

ÉCOLE DOCTORALE SST

INSERM U930 – Equipe 4 : Troubles affectifs

THÈSE présentée par :

Elsa ISINGRINI

soutenue le : 01 Juin 2010

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie et de la santé - Neurosciences

**Modélisation de l'impact de la dépression
sur le système cardiovasculaire : utilisation
du modèle de stress chronique imprédictible
chez la souris**

THÈSE dirigée par :
Mr CAMUS Vincent

PU-PH, université François - Rabelais

RAPPORTEURS :
Mr VANDEL Pierre
Mr GARDIER Alain

PU-PH, CHU de besançon
Professeur, université Paris-Sud

JURY :

Me AGIN Véronique
Me BELZUNG Catherine
Mr GARDIER Alain
Mr MATCHKOV Vladimir
Mr SIBILLE Etienne
Mr VANDEL Pierre

Maître de conférences, université de Caen Basse - Normandie
Professeur, université François - Rabelais
Professeur, université Paris-Sud
Associate professor, Aarhus University
Associate professor, University of Pittsburgh
PU-PH, CHU de besançon

Remerciements

En sa qualité de directeur de thèse, je tiens à remercier le Pr Vincent Camus pour m'avoir permis de travailler sur son projet de recherche. A travers une totale confiance, il m'a donné la liberté nécessaire à l'accomplissement de mes travaux tout en y gardant un œil critique. Son enthousiasme au regard de mes idées et suggestions mais également face aux résultats obtenus m'a donné la motivation et la persévérance nécessaires à la réalisation de mon travail.

Je tiens tout particulièrement à remercier le Pr Catherine Belzung qui, malgré l'absence de titre officiel, s'est énormément impliquée dans mon travail. Sa présence et sa confiance ont été pour moi d'un grand soutien au cours de ces trois années, elle a su me guider dans mes idées et mes doutes à travers ses conseils toujours pertinents.

Je tiens également à remercier tous les membres du jury : les Drs. Pierre Vandiel et Alain Gardier qui me font l'honneur d'être rapporteurs de ce travail, ainsi que le Dr Etienne Sybille, le Dr Véronique Agin, le Dr Vladimir Matchkov pour le temps et l'attention qu'ils vont accordés à mon travail.

Au cours de ces trois années, j'ai eu le plaisir de collaborer avec le Dr Alexandre d'Audiffret qui m'a accueillie dans sa famille et dans son laboratoire ce qui a permis d'orienter mes travaux. Le Pr Jean-Louis Freslon qui m'a intégrée dans son équipe et m'a formée à la technique de réactivité vasculaire ainsi que le Dr Marie-Christine Machet qui a participé activement à la réalisation des expériences d'histologie. Je les remercie tous également pour l'attention qu'ils m'ont accordée.

Je remercie tous les membres du laboratoire pour leur accueil. Particulièrement Dominique Le Glaunec, Anne-Marie Le Guisquet, Séverine Devers, Maryse Paingaud et Bruno Brizard pour leur disponibilité et la participation (administrative, technique, et amicale) qu'ils ont apportés à mon travail. Merci à tous les doctorants et stagiaires qui ont croisé ma route au cours de ces années, pour leur bonne humeur et tous les bons moments partagés mais également le soutien et les conseils qu'ils m'ont apportés : Anthony, Mathieu, Julien, Marlène, Charline, Alexandre, Yadira, Khalid, et bien sûr Arnaud pour avoir pris le temps de lire ce manuscrit, sans oublier Petra pour sa positive attitude et son aide précieuse en anglais. Et merci à tous les autres que je n'ai pas encore cités, Samuel Leman, Frédéric Minier,

Boriana Atanasova et Pascal Barone sans qui le quotidien au laboratoire ne serait pas le même et ainsi qu'à toute l'équipe de psychiatres. Enfin, je remercie également tous les stagiaires qui ont participé et ont été d'une aide précieuse à la réalisation des manipulations.

Bien sûr, je remercie ma famille, mes parents (sans qui rien n'aurait été possible), Mathias, Thomas, Laure, Romane et Carmen pour leur présence, leur soutien, leur patience et surtout leur amour. Merci à mes amis qui m'ont accompagnée pendant toutes ces années et ont amené un peu de légèreté dans ma vie de doctorante. Globalement, je tiens à remercier toutes les personnes que j'ai côtoyées, ou tout simplement croisées durant cette période, et qui ont contribué à transformer ce challenge professionnel en une expérience qui restera positive et inoubliable.

