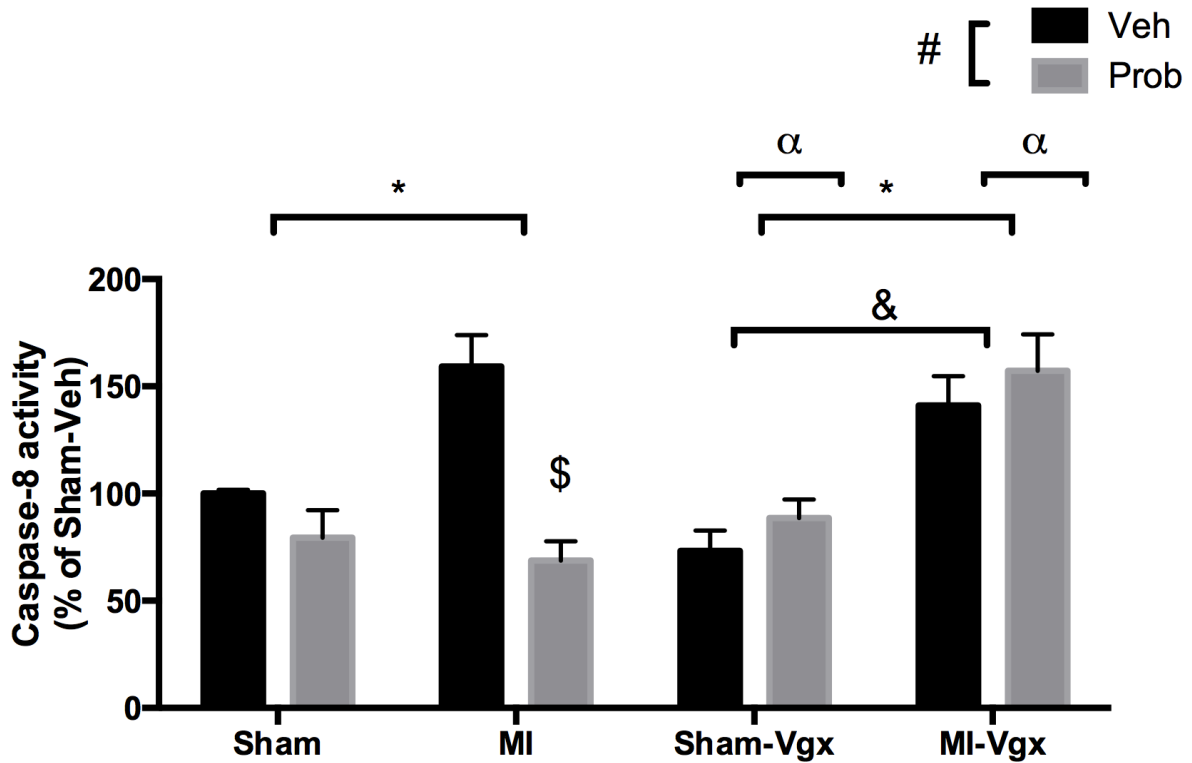
MI	*p < 0.05
Prob	#p < 0.05
Vgx	NS
MI*Prob	NS
MI*Vgx	NS
Prob*Vgx	NS
MI*Prob*Vgx	\$p < 0.05

Figure 4 : Caspase-8 activity in the lateral amygdala expressed as percent of the Sham-Veh group. Significant differences were observed in the main factor MI and Prob and for the interactions between MI*Prob*Vago (*p<0.05). These data indicate that in the presence of MI, probiotics reduce the caspase-3 activity in the lateral amygdala. This beneficial effect is lost in the presence of vagotomy. Veh : vehicule; Prob: probiotics; Vgx : vagotomy; NS : not significant.



MI	*p < 0.05
Prob	NS
Vgx	NS
MI*Prob	#p < 0.05
MI*Vgx	NS
Prob*Vgx	&p < 0.05
MI*Prob*Vgx	\$p < 0.05

Figure 5 : Caspase-3 activity in the medial amygdala expressed as percent of the Sham-Veh group. Significant differences were observed in the main factor MI and for the interactions between MI*Prob, Prob*Vgx and MI*Prob*Vgx (*p<0.05). These data indicate that in the presence of MI, probiotics reduce the caspase-3 activity in the medial amygdala. This beneficial effect is lost in the presence of vagotomy. Veh : vehicle; Prob: probiotics; Vgx : vagotomy; NS : not significant.



MI	*p < 0.05
Prob	#p < 0.05
Vgx	NS
MI*Prob	\$p < 0.05
MI*Vgx	&p < 0.05
Prob*Vgx	αp < 0.05
MI*Prob*Vgx	NS

Figure 6 : Caspase-8 activity in the medial amygdala expressed as percent of the Sham-Veh group. Significant differences were observed in the main factor MI and Prob and for the interactions between MI*Prob, Prob*Vgx and MI*Prob*Vgx (*p<0.05). These data indicate that in the presence of MI, probiotics reduce the caspase-8 activity in the medial amygdala. This beneficial effect is lost in the presence of vagotomy. Veh : vehicle; Prob: probiotics; Vgx : vagotomy; NS : not significant.

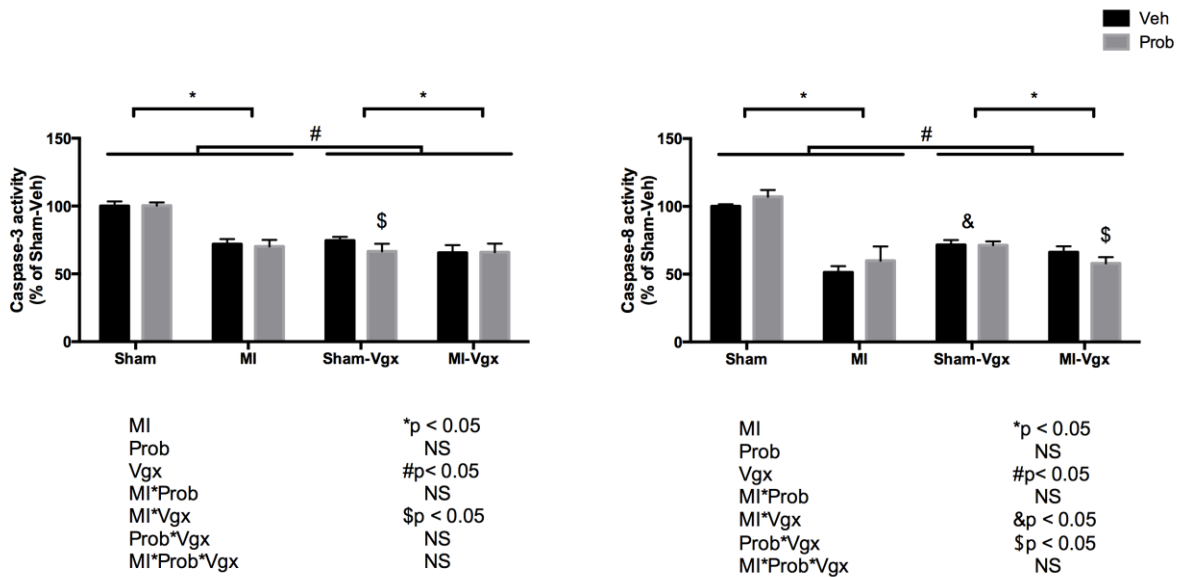
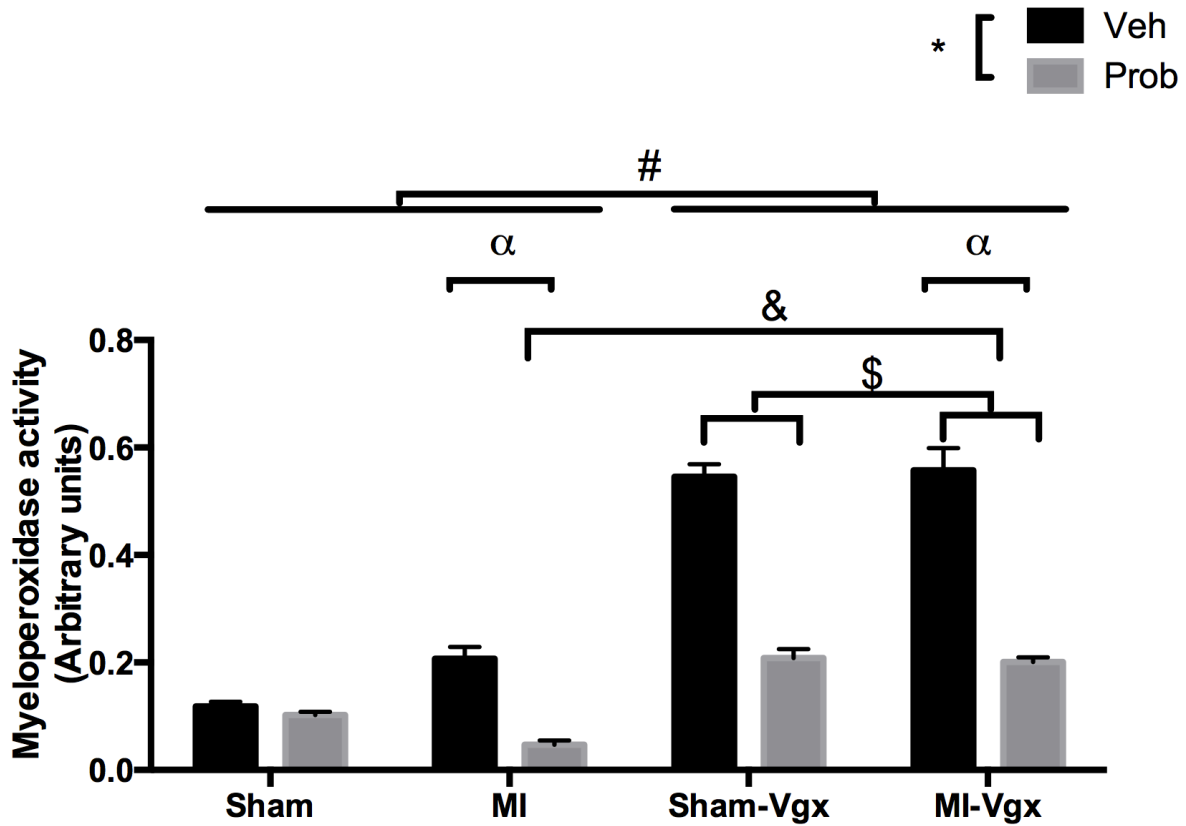


Figure 7 : Left : Caspase-3 activity in the small intestine expressed as percent of the Sham-Veh group. Significant differences were observed in the main factors MI and Vgx and for the interactions between MI*Vgx (*p<0.05). These data indicate that MI or vagotomy reduce the activity of caspase-3 in this region. Probiotics have no significant difference in this parameter. **Right :** Caspase-8 activity in the small intestine expressed as percent of the Sham-Veh group. Significant differences were observed in the main factor MI and Vgx and for the interactions between MI*Vgx and Prob*Vgx (*p<0.05). These data indicate that MI or vagotomy reduce the activity of caspase-8 in this region. Veh : vehicule; Prob: probiotics; Vgx : vagotomy; NS : not significant.



MI	NS
Prob	*p < 0.05
Vgx	#p < 0.05
MI*Prob	αp < 0.05
MI*Vgx	&p < 0.05
Prob*Vgx	\$p < 0.05
MI*Prob*Vgx	NS

Figure 8 : Estimation of the accumulation of neutrophils in the small intestine as estimated by the activity of myeloperoxidase. Significant differences were observed in the main factors Prob and Vgx and for the interactions between MI*Prob, MI*Vgx and Prob*Vgx (*p<0.05). These data indicate that Vgx increases the accumulation of neutrophils and probiotics produce a reduction of the neutrophils in this region independently of the presence or absence of vagotomy. Veh : vehicule; Prob: probiotics; Vgx : vagotomy; NS : not significant.

8. References

1. Frasure-Smith N, Lespérance F. 2003. Depression and other psychological risks following myocardial infarction. *Arch. Gen. Psychiatry* 60:627-636.
2. Frasure-Smith N, Lespérance F, Gravel G, Masson A, Juneau M, Talajic M, Bourassa MG. 2000. Social support, depression, and mortality during the first year after myocardial infarction. *Circulation* 101:1919-1924.
3. Lane D, Carroll D, Ring C, Beevers DG, Lip GYH. 2001. Mortality and quality of life 12 months after myocardial infarction: effects of depression and anxiety. *Psychosomatic Med.* 63:221-230.
4. Boucher M, Wann BP, Kaloustian S, Cardinal R, Godbout R, Rousseau G. 2006. Reduction of apoptosis in the amygdala by an A2A adenosine receptor agonist following myocardial infarction. *Apoptosis* 11:1067-1074.
5. Wann BP, Bah TM, Boucher M, Courtemanche J, Le Marec N, Rousseau G, Godbout R. 2007. Vulnerability for apoptosis in the limbic system after myocardial infarction in rats: a possible model for human postinfarct major depression. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN* 32:11-16.
6. Wann BP, Boucher M, Kaloustian S, Nim S, Godbout R, Rousseau G. 2006. Apoptosis detected in the amygdala following myocardial infarction in the rat. *Biological psychiatry* 59:430-433.
7. Wann BP, Bah TM, Kaloustian S, Boucher M, Dufort AM, Le Marec N, Godbout R, Rousseau G. 2009. Behavioural signs of depression and apoptosis in the limbic system following myocardial infarction: effects of sertraline. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)* 23:451-459.

8. Bah TM, Benderdour M, Kaloustian S, Karam R, Rousseau G, Godbout R. 2011. Escitalopram reduces circulating pro-inflammatory cytokines and improves depressive behavior without affecting sleep in a rat model of post-cardiac infarct depression. *Behavioral brain research* 225:243-251.
9. Bah TM, Kaloustian S, Rousseau G, Godbout R. 2011. Pretreatment with pentoxifylline has antidepressant-like effects in a rat model of acute myocardial infarction. *Behavioral pharmacology* 22:779-784.
10. Arseneault-Breard J, Rondeau I, Gilbert K, Girard SA, Tompkins TA, Godbout R, Rousseau G. 2012. Combination of *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 reduces post-myocardial infarction depression symptoms and restores intestinal permeability in a rat model. *The British journal of nutrition* 107:1793-1799.
11. Girard SA, Bah TM, Kaloustian S, Lada-Moldovan L, Rondeau I, Tompkins TA, Godbout R, Rousseau G. 2009. *Lactobacillus helveticus* and *Bifidobacterium longum* taken in combination reduce the apoptosis propensity in the limbic system after myocardial infarction in a rat model. *The British journal of nutrition* 102:1420-1425.
12. Arseneault-Bréard J, Rondeau I, Gilbert K, Girard SA, Godbout R, Rousseau G. 2010. Probiotics inhibit behavioural signs of depression after a myocardial infarction in a rat model. *The New York Academy of Sciences*.
13. Howland RH. 2014. Vagus Nerve Stimulation. *Current behavioral neuroscience reports* 1:64-73.
14. Mihaylova S, Killian A, Mayer K, Pullamsetti SS, Schermuly R, Rosengarten B. 2012. Effects of anti-inflammatory vagus nerve stimulation on the cerebral microcirculation in endotoxemic rats. *Journal of neuroinflammation* 9:183.
15. Bercik P, Park AJ, Sinclair D, Khoshdel A, Lu J, Huang X, Deng Y, Blennerhassett PA, Fahnstock M, Moine D, Berger B, Huizinga JD, Kunze W, McLean PG, Bergonzelli GE, Collins

SM, Verdu EF. 2011. The anxiolytic effect of *Bifidobacterium longum* NCC3001 involves vagal pathways for gut-brain communication. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 23:1132-1139.

16. Perez-Burgos A, Wang B, Mao YK, Mistry B, McVey Neufeld KA, Bienenstock J, Kunze W. 2013. Psychoactive bacteria *Lactobacillus rhamnosus* (JB-1) elicits rapid frequency facilitation in vagal afferents. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 304:G211-220.

17. van der Kleij H, O'Mahony C, Shanahan F, O'Mahony L, Bienenstock J. 2008. Protective effects of *Lactobacillus rhamnosus* [corrected] and *Bifidobacterium infantis* in murine models for colitis do not involve the vagus nerve. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 295:R1131-1137.

18. Field A. 2009. *Discovering statistics using SPSS, Third ed.* SAGE Publications Ltd, London.

19. Scheuer DA, Vitela M, Mifflin SW. 1995. Vagotomy increases myocardial infarct size in anesthetized rats. *Faseb Journal* 9:A7 (abstract).

20. Basalay M, Barsukevich V, Mastitskaya S, Mrochek A, Pernow J, Sjoquist PO, Ackland GL, Gourine AV, Gourine A. 2012. Remote ischaemic pre- and delayed postconditioning - similar degree of cardioprotection but distinct mechanisms. *Experimental physiology* 97:908-917.

21. Southerland EM, Gibbons DD, Smith SB, Sipe A, Williams CA, Beaumont E, Armour JA, Foreman RD, Ardell JL. 2012. Activated cranial cervical cord neurons affect left ventricular infarct size and the potential for sudden cardiac death. *Autonomic neuroscience : basic & clinical* 169:34-42.

22. Donato M, Buchholz B, Rodriguez M, Perez V, Inserte J, Garcia-Dorado D, Gelpi RJ. 2013. Role of the parasympathetic nervous system in cardioprotection by remote hindlimb ischaemic preconditioning. *Experimental physiology* 98:425-434.

23. Kaloustian S, Bah TM, Rondeau I, Mathieu S, Lada-Moldovan L, Ryvlin P, Godbout R, Rousseau G. 2009. Tumor necrosis factor-alpha participates in apoptosis in the limbic system after myocardial infarction. *Apoptosis* 14:1308-1316.
24. Lee JS, Paek NS, Kwon OS, Hahm KB. 2010. Anti-inflammatory actions of probiotics through activating suppressor of cytokine signaling (SOCS) expression and signaling in *Helicobacter pylori* infection: A novel mechanism. *Journal of gastroenterology and hepatology* 25:194-202.
25. Boirivant M, Strober W. 2007. The mechanism of action of probiotics. *Current opinion in gastroenterology* 23:679-692.
26. Pavlov VA, Tracey KJ. 2012. The vagus nerve and the inflammatory reflex--linking immunity and metabolism. *Nature reviews. Endocrinology* 8:743-754.
27. Ait-Belgnaoui A, Colom A, Braniste V, Ramalho L, Marrot A, Cartier C, Houdeau E, Theodorou V, Tompkins T. 2014. Probiotic gut effect prevents the chronic psychological stress-induced brain activity abnormality in mice. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 26:510-520.
28. Hanke ML, Powell ND, Stiner LM, Bailey MT, Sheridan JF. 2012. Beta adrenergic blockade decreases the immunomodulatory effects of social disruption stress. *Brain, behavior, and immunity* 26:1150-1159.
29. Thrivikraman KV, Zejnelovic F, Bonsall RW, Owens MJ. 2013. Neuroendocrine homeostasis after vagus nerve stimulation in rats. *Psychoneuroendocrinology* 38:1067-1077.
30. Khoshdel A, Verdu EF, Kunze W, McLean P, Bergonzelli G, Huizinga JD. 2013. *Bifidobacterium longum* NCC3001 inhibits AH neuron excitability. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 25:e478-484.

31. Bravo JA, Forsythe P, Chew MV, Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, Bienenstock J, Cryan JF. 2011. Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:16050-16055.
32. Bercik P, Verdu EF, Foster JA, Macri J, Potter M, Huang X, Malinowski P, Jackson W, Blennerhassett P, Neufeld KA, Lu J, Khan WI, Corthesy-Theulaz I, Cherbut C, Bergonzelli GE, Collins SM. 2010. Chronic gastrointestinal inflammation induces anxiety-like behavior and alters central nervous system biochemistry in mice. *Gastroenterology* 139:2102-2112 e2101.
33. Mao Y, Wang SQ, Mao XB, Zeng QT, Li YS. 2011. Intestinal barrier function in patients with acute myocardial infarction and the therapeutic effect of glutamine. *International journal of cardiology* 146:432-433.
34. Fujimoto K, Iwakiri R, Utsumi H, Kojima M, Ishibashi S, Wu B, Sakata H, Noda T. 2001. Effect of the central nervous system on mucosal growth and apoptosis in the small intestine. *Digestion* 63 Suppl 1:108-111.
35. Fujimoto K, Iwakiri R, Wu B, Fujise T, Tsunada S, Ootani A. 2002. Homeostasis in the small intestinal mucosa balanced between cell proliferation and apoptosis is regulated partly by the central nervous system. *Journal of gastroenterology* 37 Suppl 14:139-144.
36. Watanabe T, Nishio H, Tanigawa T, Yamagami H, Okazaki H, Watanabe K, Tominaga K, Fujiwara Y, Oshitani N, Asahara T, Nomoto K, Higuchi K, Takeuchi K, Arakawa T. 2009. Probiotic Lactobacillus casei strain Shirota prevents indomethacin-induced small intestinal injury: involvement of lactic acid. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 297:G506-513.
37. Bercik P, Verdu EF, Foster JA, Macri J, Potter M, Huang X, Malinowski P, Jackson W, Blennerhassett P, Neufeld KA, Lu J, Khan W, Corthesy-Theulaz I, Cherbut C, Bergonzelli GE,

Collins SM. 2010. Chronic Gastrointestinal Inflammation Induces Anxiety-Like Behavior and Alters Central Nervous System Biochemistry in Mice. *Gastroenterology* 139:2102-2112.

38. Vyas U, Ranganathan N. 2012. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: gut and beyond. *Gastroenterology research and practice* 2012:872716.

Discussion générale

Les résultats présentés dans les trois articles ont été discutés en détail dans chacun des manuscrits. Le prochain chapitre discutera de ces résultats dans un contexte et une perspective plus globale afin de les positionner

I. La physiopathologie de la dépression post-infarctus du myocarde est-elle la même qu'une autre dépression ?

1. Cytokines et apoptose dans la dépression post-infarctus du myocarde

Depuis 1960, plusieurs études démontrent que les maladies cardiovasculaires constituent un risque dans le développement de troubles dépressifs [145, 392, 393]. Plus récemment, il a été démontré que 65 % des patients ayant subi un infarctus du myocarde présentent des symptômes de dépression et 20 % de ceux-ci développent une dépression majeure dans les 6 à 8 mois suivant cet évènement cardiaque [2]. Dans notre laboratoire, un modèle de dépression post-infarctus du myocarde chez le rat a été mis en place mimant la physiopathologie de la dépression après un infarctus du myocarde que l'on peut retrouver chez l'Homme [161, 391]. Ce modèle a permis de découvrir que trois jours après l'infarctus du myocarde, les rats présentent une augmentation des marqueurs apoptotiques (caspases) dans le système limbique ainsi que des comportements de dépression deux semaines après l'évènement cardiaque [90, 161, 276, 327, 391]. Les comportements de dépression se traduisent par une anhédonie, de la détresse comportementale ainsi que d'un comportement de retrait social [90, 391]. L'apoptose et les comportements de dépression peuvent être prévenus pharmacologiquement par différents antidépresseurs tels que la désipramine, la sertraline, l'escitalopram [161, 276, 391] et dans cette thèse la desvenlafaxine ainsi que par la pentoxifylline [275] (un inhibiteur des cytokines pro-inflammatoire) et le célécoxib [327]. Aussi, en plus de diminuer les comportements de dépression, l'escitalopram a aussi permis de

diminuer les cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-1 β et la PGE2 ainsi que l'apoptose dans le système limbique chez les rats ayant eu un infarctus du myocarde [276] suggérant que l'effet antidépresseur de la molécule agirait via son effet anti-inflammatoire. En effet, certaines études ont montré que les antidépresseurs diminuent la concentration des cytokines pro-inflammatoires périphérique chez l'Homme [217, 240] potentialisant certainement leur effet thérapeutique. Ces données suggèrent un lien entre apoptose, cytokines pro-inflammatoires et comportement de dépression post-infarctus du myocarde. L'apoptose se retrouve aussi dans la dépression induite par un stress chronique [305, 394] et les antidépresseurs sont aussi efficaces à prévenir cette apoptose [394, 395].

L'hypothèse physiopathologique de la dépression post-infarctus que nous envisageons repose sur l'activation de la mort par apoptose dans certaines régions du système limbique par les cytokines pro-inflammatoires périphériques. En effet, la reperfusion après un infarctus du myocarde entraîne une augmentation de cytokines pro-inflammatoires plasmatiques telles que IL-1 β , IL-6, et TNF- α [73, 396, 397]. Francis et coll ont observé que la synthèse de TNF- α dans l'hypothalamus augmente très rapidement dans les minutes suivant l'ischémie et participerait à la mort par apoptose dans le système limbique via l'activation des récepteurs de mort de la voie extrinsèque d'apoptose [336]. Le blocage du récepteur TNF- α avant le début de l'ischémie par l'administration d'un récepteur soluble TNFR1 humanisé, diminue significativement l'apoptose après 15 min et 72 heures de reperfusion dans le système limbique [73]. En clinique, une augmentation des marqueurs inflammatoires chez les patients dépressifs a été révélée [398, 399]. Plus précisément, une production plasmatique accrue de cytokines inflammatoires tel que l'IL-1 β , l'IL-2, l'IL-6, l'IL-10, et IFN- γ [242], ainsi qu'une augmentation des concentrations d'IL-1 β et d'IL-6 dans le liquide céphalorachidien de patients souffrant de troubles dépressifs a été observée [400]. Une concentration élevée de cytokines pro-inflammatoires plasmatiques pourrait induire l'apoptose et de ce fait provoquer les symptômes de dépression chez l'Homme [243, 401, 402]. Il existe aussi une corrélation entre l'augmentation de la concentration plasmatique de cytokines pro-inflammatoires et la sévérité des symptômes de dépression [403]. De plus, une proportion importante de patients traités

par immunothérapie par IFN- γ développent des symptômes de dépression qui sont atténués par la prise d'antidépresseurs [404]. Cet effet a pu être reproduit chez le rongeur où l'injection intraveineuse d'IFN- γ humain augmente l'immobilité dans le test de Porsolt [405]. Finalement, un traitement par des anti-inflammatoires permet une amélioration significative des symptômes de dépression chez l'Homme [406, 407]. Dans cette thèse, la première étude nous a permis de démontrer qu'il y avait une augmentation de l'apoptose dans la région de l'amygdale après un infarctus du myocarde pouvant être à l'origine des comportements de dépression observés plus tard. En effet l'amygdale est une région d'intérêt dans la dépression majeure avec l'hippocampe et le cortex préfrontal. Le rôle de l'amygdale est au centre de la gestion des émotions, de l'anxiété et des réactions de peur. En effet elle reçoit par la partie latérale de nombreuses informations en provenance des régions sensorielles du thalamus et du cortex, qui l'informe d'un danger mais aussi de plusieurs autres structures comme l'hippocampe et le cortex préfrontal qui lui décrivent de quel type de danger il s'agit et s'il est nécessaire de prendre la fuite [408]. Ce noyau envoie l'information au noyau médial et au noyau central qui lui projette vers d'autres structures cérébrales pour produire diverses réactions physiologiques et comportementales relatives à la réponse à un stress. Ces structures correspondent à la substance grise périaqueducule contrôlant le comportement émotionnel, le noyau périventriculaire de l'hypothalamus et l'hypothalamus latéral, qui contribuent respectivement à la réponse viscérale par la sécrétion de cortisol et à l'activation sympathique, le noyau moteur du nerf vague qui contrôle le système parasympathique (figure 12).

Si l'amygdale est dysfonctionnelle, elle peut mal interpréter l'information provenant des structures en aval et toutes les structures innervées par celle-ci reçoivent alors une information pouvant être éronnée. En clinique l'imagerie cérébrale a permis de détecter une hyperactivation des cellules gliales de l'amygdale ainsi qu'une diminution de son volume chez les personnes dépressives [131]. Étant donné que les récepteurs aux cytokines ont été détectés dans la région de l'hippocampe et que cette structure est en relation étroite avec l'amygdale il est possible que les cytokines pro-inflammatoires sécrétées lors de l'infarctus du myocarde

envahissent d'abord l'hippocampe puis l'amygdale. Les cytokines provoqueraient ainsi la mort par apoptose des cellules de ces structures et engendreraient ainsi les comportements de dépression.

Toutes ces données suggèrent que la physiopathologie de la dépression après un infarctus serait la même que celle de la dépression majeure c'est-à-dire serait à composante inflammatoire. Bien que dans certaines de nos études antérieures nous ayons observé une augmentation des cytokines pro-inflammatoires plasmatiques après l'infarctus du myocarde chez le rat, nous n'avons pas noté de différences significatives dans notre étude. Nous avons utilisé différentes méthodes de dosage de cytokines pro-inflammatoires telles que l'ELISA ou le multiplex, mais les variations étaient très grandes. Plusieurs facteurs peuvent influencer les mesures. Tout d'abord l'heure à laquelle le sacrifice est effectué : il est important de s'assurer que les sacrifices se font tous au même moment de la journée. Lorsqu'il y a plusieurs animaux à sacrifier par exemple dans une journée, le délai entre le premier et le dernier peut-être de plusieurs heures et ainsi induire une variation. En effet le matin le niveau de corticostérone est plus élevé et influence sur la concentration de cytokines certainement. Ensuite, les animaux sont soumis à plusieurs tests comportementaux les jours précédents le sacrifice pouvant leur créer un stress. Le stress peut influencer les niveaux circulants de cytokines et donc encore participer à une variation de la mesure. Finalement, d'autres facteurs comme le changement d'animalier, le moment où la nourriture a été ingérée, la prise d'eau peuvent eux aussi influencer le niveau de cytokines circulant.

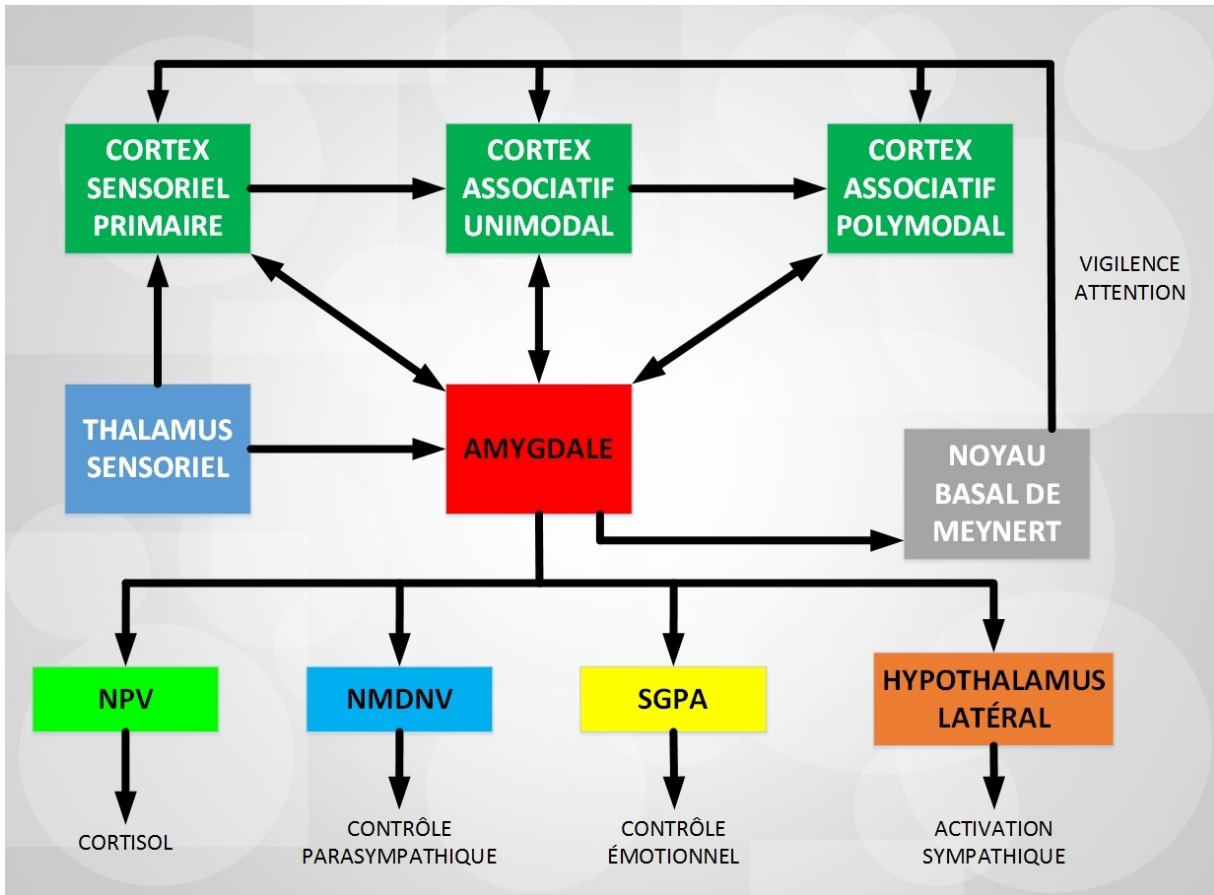


Figure 12 : Implication de l'amygdale dans les symptômes de la dépression. L'amygdale est au centre de la gestion des émotions, de l'anxiété et des réactions de peur. Elle reçoit par la partie latérale de nombreuses informations en provenance des régions sensorielles du thalamus et du cortex (voie courte ou voie longue décrites dans la figure 7), qui l'informe d'un danger mais aussi de plusieurs autres structures comme l'hippocampe et le cortex préfrontal qui lui décrivent quel type de danger il s'agit et s'il est nécessaire de prendre la fuite [408]. Ce noyau envoie l'information au noyau médial et central qui lui projette vers la substance grise périaqueducule contrôlant le comportement émotionnel, le noyau périventriculaire de l'hypothalamus et l'hypothalamus latéral, qui contribuent respectivement à la réponse viscérale par la sécrétion de cortisol et à l'activation sympathique, le noyau moteur du nerf vague qui contrôle le système parasympathique.

2. Développement de la dépression post-infarctus et complication

Lors d'un épisode infectieux, un ensemble de symptômes, non spécifiques de la maladie, tels qu'une anorexie, une grande fatigue, et un manque d'intérêt pour son environnement physique et social se développent chez l'Homme. L'ensemble de ces réponses comportementales est regroupé sous le terme de comportement de maladie [409]. Un certain nombre d'analogie entre ces comportements de maladie et de nombreux symptômes de la dépression ont été décrits, dont : une activité réduite, une anorexie, ainsi qu'une anhédonie [217]. Plusieurs études montrent que l'apparition des troubles de l'humeur est précédée d'une dérégulation de la réponse immunitaire [7, 8]. De plus, ces symptômes peuvent être atténués par l'administration d'inhibiteurs de la synthèse de cytokines, d'antagonistes de cytokines ou encore l'utilisation d'animaux knock-out pour certaines cytokines [410, 411]. Des études cliniques ont permis de mettre en évidence que l'administration thérapeutique de cytokines telles que IL-2 ou IFN- γ induit une importante production de cytokines dont l'IFN- γ , l'IL-6, l'IL-10, corrélée à l'apparition d'altérations de l'humeur [215, 412]. Chez le rat, l'injection systémique d'IL-1 β ou de TNF- α induit des comportements de dépression [413]. Si les comportements de maladie sont majoritairement transitoires et disparaissent dès les marqueurs inflammatoires diminués, l'administration prolongée de cytokines chez l'Homme provoque, dans un tiers des cas, l'apparition de symptômes neuropsychiatriques comprenant des troubles de l'humeur (anhédonie, irritabilité, anxiété), ainsi que des troubles cognitifs (déficit d'attention, perte de mémoire, confusion, indécision) [214, 217, 414]. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'action chronique des cytokines pourrait être responsable du développement des symptômes dépressifs observés lors d'une infection.

Dans notre modèle de dépression post-infarctus du myocarde chez le rat dans lequel nous avons observé une composante inflammatoire peu de temps après l'infarctus, l'hypothèse cytokine dépendante stipulerait que si l'inflammation est prévenue, les comportements de dépression ne se développeraient pas ou si l'inflammation est atténuée à plus long terme, les comportements de dépression eux aussi disparaîtraient. Dans la deuxième publication, nous avons analysé les comportements de dépression à 2 semaines post-reperfusion en utilisant 2

tests comportementaux différents : Le test de socialisation qui mesure le temps d'interaction réduit des rats dépressifs et le test d'évitement passif qui mesure l'efficacité comportementale réduite des rats dépressifs en présence d'un stimulus aversif répété [415]. Les résultats de ces deux tests indiquent que deux semaines après l'infarctus du myocarde, les rats développent des comportements de dépression comme nous l'avons déjà observé dans les études antérieures [391, 416]. Ces comportements de dépression peuvent être prévenus par l'administration de desvenlafaxine dès le début de la reperfusion. Ce résultat est en accord avec d'autres études faites chez l'humain qui ont déjà démontré que l'administration de paroxétine et fluoxétine respectivement en prévention avant le début de l'immunothérapie prévient les symptômes de dépression [212, 220]. Ensuite, les comportements de dépression à long terme et les troubles de l'apprentissage 4 mois post-reperfusion ont été déterminés respectivement avec le test de la nage forcée (test de Porsolt) qui constitue une mesure de détresse comportementale chez les rats dépressifs [417, 418] et le test du labyrinthe aquatique de Morris (version allostérique) qui est un test d'orientation spatiale [419]. Les résultats au test de la nage forcée ont montré que les rats ayant eu un infarctus du myocarde et traités à la saline durant 4 mois s'immobilisaient significativement plus longtemps que les rats témoins. Ce comportement passif traduit une déficience du système motivationnel caractéristique du trouble dépressif [420]. Cette détresse comportementale a pu être prévenue par la desvenlafaxine indépendamment de la durée du traitement et indépendamment du moment où le traitement a débuté.

Comme les antidépresseurs ont des effets anti-inflammatoires, ils seraient en mesure de prévenir l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires responsable d'une part des comportements de maladie qui peuvent être prédominants deux semaines après l'infarctus du myocarde même si de l'apoptose a été détecté trois jours après l'infarctus. En effet, bien qu'il y ai une augmentation de l'apoptose trois jours après la reperfusion il y a aussi une augmentation du facteur de croissance BDNF dans le gyrus dentelé 2 jours après la reperfusion et 7 jours après la reperfusion dans l'amygdale médiane [421]. Ceci indique qu'il existe une certaine compensation de l'apoptose dans les premiers jours après l'infarctus et que les

comportements de dépression observée 2 semaines après l'infarctus du myocarde pourraient être seulement des comportements de maladie. Toutefois si la composante inflammatoire n'est pas prévenue ou inhibée 2 semaines après l'infarctus du myocarde, l'action chronique des cytokines pro-inflammatoires seraient responsable des comportements de dépression majeure 4 mois après l'infarctus du myocarde. La dépression à 2 semaines ne serait pas la même que la dépression à 4 mois.

Ensuite, les résultats au test de la piscine de Morris démontrent que les rats ayant eu un infarctus du myocarde présentent des troubles de l'apprentissage qui peuvent être prévenus par un traitement par la desvenlafaxine débutant dès le début de la reperfusion sur une courte période. Le test de la piscine de Morris repose sur l'intégrité de la région CA3 de l'hippocampe [419]. Les analyses biochimiques montrent qu'il y a une augmentation de l'activité de la caspase-3 dans la région CA3 de l'hippocampe chez les rats jamais traités avec la desvenlafaxine 4 mois après la reperfusion ce qui pourrait expliquer les problèmes d'apprentissage observés chez ces rats. La région CA3 de l'hippocampe n'a démontré aucune activation de la caspase-3 trois jours après la reperfusion dans notre première étude ni dans aucune de nos études antérieures [191, 391]. Il a déjà été démontré dans notre modèle que la mort par apoptose dans le système limbique des rats après un infarctus du myocarde est cinétique dépendante [191]. Une hypothèse est que la mort par apoptose des cellules d'une région provoque une perte de support trophique et électrique nécessaire à la survie des cellules des régions avoisinantes [422]. Peut-être que la mort par apoptose de la région CA1 observée à 3 jours post-reperfusion provoque une perte de connexions avec la région CA3 de l'hippocampe et serait ainsi responsable de la mort par apoptose observée 4 mois plus tard dans cette région.

Nous avons aussi observé une augmentation de l'activité de la caspase-6 dans la région CA1 de l'hippocampe 4 mois après l'infarctus du myocarde chez les rats jamais traités à la desvenlafaxine. La caspase-6 est particulièrement impliquée dans les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer et la maladie d'Huntington [423-426]. Il est admis que c'est une protéine activée très tôt dans l'apparition de ces maladies

responsables en partie de la mort et la dégénérescence neuronale [423, 425]. Une augmentation significative de l'ARNm de la caspase-6 est observée dans des échantillons post-mortem de cerveaux de personnes atteintes de maladies d'Alzheimer par rapport aux personnes témoins [427]. Il a été démontré que la caspase-6 coupe aussi la protéine précurseur amyloïde jouant un rôle important dans l'apparition de la maladie d'alzheimer [423, 425]. La région CA1 étant la première région touchée par l'apoptose après l'infarctus du myocarde chez le rat [191] est aussi la seule dans laquelle nous observons une augmentation de caspase-6 quatre mois après la reperfusion. Il est possible que si nous attendions encore quelques semaines, d'autres régions (plus particulièrement de l'hippocampe) montrent aussi une augmentation de la caspase-6. De plus, dans une étude très récente il a été démontré que l'activation de la caspase-6 dans la région CA1 était responsable des troubles de l'apprentissage spatial chez des souris âgées [428].

Finalement dans cette étude nous avons pu démontrer que la dépression après un infarctus semble suivre un décours temporel très précis débutant par l'activation de l'apoptose dans la région CA1 de l'hippocampe puis dans l'amygdale et se propageant dans d'autres régions plus tardivement (Région CA3 de l'hippocampe). L'induction de l'apoptose serait alors responsable des comportements de dépression et des troubles de l'apprentissage si aucun traitement n'est établi. De nombreuses études semblent démontrer que la dépression pourrait être soit une réaction précoce au déclin cognitive ou encore un prodrome de démences [429-431]. Tous ces symptômes auraient comme origine l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires. En effet, les cytokines sont en partie responsables de la diminution de la neurogenèse [282], d'une induction de l'apoptose [302, 432] ainsi qu'une dérégulation des fonctions cognitives [281, 283, 294, 433]. Yirmiya et coll ont démontré que l'injection intra-cérébro-ventriculaire d'un antagoniste du récepteur $Il-1\beta$ chez le rat provoque des troubles de l'apprentissage spatial ainsi que des troubles de la mémoire [293].

Selon l'hypothèse cytokine dépendante, l'origine de la dépression serait la même que la dépression post-infarctus du myocarde c'est-à-dire d'origine inflammatoire et provoquerait alors dans les deux cas des troubles cognitifs à long terme si aucun traitement n'est instauré.

Toutefois, dans la dépression post-infarctus du myocarde il est possible de connaître l'évènement inflammatoire inducteur et d'agir tout de suite avant que la cascade d'évènements provoquant les comportements de dépression commence. Toutefois, il est admis que les maladies cardiovasculaires sont associées à une augmentation du risque de développer des problèmes cognitifs et des démences [434-436]. Une seconde hypothèse proviendrait d'une baisse de la circulation sanguine cérébrale se manifestant après un infarctus du myocarde et serait responsable de la mort par apoptose des cellules dans le système limbique [437-439]. Il serait donc intéressant dans notre étude de déterminer cette composante dans le cerveau de nos rats 4 mois après l'infarctus du myocarde.

II. Rôle du nerf vague dans la dépression post-infarctus

1. *Nerf vague et apoptose dans le système limbique*

En plus d'un lien entre l'infarctus du myocarde, l'inflammation et les comportements de dépression que l'on a démontré, il y aurait aussi un lien entre les cytokines, les troubles gastro-intestinaux et les troubles dépressifs. En effet, les personnes atteintes de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin présentent 3 fois plus de dépressions que la population générale [440]. Selon des estimations, l'anxiété et la dépression affectent 30 % des patients atteints de maladies chroniques de l'intestin en période de rémission et 60 %-80 % au cours de la maladie [441-443]. La physiopathologie de cette association n'est pas comprise et il est difficile de savoir si l'anxiété et la dépression peuvent être une conséquence de la maladie intestinale chronique. Plus récemment, un lien a été proposé entre les maladies psychiatriques, l'inflammation et l'exposition aux microbes [444]. Des études sur des modèles d'animaux de colite ou utilisant l'infection par la bactérie *Campylobacter Jejuni* ont montré que l'inflammation de l'appareil gastro-intestinal peut être accompagnée par des changements de comportement qui incluent l'anorexie [445] et l'anxiété [337, 355]. Ces dernières études ont suggéré que la réponse comportementale à l'inflammation serait médiée via la voie vagale. En effet, les neurones sensoriels du nerf vague au niveau des afférences expriment les récepteurs aux cytokines [332, 333]. Francis et coll ont observé que la destruction du nerf vague afférent par du phénol 30 min avant le début de l'ischémie chez le rat prévient l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires dans le cerveau [336]. Dans notre étude nous avons observé qu'en présence de vagotomie, l'activité des caspases-3 et -8 dans les régions de l'amygdale latérale et médiane est significativement augmentée chez les rats ayant subi un infarctus du myocarde comparée aux rats avec infarctus du myocarde sans vagotomie. Il est admis que l'activation des efférences vagues peut avoir un effet anti-inflammatoire périphérique via la diminution des cytokines pro-inflammatoires [446] [447]. Le mécanisme le plus probable fait intervenir la sous-unité nAChR $\alpha 7$ présente à la surface des macrophages (Figure 10) qui va fixer l'Ach et qui va alors induire une activation de la protéine

STAT3 qui va ensuite agir d'une part comme facteur de croissance et activer l'expression de gènes de protéines anti-inflammatoires et d'autre part en inhibant le facteur de transcription NF- κ B qui provoque la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Des études ont en effet montré que l'ACh diminue de manière dose-dépendante la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , d'IL-1 β , d'IL-6 et d'IL-18) par les macrophages humains stimulés in vitro par des endotoxines [448].