Résumé

La dépression représente la seconde cause d'invalidité mondiale juste après les maladies cardiovasculaires. De façon intéressante, ces deux pathologies présentent une forte comorbidité. De nombreuses études d'épidémiologie clinique ont démontré que la dépression représente un facteur de risque de développement de maladies cardiaques chez des sujets sans antécédents de pathologies cardiovasculaires. Cependant, bien que certaines études considèrent la dépression comme un facteur de risque vasculaire indépendant, elle est également considérée comme pouvant augmenter le risque de développement d'athérosclérose par ses effets sur d'autres facteurs de risque comme le diabète, l'obésité et l'hypertension. Les mécanismes physiopathologiques à la base de la comorbidité entre la dépression et les maladies cardiovasculaires demeurant méconnus, le traitement des patients présentant cette comorbidité est rendu difficile. Les processus physiopathologiques mis en jeu semblent multiples et complexes : des déséquilibres centraux incluant les monoamines, l'axe du stress (HPA) et le système nerveux autonome (SNA) mais également des altérations de la paroi vasculaire représentatif d'un dysfonctionnement endothélial et plaquettaire et de processus inflammatoire. Par ailleurs, alors que certains traitements antidépresseurs présentent des effets cardiovasculaires indésirables, la réponse aux antidépresseurs est altérée par la présence de troubles cardiovasculaires.

Compte tenu de la charge que ces deux maladies, cardiaque et dépressive, représentent en terme de santé publique, le recours à l'expérimentation animale paraît nécessaire pour améliorer notre compréhension des mécanismes reliant ces deux pathologies. **Notre objectif est de développer des modèles animaux capables de reproduire 1) les perturbations vasculaires observées chez les patients dépressifs afin d'étudier les effets d'un traitement antidépresseur et 2) la résistance aux traitements antidépresseurs observée chez les patients dépressifs souffrant de troubles cardiovasculaires.** Dans ce but, nous avons utilisé le Stress Chronique Léger Imprédictible (UCMS) chez la souris, un modèle animal de dépression capable de reproduire le rôle des stress socio-environnementaux dans l'apparition d'un épisode dépressif, d'induire un pattern d'altérations évoquant les symptômes de la dépression et enfin de restituer le délai de la réponse thérapeutique des antidépresseurs.

Les patients dépressifs présentent de multiples altérations de la fonction endothéliale impliquées dans la pathophysiologie de l'athérosclérose dont témoignent une diminution de la réponse vasodilatatrice dépendante de l'endothélium associée à une diminution de l'activité

de l'eNOS (Endothelial nitric oxide synthase), une augmentation d'un grand nombre de biomarqueurs endothéliaux et plaquettaires circulants tels que certaines molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1), des protéases (MMP) et des facteurs de coagulation (tPA, PAI-1). Dans un premier temps, nous avons étudié les conséquences de l'UCMS en tant que facteur de risque indépendant sur la fonction endothéliale (expression des marqueurs ICMA-1, VCAM-1, MMP-9 et PAI-1 et fonction vasodilatatrice) et la formation d'athérosclérose ainsi que le profil temporel d'apparition de ces altérations vasculaires. Les résultats ont montré que l'UCMS n'entraînait pas de modifications immédiates de l'expression des différents marqueurs évalués mais augmentait l'expression tardive du PAI-1 indiquant des anomalies tardives de la fibrinolyse. Alors qu'un épisode d'UCMS est capable d'altérer l'expression de ce marqueur au cours du vieillissement, le traitement à la fluoxétine n'a pas d'effet (**Article 1**). Par ailleurs, l'UCMS a induit des altérations à court terme de la fonction vasodilatatrice de l'endothélium dépendant du NO (**Article 2**) qui persistent au cours de la répétition des épisodes d'UCMS. Cependant, ces altérations de la fonction endothéliale reversées par un traitement chronique à la fluoxétine ne sont pas suffisantes pour induire la formation d'athérosclérose (**Article 3**). Alors que la dépression est considérée comme un facteur de risque cardiovasculaire indépendant, dans notre modèle, ces différentes études indiquent que l'UCMS peut être considéré comme un facteur indépendant pour la formation de lésions physiologiques puisqu'il reproduit les différentes altérations de la fonction endothéliale observées chez les patients dépressifs ; cependant, ces altérations ne sont pas suffisantes pour induire la formation de lésions morphologiques de type athérosclérose.

Dans une seconde partie, dans le but de développer un modèle animal de résistance aux AD induite par la présence de risques cardiovasculaires, nous avons couplé l'UCMS à un régime alimentaire riche en lipide capable d'induire une hypercholestérolémie et de l'athérosclérose. A travers plusieurs dimensions comportementales, les résultats ont montré que la présence d'un facteur de risque cardiovasculaire, un régime alimentaire riche en lipide est capable d'abolir les effets de la fluoxétine sur les conséquences comportementales de l'UCMS. En effet, alors que la fluoxétine est capable de reverser l'état « dépressif-like » induit par l'UCMS chez des animaux soumis à un régime alimentaire standard, la fluoxétine n'a pas d'effet chez des animaux soumis à un régime alimentaire saturés en graisse (**Article 4**). Cette étude nous a donc permis de modéliser la résistance aux ADs observées chez les patients dépressifs présentant des facteurs de risque cardiovasculaire.