Il est possible que la destruction du nerf vague dans notre modèle de dépression post-infarctus du myocarde chez le rat, inhibe l'effet anti-inflammatoire de celui-ci et provoque alors une augmentation encore plus marquée de l'apoptose dans le système limbique par les cytokines pro-inflammatoires. Le nerf vague via son action anti-inflammatoire régulerait la mort par apoptose dans le système limbique après un infarctus du myocarde. Il serait intéressant de déterminer effectivement si l'infarctus du myocarde provoque une activation du nerf vague pour confirmer cette hypothèse via le dosage de la protéine cfos.

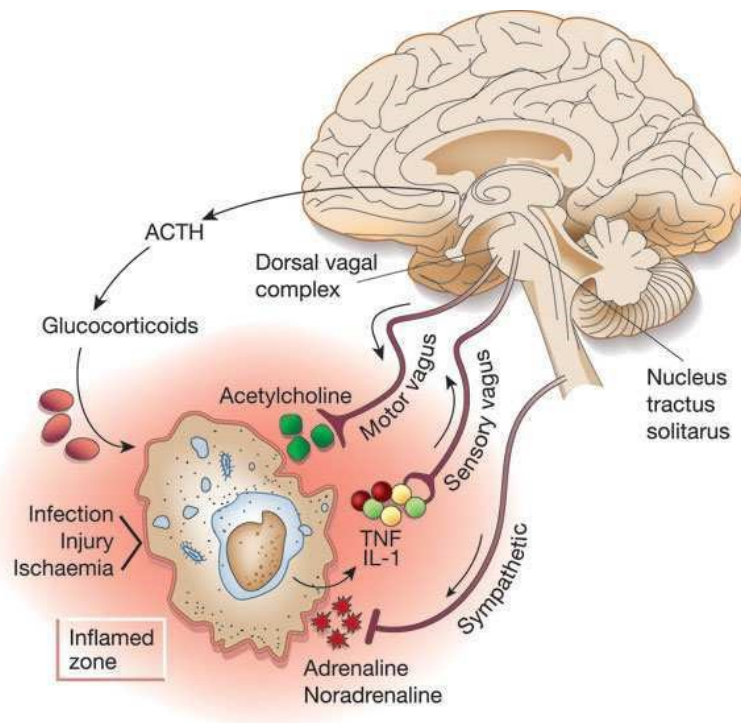


Figure 13 : La voie cholinergique anti-inflammatoire (d'après Tracey, 2002) [449].

2. *Le nerf vague est nécessaire à l'effet antidépresseur des probiotiques*

Certaines études soutiennent l'hypothèse que le nerf vague contribuerait au signal entre les bactéries pathogènes intestinales et le cerveau [337, 355]. Les comportements de dépression et d'anxiété ainsi que l'altération du système GABAergique, engendrés par un traitement chronique par *Lactobacillus rhamnosus* sont atténués chez les souris vagotomisées [450]. Une autre étude a démontré que les comportements de dépression engendrés par du sulfate de sodium dextran chez les souris peuvent être renversés par l'administration de probiotiques, mais que cet effet est perdu si les souris sont vagotomisées [451]. En effet, il a récemment été démontré que les probiotiques disposent d'un potentiel antidépresseur détaillé dans la dernière section de cette thèse [348].

Dans cette thèse nous avons observé une augmentation de l'activité des caspases-3 et -8 dans les régions de l'amygdale latérale et médiane chez les rats ayant subi un infarctus du myocarde comparé aux rats témoins [90, 162]. Les probiotiques sont capables de renverser cette activation comme nous l'avons observé antérieurement dans l'étude de Girard et coll [372]. Les probiotiques perdent cependant leur capacité à prévenir l'augmentation de ces caspases en présence de vagotomie chez les rats avec infarctus du myocarde.

Le rôle du nerf vague dans l'effet thérapeutique des probiotiques a été suggéré dans de nombreuses études, mettant en avant le lien entre l'intestin et le SNC [451-453]. Par exemple, dans un modèle animal de colite ulcéreuse, la souche *B. longum* a permis de renverser les comportements d'anxiété que démontraient les souris sous colite alors que l'effet des probiotiques est perdu chez les animaux vagotomisés [451]. De même, chez la souris soumise à des stress chroniques pour induire la dépression, la souche *L. Rhamnosus* a permis de réduire les concentrations circulantes de corticostérone ainsi que les comportements de dépression. Cet effet est encore une fois perdu chez les animaux vagotomisés [450]. De plus, certaines études ont découvert que les probiotiques modulent l'excitabilité des neurones entériques suggérant encore l'implication du nerf vague dans l'effet bénéfique des probiotiques [453]

Pour conclure le nerf vague semble être essentiel à l'effet thérapeutique antidépresseur des probiotiques dans la dépression post-infarctus du myocarde chez le rat. Il serait envisageable de faire une étude dans laquelle nous donnons un antidépresseur avec une vagotomie pour déterminer si le nerf vague est aussi essentiel à l'action d'un antidépresseur sur l'apoptose dans le système limbique et sur les comportements de dépression après un infarctus du myocarde. Ceci suggérerait un rôle important du nerf vague dans un traitement antidépresseur.

3. Rôle du nerf vague dans la triade intestin, infarctus du myocarde et système nerveux central

Récemment dans notre laboratoire il a été démontré qu'en plus de provoquer de l'apoptose dans le système limbique et des comportements de dépression, l'infarctus du myocarde provoque une augmentation de la perméabilité de la membrane épithéliale intestinale chez les rats, associée à une augmentation de cytokines pro-inflammatoires plasmatiques [9, 10]. Les mêmes observations ont été reportées chez des patients après un infarctus du myocarde. [454].

En accord avec cela, d'autres études démontrent aussi que l'exposition aux cytokines pro-inflammatoires altère la fonction de la barrière épithéliale sur une culture de membrane épithéliale polarisée [455, 456]. Les cytokines pro-inflammatoires ouvrent les jonctions serrées, augmentent la perméabilité paracellulaire et affectent l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale [353, 354]. Dans notre troisième étude, nous avons, pour la première fois, observé que l'activité de la caspase-3 est diminuée dans le petit intestin des rats ayant subi un infarctus du myocarde ainsi que chez les rats vagotomisés. De même, l'interaction entre l'infarctus du myocarde et la vagotomie a montré qu'en présence d'infarctus du myocarde, la vagotomie n'a pas d'effet sur l'activité de la caspase-3 alors qu'en absence d'infarctus, la vagotomie diminue l'activité de la caspase-3. Nous pouvons supposer que l'infarctus et la vagotomie agissent via le même mécanisme et que si l'un ou l'autre est présent,

c'est suffisant, il n'y aurait pas d'effet synergique. L'hypothèse probable dans notre modèle resterait encore une fois l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires. Des études antérieures ont souligné le rôle des cytokines pro-inflammatoires sur l'induction de l'apoptose comme médiateur de l'augmentation de la perméabilité de la membrane épithéliale [457]. Toutefois, d'autres ont démontré que l'effet pro-apoptotique des cytokines pro-inflammatoires est indépendant à leur habilité à induire une dysfonction de barrière épithéliale suggérant que l'apoptose n'est pas le facteur majeur dans l'augmentation de la perméabilité de la membrane intestinale [458, 459]. Donc la diminution de l'apoptose que l'on observe dans notre étude chez les rats après un infarctus du myocarde n'explique pas forcément l'augmentation de la perméabilité de la membrane intestinale retrouvée dans une étude antérieure de notre laboratoire [10]. Les cytokines pro-inflammatoires sont aussi capables de promouvoir la prolifération cellulaire et la survie des cellules [460, 461]. L'intégrité de la barrière épithéliale est dépendante de l'équilibre entre la production de nouvelles cellules épithéliales et leur élimination. Toute modification de cet équilibre via une diminution de l'apoptose comme nous l'observons dans notre étude peut compromettre le fonctionnement de l'intestin, car les cellules peuvent devenir trop vieilles si elles ne sont plus dégradées par l'apoptose et devenir moins fonctionnelles. Mettant en exergue la relation entre le cerveau et l'intestin, certaines études ont démontré que des lésions au niveau du système nerveux central provoquent une diminution de l'apoptose dans l'intestin [462, 463]. Ces observations pourraient expliquer que l'apoptose au niveau du système limbique retrouvée après un infarctus du myocarde dans notre modèle de dépression post-infarctus chez le rat est à son tour responsable de la diminution de l'apoptose dans l'intestin. Peut-être que l'inhibition du nerf vague provoque une diminution du tonus parasympathique et donc de la motilité de tractus intestinal via une diminution du système nerveux entérique et une modification biochimique provoquant une diminution de l'apoptose. Toutefois, l'administration de probiotiques chez les rats après un infarctus du myocarde dans cette thèse est capable de prévenir l'augmentation de l'apoptose dans le système limbique, mais aucune modification n'est cependant observée dans l'intestin. Seulement les rats vagotomisés présentent une diminution de l'activité des caspases-3 et -8. Nous avons supposé que comme la vagotomie

provoque les mêmes effets que l'infarctus du myocarde sur l'apoptose dans le système limbique et dans l'intestin, le signal apoptotique passe par le nerf vague. Nous avons démontré que les probiotiques agissent via le nerf vague sur le système nerveux central, il est possible que cette voie de signalisation nerveuse soit rapide comparé à l'action sur l'intestin ce qui pourrait expliquer que nous n'observons rien après 3 jours de traitement avec les probiotiques sur l'apoptose dans l'intestin et que le traitement devrait être administré plus longtemps.

III. Quel traitement pour soigner la dépression post-infarctus du myocarde doit-on privilégier ?

1. Doit-on plutôt prescrire un inhibiteur de la sérotonine et de la noradrénaline ou rester avec les antidépresseurs spécifiques de la sérotonine ?

Actuellement le traitement de la dépression post-infarctus du myocarde se traite avec des antidépresseurs de la classe des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS)[148, 464, 465]. Ces médicaments sont capables de prévenir l'apoptose dans le système limbique chez nos rats trois jours après l'infarctus du myocarde et permettent d'atténuer les comportements de dépression deux semaines après l'infarctus du myocarde [276, 466]. Cependant en clinique, les patients atteints à la fois de troubles dépressifs et de problème cardiovasculaire ne semblent pas améliorer le pronostic cardiovasculaire [380]. De plus, certaines personnes ne répondent pas à ce genre de traitement. Alors qu'une étude récente démontre que les inhibiteurs de la recapture de la noradrénaline et de la sérotonine (IRNS) pourraient avoir une efficacité légèrement meilleure que les inhibiteurs spécifiques de la sérotonine dans le traitement de la dépression [467]. Toutefois, Jan et coll ont démontré que les inhibiteurs de la recapture de la noradrénaline présentent une activité pro-apoptotique [468] et pourraient ainsi contribuer à aggraver l'apoptose retrouvée dans le système limbique de nos rats après l'infarctus du myocarde.

Dans notre première étude, nous avons démontré que l'infarctus du myocarde provoque une augmentation de la mort par apoptose des cellules dans les régions de l'amygdale latérale et médiale ainsi que dans la région CA1 de l'hippocampe chez les rats trois jours après la reperfusion. La desvenlafaxine donnée 5 min après le début de la reperfusion sur 3 jours permet de prévenir l'augmentation de l'apoptose dans les régions de l'amygdale latérale et médiane contrairement à ce qu'on noté Jan et coll [468]. De façon similaire aux ISRS testés dans notre laboratoire, la desvenlafaxine n'a aucun effet dans la région CA1 de l'hippocampe après un infarctus du myocarde [276, 391]. La région CA1 étant sensible à l'hypoxie, l'apoptose dans cette région serait activée via la voie intrinsèque et les antidépresseurs n'agiraient pas sur cette voie de signalisation. Dans le cas de la région de l'amygdale, les cytokines pro-inflammatoires sécrétées au niveau du site ischémique joueraient le rôle de ligand majeur dans l'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose et passeraient par l'activation des caspases 3 et 8. La desvenlafaxine diminue justement l'activité des caspases 3 et 8 dans les régions de l'amygdale latérale et médiane suggérant que l'effet anti-apoptotique de cette molécule provient d'un effet anti-inflammatoire. Toutefois, certains auteurs ont mentionné que les IRNS n'avaient pas d'effet sur la synthèse de cytokines pro-inflammatoires [469, 470]. Nous pouvons donc supposer que l'effet anti-inflammatoire d'un antidépresseur et donc l'effet anti-apoptotique dépendent de sa capacité à inhiber la recapture de la sérotonine. Nous pourrions ainsi attribuer l'effet de l'inhibition de la sérotonine plutôt que l'inhibition de la noradrénaline sur l'effet anti-apoptotique que détient la desvenlafaxine. En effet, les cytokines dont IL-1 β et TNF- α sont des activateurs de l'indoléamine 2,3 dioxygénase (IDO) [471-473]. Cette enzyme vient briser le tryptophane, le précurseur de la sérotonine, en kinurénine. Une activation de l'IDO entraîne donc une diminution de sérotonine et une augmentation plasmatique de kinurénine. La kinurénine est convertie en acide kinurénique dans les astrocytes et en acide quinolinique dans la microglie ayant toutes les deux des activités cytotoxiques qui modulent le système monoaminergique [234, 474]. De plus, IL-1 β et TNF- α viennent augmenter la recapture de la sérotonine par une activité amplifiée de ses transporteurs dans le cerveau via l'activation de la voie MAPK par p38 [475]. Les cytokines auraient donc une double action sur la biodisponibilité de la sérotonine via une diminution de sa synthèse et via une augmentation

de sa recapture. Un autre mécanisme pouvant être attribué à la desvenlafaxine et pouvant lui conférer son potentiel anti-apoptotique serait via la voie de signalisation PI3K/Akt. Une étude récente a démontré en effet que la venlafaxine permet de prévenir la mort par apoptose dans une culture de cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines via la voie de signalisation PI3K/Akt [476]. Des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

En plus d'avoir des effets anti-apoptotiques, nous avons démontré que la desvenlafaxine s'est montrée efficace à prévenir les comportements de dépression à court et long terme dans notre modèle de dépression post-infarctus chez le rat. Ces résultats sont en accord avec des études cliniques qui démontrent que la desvenlafaxine est efficace à diminuer les symptômes de dépression chez l'Homme [477, 478]. Finalement, nous pouvons supposer que l'administration de la desvenlafaxine tout de suite dès le début de la reperfusion sur une courte période est capable de prévenir l'apoptose dans le système limbique par une action anti-inflammatoire, et donc le développement des comportements de dépression à court et long terme.

Ensuite, les comportements de dépression déjà présents chez les rats traités à la saline 2 semaines après l'infarctus du myocarde, peuvent être renversés par l'administration de desvenlafaxine tous les jours durant 4 mois. Les antidépresseurs disposent aussi de propriétés neurogéniques qui pourraient s'expliquer par une augmentation du support trophique des cellules. Enfin, la desvenlafaxine permet de prévenir la mise en place de trouble de l'apprentissage après un infarctus du myocarde comme le démontre notre test de la piscine de Morris. En effet, les rats après un infarctus du myocarde mettent beaucoup plus de temps à trouver la plate forme dans le test comparé aux rats traités à la desvenlafaxine. Cette observation est en accord avec les études qui démontrent que les antidépresseurs améliorent les fonctions cognitives dans la dépression potentiellement par un effet anti-inflammatoire [295, 394, 479].

Maintenant, il serait intéressant d'envisager une étude dans laquelle nous donnerions un antidépresseur (ou un inhibiteur des cytokines) dès le début de la reperfusion sur 3 jours

seulement et de déterminer les comportements de dépression et les troubles d'apprentissages 4 mois plus tard. En nous basant sur les études antérieures démontrant que l'apoptose est prévenue avec un traitement de 3 jours post-reperfusion, nous pourrions supposer que l'inhibition de l'apoptose est suffisante pour prévenir les comportements de dépression à long terme.

Finalement, la desvenlafaxine semble être sécuritaire après un infarctus du myocarde, car contrairement aux autres antidépresseurs de la classe des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine, testés dans notre laboratoire [276, 391] nous avons observé une diminution de la taille de l'infarctus de 18 % chez les rats traités avec la desvenlafaxine 3 jours post-reperfusion. Des analyses complémentaires sont nécessaires pour déterminer l'éventuel effet cardioprotecteur de la desvenlafaxine.

En conclusion, comme les inhibiteurs sélectifs de la sérotonine, la desvenlafaxine permet de prévenir l'apoptose dans le système limbique des rats ainsi que les comportements de dépression à court et long terme et les troubles de l'apprentissage. Toutefois, cette molécule semble avoir un léger bénéfice cardioprotecteur que ne détiennent pas les inhibiteurs sélectifs de la sérotonine.

Maintenant, certains patients ne souhaitent pas prendre d'antidépresseur, car ils ont déjà un traitement assez lourd post-infarctus du myocarde et appréhendent les effets secondaires de ces derniers. En effet, de nombreuses personnes ne tolèrent pas le traitement voire même pour certain le traitement n'apporte aucun bénéfice sur leur santé mentale. Une alternative aux antidépresseurs, représentant un traitement plus naturel et moins lourd pour les patients après un infarctus du myocarde serait de prendre des compléments de probiotiques.

2. *Effet antidépresseur des probiotiques*

De nombreuses études soutiennent l'évidence que les probiotiques détiennent des effets antidépresseurs [348, 373, 452]. Plus précisément dans notre modèle de dépression post-

infarctus du myocarde chez le rat l'administration d'une combinaison de probiotiques *Lactobacillus Helveticus* R0052 et *Bifidobacterium longum* R0175 en prophylaxie permet de diminuer l'apoptose dans certaines régions du système limbique, ainsi que les comportements de dépression [10, 372]. Dans notre étude sur les probiotiques, nous avons aussi observé une diminution de l'activité des caspases 3 et 8 dans les régions de l'amygdale latérale et médiane chez les rats traités avec des probiotiques après un infarctus du myocarde comparé aux rats témoins et que cet effet est perdu lorsque le nerf vague est sectionné. À la suite d'observations faites dans l'étude de Girard et coll dans notre laboratoire, il a été proposé que c'est l'action anti-inflammatoire des probiotiques qui pourrait leur conférer leur pouvoir anti-apoptotique [372] et donc leur effet antidépresseur. En effet, les cytokines semblent être responsables de la mort par apoptose dans le système limbique chez les rats après un infarctus du myocarde, leur diminution aurait un effet anti-apoptotique [275]. De plus, comme la stimulation du nerf vague est anti-inflammatoire via la diminution des cytokines pro-inflammatoires [446] cela suggère que l'effet anti-inflammatoire des probiotiques se ferait via un mécanisme impliquant le nerf vague. Des études ont en effet démontré que les probiotiques ont des effets anti-inflammatoires [480, 481]. Plus précisément, l'étude de Lee et coll démontre que les probiotiques activent une voie de signalisation impliquant STAT3 sur une culture de cellule de mucus gastrique infectée par *H.Pylori*.

En plus de diminuer les cytokines pro-inflammatoires plasmatiques dans notre modèle de dépression post-infarctus du myocarde chez le rat, les probiotiques ont aussi permis de restituer la fonction de la barrière intestinale qui est perturbée après un infarctus du myocarde [10, 372]. Nous avons nous même observé dans cette thèse que les rats ayant subi un infarctus du myocarde ainsi que les rats vagotomisés démontraient une diminution de l'activité des caspases 3 et 8 dans le petit intestin. Les probiotiques ont diminué l'activité de la caspase-8 en présence de vagotomie ce qui confirme notre hypothèse que les probiotiques nécessitent un nerf vague intact pour être bénéfique. Nous avons aussi vu une diminution de l'activité des neutrophiles estimée par le dosage de la myéloperoxidase chez les rats ayant eu des probiotiques. Ceci démontre bien que les probiotiques exercent aussi une action locale directe

sur l'intestin. Watanabe et coll dans un modèle d'infection intestinale induite par l'indométacine chez le rat ont eux aussi observé une diminution des neutrophiles chez les rats traités en prophylaxie par les probiotiques *Lactobacillus casei* [482] alors qu'une autre étude utilisant un modèle d'infection par le parasite *Trichimuris Muris* chez le rat ne mentionne aucune diminution de neutrophiles chez les rats traités avec *L rhamnosus* et *B longum* [483]. La souche de probiotiques, et surtout le moment auquel le traitement est commencé, semblent être déterminants dans l'action anti-inflammatoire des probiotiques sur l'intestin

Ces données suggèrent donc que les probiotiques agissent via le nerf vague sur le système nerveux central en prévenant l'augmentation de l'apoptose dans l'amygdale des rats après un infarctus du myocarde. Cette action pourrait être anti-inflammatoire via la diminution des cytokines pro-inflammatoires. Le mécanisme reste à déterminer, mais l'hypothèse possible est la stimulation du système cholinergique via la fixation de l'Ach sur le récepteur nAChR $\alpha 7$ induisant l'augmentation de STAT-3 et l'inhibition de NF-kB. Finalement les probiotiques pourraient agir directement sur l'intestin en diminuant les cytokines pro-inflammatoires locales se traduisant par une diminution de l'activité des neutrophiles. En effet, les cytokines IL-8 et CCL11 attirent les neutrophiles, il faudrait dans le futur doser ces cytokines dans les intestins des rats.

Conclusion générale

Tel que démontré dans cette thèse, après l'infarctus du myocarde, les rats présentent à la fois une augmentation des marqueurs apoptotiques, des comportements de dépression et des troubles de l'apprentissage à long terme si aucun traitement n'est établi. Les comportements de dépression, les troubles de l'apprentissage ainsi que la mort par apoptose ont été prévenus par l'administration de desvenlafaxine débutant dès le début de la reperfusion, et ce même sur une courte période de traitement (2 semaines). La forte prévalence des troubles de l'humeur fréquemment associée aux pathologies à composante inflammatoire comme l'infarctus du myocarde dans notre cas ne semble pas être le reflet d'une réaction psychologique à la douleur, la détresse émotionnelle ou encore l'invalidité souvent observée au cours de la maladie, mais plutôt une conséquence directe d'une inflammation [211]. Il est donc important d'intervenir rapidement chez les patients dès les premiers jours qui suivent l'infarctus du myocarde, et avant même l'apparition des premiers signes de dépression dans le but de prévenir les complications à long terme.

En plus de pouvoir causer des comportements de dépression, l'infarctus du myocarde est aussi associé à une modification de l'homéostasie de l'intestin se traduisant par une diminution de l'activité apoptotique ainsi qu'une augmentation de l'activité des neutrophiles. Un traitement en prophylaxie par des probiotiques permet de prévenir l'apoptose dans le système limbique des rats après un infarctus du myocarde ainsi que le maintien de l'homéostasie de l'intestin. La consommation de probiotiques chez les personnes à risque (hypertendus, obèses, qui ont des antécédents de maladies cardiovasculaires) pourrait prévenir les troubles neurobiologiques et la mise en place de la dépression après un infarctus du myocarde.

Finalement, le nerf vague semble être essentiel à l'effet bénéfique antidépresseur des probiotiques.