Mots clés : dépression, antidépresseurs, maladies cardiovasculaires, fonction endothélial, athérosclérose, modèle animal, stress chronique.

Résumé en anglais

Depression and vascular disease are among the two most prevalent health problems in the world today. Although these diseases commonly coexist, several epidemiologic studies show depression to be an independent risk factor for the development of vascular disease in healthy patients and to increase morbidity and mortality in patients with pre-existing coronary artery disease. However, patients with depressive disorders often have multiple confounding risks factors, although the specific role played by depression on the development of cardiovascular disease is difficult to define. The underlying pathophysiological mechanisms responsible of this comorbidity remain essentially unexplored, resulting in difficulties in the treatment of these patients. Several hypotheses have been proposed, including alteration of the monoamines, the hypothalamo-hypophyso-pituitary axis (HPA) and the autonomic nervous system (ANS) and also alteration of the vascular bed with endothelial and platelet dysfunction and inflammatory processes. Moreover, although most antidepressants have cardiovascular side effects, the antidepressant response is altered by cardiovascular alterations.

As a result, it is particularly attractive to use an animal model to further study the mechanisms responsible for the association between cardiovascular disease and depression. The main objective is to develop an animal model able to reproduce 1) the vascular alterations observed in depressed subjects and evaluate antidepressant effects and 2) the antidepressant resistance observed in depressed subjects suffering from cardiovascular risk factors. We used the unpredictable chronic mild stress in mice, an animal model of depression capable of reproducing the implications of socio-environmental stressor in the etiology of depression, inducing alterations mimicking symptoms of depression and respecting the therapeutic delay in effect of antidepressants.

Depressed patients expose multiple alterations of the endothelial function implicated in the pathophysiology of atherosclerosis including an alteration of the endothelium dependent vasodilatation associated with decreased eNOS (Endothelial nitric oxide synthase) activity and an increase of multiple endothelial and platelet bio-markers such as adhesion molecule (ICAM-1, VCAM-1), proteases (MMP) and coagulations factors (tPA, PAI-1). In the first set of experiments, we studied the UCMS effect as an independent cardiovascular risk factor on the endothelial function (markers expression ICMA-1, VCAM-1, MMP-9 and PAI-1 and the endothelium- and NO-dependent vasodilatation) and on atherosclerosis formation as well as the temporal profile of appearance of these vascular changes. Results indicate that UCMS does not

modify the early expression of the markers but increases the late-onset expression of PAI-1 suggesting late-onset alteration of fibrinolysis. Although UCMS procedure is able to alter the markers expression with ageing, fluoxetine treatment has no effect (**Article 1**). Moreover, UCMS induces short term alterations of the NO-dependent vasodilatation (**Article 2**) which persists with the repetition of the UCMS procedure. However, UCMS-induced endothelial dysfunction reversed by fluoxetine treatment is insufficient to induce atherosclerosis formation (**Article 3**). While depression is considered as independent cardiovascular risk factor, in our model, these different studies indicate that UCMS can be considered as an independent risk factor for the formation of physiological lesions since UCMS reproduced the endothelial dysfunction observed in depressed subjects; however, these alterations were not sufficient to induce morphological lesions such as atherosclerosis.

In a second set of experiments, in order to develop an animal model of antidepressant resistance induced by cardiovascular risk factors, the UCMS procedure was coupled to a high fat diet regimen, a cardiovascular risk factor able to induce hypercholesterolemia and atherosclerosis. Through multiple behavioural paradigms, we demonstrate that a high fat diet prevents chronic fluoxetine treatment from reversing UCMS-induced depression-like phenotype. Indeed, while fluoxetine is able to reverse UCMS-induced depression like behaviour in mice submitted to a regular diet, fluoxetine has no effect in mice subjected to a high fat diet (**Article 4**). By mimicking clinical data our results consequently allow us to suggest that the combination of UCMS with a high fat diet can be used as an animal model of resistance to antidepressant drugs.

Key words: depression, antidepressant, cardiovascular disease, endothelial function, atherosclerosis, animal model, chronic stress.

Liste des publications

DEPRESSIVE BEHAVIOR AND VASCULAR DYSFUNCTION: A LINK BETWEEN CLINICAL DEPRESSION AND VASCULAR DISEASE?

d'Audiffret AC, Frisbee SJ, Stapleton PA, Goodwill AG, Isingrini E, Frisbee JC.
J Appl Physiol. 2010 Feb 18.

Endothelial dysfunction: A potential therapeutic target for geriatric depression and brain amyloid deposition in Alzheimer's disease?