Significations scientifiques des résultats de cette thèse

L'utilisation de modèles animaux capables de reproduire l'ensemble des symptômes caractérisant l'hypothèse inflammatoire de la dépression majeure est facilement discutable [484]. Ces modèles ne permettront jamais d'appréhender chez le rongeur des symptômes cliniques tels que les idées pessimistes ou suicidaires, le manque de motivation [485]. Néanmoins, de nombreux efforts ont été réalisés pour développer des tests comportementaux de dépression chez l'animal, ne visant pas à modéliser l'ensemble des symptômes du syndrome dépressif, mais plutôt basés sur des analogies comportementales et pharmacologiques avec certains des symptômes majeurs décrits chez les patients dépressifs [486]. Ainsi, certains aspects tels que l'anhédonie, de même que le manque de socialisation ou la résignation peuvent être évalués grâce à différents tests comportementaux dont la validité et la reproductibilité ont été maintes fois démontrées [487].

La mise en place de notre modèle animal de dépression post-infarctus du myocarde dans notre laboratoire a permis de montrer que ce modèle présente des signes comportementaux de dépression et des perturbations biochimiques comparables à d'autres modèles animaux de dépression et à ce que l'on retrouve chez l'humain [488-490]. De plus, les comportements de dépression post-infarctus du myocarde sont sensibles aux effets de divers antidépresseurs (escitalopram, sertraline) [276, 466] comme d'autres modèles animaux de dépression [163]. Ce modèle permet alors d'étudier d'une manière très proche la physiopathologie que l'on retrouve après un infarctus du myocarde chez l'humain.

Les résultats de cette thèse montrent que l'administration précoce 5 min après le début de la reperfusion de l'antidépresseur desvenlafaxine avait pour but de prévenir non seulement les comportements de dépression à court et long terme ainsi que les troubles de l'apprentissage, mais aussi les dommages neurobiologiques causés à la suite de l'infarctus du myocarde tel que l'augmentation de l'apoptose dans le système limbique.

Aussi, la desvenlafaxine a permis de réduire la taille de l'infarctus du myocarde de 18 %. Dans les études antérieures de notre laboratoire, faites avec les antidépresseurs de la classe des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine, aucun effet sur la taille de l'infarctus n'a été observé [276, 466]. Toutefois dans la seconde étude, la taille de la cicatrice laissée après un infarctus du myocarde n'était significativement pas plus petite avec la desvenlafaxine. Ces résultats suggèrent que la desvenlafaxine pourrait avoir un effet bénéfique limite sur la taille de l'infarctus et que, dépendamment des situations, il est possible que la différence n'atteigne pas le seuil de significativité. Dans nos études où une intervention produit une différence significative sur la taille de l'infarctus, l'effet est plus de 30 % de réduction au lieu de 18 %, comme observé dans la première étude. Néanmoins, on peut affirmer que la desvenlafaxine ne semble pas avoir d'effet néfaste dans l'infarctus du myocarde.

Ensuite, il avait déjà été démontré dans notre laboratoire que l'infarctus du myocarde provoque une augmentation de la perméabilité de la barrière épithéliale intestinale et que cela pouvait être prévenu par l'administration de probiotiques en prophylaxie. De même, les comportements de dépression ainsi que l'apoptose dans le système limbique peuvent être prévenus par les probiotiques [10, 372]. Les résultats de cette thèse démontrent pour la première fois qu'il existe une voie de communication impliquant le nerf vague qui renforce le lien physiopathologique entre l'intestin et le système nerveux central. Nous avons aussi pu démontrer que le nerf vague est essentiel à l'action anti-apoptotique des probiotiques dans le système limbique des rats après un infarctus du myocarde.

L'administration préventive de probiotiques chez les personnes à risque de développer un infarctus du myocarde pourrait être envisagée en clinique et complétée par une thérapie comportementale pour une meilleure prise en charge des patients après un infarctus du myocarde.

Les résultats de cette thèse ont permis de comprendre que le syndrome de dépression post-infarctus du myocarde chez le rat n'est pas un comportement de maladie, mais bien une

pathologie où la composante de l'inflammation semble jouer un rôle important dans la mise en place de la dépression majeure si aucun traitement n'est mis en place.

Limites et perspectives

I. Limites

Notre laboratoire fut le premier à développer un modèle animal qui mime la dépression post-infarctus du myocarde [161]. Toutefois, ce modèle comprend quelques limites. L'incidence de l'infarctus du myocarde augmente considérablement avec l'âge où les patients âgés sont plus susceptibles de développer un infarctus du myocarde que les jeunes patients [491]. Nous travaillons généralement sur des jeunes rats adultes, il se pourrait que les résultats obtenus ne reflètent pas nécessairement ce que l'on aurait observé chez des animaux d'âge moyen ou vieillissant.

Ensuite, l'infarctus du myocarde n'est pas une pathologie qui survient soudainement. Dans notre modèle, nous procédons à une occlusion mécanique soudaine de l'artère coronaire gauche descendante alors qu'un infarctus du myocarde provient généralement d'un processus à long terme impliquant entre autres l'agrégation plaquettaire, la formation d'une plaque athéromateuse, la rupture d'un thrombus. Ces différents processus menant à une ischémie nécessitent la présence de divers facteurs biochimiques pouvant éventuellement modifier la physiopathologie de la dépression post-infarctus chez le rat.

Une seconde limite proviendrait de l'utilisation de l'isoflurane pour maintenir l'anesthésie lors de la chirurgie. Il a été démontré que l'isoflurane administré après ou avant l'ischémie détient des effets cardioprotecteurs [492]. L'isoflurane pourrait avoir des effets cardioprotecteurs dans notre modèle. Toutefois, étant donné que tous nos rats subissent la même intervention chirurgicale avec les mêmes médicaments et que l'isoflurane est donné en continu tout au long de la chirurgie, ce facteur peut-être négligé, car nous n'avons observé dans aucune de nos études de différences entre les groupes.

Aussi dans ma 2e étude intitulée « Desvenlafaxine reduces depressive behavior and memory deficit in a rat model of myocardial infarction at long-term », nous avons gardé les animaux 4

mois après l'infarctus du myocarde. Les chirurgies ont été effectuées sur une longue période de 8 mois ce qui nous a fait faire les tests comportementaux de 4 mois (test de nage forcée et test de la piscine de Morris) du mois d'avril à novembre. Une étude démontre que les rats performant différemment en fonction de la période de l'année dans le test de nage forcée. Le temps d'immobilité est significativement réduit durant les mois de juin, juillet, août, septembre comparés aux autres mois de l'année [493]. Nos rats témoins ne démontrent pas de variations durant l'année, mais il se peut que dépendamment de la sensibilité accrue des rats ayant eu un infarctus du myocarde ceux-ci présentent certaines variations dans nos tests dus à ce facteur.

Finalement, dans notre troisième étude intitulée « Vagus nerve is the beneficial effect of probiotics on post-MI apoptosis in the limbic system » nous avons provoqué une vagotomie aux animaux avant l'infarctus du myocarde. Nous avons pu observer sur plus de 50 % des animaux vagotomisés, une augmentation significative de la masse de l'estomac ainsi qu'une diminution de la production de selles 3 jours après la vagotomie. Il est admis que la vagotomie provoque une sténose du pylore perturbant ainsi la digestion [352]. Dans les études futures, il serait nécessaire de faire une pyloroplastie avant la vagotomie pour minimiser la souffrance des animaux et pour pouvoir garder les animaux plus longtemps après l'infarctus du myocarde dans le but de procéder à des tests comportementaux. Toutefois, nous ne savons pas si la pyloroplastie aurait des effets sur le comportement.

Une autre limitation de cette étude résulte du fait que, bien que certains probiotiques soient capables d'agir sur l'inflammation en diminuant les cytokines inflammatoires, aucune mesure de cytokines n'a été effectuée. Notre hypothèse que se sont les cytokines pro-inflammatoires qui pourraient être responsable de la perturbation biochimique intestinale repose sur l'observation des études antérieures.

II. Perspectives

À présent, il est à signaler que certaines questions soulevées dans cette thèse demeurent toutefois sans réponse.

Jusqu'à présent, les comportements de dépression post-infarctus du myocarde retrouvés dans notre modèle animal ont été associés à une augmentation de la mort par apoptose dans certaines régions du système limbique. Toutes les thérapies actuellement étudiées (antidépresseurs, anti-inflammatoire, probiotiques) préviennent ces comportements de dépression ainsi que l'apoptose dans le système limbique. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'augmentation de la mort par apoptose dans le système limbique serait responsable en partie des comportements de dépression chez le rat après un infarctus du myocarde. Dans le but d'approfondir cette théorie, il serait intéressant de bloquer l'activation des caspases induisant la mort par apoptose dans le système limbique avant l'infarctus du myocarde et de voir si les rats démontrent encore des comportements de dépression 2 semaines après l'évènement cardiaque. Toutefois, l'utilisation d'inhibiteur des caspases reste délicate. Une injection intra-cérébro-ventriculaire dans les régions du cerveau les plus affectées lors de l'infarctus du myocarde soit l'amygdale et l'hippocampe des régions sous corticale devrait être effectuée.

Puis, dans cette thèse, nous traitons les rats par la desvenlafaxine, un antidépresseur de la classe des inhibiteurs de la sérotonine et noradrénaline. Bien que les antidépresseurs, dont la desvenlafaxine, démontrent des effets anti-apoptotiques, nous nous basons sur l'hypothèse monoaminergique de la dépression pour traiter la dépression après un infarctus en utilisant ce genre de médication. Il serait intéressant de déterminer si les rats dans notre modèle de dépression post-infarctus du myocarde démontrent des perturbations du système monoaminergique et si cette perturbation pourrait être en relation avec l'apoptose retrouvée dans le système limbique.

Ensuite dans une étude antérieure faite par Arseneault-Breard. J et coll dans notre laboratoire, il a été démontré que l'infarctus du myocarde provoque une augmentation de la perméabilité de la membrane intestinale et que les probiotiques sont capables de restaurer cette perméabilité [10]. Cette augmentation de la perméabilité de la membrane intestinale pourrait être la cause des cytokines pro-inflammatoires comme le démontrent d'autres études [455, 494, 495]. Il serait intéressant de déterminer l'effet des probiotiques et de la vagotomie sur le taux de cytokines pro-inflammatoires dans l'intestin des rats après un infarctus du myocarde versus des rats témoins. Puis, de déterminer l'impact de la vagotomie sur l'effet des probiotiques sur la perméabilité de la membrane intestinale. Aussi, l'hypothèse serait que les probiotiques agissent via le nerf vague sur le récepteur à l'Ach, on pourrait doser STAT-3 et NF- κ B pour voir si cette voie de signalisation est activée avec les probiotiques.

Aussi, nous envisageons de garder les animaux 2 semaines après la reperfusion pour déterminer l'effet de la vagotomie et des probiotiques sur les comportements de dépression chez les rats.

Finalement, dans cette étude nous avons démontré que l'infarctus du myocarde et la vagotomie provoquent une diminution de l'activité de la caspase-3 dans le petit intestin des rats. L'intégrité de la barrière épithéliale étant dépendante de l'équilibre entre la production de nouvelles cellules épithéliales et leur élimination, toute modification de cette barrière (augmentation de la perméabilité, rupture, modification de l'apoptose) génère un processus inflammatoire qui peut compromettre le fonctionnement de l'intestin en modifiant cet équilibre. Il serait intéressant d'analyser la prolifération des cellules intestinales par la méthode au BrdU pour voir si le renouvellement de celles-ci est modifié. Une diminution de l'apoptose pourrait être la cause d'une augmentation du nombre exagéré de cellules vieillissantes moins viable pouvant modifier la fonctionnalité de l'intestin.

Références

1. Bush DE, Z.R., Tayback M, Richter D, Stevens S, Zahalsky H, Fauerbach JA, Even minimal symptoms of depression increase mortality risk after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*, 2001. 88(4): p. 337-41.
2. Frasure-Smith N, L.F., Talajic .M, Depression following myocardial infarction. Impact on 6-month survival. *Jama*, 1993. 270(15): p. 1819-25.
3. Maes M., B.E., Meltzer H. Y., Scharpe S., Suy E, Interleukin-1 beta: a putative mediator of HPA axis hyperactivity in major depression. *Am J Psychiatry*, 1993. 150(8): p. 1189-1193.
4. Maes, M., Meltzer, H., Bosmans, E., Bergmans, R., Vandoolaeghe, E., Rajan, R., Desnyder, R., 1995, Increased plasma concentrations of interleukin-6, soluble interleukin-6 receptor, soluble interleukin-2 receptor and transferrin receptor in major depression. *J. Affect. Disord.* , 1995. 34: p. 301-309.
5. Sinead M. O'Brien, L.S.a.T.G.D., Cytokines- abnormalities in major depression and implications for pharmacological treatment. *Hum Psychopharmacol Clin Exp*, 2004. 19: p. 397-403.
6. Sakic, B., Denburg, J.A., Denburg, S.D., Szechtman, H. Blunted, sensitivity to sucrose in autoimmune MRL-1pr mice: a curve shift study. *Brain Res. Bull*, 1996. 41: p. 305-311.
7. R, Y., Endotoxin produces a depressive-like syndrome in rats. *Brain Res*, 1996. 711: p. 163-174.
8. Pollak, R., Blanchard, J.M, Organ donor or graft pretreatment to prolong allograft survival: lessons learned in the murine model. *Transplantation* 2000. 69: p. 2432-2439.
9. Wann BP, B.S., Rousseau G, , Permeability in the limbic system following myocardial infarction in the rat. In *Society for Neuroscience 34th Annual Meeting*, , 2004.

10. Jessica Arseneault-Breard, I.R., Kim Gilbert, Stephanie-Anne Girard, Thomas A. Tompkins, Roger Godbout and Guy Rousseau, Combination of *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 reduces post-myocardial infarction depression symptoms and restores intestinal permeability in a rat model. *British Journal of Nutrition* 2012. 107: p. 1793-1799.
11. OMS, O.m.d.l.s. Rapport sur la situation mondiale des maladies non transmissibles 2010. 2011; Available from: http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report-summary_fr.pdf.
12. l'AVC, L.F.d.M.d.C.e.d. Statistiques- Maladies du coeur. Available from: <http://www.fmcoeur.qc.ca/site/c.kplQKVOxFoG/b.3669917/k.9F47/Statistiques.htm>.
13. Reeve, J.L., A. M. Duffy, T. O'Brien, A. Samali, Don't lose heart-therapeutic value of apoptosis prevention in the treatment of cardiovascular disease. *J. Cell Mol. Med*, 2005. 9: p. 609-622.
14. Lê, V.H., L'allier, P.L Traiter l'Infarctus Aigu du Myocarde Être un Bon Stratège! *Le clinicien*, 2008. 23: p. 72-9.
15. Kannel, W.B., Incidence and epidemiology of heart failure. *Heart Fail. Rev*, 2000. 5: p. 167-173.
16. Buja, L.M., Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol*, 2005. 14(4): p. 170-5.
17. Solaini, G. and D.A. Harris, Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion. *Biochem J*, 2005. 390(Pt 2): p. 377-94.
18. Braunwald E, K.R., Myocardial reperfusion- a double-edged sword? . *J clin invest*, 1985. 76: p. 1713-9.

19. Jennings RB, G.C., Structural changes in myocardium during acute ischemia. *Circ Res* 1974. 35(4): p. 156-72.
20. Jennings, R.B., Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H, Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. . *Arch Pathol*, 1960. 70: p. 68-78.
21. Jennings, R.B., Herbert M. Sommers, Peter B. Herdson, and John P. Kaltenbach, Ischemic injury of myocardium. *Ann N Y Acad Sci*, 1969. 1(1): p. 61-78.
22. Jennings, R.B., Hal K. Hawkins, James E Lowe, Mary L. Hill, Sherry Klotman, and Keith A. Reimer, Relation between high energy phosphate and lethal injury in myocardial ischemia in the dog. *Am J Pathol*, 1978. 92(1): p. 187-214.
23. Barry W, H., mechanism of myocardial cell injury during ischemia and reperfusion. *Journal of Cardiac Surgery*, 1987(2): p. 375-383.
24. Hasin Y, B.W., Myocardial metabolic inhibition and membrane potential, contraction, and potassium uptake. *Am J Physiol*, 1984: p. 247-322.
25. D, F., Structural, functional, and metabolic correlates in ischemic hearts: effects of substrates. *Am J Physiol*, 1981. 240(3): p. 391-8.
26. Burke, A.P. and R. Virmani, Pathophysiology of acute myocardial infarction. *Med Clin North Am*, 2007. 91(4): p. 553-72; ix.
27. Carmeliet, E., Myocardial ischemia: reversible and irreversible changes. *Circulation*, 1984. 70(1): p. 149-151.
28. Keith A Reimer, J.E.L., Margaret M Rasmussen, Robert B Jennings The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1977.

29. Reimer, K.A.a.R.B.J., The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Lab Invest*, 1979. 40(6): p. 633-44.
30. Lowe, J.E., K.A. Reimer, and R.B. Jennings, Experimental infarct size as a function of the amount of myocardium at risk. *Am J Pathol*, 1978. 90(2): p. 363-79.
31. Bradley G. Leshnower, H.S., Hirotsugu Hamamoto, Ahmad Zeeshan, Joseph H. Gorman III, and Robert C. Gorman, Progression of myocardial injury during coronary occlusion in the collateral-deficient heart- a non-wavefront phenomenon. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. 293(3): p. 1799-804.
32. Miwa, K., Absence of myocardial ischemia during sudden controlled occlusion of coronary arteries in patients with well-developed collateral vessels. *Coron Artery Dis*, 1999. 10(7): p. 459-63.
33. Charney, R.a.C., M, The role of the coronary collateral circulation in limiting myocardial ischemia and infarct size. *Am Heart J*, 1993. 126(4): p. 937-45.
34. Van de Werf F, B.J., Betriu A, Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation : The task force on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European society of cardiology. *Eur Heart J*, 2008. 29: p. 2909-45.
35. Piper, H.M.G.D., Ovize M, A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 1998. 38 p. 291-300.
36. Dirksen MT, L.G., Simoons ML, Duncker DJ., Reperfusion injury in humans- a review of clinical trials on reperfusion injury inhibitory strategie. *Cardiovasc Res*, 2007. 74: p. 343-55.

37. Glanz W, W.I.K.K.Y.I.H.D.-S., Fishbein MC, Does reperfusion extend necrosis? A study in a single territory of myocardial ischemia--half reperfused and half not reperfused. *Circulation*, 1990. 82: p. 1020-33.
38. Vanden Hoek TL, Q.Y., Wojcik K, Li CQ, Shao ZH, Anderson T, Becker LB, Hamann KJ, Reperfusion, not simulated ischemia, initiates intrinsic apoptosis injury in chick cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. 284: p. 141-50.
39. A.L. Moens, M.J.C., J.P, Timmermans, C.J. Vrints, Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. *International journal of cardiology*, 2005. 100: p. 179-190.
40. Tennant R, W.C., The effect of coronary occlusion on myocardial contraction. *T Am. J. Physiol*, 1935. 112: p. 351-361.
41. Akar JG, A.F., Regulation of ion channels and arrhythmias in the ischemic heart. *J Electrocardio*, 2007. 40(6): p. 37-41.
42. Kloner RA, G.C., Jennings RB., The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest.* , 1974. 54(6): p. 1496-508.
43. Kloner RA, R.R., Carlson N, MAroko PR Ultrastructure evidence of microvascular damage and myocardial cell injury after coronary. *Circulation*, 1980. 62(5): p. 945-52.
44. L.H, O., Postischemic stunning--the case for calcium as the ultimate culprit. *Cardiovasc Drugs Ther* 1991. 5(5): p. 895-9.
45. Braunwald E, K.R., The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation*, 1982. 66(6): p. 1146-9.
46. Pfeffer MA, B.E., Ventricular remodeling after myocardial infarction: Experimental observations and clinical implications. *Circulation*, 1990. 81: p. 1161-1172.

47. Swynghedauw, B., Phenotypic plasticity of adult myocardium- molecular mechanisms. *J Exp Biol*, 2006. 209: p. 2320-7.
48. Zimmerman AN, D.W., Hußmann WC et al, Morphological changes of heart muscle caused by successive perfusion with calcium-free and calcium-containing solutions (calcium paradox). *Cardiovasc Res*, 1967. 1: p. 201-209.
49. Rousseau G, S.J.G., Latour JG, Merhi Y, Nattel S, Waters D, Diltiazem at reperfusion reduces neutrophil accumulation and infarct size in dogs with ischaemic myocardium. *Cardiol Res*, 1991. 25(4): p. 319-29.
50. Segawa, D.S., Per-Ove; Wang, Qing-Dong; Gonon, Adrian; Nordlander, Margareta; Rydén, Lars, Calcium antagonist protects the myocardium from reperfusion injury by interfering with mechanisms directly related to reperfusion: an experimental study with the ultrashort-acting calcium antagonist clevidipine. *J Cardiovasc Pharmacol*, , 2000. 36(3): p. 338-43.
51. Avellanal M, R.P., Barrigon S, Protective effects of cyclopiazonic acid on ischemia-reperfusion injury in rabbit hearts. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1998. 32(5): p. 845-51.
52. Hearse DJ, H.S., Chain EB, Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release. *J Mol Cell Cardiol*, 1973. 5(4): p. 395-407.
53. Kannan K, J.S., Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 2000. 7: p. 153-63.
54. Chen, J.K.a.S.E.C., Antioxidants and myocardial ischemia- reperfusion injuries. *Chang Gung Med J*, 2005. 28(6): p. 369-77.
55. Dingchao H, Z.Q., Liye H, Xiaodong F. , The protective effects of high-dose ascorbic acid on myocardium against reperfusion injury during and after cardiopulmonary bypass. *Thorac Cardiovasc Surg* 1994. 33(10): p. 1536-1539.

56. Barta E, P.I., Cornak V, Luknarova O, Rendekova V, Verchovodko P, Protective effect of alpha-tocopherol and L-ascorbic acid against the ischemic-reperfusion injury in patients during open-heart surgery. *Bratisl Lek Listy* 1991. 92(3-4): p. 174-83.
57. Jolly SR, K.W., Bailie MB, Abrams GD, Lucchesi BR. , Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase. *Circ Res.*, 1984. 54(3): p. 277-85.
58. Werns SW, S.M., Driscoll EM, Cohen C, Abrams GD, Pitt B, , The independent effects of oxygen radical scavengers on canine infarct size. Reduction by superoxide dismutase but not catalase. *Circ Res.* , 1985. 56(6): p. 895-8.
59. Gallagher KP, B.A., Pace D, Gerren RA, Shlafer M, Failure of superoxide dismutase and catalase to alter size of infarction in conscious dogs after 3 hours of occlusion followed by reperfusion. *Circulation*, 1986. 73(5): p. 1065-76.
60. Uraizee A, R.K., Murry CE, Jennings RB, Failure of superoxide dismutase to limit size of myocardial infarction after 40 minutes of ischemia and 4 days of reperfusion in dogs. *Circulation*, 1987. 75(6): p. 1237-48.
61. Kapadia SR, O.H., Lee J, Nakano M, Taffet GE, Mann DL, Hemodynamic regulation of tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium. *Circ Res*, 1997. 81: p. 187-95.
62. Frangogiannis NG, S.C., Entman ML, The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, 2002. 53(1): p. 31-47.
63. Frangogiannis, N.G., The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res*, 2008. 58(2): p. 88-111.
64. Matsui, T.A.a.T., The Cardiomyocyte as a Source of Cytokines in Cardiac Injury. *J Cell Sci Ther*, 2011: p. 1-3.