Isingrini E, Desmidt T, Belzung C, Camus V.
Curr Opin Investig Drugs. 2009 Jan;10(1):46-55.

Cocaine-induced reinstatement in rats: evidence for a critical role of cocaine stimulus properties.

Keiflin R, Isingrini E, Cador M.
Psychopharmacology (Berl). 2008 May;197(4):649-60.

Table des matières

Remerciements	3
Résumé	5
Résumé en anglais	7
Liste des publications	9
Table des matières	10
Liste des tableaux	13
Liste des figures	14
Liste des annexes.....	17
AVANT PROPOS	18
INTRODUCTION	22
Dépression et maladies cardiovasculaires : lien bidirectionnel	26
1/ PREVALENCE DE LA DEPRESSION CHEZ LES PATIENTS SOUFFRANT DE PATHOLOGIES VASCULAIRES	26
1.1 Dépression post accident vasculaire cardiaque	26
1.2 Dépression post accident vasculaire cérébral	28
2/ LA DEPRESSION PREDISPOSE A LA MORTALITE ET LA MORBIDITE VASCULAIRE.....	29
2.1 Chez des patients avec des troubles cardiovasculaires établis	29
2.2 Chez des patients sans antécédents de pathologies cardiovasculaires	31
3/ LE CONCEPT DE DEPRESSION VASCULAIRE	33
3.1 Phénotype de la dépression gériatrique à début tardif.....	33
3.2 Contribution de la neuroimagerie.....	34
3.3 Vers un diagnostique de la « dépression vasculaire »	35
Les hypothèses physiopathologiques du lien entre la dépression et les maladies cardiovasculaires	36
1/ MECANISMES ETIOPATHOLOGIQUES COMMUNS	36
1.1 Facteur étiologique de la dépression : le stress	36
1.2 Facteurs de risques cardiovasculaires	41
2/ PHYSIOPATHOLOGIE DE LA DEPRESSION ET SES LIENS AVEC LA PATHOLOGIE VASCULAIRE.....	48
2.1 L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA).....	48
2.2 Le système nerveux autonome (SNA)	56
2.3 Les systèmes de neurotransmissions monoaminergiques centraux.....	60
2.4 Angiogenèse et neurogenèse	65
3/ PHYSIOPATHOLOGIE DE LA PAROI VASCULAIRE ET SES LIENS AVEC LA DEPRESSION.....	71
3.1 La fonction endothéliale.....	71
3.2 Fonction plaquettaire et hémostase	75
3.3 Inflammation et immunité.....	79
Les implications thérapeutiques du lien entre la dépression et les maladies cardiovasculaires	83
1/ IMPACT DES TRAITEMENTS AD SUR LE SYSTEME CARDIOVASCULAIRE.....	83
1.1 Les antidépresseurs tricycliques (TCA)	83
1.2 Les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (SSRI)	85
1.3 Les médicaments cardiaques.....	86

2/ AMELIORATION DES SYMPTÔMES DEPRESSIFS CHEZ LES PATIENTS SOUFFRANTS DE PATHOLOGIES VASCULAIRES	86
2.1 Evénements cardiaques et résistance aux antidépresseurs	88
2.2 Facteurs de risques cardiovasculaires et résistance aux antidépresseurs	89
3/ AMELIORATION DU PRONOSTIC CARDIAQUE	90
Vers une modélisation des liens entre la dépression et les maladies cardiovasculaires ...	92
1/ INTERET D'UNE APPROCHE PRECLINIQUE	92
1.1 Direction de l'interaction entre la dépression et les maladies cardiovasculaires	92
1.2 Le grand nombre d'hypothèses physiopathologiques	93
1.3 Les limites thérapeutiques des traitements	94
2/ MODELISATION DE LA DEPRESSION MAJEURE	95
2.1 Les critères de validation d'un modèle animal	95
2.2 Tests des phénotypes de la dépression	98
2.3 Les modèles de dépression	102
3/ ETUDES PRECLINIQUES DES LIENS ENTRE LA DEPRESSION ET LES MALADIES VASCULAIRES	107
OBJECTIFS	111
RESULTATS	115
Modélisation des conséquences cardiovasculaires de la dépression	116
ARTICLE 1 : EARLY AND LATE-ONSET EFFECT OF CHRONIC STRESS ON VASCULAR FUNCTION IN MICE : A POSSIBLE MODEL OF THE IMPACT OF DEPRESSION ON VASCULAR DISEASE IN AGEING.	119
ARTICLE 2 : ALTERED AORTIC VASCULAR REACTIVITY IN THE UNPREDICTABLE CHRONIC MILD STRESS MODEL OF DEPRESSION IN MICE	143
ARTICLE 3 : ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN A RODENT MODEL OF DEPRESSION MAY UNDERLIE ATHEROSCLEROSIS	159
Résistance aux AD en situation de challenge cardiovasculaire	182
ARTICLE 4 : ASSOCIATION BETWEEN REPEATED UNPREDICTABLE CHRONIC MILD STRESS (UCMS) WITH HIGH FAT DIET : A MODEL OF FLUOXETINE RESISTANCE IN MICE	184
DISCUSSION	204
L'UCMS en tant que modèle de dépression	207
1/ VALIDATION DU MODELE UCMS	207
1.1 Validation du modèle	207
1.2 Différents profils d'altérations	209
1.3 Aspect récurrent de la dépression	210
2/ ETAT DE STRESS OU DEPRESSIF-LIKE	211
2.1 Conséquences cardiovasculaires du stress	211
2.2 Profil psychosocial responsable des altérations cardiovasculaires de la dépression	212
2.3 Mécanismes adaptatifs ou pathologiques	213
L'UCMS en tant que facteur de risque cardiovasculaire	215
1/ ROLE CENTRAL DE LA FONCTION ENDOTHELIALE DANS L'HOMEOSTASIE VASCULAIRE	215
2/ LES ALTERATIONS DE LA FONCTION ENDOTHELIALE DANS L'UCMS	217
2.1 L'expression des marqueurs endothéliaux	217
2.2 La réactivité vasculaire	222