65. Francis, J., et al., Acute myocardial infarction induces hypothalamic cytokine synthesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. 286(6): p. 2264-2271.
66. Medzhitov, R., Origin and physiological roles of inflammation. *nature*, 2008. 454: p. 428-435.
67. Moro C, J.M., Rakotovo A, Toufektsian MC, Ormezzano O, Nagy N, Tosaki A, de Leiris J, Boucher F, Delayed expression of cytokines after reperfused myocardial infarction: possible trigger for cardiac dysfunction and ventricular remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* , 2007. 293(5): p. 3014-9.
68. Ono, K., et al., Cytokine Gene Expression After Myocardial Infarction in Rat Hearts : Possible Implication in Left Ventricular Remodeling. *Circulation*, 1998. 98(2): p. 149-156.
69. Irwin, M.W.M., S. Mann, D. L. Qu, R. Penninger, J. M. Yan, A. Dawood, F. Wen, W. H. Shou, Z. Liu, P, Tissue Expression and Immunolocalization of Tumor Necrosis Factor in Postinfarction Dysfunctional Myocardium. *Circulation*, 1999. 99(11): p. 1492-1498.
70. Gu Q, Y.X., Bonde P, DiPaula A, Fox-Talbot K, Becker LC, Inhibition of TNF-alpha reduces myocardial injury and proinflammatory pathways following ischemia-reperfusion in the dog. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006. 48(6): p. 320-8.
71. Maekawa N, W.H., Kanda T, Niwa T, Yamada Y, Saito K, Fujiwara H, Sekikawa K, Seishima M, Improved myocardial ischemia:reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor-alpha. *J Am Coll Cardiol*, 2002. 3(39): p. 1229-35.
72. Belosjorow S, B.I., Duschin A, Heusch G, Schulz R, TNF-alpha antibodies are as effective as ischemic preconditioning in reducing infarct size in rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. 284(3): p. 927-30.

73. Kaloustian, S.B., T. M. Rondeau, I. Mathieu, S. Lada-Moldovan, L. Ryvlin, P. Godbout, R. Rousseau, G., Tumor necrosis factor-alpha participates in apoptosis in the limbic system after myocardial infarction. *Apoptosis*, 2009. 14(11): p. 1308-16.
74. Yokoyama T, N.M., Bednarczyk JL, McIntyre BW, Entman M, Mann DL, Tumor necrosis factor-alpha provokes a hypertrophic growth response in adult cardiac myocytes. *Circulation*, 1997. 95: p. 1247-52.
75. Kubota T, M.C., Frye CS, Slawson SE, Lemster BH, Koretsky AP, Demetris AJ, Feldman AM, Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha. *Circ Res*, 1997. 81(4): p. 627-35.
76. Satoshi Kokura, R.E.W., Toshikazu Yoshikawa, D. Neil Granger and Tak Yee Aw, T-Lymphocyte-Derived Tumor Necrosis Factor Exacerbates Anoxia-Reoxygenation- Induced Neutrophil-Endothelial Cell Adhesion. *Circ Res*, 2000. 86: p. 205-213.
77. Smith, E.F., 3rd, et al., Temporal relation between neutrophil accumulation and myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol*, 1988. 255(5 Pt 2): p. H1060-8.
78. Vinten-Johansen, J., Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 2004. 61(3): p. 481-97.
79. J L Romson, B.G.H., S L Kunkel, G D Abrams, M A Schork, B R Lucchesi, Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation*, 1983. 67: p. 1016-1023.
80. Mickelson JK, S.P., Lucchesi BR, Ischemic heart disease: pathophysiology and pharmacology management. *cardiovascular pharmacology*", Raven Press, New York 1990. 3: p. 293-340.

81. De Lorgeril M, B., A., Lavalley, M., Clement, R., Milette, D., Rousseau, G. & Latour, J. G. , Influence of leukopenia on collateral flow, reperfusion flow, reflow ventricular fibrillation, and infarct size in dogs. *Am Heart J*, 1989. 117: p. 523-32.
82. Norihide Takaya, Y.K., Kazuhis Iwabuchi , Ichiro Hayashi , Hakuoh Konishi , Seigo Itoh , Ko Okumura , Chisei Ra , Isao Nagaoka , Hiroyuki Daida Platelets activated by collagen through the immunoreceptor tyrosine-based activation motif in the Fc receptor c-chain play a pivotal role in the development of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2005. 39: p. 856-864.
83. Rousseau G, H.D., Libersan D, Khalil A, St-Jean G, Latour JG, Importance of platelets in myocardial injury after reperfusion in the presence of residual coronary stenosis in dogs. *Am Heart J*, 1993. 125: p. 1553-63.
84. Palojoki E, S.A., Eriksson A, Pulkki K, Kallajoki M, Voipio-Pulkki LM, Tikkanen I, Cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodelling after myocardial infarction in rats. *Am J Physiol*, 2001. 280: p. 2726-31.
85. Krown KA, P., Nguyen C, et al. , Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes-Involvement of the sphingolipid signaling cascade in cardiac cell death. *J Clin Invest*, 1996. 98: p. 2854-2865.
86. Allen RT, H.W.r., Agrawal DK, Morphological and Biochemical Characterization and analysis of apoptosis. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 1997. 37: p. 215-228.
87. Kerr, J.F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R, Apoptosis- a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972. 26: p. 239-57.
88. Elmore, S., Apoptosis- a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 2007. 35: p. 495-516.

89. Checler F, A.d.C.C., p53 in neurodegenerative diseases and brain cancers. *Pharmacol Ther*, 2014. 142(1): p. 99-113.
90. Wann, B.P.B., M. Kaloustian, S. Nim, S. Godbout, R. Rousseau, G., Apoptosis detected in the amygdala following myocardial infarction in the rat. *Biol Psychiatry*, 2006. 59(5): p. 430-3.
91. Anversa P, C.W., Liu Y, Leri A, Redaelli G, Kajstura J, apoptosis and myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*, 1998. 93(3): p. 8-12.
92. Willis, S.N.F., J. I. Kaufmann, T. van Delft, M. F. Chen, L. Czabotar, P. E. Ierino, H. Lee, E. F. Fairlie, W. D. Bouillet, P. Strasser, A. Kluck, R. M. Adams, J. M. Huang, D. C., Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science*, 2007. 315(5813): p. 856-9.
93. Hacker, G.W., A., BH3-only proteins trigger cytochrome c release, but how? *Arch Biochem Biophys*, 2007. 462(2): p. 150-5.
94. Antonsson B, C.F., Ciavatta A.M, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, Bernasconi L, Bernard A, Mermod J.J, Mazzei G, Maundrell K, Gambale F, Sadoul R, Martinou J.C, Inhibition of Bax Channel-Forming Activity by Bcl-2. *science*, 1997. 277: p. 370-372.
95. Jeong SY, S.D., The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Rep*, 2008. 41(11): p. 11-22.
96. Lorenzo, H.K.S., Santos A., Mitochondrial effectors in caspase-independent cell death. *FEBS Lett*, 2004. 557(1-3): p. 14-20.
97. Lily Y. Li, X.L.X.W., Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *NATURE* 2001. 412: p. 95-99.
98. Shiozaki, E.N. and Y. Shi, Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. *Trends Biochem Sci*, 2004. 29(9): p. 486-94.

99. Ashkenazi, A., Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science*, 1998. 281(5381): p. 1305-1308.
100. Guy S. Salvasen, a.V.M.D., Caspase activation- The induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci* 1999. 96(20): p. 10964-7.
101. Xu Luo, I.B., Hua Zou, Clive Slaughter, and Xiaodong Wang, <Bid, a Bcl2 Interacting Protein, Mediates Cytochrome c Release from Mitochondria in Response to Activation of Cell Surface Death Receptors.pdf>. *cell*, 1998. 94: p. 481-490.
102. Clarke, P. and K.L. Tyler, Apoptosis in animal models of virus-induced disease. *Nat Rev Microbiol*, 2009. 7(2): p. 144-55.
103. Zhao, Z.Q., et al., Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. *Cardiovasc Res*, 2000. 45(3): p. 651-60.
104. Fliss H, G.D., Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res*, 1996. 79: p. 949-56.
105. Holly, T.A., et al., Caspase inhibition reduces myocyte cell death induced by myocardial ischemia and reperfusion in vivo. *J Mol Cell Cardiol*, 1999. 31(9): p. 1709-15.
106. Yaoita, H., et al., Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation*, 1998. 97(3): p. 276-81.
107. Chen, Z., Overexpression of Bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial I:R injury in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001. 280(5): p. 2313-20.
108. Freude, B.M., T. N. Robicsek, F. Fokin, A. Kostin, S. Zimmermann, R. Ullmann, C. Lorenz-Meyer, S. Schaper, J., Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*, 2000. 32(2): p. 197-208.

109. McCully JD, W.H., Hsieh YJ, Jones M, Levitsky S, Differential contribution of necrosis and apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. 286(5): p. 1923-1935.
110. Maury CP, T.A., Circulating tumour necrosis factor- α (cachectin) in myocardial infarction. *J Intern Med*, 1989. 225: p. 333-6.
111. Kubota T, M.M., Frye CS, Alber SM, Bounoutas GS, Kadokami T, Watkins SC, McTiernan CF, Feldman AM, Overexpression of tumor necrosis factor- α activates both anti- and pro-apoptotic pathways in the myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 2001. 33: p. 1331-44.
112. Nakano M, K.A., Dibbs Z, Mann DL, Tumor necrosis factor-alpha confers resistance to hypoxic injury in the adult mammalian cardiomyocyte. *Circulation*, 1998. 97(14): p. 1392-400.
113. DJ, M., TNF receptor subtype signalling- differences and cellular consequences. *Cell Signal*, 2002. 14: p. 477-792.
114. Flaherty, M.P.G., Y. Tiwari, S. Rezazadeh, A. Hunt, G. Sanganalmath, S. K. Tang, X. L. Bolli, R. Dawn, B., The role of TNF-alpha receptors p55 and p75 in acute myocardial ischemia/reperfusion injury and late preconditioning. *J Mol Cell Cardiol*, 2008. 45(6): p. 735-41.
115. Monden, Y.K., T. Inoue, T. Tsutsumi, T. Kawano, S. Ide, T. Tsutsui, H. Sunagawa, K., Tumor necrosis factor-alpha is toxic via receptor 1 and protective via receptor 2 in a murine model of myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. 293(1): p. H743-53.
116. Deuchar, G.A., L.H. Opie, and S. Lecour, TNFalpha is required to confer protection in an in vivo model of classical ischaemic preconditioning. *Life Sci*, 2007. 80(18): p. 1686-91.
117. Dirksen, M.T.L., G. J. Simoons, M. L. Duncker, D. J., Reperfusion injury in humans: a review of clinical trials on reperfusion injury inhibitory strategies. *Cardiovasc Res*, 2007. 74(3): p. 343-55.

118. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection. *Heart Fail Rev*, 2007. 12(3-4): p. 217-34.
119. Matsui T, T.J., del Monte F, Lee KH, Li L, Picard M, Force TL, Franke TF, Hajjar RJ, Rosenzweig A, Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo. *Circulation*. 2001 Jul 17;104(3):330-5. *Circulation*, 2001. 104(3): p. 330-5.
120. Andersen JS, M.M., Terada N, Korsmeyer SJ p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD. *Proc Natl Acad Sci* 2001. 98: p. 9666–9670.
121. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, Cardioprotective growth factors. *Cardiovasc Res*, 2009. 83(2): p. 179-94.
122. Leri A, J.K., Liu Y et al, Overexpression of insulin- like growth factor-1 in mice protects from myocyte death after infarction, attenuating ventricular dilation, wall stress, and cardiac hypertrophy. *J Clin Invest* 1999. 100: p. 1991-1999.
123. Ioanna Andreadou, E.K.I., Maria Koufaki and Dimitrios Th. Kremastinos, Alternative pharmacological interventions that limit myocardial infarction. *Current medicinal chemistry*, 2008. 15(30): p. 3204-13.
124. Lecour, S., Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway? *J Mol Cell Cardiol*, 2009. 47(1): p. 32-40.
125. Burley, D.S., P. Ferdinandy, and G.F. Baxter, Cyclic GMP and protein kinase-G in myocardial ischaemia-reperfusion: opportunities and obstacles for survival signaling. *Br J Pharmacol*, 2007. 152(6): p. 855-69.

126. Costa, A.D.P., S. V. Cohen, M. V. Downey, J. M. Garlid, K. D., cGMP signalling in pre- and post-conditioning: the role of mitochondria. *Cardiovasc Res*, 2008. 77(2): p. 344-52.
127. Lacerda, L.S., S. Opie, L. H. Lecour, S., Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway. *Cardiovasc Res*, 2009. 84(2): p. 201-8.
128. Gold PW, G.F.a.C.G., Clinical and biochemical manifestations of depression. Relation to the neurobiology of stress. . *Engl J Med*, 1988. 319(7): p. 413-20.
129. Penninx BW, G.J., Mendes de Leon CF, Pahor M, Visser M, Corti MC and Wallace RB, Cardiovascular events and mortality in newly and chronically depressed persons > 70 years of age. *Am J Cardiol*, 1998. 81(8): p. 988-94.
130. Penninx BW, B.A., Honig A, Deeg DJ, Schoevers RA, van Eijk JT and van Tilburg W. , Depression and cardiac mortality: results from a community-based longitudinal study. *Arch Gen Psychiatry*, 2001. 58(3): p. 221-7.
131. Eric J. Nestler, M.B., Ralph J. DiLeone, Amelia J. Eisch, Stephen J. Gold, and a.L.M. Monteggia, Neurobiology of Depression. *Neuron*, 2002. 34: p. 13-25.
132. McLachlan, R.S., A brief review of the anatomy and physiology of the limbic system. *Can J Neurol Sci*, 2009. 36(2): p. 84-7.
133. H K. Manji, W.C.D.a.D.S.C., The cellular neurobiology of depression. *nature medicine*, 2001. 7(5): p. 541-547.
134. Nieuwenhuys R, V.J., van Huijzen C: , *The Human Central Nervous System: A Synopsis and Atlas*, 3rd revised ed. Berlin, Springer-Verlag, 1988. A Synopsis and Atlas, 3rd revised ed. Berlin, Springer-Verlag, 1988.
135. Squire LR, K.B., The medial temporal lobe, the hippocampus, and the memory systems of the brain. *The new cognitive neurosciences*, , 2000: p. 765-76.

136. Davidson RJ, P.D., Nitschke JB, et al, Depression: Perspectives from affective neuroscience. *Annu Rev Psychol*, 2002. 53: p. 545–74.
137. Frasure-Smith N, L.r.F., Depression and cardiac risk- present status and future directions. *Postgrad Med J.*, 2010. 86(1014): p. 193-6.
138. Dominique L. Musselman, M.D.L.E., MD; Charles B. Nemeroff, MD, PhD, the relationship of depression to cardiovascular disease. *Arch Gen Psychiatry*, 1998. 55: p. 580-592.
139. Thomas AJ, K.R.a.O.B.J., Depression and vascular disease- what is the relationship? *J Affect Disord*, , 2004. 79(1-3): p. 81-95.
140. O'Connor C M, G.P.a.S.V., Depression and ischemic heart disease. *Am Heart J*, 2000. 140(4): p. 63-9.
141. Ford DE, M.L., Chang PP, Cooper-Patrick L, Wang NY and Klag MJ, Depression is a risk factor for coronary artery disease in men: the precursors study. *Arch Intern Med*, 1998. 158(13): p. 1422-6.
142. Rugulies, R., Depression as a Predictor for Coronary Heart Disease a Review and Meta-Analysis. *Am J Prev Med* 2002. 23(1): p. 51-61.
143. Barefoot JC, H.M., Mark DB, Blumenthal JA, Califf RM, Haney TL, O'Connor CM, Siegler IC and Williams RB., Depression and long-term mortality risk in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol*, 1996. 78(6): p. 613-7.
144. Ferketich AK, S.J., Frid DJ and Moeschberger ML, Depression as an antecedent to heart disease among women and men in the NHANES I study. *National Health and Nutrition Examination Survey. Arch Intern Med*, 2000. 160(9): p. 1261-8.

145. Thomas P. Hackett, M.D., N. H Cassem, M.D., Howard A. Wishnie, M.D., the coronary-care unit. An Appraisal of its psychologic hazards. *the new england journal of medicine*, 1968. 279(25): p. 1365-1368.
146. Hance M, C.R., Freedland KE and Skala J, Depression in patients with coronary heart disease. A 12-month follow-up. *Gen Hosp Psychiatry*, , 1996. 18(1): p. 61-5.
147. Thombs BD, B.E., Ford DE, Stewart KJ, Tsilidis KK, Patel U, Fauerbach JA, Bush DE, Ziegelstein RC., Prevalence of depression in survivors of acute myocardial infarction. *J Gen Intern Med*, 2006. 21(1): p. 30-8.
148. T P. Guck, M.G.K., G N. Elsasser, and E J. Barone., Assessment and Treatment of Depression Following Myocardial Infarction. *Am Fam Physician*, 2001. 64: p. 641-651.
149. Lespérance F, F.-S.N., Depression and coronary artery disease: time to move from observation to trials. *CMAJ*, 2003. 168(5): p. 570-71.
150. M. Zuidersma, J.O., H. J. Conradi, P de Jonge, An increase in depressive symptoms after myocardial infarction predicts new cardiac events irrespective of depressive symptoms before myocardial infarction. *Psychological Medicine* /, 2012. 42(4): p. 683-693.
151. Schleifer SJ, M.-H.M., Coyle DA, Slater WR, Kahn M, Gorlin R and Zucker HD, The nature and course of depression following myocardial infarction. *Arch Intern Med*, 1989. 149(8): p. 1785-9.
152. Frasure-Smith N, L.F., Talajic M, Depression and 18-month prognosis after myocardial infarction. *Circulation*, 1995. 91(4): p. 999-1005.
153. Van Melle, J.P.d.J., P. Spijkerman, T. A. Tijssen, J. G. Ormel, J. van Veldhuisen, D. J. van den Brink, R. H. van den Berg, M. P., Prognostic association of depression following myocardial

infarction with mortality and cardiovascular events: a meta-analysis. *Psychosom Med*, 2004. 66(6): p. 814-22.

154. Frasure-Smith N, L.F.a.T.M., Depression following myocardial infarction. Impact on 6-month survival. *Jama*, 1993. 270(15): p. 1819-25.

155. Frasure-Smith N, L.F.a.T.M., Depression and 18-month prognosis after myocardial infarction. *Circulation*, 1995. 91(4): p. 999-1005.

156. Lane D, C.D., Ring C, Beevers DG, Lip GY, Predictors of attendance at cardiac rehabilitation after myocardial infarction. *J Psychosom Res*, 2001. 51(3): p. 497-501.

157. Ladwig KH, R.G., Breithardt G, Budde T, Borggrefe M, Post-infarction depression and incomplete recovery 6 months after acute myocardial infarction. *lancet*, 1994. 343: p. 20-3.

158. Beck CA, J.L., Bélisle P, Pilote L, Predictors of quality of life 6 months and 1 year after acute myocardial infarction. *Am Heart J*, 2001. 142(2): p. 271-9.

159. Söderman E, L.J., Sundin O., Depression as a predictor of return to work in patients with coronary artery disease. *Soc Sci Med*, 2003. 56(1): p. 193-202.

160. Wann, B.P., et al., Apoptosis detected in the amygdala following myocardial infarction in the rat. *Biol Psychiatry*, 2006. 59(5): p. 430-3.

161. Wann, B.P.B., T. M. Boucher, M. Courtemanche, J. Le Marec, N. Rousseau, G. Godbout, R., Vulnerability for apoptosis in the limbic system after myocardial infarction in rats: a possible model for human postinfarct major depression. *J Psychiatry Neurosci*, 2007. 32(1): p. 11-6.

162. Wann, B.P., et al., Behavioural signs of depression and apoptosis in the limbic system following myocardial infarction: effects of sertraline. *J Psychopharmacol*, 2009. 23(4): p. 451-9.

163. Cristina Lanni, S.G., Adele Lucchelli, Cinzia Boselli, Depression and antidepressants- molecular and cellular aspects. *Cell Mol Life Sci*, 2009. 66(18): p. 2985-3008.
164. Edwards, D.F., <mental depression in hypertensive patients treated for long periods with large doses of reserpine.pdf>. *the new england journal of medicine*, 1954. 251(25): p. 1006-1008.
165. Lemieux, G., Davignon, A., Genest, J., Depressive states during Rauwolfia therapy for arterial hypertension; a report of 30 cases. *Can Med Assoc J* 1956. 74: p. 522-526.
166. Schildkraut, J.J., Gordon, E.K., Durell, J, Catecholamine metabolism in affective disorders. I. Normetanephrine and VMA excretion in depressed patients treated with imipramine. *J Psychiatr Res*, 1965. 3: p. 213-228.
167. Coppen, A., The biochemistry of affective disorders. *Br J Psychiatry* 1967. 113: p. 1237-1264.
168. Gavin Lambert, M.J., Hans A gren, Peter Friberg,, Reduced Brain Norepinephrine and Dopamine Release in Treatment-Refractory Depressive Illness. *Arch Gen Psychiatry*, 2000. 57: p. 787-793.
169. Beskow, J., Gottfries, C.G., Roos, B.E., Winblad, B, Determination of monoamine and monoamine metabolites in the human brain: post mortem studies in a group of suicides and in a control group. *Acta Psychiatr Scand*, 1976. 53: p. 7-20.
170. Schildkraut, J.J., The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. 122, 1965. *Am J psychiatry*(509-522).
171. Ruhé HG, M.N., Schene AH, Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans- a meta-analysis of monoamine depletion studies. *Mol Psychiatry*, 2007. 12: p. 331-59.

172. Autry, A.E. and L.M. Monteggia, Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol Rev*, 2012. 64(2): p. 238-58.
173. Rajkowska, G., Postmortem studies in mood disorders indicate altered numbers of neurons and glial cells. *Biol Psychiatry*, 2000. 48(8): p. 766-77.
174. WC, D., Neuroimaging and neuropathological studies of depression- implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. *Curr Opin Neurobiol*, 2001. 11: p. 240-249.
175. Duman R.S, M.L., M, A Neurotrophic Model for Stress-Related Mood Disorders. *Biol psychiatry* 2006. 59: p. 1116–1127.
176. J. Douglas Bremner., M.N., Eric R. Anderson, Lawrence H. Staib, Helen L. Miller, and Dennis S. Charney, Hippocampal volume reduction in major depression. *Am J Psychiatry*, 2000. 157(1): p. 115-8.
177. Grazyna Rajkowska, J.J.M.-H., Jinrong Wei, Ginny Dilley, and H.Y.M. Stephen D. Pittman, James C. Overholser, Bryan L. Roth, and Craig A. Stockmeier, Morphometric Evidence for Neuronal and Glial Prefrontal Cell Pathology in Major Depression. *Biol Psychiatry*, 1999. 45(9): p. 1085-98.
178. Hohn A, L.J., Bailey K, and Barde YA, Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor:brain-derived neurotrophic factor family. *Nature*, 1990. 244: p. 339-341.
179. R, L.-M., The nerve growth factor: its mode of action on sensory and sympathetic nerve cells. *Harvey Lect* 1966. 60: p. 217-259.
180. Barde YA, E.D., and Thoenen H Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J*, 1982. 1: p. 549-553.