3/ LES ALTERATIONS MORPHOLOGIQUES DANS L'UCMS.....	227
Les altérations cardiovasculaires dans l'UCMS.....	230
1/ MARQUEURS DE TRAIT OU D'ETAT.....	230
1.1 Pourquoi la fluoxétine ?	230
1.2 Amélioration du pronostic vasculaire par la fluoxétine dans l'UCMS	231
1.3 Effets vasculaires de la fluoxétine indépendant de l'état dépressif dans l'UCMS...	232
2/ FACTEUR D'INDUCTION DE RESISTANCE AUX AD.....	233
2.1 Hypercholestérolémie et résistance aux AD	233
2.2 Association de l'UCMS avec un régime lipidique : modèle de résistance à la fluoxétine.....	234
2.3 Les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la résistance aux AD	235
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	236
BIBLIOGRAPHIE	241
ANNEXES.....	279
Annexe 1	
Endothelial dysfunction: A potential therapeutic target for geriatric depression and brain amyloid deposition in Alzheimer's disease?.....	280
Annexe 2	
Depressive behavior and vascular dysfunction: a link between clinical depression and vascular disease?	291
Résumé.....	325
Résumé en anglais.....	325

Liste des tableaux

Table 1: Caractéristiques des études cliniques sur la relation entre la dépression et les maladies cardiovasculaires. D'après Rudisch & Nemeroff, 2003 [51].	27
Table 2: Facteurs angiogéniques affectant le système nerveux. Ang-1, angiopoietin-1; FGF, fibroblast growth factor; IGF, insulin-like growth factor; VEGF, vascular endothelial growth factor. D'après Lee et al, 2009 [336].	66
Table 3: Facteurs neurogéniques affectant le système vasculaire. BDNF, brain-derived neurotrophic factor; NGF, nerve growth factor; NT, neurotrophins; SEMA, semaphorin. D'après Lee et al, 2009 [336].	67
Table 4: Conditions associées à un dysfonctionnement endothélial, stratégies pour contrecarrer un dysfonctionnement endothélial et marqueurs solubles d'un dysfonctionnement endothélial. D'après Verma et al, 2002 [397].	74
Table 5: Antidépresseurs généralement utilisés, dosages, effets secondaires généraux et cardiovasculaires. D'après Shah et al, 2004 [434].	85
Table 6: Interaction entre médication cardiaque et psychotrope : interaction impliquant les antidépresseurs tricycliques et sérotoninergiques. D'après Shah et al, 2004 [434].	86
Table 7: Correlation entre les conséquences du traitement (réponse et remission) et les facteurs de risque cardiovasculaire ^a . D'après Iosifescu et al, 2005 [474].	90
Table 8: Le stress chronique modéré (CMS) induit des modifications comportementales, physiologiques et biochimiques reliées aux maladies cardiovasculaires et à la dépression. D'après Johnson & Grippo, 2006 [36].	108