181. Felicien Karege, G.V., Michele Schwald, Nader Perroud, Romano La Harpe, Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. *Brain Res Mol Brain Res*, 2005. 136(1-2): p. 29-37.
182. Betina Elfving, P.H.P., Heidi Kaastrup Muller, Aleksander A. Mathe, Raben Rosenberg and Gregers Wegener, Inverse correlation of brain and blood BDNF levels in a genetic rat model of depression. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2009: p. 1-10.
183. Gardier, A.M., et al., Interest of using genetically manipulated mice as models of depression to evaluate antidepressant drugs activity: a review. *Fundamental & clinical pharmacology*, 2009. 23(1): p. 23-42.
184. Lewin, G.R.a.Y.A.B., Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci*, 1996. 19: p. 289-317.
185. Lanni, C., et al., Depression and antidepressants: molecular and cellular aspects. *Cell Mol Life Sci*, 2009. 66(18): p. 2985-3008.
186. De Foubert, G., S. L. Carney, C. S. Robinson, E. J. Destexhe, R. Tomlinson, C. A. Hicks, T. K. Murray, J. P. Gaillard, C. Deville, V. Xhenseval, C. E. Thomas M. J. O'Neill, T. S. C. Zetterstrom Fluoxetine-induced change in rat brain expression of brain-derived neurotrophic factor varies depending on length of treatment. *Neuroscience*, 2004. 128(3): p. 597-604.
187. Rogoz, Z., G. Skuza, and B. Legutko, Repeated treatment with mirtazepine induces brain-derived neurotrophic factor gene expression in rats. *J Physiol Pharmacol*, 2005. 56(4): p. 661-71.
188. Dias B G, B.S.B., Duman R.S, Vaidy V.A, Differential regulation of brain derived neurotrophic factor transcripts by antidepressant treatments in the adult rat brain. *Neuropharmacology*, 2003. 45(4): p. 553-63.

189. Shimizu, E.H., Kenji Okamura, Naoe Koike, Kaori Komatsu, Naoya Kumakiri, Chikara Nakazato, Michiko Watanabe, Hiroyuki Shinoda, Naoyuki Okada, Sin-ichi Iyo, Masaomi, Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biological Psychiatry*, 2003. 54(1): p. 70-75.
190. Sen S, D.R., and Sanacora G, Serum brain-derived neurotrophic factor, depression, and antidepressant medications- meta-analyses and implications. *Biol Psychiatry* 2008. 64: p. 527-532.
191. Kaloustian, S.W., B. P. Bah, T. M. Girard, S. A. Apostolakis, A. Ishak, S. Mathieu, S. Ryvlin, P. Godbout, R. Rousseau, G., Apoptosis time course in the limbic system after myocardial infarction in the rat. *Brain Res*, 2008. 1216: p. 87-91.
192. Duman R S, V.B., Signaling pathway underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid -acting agent. *Trends Neurosci.*, 2012. 35(1): p. 47-56.
193. Pariante CM, M.A., Glucocorticoid receptors in major depression- relevance to pathophysiology and treatment. *Biol Psychiatry*, 2001. 49: p. 391-404.
194. Bao, A.M., G. Meynen, and D.F. Swaab, The stress system in depression and neurodegeneration: focus on the human hypothalamus. *Brain Res Rev*, 2008. 57(2): p. 531-53.
195. Zunszain, P.A.A., C. Cattaneo, A. Carvalho, L. A. Pariante, C. M., Glucocorticoids, cytokines and brain abnormalities in depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2011. 35(3): p. 722-9.
196. Maes, M., Lin, A., Bonaccorso, S., van Hunsel, F., Van Gastel, A., Delmeire, L., Biondi, M., Bosmans, E., Kenis, G., Scharpe, S, Increased 24-hour urinary cortisol excretion in patients with post-traumatic stress disorder and patients with major depression, but not in patients with fibromyalgia. *Acta Psychiatr Scand*, 1998. 98: p. 328-335.

197. Banki, C.M., Bissette, G., Arato, M., O'Connor, L., Nemeroff, C.B, CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depression and schizophrenia. *Am J Psychiatry* 1987. 144: p. 873-877.
198. Geert Raes, P.D.B., Wim Noë I, Alain Beschin, Frank Brombacher, and Gholamreza Hassanzadeh Gh., <Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages.pdf>.
199. J.M, d.K.E.R.a.R., Feedback action and tonic influence of corticosteroids on brain function: a concept arising from the heterogeneity of brain receptor system. *Psychoneuroendocrinology* 1987. 12: p. 83-105.
200. Modell, S., Yassouridis, A., Huber, J., Holsboer, F, Corticosteroid receptor function is decreased in depressed patients. *Neuroendocrinology*, 1997. 65: p. 216-222.
201. Kunugi H, H.H., Adachi N, Numakawa T., Interface between hypothalamic-pituitary-adrenal axis and brain-derived neurotrophic factor in depression. *Psychiatry Clin Neurosci*, 2010. 64(5): p. 447-59., 2010. 64(5): p. 447-59.
202. Rozanski A, B.C., Krantz DS, et al. Mental stress and the induction of silent myocardial ischemia in patients with coronary artery disease, Mental stress and the induction of silent myocardial ischemia in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1988. 318: p. 1005–1012.
203. Grippo, A.J., Francis, J., Weiss, R.M., Felder, R.B., Johnson, A.K., Cytokine mediation of experimental heart failure-induced anhedonia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003. 284: p. 666-673.
204. X Wang, H.W.a.A.M., Interleukin 1a (IL-1a) induced activation of p38 mitogen-activated protein kinase inhibits glucocorticoid receptor function. 9, 2004: p. 65-74.

205. Charles L. Raison, L.C., and Andrew H. Miller, Cytokines sing the blues- inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol* 2006. 27(1): p. 24-31.
206. G, B.R.a.A., Major Depressive Disorder. *N Engl J Med*, 2008. 1: p. 55-68.
207. Schiepers, O.J., M.C. Wichers, and M. Maes, Cytokines and major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2005. 29(2): p. 201-17.
208. Leonard, B.E. and A. Myint, The psychoneuroimmunology of depression. *Hum Psychopharmacol*, 2009. 24(3): p. 165-75.
209. Kronfol, Z., Silva, J., Jr., Greden, J., Dembinski, S., Gardner, R., Carroll, B, Impaired lymphocyte function in depressive illness. *Life Sci*, 1983. 33: p. 241-47.
210. Schleifer, S.J., Keller, S.E., Meyerson, A.T., Raskin, M.J., Davis, K.L., Stein, M, Lymphocyte function in major depressive disorder. *Arch Gen Psychiatry* 1984. 41: p. 484-486.
211. Dwight L. Evans, D.S.C., Lydia Lewis, Robert N. Golden, Jack M. Gorman,, et al., Mood Disorders in the Medically Ill- Scientific Review and Recommendations. *BIOL PSYCHIATRY*, 2005. 58: p. 175-189.
212. Musselman DL, L.D., Gumnick JF, Manatunga AK, Penna S, Goodkin RS, Greiner K, Nemeroff CB, Miller AH., Paroxetine for the prevention of depression induced by high-dose interferon alfa. *N Engl J Med*, 2001. 344(13): p. 961-966.
213. Capuron L, M.A., Cytokines and psychopathology: lessons from interferon-alpha. *Biol Psychiatry*, 2004. 56: p. 819-824.
214. Bonaccorso S, M.V., Biondi M, Grimaldi F, Ippoliti F, Maes M., Depression induced by treatment with interferon-alpha in patients affected by hepatitis C virus. *Journal of Affective Disorders*, 2002. 72: p. 237-241.

215. Bonaccorso, S., Puzella, A., Marino, V., Pasquini, M., Biondi, M., Artini, M., Almerighi, C., Levrero, M., Egyed, B., Bosmans, E., Meltzer, H.Y., Maes, M., Immunotherapy with interferon-alpha in patients affected by chronic hepatitis C induces an intercorrelated stimulation of the cytokine network and an increase in depressive and anxiety symptoms. . *Psychiatry Res* 2001. 105: p. 45-55.
216. Niiranen A, L.R., Iivanainen M, Mattson K, Fäkkilä M, Cantell K, Behavioral assessment of patients treated with alpha-interferon. *Acta Psychiatr Scand.* , 1988. 78: p. 622-6.
217. Yirmiya R, P.Y., Morag M, Reichenberg A, Barak O, Avitsur R, Shavit Y, Ovadia H, Weidenfeld J, Morag A, Newman ME, Pollmächer T, Illness, cytokines, and depression. *Ann NY Acad Sci*, 2000. 917: p. 478-487.
218. GR, L., Infliximab improves quality of life in patients with Crohn's disease. *Inflam Bowel Dis*, 2002. 8: p. 237–243.
219. SD, M., Health related quality of life and functional status of patients with rheumatoid arthritis randomly assigned to receive etanercept or placebo. *Clin Therap*, 2000. 22: p. 128-139.
220. Levenson JL, F.H., Fluoxetine treatment of depression caused by interferon-alpha. *Am J Gastroenterol*, 1993. 88(5): p. 760-1.
221. Dentino AN, P.C., Rao KMK, Currie MS, Harris T, Blazer DG, Cohen HJ. . *J Am Geriatr Soc*, Association of interleukin-6 and other biologic variables with depression in older people living in the community. *J Am Geriatr Soc*, 1999. 47: p. 6-11.
222. Maes M, B.E., De Jongh R, Kenis G, Vandoolaeghe E, Neels H, Increased serum IL- 6 and IL-1 receptor antagonist concentrations in major depression and treatment resistant depression. *Cytokine* 1997. 9: p. 853-858.

223. Linda L. Carpentera, G.R.H., Robert T. Malisonb, Audrey R. Tyrka, Lawrence H. Price, Cerebrospinal fluid interleukin (IL)-6 in unipolar major depression. [\[OBJ\]](#)Journal of Affective Disorders, 2004. 79(285-289).
224. Barbara Viviani, S.B., Emanuela Corsini, Corrado L. Galli, Marina Marinovich., Cytokines role in neurodegenerative events Toxicology Letters, 2004. 149: p. 85-89.
225. Kronfol, Z., Remick, D.G., Cytokines and the brain- implications for clinical psychiatry. Am. J. Psychiatry 2000. 157: p. 683-694.
226. M. Rothermundt, V.A., J. Fenker, H. Gutbrodt, M. Peters, and H. Kirchner, Different immune patterns in melancholic and non-melancholic major depression. European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience, 2001. 251(2): p. 90-97.
227. McNicol A, I.S., Beyond hemostasis: the role of platelets in inflammation, malignancy and infection. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets 2008. 8(2): p. 99-117.
228. Ljubisa Vitkovic, J.B., Claude Jacque, Inflammatory Cytokines: Neuromodulators in Normal Brain? Journal of Neurochemistry, 2000. 74: p. 457-471.
229. Munoz-Fernandez, M.A., Fresno, M., , The role of tumour necrosis factor, interleukin-6, interferon-g and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system. Prog. Neurobiol, 1998. 56(3): p. 307-340.
230. Beattie E.C., S.D., Morishita W., Bresnahan J.C., Ha B.K., Von Zastrow M., Beattie M.S., Malenka R.C, Control of Synaptic Strength by Glial TNF. Science, 2002. 295: p. 2282-2285.
231. Breder C., D.C., and Saper C, Interleukin-1 immunore- active innervation of the human hypothalamus. Science, 1988. 240: p. 321-324.
232. Rothwell, S.M.A.a.N.J., Inflammation in central nervous system injury. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2003. 358(1438): p. 1669-1677.

233. Zunszain, P.A., N. Hepgul, and C.M. Pariante, Inflammation and Depression. *Curr Top Behav Neurosci*, 2012.
234. Miller, A.H., V. Maletic, and C.L. Raison, Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry*, 2009. 65(9): p. 732-41.
235. Dantzer, R., Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. *Eur J Pharmacol*, 2004. 500(1-3): p. 399-411.
236. Dantzer, R., Cytokine-Induced Sickness Behavior- Mechanisms and Implications. *Ann N Y Acad Sci* 2001. 933: p. 222-234.
237. Maes M, B.M., Goehler L, Song C, Anderson G, Galecki P, Leonard Depression and sickness behavior are Janus-faced responses to shared inflammatory pathways *BMC Med*, 2012. 10(66): p. 1-19.
238. Jan Pieter Kohnsman, P.P.a.R.D., Cytokine-induced sickness behaviour- mechanisms and implications. *TRENDS in Neurosciences*, 2002. 25(3): p. 154-159.
239. Connor TJ, L.B., Depression, stress and immunological activation- the role of cytokines in depressive disorders. *Life Sci*, 1998. 62(7): p. 583-606.
240. Xia Z., D.J.W., & Nassberger L, Tricyclic antidepressants inhibit IL-6-1 beta and TNF-alpha release in human blood monocytes and IL-2 and interferon-gamma in T cells. *Immunopharmacology* 1996. 34(1): p. 27-37.
241. RS, S., The macrophage theory of depression. *Med Hypotheses* 1991;35:298–306. *Med Hypotheses* 1991. 35: p. 298–306.
242. Seidel A, R.M., Rink L., Cytokine production in depressed patients. *Adv Exp Med Biol*, 1999. 461: p. 47-57.

243. O'Brien, S.M., L.V. Scott, and T.G. Dinan, Cytokines: abnormalities in major depression and implications for pharmacological treatment. *Hum Psychopharmacol*, 2004. 19(6): p. 397-403.
244. Ljubisa Vitkovic, J.B., Claude Jacque, Inflammatory Cytokines- Neuromodulators in Normal Brain? *Journal of Neurochemistry*, 2000. 74: p. 457-471.
245. Utsuyama, M., Hirokawa, K, Differential expression of various cytokine receptors in the brain after stimulation with LPS in young and old mice. *Exp. Gerontol*, 2002. 37(2-3): p. 411-420.
246. J, D.A., Cytokine Activation of the HPA Axis. *Ann N Y Acad Sci*, 2000. 917: p. 608-617.
247. Turnbull AV, R.C., Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines- actions and mechanisms of action. *Physiol Rev*, 1999. 79: p. 1-71.
248. Capuron, L., Raison, C.L., Musselman, D.L., Lawson, D.H., Nemeroff, C.B., Miller, A.H.A, Association of exaggerated HPA axis response to the initial injection of interferon-alpha with development of depression during interferon-alpha therapy. *Am J Psychiatry* 2003. 160: p. 1342-1345.
249. Matta, S.G., Linner, K.M., Sharp, B.M, Interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta stimulate adrenocorticotropin secretion in the rat through a similar hypothalamic receptor(s): effects of interleukin-1 receptor antagonist protein *Neuroendocrinology*, 1993. 57: p. 14-22.
250. van der Meer, M.J., Sweep, C.G., Rijnkels, C.E., Pesman, G.J., Tilders, F.J., Kloppenborg, P.W., Hermus, A.R, Acute stimulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by IL-1 beta, TNF alpha and IL-6: a dose response study. *J Endocrinol Invest*, 1996. 19: p. 175-182.
251. Pariante CM, P.B., Pisell TL, Sanchez CI, Po C, Su C, Miller AH The proinflammatory cytokine, interleukin-1alpha, reduces glucocorticoid receptor translocation and function. *endocrinology*, 1999. 140: p. 4359-4366.

252. Pauli, S., Linthorst, A.C., Reul, J.M, Tumour necrosis factor- α and interleukin-2 differentially affect hippocampal serotonergic neurotransmission, behavioural activity, body temperature and hypothalamic– pituitary–adrenocortical axis activity in the rat. . Eur. J. Neurosci, 1998. 10(3): p. 868-878.
253. Sapolsky, R., Rivier, C., Yamamoto, G., Plotsky, P., Vale, W.W, Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin- releasing factor. Science, 1987. 238: p. 522-524.
254. Harbuz, M.S., Stephanou, A., Sarlis, N., Lightman, S.L, The effects of recombinant human interleukin (IL)-1 α , IL-1 β or IL-6 on hypothalamo–pituitary–adrenal axis activation. J. Endocrinol, 1992. 133(3): p. 349-355.
255. Hymie Anisman , Z.M.b., Shawn Hayley Neurotransmitter, peptide and cytokine processes in relation to depressive disorder- comorbidity between depression and neurodegenerative disorders. Progress in Neurobiology 2008. 85: p. 1-74.
256. Lacosta, S., Merali, Z., Anisman, H, Central monoamine activity following acute and repeated systemic interleukin-2 administration. Neuroimmunomodulation, 2000. 8(2): p. 83-90.
257. Song, C., Merali, Z., Anisman, H, Variations of nucleus accumbens dopamine and serotonin following systemic interleukin-1, interleukin-2 or interleukin-6 treatment. Neuroscience, 1999. 88(3): p. 823-836.
258. Dunn AJ, W.J., Ando T., Effects of cytokines on cerebral neurotransmission. Comparison with the effects of stress.. Adv Exp Med Biol, 1999. 461: p. 117-27.
259. Dunn AJ, W.J., Cytokine effects on CNS biogenic amines. Neuroimmunomodulation, 1995. 2: p.:319–328
260. Linthorst, A.C., Flachskamm, C., Muller-Preuss, P., Holsboer, F., Reul, J.M, Effect of bacterial endotoxin and interleukin-1 α on hippocampal serotonergic neurotransmission,

behavioral activity, and free corticosterone levels an in vivo microdialysis study. *J. Neurosci*, 1995. 15(4): p. 2920-2934.

261. Lloyd-Jones, D., et al., Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*, 2009. 119(3): p. e21-181.

262. Morikawa O, S.N., Obara H, Saito N, Effects of interferon-alpha, interferon-gamma and cAMP on the transcriptional regulation of the serotonin transporter. *European Journal of Pharmacology* 1998. 349: p. 317-324.

263. Mossner R, H.A., Stober G, Okladnova O, Daniel S, Lesch KP, Enhancement of serotonin transporter function by tumor necrosis factor alpha but not by interleukin-6. *Neurochem Int*, 1998. 33: p. 251-254.

264. Wirleitner B, N.G., Schrocksnadel K, Frick B, Fuchs D, Interferon-gamma-induced conversion of tryptophan: immunologic and neuropsychiatric aspects. *Curr Med Chem*, 2003. 10: p. 1581-1591.

265. Takikawa, O., Yoshida, R., Kido, R., Hayaishi, O, Tryptophan degradation in mice initiated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Biol Chem* 1986. 261: p. 3648-3653.

266. Carlin JM, B.E., Byrne GI., Interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity inhibits *Chlamydia psittaci* replication in human macrophages. *J Interferon Res*, 1989. 9(3): p. 329-37.

267. Guillemin, G.J., Smythe, G., Takikawa, O., Brew, B.J, Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and production of quinolinic acid by human microglia, astrocytes, and neurons. *Glia*, 2005. 49: p. 15-23.

268. Wichers, M. and M. Maes, The psychoneuroimmuno-pathophysiology of cytokine-induced depression in humans. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2002. 5(4): p. 375-88.

269. Heyes MP, S.K., Crowley JS, Davis LE, Demitrack MA, Der M, Dilling LA, Elia J, Kruesi MJ, Lackner A, Quinolinic acid and kynurenine pathway metabolism in inflammatory and non-inflammatory neurological disease. *Brain* 1992. 115: p. 1249– 1273.
270. Jason C. O'Connor, M.A.L., Caroline André, Eileen M. Briley, Sandra S. Szegedi, Jacques Lestage, Nathalie Castanon, Miles Herkenham, Robert Dantzer and Keith W. Kelley, Induction of IDO by Bacille Calmette-Guérin Is Responsible for Development of Murine Depressive-Like Behavior. *J Immunol*, 2009. 182: p. 3202-3212.
271. Eran Eilat, S.M., Adiel Doron, Vera Zakuth, and Zvi Spirer, Increased Apoptosis in Patients with Major Depression- A Preliminary Study. *J Immunol*, 1999. 163: p. 533-534.
272. Paul J. Lucassen, M.B.M., J.B. Florian Holsboer, Anne Holtrop, Jose Wouda, Witte J. G. Hoogendijk,, and a.D.F.S. E. Ron De Kloet, Hippocampal Apoptosis in Major Depression Is a Minor Event and Absent from Subareas at Risk for Glucocorticoid Overexposure. *American Journal of Pathology*, 2001. 158(2): p. 453-458.
273. Parissis JT, A.S., Rigas A, Kostakis G, Karatzas D, Venetsanou K, Kremastinos DT, Comparison of circulating proinflammatory cytokines and soluble apoptosis mediators in patients with chronic heart failure with versus without symptoms of depression. *Am J Cardiol*, 2004. 2004(94): p. 1326–8.
274. Gilbert, K.A.-B., J. Monaco, F. F. Beaudoin, A. Bah, T. M. Tompkins, T. A. Godbout, R. Rousseau, G., Attenuation of post-myocardial infarction depression in rats by n-3 fatty acids or probiotics starting after the onset of reperfusion. *Br J Nutr*, 2012: p. 1-7.
275. Bah, T.M., et al., Pretreatment with pentoxifylline has antidepressant-like effects in a rat model of acute myocardial infarction. *Behav Pharmacol*, 2011. 22(8): p. 779-84.
276. Bah, T.M.B., M. Kaloustian, S. Karam, R. Rousseau, G. Godbout, R., Escitalopram reduces circulating pro-inflammatory cytokines and improves depressive behavior without

affecting sleep in a rat model of post-cardiac infarct depression. *Behav Brain Res*, 2010. 225(1): p. 243-51.

277. Zou, J.Y. and F.T. Crews, TNF alpha potentiates glutamate neurotoxicity by inhibiting glutamate uptake in organotypic brain slice cultures: neuroprotection by NF kappa B inhibition. *Brain Res*, 2005. 1034(1-2): p. 11-24.

278. Simen, B.B.D., C. H. Simen, A. A. Duman, R. S., TNFalpha signaling in depression and anxiety: behavioral consequences of individual receptor targeting. *Biol Psychiatry*, 2006. 59(9): p. 775-85.

279. Hayley S, P.M., Merali Z, Anisman H The pathogenesis of clinical depression- stressor- and cytokine-induced alterations of neuroplasticity. *Neuroscience*, 2005. 135: p. 659-678.

280. Maes M, Y.R., Noraberg J, Brene S, Hibbeln J, Perini G, Kubera M, Bob P, Lerer B, Maj M, The inflammatory and neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. *Metab Brain Dis* 24:27–53, 2009. 24: p. 27-53.

281. McAfoose J, B.B., Evidence for a cytokine model of cognitive function. *Neurosci Biobehav Rev* 2009. 33: p. 355-366.

282. Song C, W.H., Cytokines mediated inflammation and decreased neurogenesis in animal models of depression. *Biol Psychiatry*, 2011. 35: p. 760-768.