Liste des figures

Figure 1: mortalité cardiovasculaire associée à la dépression suite à un infarctus du myocarde. Résultat de Frazure-Smith et al, 1993 et de Frazure-Smith et al, 1995 [25, 26]. Résultats de Lesperance et al, 2002 [29].	30
Figure 2: Le risque de mortalité due à une maladie cardiovasculaire, un infarctus du myocarde, une insuffisance coronarienne ou une angine de poitrine pour les facteurs de risque cardiovasculaire traditionnels proviennent de l'étude Framingham. D'après Rozanski et al, 2005 [87].	33
Figure 3: La réponse au stress et le développement de la charge allostatique. D'après Mc Ewen et al, 1998 [129].	39
Figure 4: Les composantes de la réponse au stress. D'après S Vale, 2004 [1].	41
Figure 5 : Fonctionnement de l'axe HPA. Modifié d'après Nestler et al, 2002 [3].	50
Figure 6: L'axe HPA dans la dépression. D'après Belmaker & Agam, 2008 [259].	52
Figure 7: Effets des glucocorticoïdes sur les facteurs de risques cardiovasculaires. D'après Girod & Brotman, 2004 [263].	54
Figure 8: Résumé des innervations neuronales autonomiques des systèmes nerveux sympathique (A) et parasympathique (B). Figure adaptée de <i>Gray's Anatomy</i> 31st Edition 1954, et de Cannon and Rosenblueth <i>Physiology of the Autonomic Nervous System</i> , 1937.	58
Figure 9: Hypothèse de la déplétion monoaminergique dans la dépression. D'après Belmaker et Agam, 2008 [259].	63
Figure 10: Communication cellulaire dans l'interface neurovasculaire. D'après Lee et al, 2009 [336].	68
Figure 11: Le rôle de l'endothélium dans le maintien de l'homéostasie vasculaire. D'après Verma & Anderson (2002) [397].	73

Figure 12: Formation et lyse d'un caillot sanguin riche en fibrinogène. D'après Mackman, 2005 [410].	77
Figure 13: Recrutement et activation des macrophages dans la formation d'athérome. D'après Hansson et al, 2006 [4].	80
Figure 14: Les différentes phases du traitement de la dépression. D'après Kupfer, 1991 [469].	87
Figure 15: Relation entre les modifications au score de dépression et le risque de mortalité reporté dans l'étude ENRICHD (Enhanced Recovery in Coronary Heart Disease). D'après Carney & Freedland, 2009 [2].	89
Figure 16: Trois hypothèses non exclusives pour expliquer la co-morbidité entre la dépression et les maladies cardiovasculaires. D'après Johnson & Grippo, 2006 [36].	93
Figure 17: Modèle physiopathologique des mécanismes dont l'implication a été proposée pour expliquer la relation entre la dépression et les maladies cardiovasculaires.	94
Figure 18: Représentation schématique des hypothèses sur la relation entre les variables mesurées chez le primate non humain dans le modèle de subordination sociale, entre la dépression et la formation d'athérosclérose. D'après Shively et al, 2009 [557].	109
Figure 19: Résultats (moyenne +/- SEM) de la latence à renifler et à croquer la boulette de nourriture dans le test du NSF (novelty suppressed feeding test) chez des souris de la souche BDA/2j soumises ou non à 7 semaines de stress chronique imprédictible (unpredictable chronic mild stress, UCMS) et recevant soit un traitement à la fluoxétine (10 mg/kg, i.p.) soit des injections de NaCl (9%, i.p.) au cours des 5 dernières semaines du protocole.	210
Figure 20: Stress, inflammation et athérosclérose. D'après Black et al, 2002 [138].	212
Figure 21: A travers un grand nombre de médiateurs, les cellules endothéliales exercent des fonctions autocrine, paracrine et endocrine et influencent les fonctions cellulaires des plaquettes, des cellules musculaires lisses et des leucocytes. D'après Galley et al, 2004 [575].	216
Figure 22: Modèle hypothétique d'athérogenèse. D'après Gawaz et al, 2005 [411].	219

Figure 23: Interaction entre le système du tPA-plasminogène et le BDNF. D'après Tsai SJ, 2007 [608].	221
Figure 24: Génération des espèces réactives de l'oxygène (ROS). D'après Fortuno et al, 2005 [609].	223
Figure 25: Signalisation de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS). D'après behrendt et al, 2002 [393].	224
Figure 26: Les principaux candidats en tant que mécanisme EDHF. D'après Luksha et al, 2009 [623].	227

Liste des annexes

Annexe 1

Endothelial dysfunction: A potential therapeutic target for geriatric depression and brain amyloid deposition in Alzheimer's disease?..... 280

Annexe 2

Depressive behavior and vascular dysfunction: a link between clinical depression and vascular disease?..... 291

AVANT PROPOS

Dans les pays développés, la dépression majeure représente la seconde cause de mortalité et d'incapacité juste après les maladies cardiaques et coronariennes. De façon intéressante, ces deux pathologies présentent une forte comorbidité. De nombreuses études ont en effet mis en évidence une augmentation du taux de dépression suites à un infarctus du myocarde ou d'un accident vasculaire cérébral. D'autre part, un certain nombre d'études épidémiologiques, ont montré que la dépression est fortement associée à une augmentation accrue du risque de morbidité et de mortalité par maladies cardiovasculaires à la fois chez des patients présentant des troubles cardiovasculaires établies et chez des patients sans antécédents de pathologies cardiovasculaires. Plus spécifiquement, la dépression a été considérée comme un facteur de risque cardiovasculaire indépendant. La fréquence de l'association entre dépression et les maladies cardiovasculaires a des conséquences thérapeutiques majeures : d'une part certains antidépresseurs ont des effets indésirables cardio-vasculaires, par ailleurs, la réponse aux traitements antidépresseurs est fréquemment altérée chez les patients dépressifs présentant des troubles cardiovasculaires.