283. Sparkman, N.L.B., J. B. Heyen, J. R. Chen, J. Beverly, J. L. Johnson, R. W., Interleukin-6 facilitates lipopolysaccharide-induced disruption in working memory and expression of other proinflammatory cytokines in hippocampal neuronal cell layers. *J Neurosci*, 2006. 26(42): p. 10709-16.

284. WC, D., Neuroimaging studies of mood disorders: Implications for a neural model of major depression. *Biol. Psychiatry* 2000. 48: p. 813-829.

285. Kendra N. Shaw, S.C., Shane M. O'Mara Lipopolysaccharide causes deficits in spatial learning in the watermaze but not in BDNF expression in the rat dentate gyrus. *Behav Brain Res*, 2001. 124: p. 47-54.
286. Michael Maes, C.S., Raz Yirmiya, Targeting IL-1 in depression. *Expert Opin Ther Targets*, 2012. 16(11): p. 1097-112.
287. Goshen I, K.T., Ben-Menachem-Zidon O, Licht T, Weidenfeld J, Ben-Hur T, Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression. *Mol Psychiatry* 2008. 13: p. 717-28.
288. Kuzumaki N, I.D., Imai S, Narita M, Tamura R, Yajima M, Suzuki A, Miyashita K, Niikura K, Takeshima H, Ando T, Ushijima T, Suzuki T Enhanced IL-1beta production in response to the activation of hippocampal glial cells impairs neurogenesis in aged mice. *Synapse* 2010. 64: p. 721-728.
289. JM., J.C.e.T., Stress, immunité et physiologie du système nerveux. *Medecine; Sciences*, 2002. 18(11): p. 1160.-6.
290. Tancredi, V., D'Antuono, M, The inhibitory effects of interleukin-6 on synaptic plasticity in the rat hippocampus are associated with an inhibition of mitogen-activated protein kinase ERK. *J. Neurochem*, 2000. 75(2): p. 634-643.
291. Pickering, M., O'Connor, J.J, Pro-inflammatory cytokines and their effects in the dentate gyrus. *Prog. Brain Res*, 2007. 163: p. 339-354.
292. Pugh, C., Fleshner, M, The immune system and memory consolidation: a role for the cytokine IL-1beta. *Biobehav. Rev*, 2001. 25(1): p. 29-41.
293. Yirmiya, R., Winocur, G, Brain interleukin-1 is involved in spatial memory and passive avoidance conditioning. *Neurobiol. Learn. Mem*, 2002. 78(2): p. 379-89.

294. Weaver, J.D., Huang, M.H, Interleukin-6 and risk of cognitive decline: MacArthur studies of successful aging. *Neurology* 2002. 59(3): p. 371-378.
295. Sutcgil, L., et al., Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in major depression: effect of sertraline therapy. *Clin Dev Immunol*, 2007. 2007: p. 76396.
296. Michael Maes, C.S., Raz Yirmiya, The Immunoregulatory Effects of Antidepressants.pdf. *Hum Psychopharmacol Clin Exp*, 2001. 16: p. 95-103.
297. Kubera M, L.A., Kenis G, Bosmans E, Van Bockstaele D, Maes M, Anti-inflammatory effects of antidepressants through suppression of the interferon-gamma:interleukin-10 production ratio. *J Clin Psychopharmacol* 2001. 21: p. 199-206.
298. Hiroaki Niino, T.O., Kenji Izuhara, Kunihiro Yamaoka, Koichi Ohshima, Tadashi Tanabe, Shuntaro Hara, Yoshiaki Nemoto, Yosuke Tanaka, Hitoshi Nakashima, and Yoshiyuki Niho, <Regulation by Interleukin-10 and Interleukin-4 of Cyclooxygenase-2 Expression in Human Neutrophils.pdf>. *blood*, 1997. 89(5): p. 1621-1628.
299. Nolan, Y., et al., Role of interleukin-4 in regulation of age-related inflammatory changes in the hippocampus. *J Biol Chem*, 2005. 280(10): p. 9354-62.
300. Musso T, G.G., Brooks A, Longo DL, Varesio L., Interleukin-4 inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human monocytes. *Blood*, 1994. 83(5): p. 1408-11.
301. Mossner R, D.S., Schmitt A, Albert D, Lesch KP, Modulation of serotonin transporter function by interleukin-4. *Life Sci*, 2001. 68: p. 873-880.
302. Soria, J.A.A., D. S. Gaviglio, E. A. Rodriguez-Galan, M. C. Wang, J. M. Iribarren, P., Interleukin 4 induces the apoptosis of mouse microglial cells by a caspase-dependent mechanism. *Neurobiol Dis*, 2011. 43(3): p. 616-24.

303. Derecki, N.C.C., A. N. Yang, C. H. Quinnes, K. M. Cihfield, A. Lynch, K. R. Kipnis, J., Regulation of learning and memory by meningeal immunity: a key role for IL-4. *J Exp Med*, 2010. 207(5): p. 1067-80.
304. Minichiello L, C.A., Medina DL, Bonhoeffer T, Klein R, Korte M., Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation. *Neuron*, 2002. 36: p. 121-137.
305. Czeh, B. and P.J. Lucassen, What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 2007. 257(5): p. 250-60.
306. Hen, A.D.a.R., Hippocampal Neurogenesis- Regulation by Stress and Antidepressants. *Biol Psychiatry*, 2006. 59: p. 1136-1143.
307. AJ., D., Endotoxin-induced activation of cerebral catecholamine and serotonin metabolism- comparison with interleukin-1. *J Pharmacol Exp Ther*, 1992. 261(3): p. 964-9.
308. Pan W, Z.J., Harlan RE, Weber JT, Banks WA, and Kastin AJ, Tumor necrosis factor- α : a neuromodulator in the CNS. *Neurosci Biobehav Rev* 1997. 21: p. 603– 613.
309. Buttini, M.B.H., Peripheral lipopolysaccharide stimulation induces interleukin-1 β messenger RNA in rat brain microglial cells. *Neuroscience* 65, 1995. 65: p. 523 – 530.
310. Watkins, S.F.M.a.L.R., Cytokines for Psychologists- Implications of Bidirectional Immune-to- Brain Communication for Understanding Behavior, Mood, and Cognition. *psychological Review*, 1998. 105(1): p. 83-107.
311. Watkins, L.R., Maier, S.F., Goehler, L.E, Cytokine-to-brain communication- a review and analysis of alternative mechanisms. *Life Sci*, 1995. 57: p. 1011-1026.
312. Dantzer, R., Aubert, A., Bluthé, R.-M., Gheusi, G., Cremona, S., Layé, S., Konsman, J.P., Parnet, P., Kelley, K.W., 1999a. Mechanisms of the behavioral effects of cytokines. In: Dantzer,

R., Wollman, E.E., Yirmiya, R. (Eds.), Cytokines, stress and depression. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 83–105.

313. Lacroix, S., Rivest, S, Effect of acute systemic inflammatory response and cytokines on the transcription of the genes encoding cyclooxygenase enzymes (COX-1 and COX-2) in the rat brain. . J Neurochem 70, 1998. 70(452-466).

314. Merrill, J.E., Murphy, S.P, Inflammatory events at the blood brain barrier- regulation of adhesion molecules, cytokines, and chemokines by reactive nitrogen and oxygen species. Brain Behav. Immun, 1997. 11: p. 245 – 263.

315. Worrall NK1, C.K., LeJeune WS, Misko TP, Sullivan PM, Ferguson TB Jr, Williamson JR, TNF-alpha causes reversible in vivo systemic vascular barrier dysfunction via NO-dependent and -independent mechanisms. Am J Physiol, 1997. 273(6): p. 2565-74

316. Banks WA, K.A., Broadwell RD, Passage of cytokines across the blood-brain barrier. Neuroimmunomodulation. , 1995. 2(4): p. 241-8.

317. Banks WA, O.L., Plotkin SR, Kastin AJ. Human Human interleukin (IL) 1 alpha, murine IL-1 alpha and murine IL-1 beta are transported from blood to brain in the mouse by a shared saturable mechanism. J Pharmacol Exp Ther, 1991. 259(3): p. 988-96.

318. Brochu, S., Olivier, M., Rivest, S, Neuronal activity and transcription of proinflammatory cytokines, IkappaBalpha, and iNOS in the mouse brain during acute endotoxemia and chronic infection with Trypanosoma brucei brucei. J Neurosci Res, 1999. 57: p. 801-816.

319. Nadeau, S., Rivest, S, Effects of circulating tumor necrosis factor on the neuronal activity and expression of the genes encoding the tumor necrosis factor receptors (p55 and p75) in the rat brain: a view from the blood-brain barrier. . Neuroscience 1999. 93: p. 1449-1464.

320. Quan, N., Whiteside, M., Herkenham, M., Time course and localization patterns of interleukin-1beta messenger RNA expression in brain and pituitary after peripheral administration of lipopolysaccharide. *Neuroscience*, 1998. 83: p. 281-93.
321. Ericsson, A., Arias, C., Sawchenko, P.E, Evidence for an intra- medullary prostaglandin-dependent mechanism in the activation of stress-related neuroendocrine circuitry by intravenous interleukin- 1. *J. Neurosci*, 1997. 17: p. 7166–7179.
322. Yamagata, K., Matsumura, K., Inoue, W., Shiraki, T., Suzuli, K., Yas-uda, S., Sugiura, H., Cao, C., Watanabe, Y., Kobayashi, S, Coexpression of microsomal-type prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells of rats during endotoxin-induced fever. *J. Neurosci*, 2001. 21: p. 2669–2677.
323. Quan, N.a.W.A.B., Brain-immune communication pathways. *Brain Behav Immun*, 2007. 21(6): p. 727-35.
324. Agnes Nadjar, R.-M.B., Michael J May, Robert Dantzer and Patricia Parnet, Inactivation of the cerebral NFkappaB pathway inhibits interleukin-1beta-induced sickness behavior and c-Fos expression in various brain nuclei. *Neuropsychopharmacology*, 2005. 30(8): p. 1492-9.
325. Tsuneo Takadera, H.Y., Yoshiko Tozuka, Takao Ohyashiki, Prostaglandin E2 induces caspase-dependent apoptosis in rat cortical cells. *Neurosci Lett*, 2002. 317: p. 61-64.
326. Zhang, J.a.S.R., Distribution, regulation and colocalization of the genes encoding the EP2- and EP4-PGE2 receptors in the rat brain and neuronal responses to systemic inflammation. *Eur J Neurosci*, 1999. 11(8): p. 2651-68.
327. Kaloustian, S.W., B. P. Bah, T. M, Falcao, S. Dufort, A. M. Ryvlin, P. Godbout, R.Rousseau, G., Celecoxib after the onset of reperfusion reduces apoptosis in the amygdala. *Apoptosis*, 2007. 12(11): p. 1945-51.

328. B. Bonaza, J.-M.S., Le dysfonctionnement du « brain-gut » brain-gut axis dysfunction. *Gastroenterol Clin Biol*, 2009. 33(1): p. 48-58.
329. Bonaz, B., Communication entre cerveau et intestin . Brain-gut interactions. *Rev Med Interne*, 2010. 31(8): p. 581-5.
330. Altschuler SM, E.J., Lynn RB & Miselis RR, The central organization of the vagus nerve innervating the colon of the rat. *Gastroenterology* 1993. 104: p. 502-509.
331. F, N., Atlas d'anatomie humaine. 2007.
332. Ek, M., Kurosawa, M., Lundeberg, T., Ericsson, A, Activation of vagal afferents after intravenous injection of interleukin-1beta: role of endogenous prostaglandins. *J Neurosci* 1998. 18: p. 9471-9479.
333. Nijima, A., The afferent discharges from sensors for interleukin 1 beta in the hepatoportal system in the anesthetized rat. *J Auton Nerv Syst*, 1996. 61: p. 287-291.
334. Laye S, B.R., Kent S, Combe C, Medina C, Parnet P, Kelley K & Dantzer R, Subdiaphragmatic vagotomy blocks induction of IL-1 beta mRNA in mice brain in response to peripheral LPS. *Am J Physiol*, 1995. 268: p. 1327-1331.
335. Bluthé RM, M.B., Kelley KW & Dantzer R, Vagotomy blocks behavioural effects of interleukin-1 injected via the intraperitoneal route but not via other systemic routes. *Neuroreport* 1996. 7: p. 2823-2827.
336. Francis, J., et al., Neural regulation of the proinflammatory cytokine response to acute myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. 287(2): p. H791-7.
337. Goehler, L.E., et al., Activation in vagal afferents and central autonomic pathways: early responses to intestinal infection with *Campylobacter jejuni*. *Brain Behav Immun*, 2005. 19(4): p. 334-44.

338. Dantzer, R. and K.W. Kelley, Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. *Brain Behav Immun*, 2007. 21(2): p. 153-60.
339. Gordon, F.J., 2000, Effect of nucleus tractus solitarius lesions on fever produced by interleukin-1beta. *Auton Neurosci*, 2000. 85: p. 102-110.
340. Elmquist, J.K., Saper, C.B, Activation of neurons projecting to the paraventricular hypothalamic nucleus by intravenous lipopolysaccharide. *J Comp Neurol*, 1996. 374: p. 315-331.
341. Bluthé, R.M., Walter, V., Parnet, P., Laye, S., Lestage, J., Verrier, D., Poole, S., Stenning, B.E., Kelley, K.W., Dantzer, R., Lipopolysaccharide induces sickness behaviour in rats by a vagal mediated mechanism. *C R Acad Sci III*, 1994. 317: p. 499-503.
342. Marek Wieczorek , A.H.S., Hossein Pournajafi-Nazarloo , Adrian J. Dunn Physiological and behavioral responses to interleukin-1h and LPS in vagotomized mice. *Physiology Behavior*, 2005. 85: p. 500-511.
343. E, M.A., The neurobiology of stress and gastrointestinal disease. *Gut*, 2000. 47: p. 861-9.
344. Logan A C, K.M., Major depressive disorder: probiotics may be an adjuvant therapy. *Medical Hypothesis*, 2005. 65(3): p. 533-8.
345. Zareie, M.J.-H., K. Jury, J. Yang, P. C. Ngan, B. Y. McKay, D. M. Soderholm, J. D. Perdue, M. H. Sherman, P. M., Probiotics prevent bacterial translocation and improve intestinal barrier function in rats following chronic psychological stress. *Gut*, 2006. 55(11): p. 1553-60.
346. Femke Lutgendorff, L.M.A.A.a.J.D.S., The role of microbiota and probiotics in stress-induced gastro-intestinal damage. *Curr Mol Med*, 2008. 8(4): p. 282-98.
347. Melanie G. Gareau, M.A.S.a.M.H.P., Pathophysiological mechanisms of stress-induced intestinal damage. *Curr Mol Med*, 2008. 8(4): p. 274-81.

348. Desbonnet, L.G., L. Clarke, G. Bienenstock, J. Dinan, T. G., The probiotic *Bifidobacteria infantis*: An assessment of potential antidepressant properties in the rat. *J Psychiatr Res*, 2008. 43(2): p. 164-74.
349. Dinan, T.G.Q., E. M. Ahmed, S. M. Scully, P. O'Brien, S. O'Mahony, L. O'Mahony, S. Shanahan, F. Keeling, P. W., Hypothalamic-pituitary-gut axis dysregulation in irritable bowel syndrome: plasma cytokines as a potential biomarker? *Gastroenterology*, 2006. 130(2): p. 304-11.
350. Fiore, M.M., R.; Alleva, E.; Aloe, L. *Schistosoma mansoni*, Influence of infection on mouse behavior. *behavior. Exp. Parasitol*, 1996. 83: p. 46-54.
351. Collins, S.M. and P. Bercik, The relationship between intestinal microbiota and the central nervous system in normal gastrointestinal function and disease. *Gastroenterology*, 2009. 136(6): p. 2003-14.
352. Bercik, P., et al., Chronic gastrointestinal inflammation induces anxiety-like behavior and alters central nervous system biochemistry in mice. *Gastroenterology*, 2010. 139(6): p. 2102-2112 e1.
353. Donato, K.A.G., M. G. Wang, Y. J. Sherman, P. M., *Lactobacillus rhamnosus* GG attenuates interferon- γ and tumour necrosis factor- α -induced barrier dysfunction and pro-inflammatory signalling. *Microbiology*, 2010. 156(Pt 11): p. 3288-97.
354. Catalioto RM, M.C.G.S., Intestinal epithelial barrier dysfunction in disease and possible therapeutical interventions. *Curr Med Chem* 2011. 18(3): p. 398-326.
355. Lyte M, V.J., Bailey MT, Anxiogenic effect of subclinical bacterial infection in mice in the absence of overt immune activation. *Physiol Behav* 1998. 65: p. 63-68.

356. Hansen MK, N.K., Goehler LE, Gaykema RP, Fleshner M, Maier SF, Watkins LR Effects of vagotomy on lipopolysaccharide-induced brain interleukin-1beta protein in rats. *Auton Neurosci* 2000. 85(119–226.).
357. Sharkey, K.A., Kroese, A.B.A, Consequences of intestinal inflammation on the enteric nervous system- neuronal activation induced by inflammatory mediators. *Anat. Rec*, 2001. 262: p. 79-90.
358. Sharkey, K.A., Mawe, G.M, Neuroimmune and epithelial inter-actions in intestinal inflammation. *Curr. Opin. Pharmacol*, 2002. 2: p. 669-677.
359. Gupta, V. and R. Garg, Probiotics. *Indian J Med Microbiol*, 2009. 27(3): p. 202-9.
360. Organisation, W.G. Probiotiques et Prébiotiques 2008; Available from: http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/fr/pdf/guidelines/19_probiotics_prebiotics_fr.pdf.
361. Singh, Y., et al., Emerging importance of holobionts in evolution and in probiotics. *Gut Pathog*, 2013. 5(1): p. 12.
362. S.C. Ng, A.L.H., M.A. Kamm, A.J. Stagg, S.C. Knight, Mechanisms of action of probiotics- Recent advances. *Inflamm Bowel Dis*, 2008. 15: p. 300-310.
363. Yadvir Singh, J.A., Javed Musarrat, Nasreen Z Ehtesham and Seyed E Hasnain, Emerging importance of holobionts in evolution and in probiotics. *Gut Pathog*, 2013. 5(1): p. 12.
364. Zareie M; Johnson-Henry, K.Z., M., JOHNSON-HENRY, K., Jury, J, Yang, P.C; Ngan, B.Y; McKay, D.M; Soderholm, J.D.; Perdue, M.H; Sherman, P.M Probiotics prevent bacterial translocation and improve intestinal barrier function in rats following chronic psychological stress. *Gut*, 55, 1553-60. . *Gut*, 2006. 55: p. 1553-60.

365. Mack DR, M.S., Wei S, Mc Dougall L, Hollingsworth M.A Probiotics inhibit enteropathogenic E. coli adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am J Physiol*, 1999. 276: p. 941–G950.
366. M. Lorea Baroja, P.V.K., S. Hekmat, G Reid, Anti-inflammatory effects of probiotic yogurt in inflammatory bowel disease patients. *Clin Exp Immunol*, 2007. 149: p. 470-9.
367. Delcenserie V, M.D., Lamoureux M, Amiot J, Boutin Y, Roy D, Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Curr Issues Mol Biol*, 2008. 10: p. 37-54.
368. Candela M, P.F., Carnevali P, Vitali B, Ciati R, Gionchetti P, Rizzello F, Campieri M, Brigidi P., Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *Int J Food Microbiol*, 2008. 125(3): p. 286-92.
369. Eun CS, K.Y., Han DS, et al., *Lactobacillus casei* prevents impaired barrier function in intestinal epithelial cells. *APMIS*, 2011. 119: p. 49-56.
370. Karczewski J, T.F., Konings I, Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* in vivo and protective effects on the epithelial barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010. 298: p. 851-859.
371. Cario E, G.G.P.D., Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier functio. *Gastroenterology* 2007. 132: p. 1359–1374.
372. Girard, S.A.B., T. M. Kaloustian, S. Lada-Moldovan, L. Rondeau, I. Tompkins, T. A. Godbout, R. Rousseau, G., *Lactobacillus helveticus* and *Bifidobacterium longum* taken in combination reduce the apoptosis propensity in the limbic system after myocardial infarction in a rat model. *Br J Nutr*, 2009. 102(10): p. 1420-5.
373. Kline MD, K.S., *Acidophilus* for sertraline- induced diarrhea. *Am J Psychiatry*, 1994. 151: p. 1521–2.

374. Hatakka K, M.J., Korpela M, Herranen M et al, Effects of probiotic therapy on the activity and activation of mild rheumatoid arthritis – a pilot study. *Scan J Rheumatol*, 2003. 32: p. 211-5.
375. Pary RP, T.C., Lippmann S, Antidepressants and the cardiac patient: selecting an appropriate medication. *Postgrad Med J.*, 1989. 85: p. 267-9.
376. Roose SP, D.G., Glassman AH, Woodring S, Walsh T, Giardina WGV, Cardiovascular effects of bupropion in depressed patients with heart disease. *Am J Psychiatry* 1991. 148: p. 512-6.
377. JP, F., Cardiovascular safety in depressed patients: focus on venlafaxine. *J Clin Psychiatry*, 1995. 56: p. 574-9.
378. Smulevich AB, D.M.Y., Ilina NA, Mirtazapine in treatment of depression in patients with ischaemic heart disease. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2001. 11(3): p. 205-6.
379. Taylor, D., Antidepressant drugs and cardiovascular pathology: a clinical overview of effectiveness and safety. *Acta Psychiatr Scand*, 2008. 118(6): p. 434-42.
380. Carney RM, F.K., Veith RC et al. Can treating depression reduce mortality after an acute myocardial infarction? , Can Treating Depression Reduce Mortality After an Acute Myocardial Infarction? *Psychosom Med* 1999. 61: p. 666-675.
381. Drzyzga, L.R.M., A. Obuchowicz, E., Antiapoptotic and neurotrophic effects of antidepressants: a review of clinical and experimental studies. *Brain Res Bull*, 2009. 79(5): p. 248-57.
382. Chiou, S.H., Chen, S.J., Peng, C.H., Chang, Y.L., Ku, H.H., Hsu, W.M., Ho, L.L.T., Lee, C.H, Fluoxetine up-regulates expression of cellular FLICE-inhibitory protein and inhibits LPS-induced apoptosis in hippocampus-derived neural stem cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 2006. 343: p. 391-400.

383. He, J., Luo, H., Yan, B., Yu, Y., Wang, H., Wei, Z., Zhang, Y., Xu, H., Tempier, A., Li, X., Li, X.M, Beneficial effects of quetiapine in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 2009. 30: p. 1205–1216.
384. Manji HK, M.G., Rajkowska G, Chen G, Neuroplasticity and cellular resilience in mood disorders. *Mol Psychiatry*, 2000. 5: p. 578 –593.
385. D'Sa C, D.R., Antidepressants and neuroplasticity. *Bipolar Disord*, 2000: p. 183-194.
386. Zhang, C., et al., Influence of BCL2 gene in major depression susceptibility and antidepressant treatment outcome. *J Affect Disord*, 2014. 155: p. 288-94.
387. Savitz J, D.W., Bipolar and Major Depressive Disorder- Neuroimaging the Developmental-Degenerative Divide. *Neurosci Biobehav*, 2009. 33: p. 699-771.
388. HJ Lee, J.K., SV Yim, MJ Kim, SA Kim, YJ Kim, CJ Kim and JH Chung, Fluoxetine enhances cell proliferation and prevents apoptosis in dentate gyrus of maternally separated rats. *Molecular Psychiatry* 2001. 6: p. 725-728.
389. Jin, Y.L., C. M. Kim, S. W. Park, J. Y. Seo, J. S. Han, P. L. Yoon, S. H. Lee, J. K., Fluoxetine attenuates kainic acid-induced neuronal cell death in the mouse hippocampus. *Brain Res*, 2009. 1281: p. 108-16.
390. Wann, B.P., et al., Vulnerability for apoptosis in the limbic system after myocardial infarction in rats: a possible model for human postinfarct major depression. *J Psychiatry Neurosci*, 2007. 32(1): p. 11-6.
391. Wann, B.P.B., T. M. Kaloustian, S. Boucher, M. Dufort, A. M. Le Marec, N. Godbout, R. Rousseau, G., Behavioural signs of depression and apoptosis in the limbic system following myocardial infarction: effects of sertraline. *J Psychopharmacol*, 2009. 23(4): p. 451-9.
392. Jiang W, K.R., O'Connor CM, Depression and heart disease: evidence of a link, and its therapeutic implications. *CNS Drugs*, 2002. 16: p. 111-127.

393. Rudisch B, N.C., Epidemiology of comorbid coronary artery disease and depression. *Biol Psychiatry*, 2003. 54: p. 227-240.
394. Mounira Banasr, J.M.D.a.R.S.D., <Cell atrophy and loss in depression- reversal by antidepressant treatment.pdf>. *Current Opinion in Cell Biology*, 2011. 23: p. 730-737.
395. Lucassen, P.J., E. Fuchs, and B. Czeh, Antidepressant treatment with tianeptine reduces apoptosis in the hippocampal dentate gyrus and temporal cortex. *Biol Psychiatry*, 2004. 55(8): p. 789-96.
396. Debrunner, M., et al., Proinflammatory cytokines in acute myocardial infarction with and without cardiogenic shock. *Clin Res Cardiol*, 2008. 97(5): p. 298-305.
397. Zhang, M. and L. Chen, Status of cytokines in ischemia reperfusion induced heart injury. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 2008. 8(3): p. 161-72.
398. Sluzewska A, R.J., Bosmans E, Sobieska M, Berghmans R, Maes M, Wiktorowicz K, Indicators of immune activation in major depression. *Psychiatry Res*, 1996. 64: p. 161–167.
399. Elovainio, M.K.-J., L. Pulkki-Raback, L. Kivimaki, M. Puttonen, S. Viikari, L. Rasanen, L. Mansikkaniemi, K. Viikari, J. Raitakari, O. T., Depressive symptoms and C-reactive protein: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Psychol Med*, 2006. 36(6): p. 797-805.
400. Levine, J., Barak, Y., Chengappa, K.N., Rapoport, A., Rebey, M., Barak, V, Cerebrospinal cytokine levels in patients with acute depression. *Neuropsychobiology*, 1999. 40: p. 171-176.
401. Anisman, H., et al., Cytokines as a precipitant of depressive illness: animal and human studies. *Curr Pharm Des*, 2005. 11(8): p. 963-72.
402. Dinan, T.G., Inflammatory markers in depression. *Curr Opin Psychiatry*, 2009. 22(1): p. 32-6.

403. Cizza, G., et al., Elevated neuroimmune biomarkers in sweat patches and plasma of premenopausal women with major depressive disorder in remission: the POWER study. *Biol Psychiatry*, 2008. 64(10): p. 907-11.
404. Capuron, L., Gumnick, J.F., Musselman, D.L., Lawson, D.H., Reemsnyder, A., Nemeroff, C.B., Miller, A.H., , Neurobehavioral effects of interferon-alpha in cancer patients phenomenology and paroxetine responsiveness of symptom dimensions. *Neuropsychopharmacology*, 2002. 26: p. 643-652.
405. Makino, M., Kitano, Y., Hirohashi, M., Takasuna, K, Enhancement of immobility in mouse forced swimming test by treatment with human interferon. *Eur J Pharmacol*, 1998. 356: p. 1-7.
406. Muller, N., Ackenheil, M.,, Psychoneuroimmunology and the cytokine action in the CNS- implications for psychiatric disorders. *Prog. Neuro-psychopharmacol Biol. Psychiatry* 1998. 22: p. 1-33.
407. Tying, S.G., Alice Papp, Kim Gordon, Ken Leonardi, Craig Wang, Andrea Lalla, Deepa Woolley, Michael Jahreis, Angelika Zitnik, Ralph Cella, David Krishnan, Ranga, Etanercept and clinical outcomes, fatigue, and depression in psoriasis: double-blind placebo-controlled randomised phase III trial. *The Lancet*, 2006. 367(9504): p. 29-35.
408. Price, J.L., Comparative aspects of amygdala connectivity. *Ann. N.Y.Acad. Sci*, 2003. 985: p. 50-58.
409. Dantzer, R., Cytokine, sickness behavior, and depression. *Neurol Clin*, 2006. 24(3): p. 441-60.
410. Yirmiya, R., Weidenfeld, J., Barak, O., Avitsur, R., Pollak, Y., Gallily, R., Wohlman, A., Ovadia, H., Ben- Hur, T, The role of brain cytokines in mediating the behavioral and neuroendocrine effects of intracerebral mycoplasma fermentans. . *Brain Res* 1999. 829: p. 28-38.

411. Meyers, C.A., Mood and cognitive disorders in cancer patients receiving cytokine therapy. *Adv Exp Med Biol* 1999. 461: p. 75-81.
412. Capuron, L., Ravaud, A., Dantzer, R, Early depressive symptoms in cancer patients receiving interleukin 2 and/or interferon alfa-2b therapy. *J Clin Oncol* 2000. 18: p. 2143-2151.
413. Bluthe, R.M., Laye, S., Michaud, B., Combe, C., Dantzer, R., Parnet, P, Role of interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha in lipopolysaccharide-induced sickness behaviour: a study with interleukin-1 type I receptor-deficient mice. *Eur J Neurosci* 2000. 12: p. 4447-4456.
414. Capuron, L., Ravaud, A., Neveu, P.J., Miller, A.H., Maes, M., Dantzer, R, Association between decreased serum tryptophan concentrations and depressive symptoms in cancer patients undergoing cytokine therapy. *Mol Psychiatry* 2002. 7: p. 468-473.
415. Joly, D. and D.J. Sanger, The effects of fluoxetine and zimeldine on the behavior of olfactory bulbectomized rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 1986. 24(2): p. 199-204.
416. Arseneault-Breard, J., et al., Combination of *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 reduces post-myocardial infarction depression symptoms and restores intestinal permeability in a rat model. *Br J Nutr*, 2012. 107(12): p. 1793-9.
417. Porsolt RD, A.G., Deniel M, Jalfre M., Behavioural despair in rats: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol*, 1978. 47: p. 379-91.
418. P, W., The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology* 1984. 83: p. 1-16.
419. R, M., Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*, 1984. 11: p. 47-60.

420. Rygula, R.A., N. Flugge, G. Fuchs, E. Ruther, E. Havemann-Reinecke, U., Anhedonia and motivational deficits in rats: impact of chronic social stress. *Behav Brain Res*, 2005. 162(1): p. 127-34.
421. Kaloustian, S., et al., Apoptosis time course in the limbic system after myocardial infarction in the rat. *Brain Res*, 2008. 1216: p. 87-91.
422. Jacobson M.D, W.M., Programmed cell death in animal development. *cell*, 1997. 83(3): p. 347-354.
423. Albrecht S1, B.M., Bennett D, Mufson EJ, Bhattacharjee M, LeBlanc AC., Activation of caspase-6 in aging and mild cognitive impairment. *Am J Pathol*, 2007. 170(4): p. 1200-9.
424. Guo, H., Albrecht S, Bourdeau M, Petzke T, Bergeron C, LeBlanc AC., Active caspase-6 and caspase-6-cleaved tau in neuropil threads, neuritic plaques, and neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol*, 2004. 165: p. 523-531.
425. Graham, R.K., Deng Y, Carroll J, Vaid K, Cowan C, Pouladi MA, Metzler M, Bissada N, Wang L, Faull RL, Gray M, Yang XW, Raymond LA, Hayden MR, Cleavage at the 586 amino acid caspase-6 site in mutant huntingtin influences caspase-6 activation in vivo. *J. Neurosci*, 2010. 30: p. 15019–15029.
426. Warby SC, D.C., Graham RK, Carroll JB, Yang YZ, Singaraja RR, Overall CM, Hayden MR., Activated caspase-6 and caspase-6-cleaved fragments of huntingtin specifically colocalize in the nucleus. *Hum. Mol. Genet*, 2008. 17: p. 2390–2404.
427. Pompl PN, Y.S., Xiang Z, Ho L, Haroutunian V, Purohit D, Mohs R, Pasinetti GM., Caspase gene expression in the brain as a function of the clinical progression of Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 60, 369–376. *Arch. Neurol*, 2003. 60: p. 369-376.

428. LeBlanc, A.C.R., J. Afonso, V. Hamel, E. Bennett, D. A. Pakavathkumar, P. Albrecht, S., Caspase-6 activity in the CA1 region of the hippocampus induces age-dependent memory impairment. *Cell Death Differ*, 2014. 21(5): p. 696-706.
429. Alexopoulos, G.S., Vascular Disease, Depression, and Dementia. *JAGS*, 2003. 51: p. 1178-1180.
430. Devanand DP, S.M., Tang MX, Taylor S, Gurland BJ, Wilder D, Stern Y, Mayeux R., Depressed mood and the incidence of Alzheimer's disease in the elderly living in the community. *Arch Gen Psychiatry*, 1996. 53(2): p. 175-82.
431. A, J., Is depression a risk factor for dementia or cognitive decline? A review. *Gerontology*, 2000. 46: p. 219-227.
432. Micheau, O. and J. Tschopp, Induction of TNF Receptor I-Mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes. *Cell*, 2003. 114(2): p. 181-190.
433. Baune, B.T.P., G. Rothermundt, M. Riess, O. Funke, H. Berger, K., Association between genetic variants of IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha cytokines and cognitive performance in the elderly general population of the MEMO-study. *Psychoneuroendocrinology*, 2008. 33(1): p. 68-76.
434. Wendell CR, W.S., Ferrucci L, O'Brien RJ, Strait JB, Zonderman AB, Carotid atherosclerosis and prospective risk of dementia. *Stroke* 2012. 43: p. 3319–3324.
435. van Oijen M, D.J.F., Witteman JC, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM., Atherosclerosis and risk for dementia. *Ann Neurol*, 2007. 61: p. 403–410.
436. JC, D.I.T., Cardiovascular risk factors promote brain hypoperfusion leading to cognitive decline and dementia. . *Cardiovasc Psychiatry Neurol*, 2012. 2012: p. 367516.

437. Ruitenberg A, d., Bakker SL, vanSwieten JC, Koudstaal PJ, Hofman A et al, Cerebral hypoperfusion and clinical onset of dementia: the Rotterdam Study. *Ann Neurol*, 2005. 57: p. 789–794.
438. K, K., Cerebral blood flow measurement by PET in hypertensive subjects as a marker of cognitive decline. *J Alzheimers Dis* 2010. 20: p. 855–859.
439. Kitagawa K, O.N., Kimura Y, Yagita Y, Sakaguchi M, Hatazawa J et al, Relationship between cerebral blood flow and later cognitive decline in hypertensive patients with cerebral small vessel disease. *Hypertens Res*, 2009. 32: p. 816–820.
440. Fuller-Thomson E, S.J., Depression and inflammatory bowel disease: findings from two nationally representative Canadian surveys. *Inflamm Bowel Dis*, 2006. 12: p. 697-707.
441. Mittermaier C, D.C., Waldhoer T, Oefflerbauer-Ernst A, Miehsler W, Beier M, Tillinger W, Gangl A, Moser G, Impact of depressive mood on relapse in patients with inflammatory bowel disease: a prospective 18-month follow-up study. *Psychosom Med* 2004, 2004. 66: p. 79-84.
442. Addolorato G, C.E., Stefanini GF, Gasbarrini G., Inflammatory bowel disease: a study of the association between anxiety and depression, physical morbidity, and nutritional status. *Scand J Gastro-enterol*, 1997. 32: p. 1013–1021.
443. Andrews H, B.P., Allan RN, Psychiatric illness in patients with inflammatory bowel disease. Andrews H, Barczak P, Allan RN. Psychiatric illness in patients with inflammatory bowel disease, 1987. 28: p. 1600-1604.
444. Rook, G.A. and C.A. Lowry, The hygiene hypothesis and psychiatric disorders. *Trends Immunol*, 2008. 29(4): p. 150-8.
445. McHugh KJ, W.H., Keenan C, On the suppression of food intake in experimental models of colitis in the rat. *Am J Physiol*, 1999. 264: p. 871-876.

446. Pavlov, V.A. and K.J. Tracey, The vagus nerve and the inflammatory reflex--linking immunity and metabolism. *Nat Rev Endocrinol*, 2012. 8(12): p. 743-54.
447. Howland, R.H., Vagus Nerve Stimulation. *Curr Behav Neurosci Rep*, 2014. 1(2): p. 64-73.
448. Borovikova LV, I.S., Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW & Tracey KJ, Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*, 2000. 405: p. 458-462.
449. Tracey, K.J., The inflammatory reflex. *Nature*, 2002. 420(6917): p. 853-9.
450. Bravo JA, F.P., Chew MV, Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, Bienenstock J, Cryan JF, Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. 108(38): p. 16050-16055
451. Bercik, P., et al., The anxiolytic effect of Bifidobacterium longum NCC3001 involves vagal pathways for gut-brain communication. *Neurogastroenterol Motil*, 2011. 23(12): p. 1132-9.
452. Ait-Belgnaoui, A.C., A. Braniste, V. Ramalho, L. Marrot, A. Cartier, C. Houdeau, E. Theodorou, V. Tompkins, T., Probiotic gut effect prevents the chronic psychological stress-induced brain activity abnormality in mice. *Neurogastroenterol Motil*, 2013.
453. Kunze, W.A.M., Y. K. Wang, B. Huizinga, J. D. Ma, X. Forsythe, P. Bienenstock, J., Lactobacillus reuteri enhances excitability of colonic AH neurons by inhibiting calcium-dependent potassium channel opening. *J Cell Mol Med*, 2009. 13(8B): p. 2261-70.
454. Mao, Y., et al., Intestinal barrier function in patients with acute myocardial infarction and the therapeutic effect of glutamine. *Int J Cardiol*, 2011. 146(3): p. 432-3.

455. Ko, J.S., Yang, H. R., Chang, J. Y. & Seo, J. K. , Lactobacillus plantarum inhibits epithelial barrier dysfunction and interleukin-8 secretion induced by tumor necrosis factor- α . *World J Gastroenterol* 2007. 13: p. 1962–1965.
456. Utech, M., Ivanov, A. I., Samarin, S. N., Bruewer, M., Turner, J. R., Mrsny, R. J., Parkos, C. A. & Nusrat, A, Mechanism of IFN- γ - induced endocytosis of tight junction proteins: myosin II-dependent vacuolarization of the apical plasma membrane. *Mol Biol Cell* 2005. 16: p. 5040–5052.
457. Bruewer, M., Luegering, A., Kucharzik, T., Parkos, C. A., Madara, J. L., Hopkins, A. M. & Nusrat, A, Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J Immunol*, 2003. 171: p. 6164–6172.
458. Marano, C.W., Lewis, S. A., Garulacan, L. A., Soler, A. P. & Mullin, J. M, Tumor necrosis factor- α increases sodium and chloride conductance across the tight junction of CACO-2 BBE, a human intestinal epithelial cell line. *J Membr Biol* 1998. 161: p. 263–274.
459. Yan, F.P., D. B, Probiotic bacterium prevents cytokine- induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem*, 2002. 277: p. 50959–50965.
460. Clevers, H., At the crossroads of inflammation and cancer. *Cells*, 2004. 118: p. 671.
461. L.M. Coussens, Z.W., Inflammation and cancer. *Nature* 2002. 420: p. 860-867.
462. Fujimoto, K., et al., Effect of the central nervous system on mucosal growth and apoptosis in the small intestine. *Digestion*, 2001. 63 Suppl 1: p. 108-11.
463. Fujimoto, K., et al., Homeostasis in the small intestinal mucosa balanced between cell proliferation and apoptosis is regulated partly by the central nervous system. *J Gastroenterol*, 2002. 37 Suppl 14: p. 139-44.

464. Carney, R.M. and K.E. Freedland, Does treating depression improve survival after acute coronary syndrome? Invited commentary on... Effects of antidepressant treatment following myocardial infarction. *Br J Psychiatry*, 2007. 190: p. 467-8.
465. François Lespérance, M., Nancy Frasere-Smith, PhD Diana Koszycki, PhD, et al., Lesperance F 07 Effects of Citalopram and Interpersonal psychotherapy on depression in patients with coronary artery disease. *JAMA*, 2007. 297(4): p. 367-379.
466. BP Wann, S.K., M Boucher, AM Dufort , N Le Marec, R Godbout,G Rousseau, Behavioural signs of depression and apoptosis in the limbic system following myocardial infarction- effects of sertraline. *Journal of psychopharmacology*, 2009. 23(4): p. 451-459.
467. Papakostas, G.I.T., M. E. Fava, M. Nelson, J. C. Shelton, R. C., Are antidepressant drugs that combine serotonergic and noradrenergic mechanisms of action more effective than the selective serotonin reuptake inhibitors in treating major depressive disorder? A meta-analysis of studies of newer agents. *Biol Psychiatry*, 2007. 62(11): p. 1217-27.
468. Jan, C.R., et al., Mechanism of maprotiline-induced apoptosis: role of $[Ca^{2+}]_i$, ERK, JNK and caspase-3 signaling pathways. *Toxicology*, 2013. 304: p. 1-12.
469. Piletz, J.E., et al., Pro-inflammatory biomarkers in depression: treatment with venlafaxine. *World J Biol Psychiatry*, 2009. 10(4): p. 313-23.
470. Tynan, R.J., et al., A comparative examination of the anti-inflammatory effects of SSRI and SNRI antidepressants on LPS stimulated microglia. *Brain Behav Immun*, 2012. 26(3): p. 469-79.
471. Babcock, T.A., Carlin, J.M., Transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in interferon-treated epithelial cells. *Cytokine* 2000. 12: p. 588-594.

472. Robinson, C.M., Shirey, K.A., Carlin, J.M, Synergistic transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J Interferon Cytokine Res*, 2003. 23: p. 413-421.
473. Robinson, C.M., Hale, P.T., Carlin, J.M, NF-kappa B activation contributes to indoleamine dioxygenase transcriptional synergy induced by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Cytokine*, 2006. 35: p. 53-61.
474. Wu HQ, R., SchwarczR, Kynurenic acid leads dopamine follows: A new case of volume transmission in the brain. *J Neural Transmission*, 2007. 114: p. 33-41.
475. Zhu, C.B., R.D. Blakely, and W.A. Hewlett, The proinflammatory cytokines interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha activate serotonin transporters. *Neuropsychopharmacology*, 2006. 31(10): p. 2121-31.
476. Lv, Q., C. Gu, and C. Chen, Venlafaxine protects methylglyoxal-induced apoptosis in the cultured human brain microvascular endothelial cells. *Neurosci Lett*, 2014. 569: p. 99-103.
477. Kamath, J. and V. Handratta, Desvenlafaxine succinate for major depressive disorder: a critical review of the evidence. *Expert Rev Neurother*, 2008. 8(12): p. 1787-97.
478. Perry, R. and M. Cassagnol, Desvenlafaxine: a new serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor for the treatment of adults with major depressive disorder. *Clin Ther*, 2009. 31 Pt 1: p. 1374-404.
479. O'Sullivan, J.B., et al., Noradrenaline reuptake inhibitors limit neuroinflammation in rat cortex following a systemic inflammatory challenge: implications for depression and neurodegeneration. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2009. 12(5): p. 687-99.
480. Lee, J.S., et al., Anti-inflammatory actions of probiotics through activating suppressor of cytokine signaling (SOCS) expression and signaling in *Helicobacter pylori* infection: A novel mechanism. *J Gastroenterol Hepatol*, 2010. 25(1): p. 194-202.

481. Boirivant, M. and W. Strober, The mechanism of action of probiotics. *Curr Opin Gastroenterol*, 2007. 23(6): p. 679-92.
482. Watanabe, T., et al., Probiotic *Lactobacillus casei* strain Shirota prevents indomethacin-induced small intestinal injury: involvement of lactic acid. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009. 297(3): p. G506-13.
483. Bercik, P., et al., Chronic Gastrointestinal Inflammation Induces Anxiety-Like Behavior and Alters Central Nervous System Biochemistry in Mice. *Gastroenterology*, 2010. 139: p. 2102-2112.
484. Dunn, A.J., A.H. Swiergiel, and R. de Beaurepaire, Cytokines as mediators of depression: what can we learn from animal studies? *Neurosci Biobehav Rev*, 2005. 29(4-5): p. 891-909.
485. Cryan, J.F. and A. Holmes, The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov*, 2005. 4(9): p. 775-90.
486. Holsboer, F., Neuroendocrine studies and antidepressant drug development. *Seishin Shinkeigaku Zasshi* 1999. 101: p. 711-716.
487. Cryan, J.F. and C. Mombereau, In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Mol Psychiatry*, 2004. 9(4): p. 326-57.
488. Song, C. and B.E. Leonard, The olfactory bulbectomized rat as a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev*, 2005. 29(4-5): p. 627-47.
489. P, W., Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural- neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*, 2005. 52: p. 90-110.
490. Overstreet DH, F.E., Mathe AA, Yadid G, The Flinders Sensitive Line rat: a selectively bred putative animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev*, 2005. 29: p. 739-59.

491. Shih, H.L., B. Lee, R. J. Boyle, A. J., The aging heart and post-infarction left ventricular remodeling. *J Am Coll Cardiol*, 2011. 57(1): p. 9-17.
492. Hu ZY1, P.X., Liu F, Liu J., Emulsified isoflurane protects rat heart in situ after regional ischemia and reperfusion. *Fundam Clin Pharmacol*, 2014. 28(2): p. 190-198.
493. Abel, E.L., Circannual changes in the duration of the immobility response of rats in the forced swim test. *Physiology Behavior*, 1995. 58(3): p. 591-593.
494. Ma, T.Y., Iwamoto, G. K., Hoa, N. T., Akotia, V., Pedram, A., Boivin, M. A. & Said, H. M, TNF-a-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kB activation. TNF-a-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kB activation, 2004. 286: p. G367–G376.
495. Wang, F., Schwarz, B. T., Graham, W. V., Wang, Y., Su, L., Clayburgh, D. R., Abraham, C. & Turner, J. R, IFN-c-induced TNFR2 expression is required for TNF-dependent intestinal epithelial barrier dysfunction. *Gastroenterology* 2006. 131: p. 1153–1163.