Bien que ces deux pathologies soient épidémiologiquement liées, les mécanismes physiopathologiques à la base de cette interaction restent à élucider. Plusieurs hypothèses ont tout de même été proposées impliquant à la fois les facteurs étiologiques de ces deux pathologies, et en particulier des mécanismes périphériques et centraux impliqués à la fois dans la dépression et les maladies cardiovasculaires. Parmi les facteurs étiologiques, le stress, aujourd'hui considéré comme le facteur environnemental majeur pouvant précipiter un épisode dépressif, contribue aux développements de maladies cardiovasculaires et aux facteurs de risque associés. Les facteurs de risques cardiovasculaires traditionnels incluant les facteurs physiologiques tels que le diabète, l'obésité, l'hypertension et l'hypercholestérolémie ainsi que les facteurs comportementaux tels que le tabac et l'alcool, l'inactivité physique et l'alimentation sont également associés à la dépression. De plus, la dépression affecte le système nerveux autonome, l'axe HPA et l'homéostasie hormonale, dont les conséquences impliquent des anomalies métaboliques, inflammatoires, des perturbations hémostatiques, une augmentation du stress oxydatif et un dysfonctionnement endothélial. Toutes ces caractéristiques pathologiques conduisent aux développements d'athérosclérose, d'athéromatose et d'événements cardiaques.

L'interaction entre la dépression et les maladies cardiovasculaires semble complexe du fait 1) de la bidirectionnalité du lien entre ces deux pathologies, 2) du manque de compréhension concernant les mécanismes physiopathologiques sous jacents et 3) des limites thérapeutiques pour la prise en charge de ces patients. La validation du lien entre la

dépression et les pathologies cardiovasculaires a principalement émergé d'études cliniques et épidémiologiques alors que très peu d'études ont tenté de l'explorer à travers l'utilisation de modèles animaux. Cependant, l'étude de la comorbidité entre la dépression et les maladies cardiovasculaires à travers une approche préclinique semble particulièrement intéressante. En s'affranchissant des facteurs de confusions multiples, une telle approche permettrait de tester de façon indépendante les différentes hypothèses sur la direction du lien et sur les mécanismes d'interaction impliqués dans le but d'améliorer la prise en charge des patients souffrant de cette comorbidité.

L'objectif de ce travail de thèse est d'étudier le lien entre la dépression et les maladies cardiovasculaires à travers l'utilisation d'un modèle animal. Nous avons choisi d'utiliser le modèle de stress chronique léger imprédictible (unpredictable chronic mild stress, UCMS) chez la souris, un modèle de dépression qui présente l'avantage de reproduire le rôle des stress socio-environnementaux dans l'apparition des troubles dépressifs. Nous avons dans un premier temps utilisé l'UCMS en tant que facteur de risque cardiovasculaire dans le but d'évaluer les conséquences cardiovasculaires de la dépression et d'un traitement antidépresseur. Nous nous sommes particulièrement intéressés à la fonction endothéliale, qui joue un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie vasculaire et dans le développement de l'athérosclérose. Le délai d'apparition des lésions vasculaires a également été testé via l'étude des conséquences à court et à long terme de l'UCMS sur la paroi vasculaire ainsi que les conséquences de la répétition des épisodes d'UCMS. Nous avons par la suite examiné l'efficacité thérapeutique d'un traitement antidépresseur en présence d'un facteur de risque cardiovasculaire. Dans ce but, le modèle UCMS a été couplé à un régime alimentaire riche en lipides capable d'induire une hypercholestérolémie et de l'athérosclérose.

Dans ce mémoire, avant de présenter les travaux réalisés au cours de ce travail de thèse, la partie d'introduction replace notre problématique dans l'ensemble des connaissances actuelles sur la relation entre la dépression et les maladies cardiovasculaires (présentation des principales études cliniques et épidémiologiques, des différentes hypothèses physiopathologiques et des implications thérapeutiques). Avant la présentation générale des objectifs, un grand nombre d'arguments en faveur de l'utilisation d'une approche préclinique sont exposés. Faisant suite à l'introduction, la présentation de nos données expérimentales est divisée en deux grandes parties et exposées à travers les différents articles produits lors de cette thèse. Dans la première partie, via l'utilisation du modèle UCMS, nous avons tenté de créer un modèle animal capable de reproduire les altérations cardiovasculaires observées chez les patients dépressifs et d'examiner les effets d'un antidépresseur. Dans la seconde partie

nous avons tenté de créer un modèle animal capable de reproduire la résistance aux antidépresseurs observée chez les patients dépressifs présentant des troubles cardiovasculaires. Cette partie résultat est suivie d'une discussion générale sur la validation du modèle UCMS en tant que modèle de dépression mais également en tant que facteur de risque cardiovasculaire. Cette discussion se termine sur l'implication thérapeutique des altérations cardiovasculaires observées dans le modèles UCMS. Finalement, les résultats expérimentaux de ce travail sont discutés en fonction des perspectives qu'ils ouvrent pour de futurs travaux de recherche.

INTRODUCTION

La dépression est définie selon le *Dictionnaire de Médecine de Flammarion* (1998) comme « un état psychique associant une modification pénible de l'humeur et un ralentissement de l'activité intellectuelle et motrice ». Cette définition, insuffisante, laisse présager d'un trouble bénin et peu invalidant alors que la dépression représente la seconde cause d'invalidité mondiale juste derrière les maladies coronariennes du cœur [5]. Des études de projections jusqu'en 2030 montrent que le pronostic de ces deux pathologies va aller vers une péjoration [6, 7]. La dépression est une maladie psychiatrique extrêmement répandue que le DSM-IV (Diagnosis and Statistical Manual of mental disorder). décrit comme se caractérisant par plusieurs modifications importantes de l'humeur et par des altérations psychophysiologiques dont la prégnance relative est très variable d'un patient à l'autre : un état dysphorique (humeur dépressive), une diminution de l'intérêt et du plaisir (anhédonie), une perte ou un gain de poids ou d'appétit, une insomnie ou une hypersomnie, une agitation ou un ralentissement psychomoteur, un sentiment de dévalorisation ou une culpabilité excessive, des troubles de la concentration et des pensées morbides ou suicidaires récurrentes. Selon le DSM-IV, le diagnostic de dépression majeure est établi par la présence d'au moins cinq de ces symptômes parmi lesquels doit figurer au moins un état dysphorique ou une anhédonie. De plus, il convient d'ajouter à cette liste de nombreux symptômes associés, plus ou moins liés aux précédents et de fréquence variable, tels que l'anxiété, le retrait social, la perte motivationnelle, des troubles cognitifs, la perturbation de l'activité sexuelle... Une durée de la symptomatologie de plus de deux semaines est requise pour que puisse être retenu le diagnostic d'épisode dépressif majeur. Des échelles permettant d'évaluer l'intensité du syndrome dépressif sont couramment utilisées lors d'essais thérapeutiques telles que les échelles d'Hamilton, de Beck ou de Montgomery et Asberg [8].

La dépression majeure affecte approximativement entre 8% et 12% des hommes et entre 15% et 20% des femmes [9, 10]. Selon une étude du CREDES publiée en 1999, le taux de dépressifs dans la population française est de 14,9%, dont près d'un tiers n'est pas pris en charge médicalement. Sa prévalence a été multipliée par 6 depuis 1970. La dépression majeure est une pathologie sévère et grave qui revêt un aspect récurrent sur toute la vie pour plus de 75% des patients, en général caractérisé par une succession de phases de rémission et de rechute [11]. Les patients rétablis à la suite d'un premier épisode dépressif présentent un risque de récurrence dans les 6 mois évalué à 50% en cas d'arrêt du traitement [12]. Plus grave, il a été établi qu'en l'absence de traitement 15% des patients succombent à la suite d'un suicide et qu'entre 60% et 80% des suicides (entre 10000 et 15000 par an en France) sont le fait d'individus porteurs d'un diagnostic de dépression [13]. En plus de causer une grande

détresse psychologique, la dépression majeure affecte également un nombre conséquent de processus biologiques perturbant diverses fonctions telles que le sommeil, l'appétit, le métabolisme, le système nerveux autonome et le système neuro-endocrinien [11, 14, 15]. Ces altérations peuvent contribuer à l'apparition de différents troubles organiques et systémiques tels qu'une ostéoporose précoce [16] et être responsable d'un accroissement du taux de mortalité indépendamment du suicide, du tabagisme ou de l'alcoolisme [17, 18]. C'est l'impact sur le système cardio-vasculaire qui est le plus documenté [17-21].

Ainsi, les sujets souffrant d'une pathologie dépressive présentent un taux 2 à 4 fois plus élevé de développer des maladies cardiovasculaires [16, 17, 20, 22-24] et un taux de mortalité 2 à 4 fois supérieur à celui de la population générale après avoir expérimenté un événement cardiaque [25-29]. Il est donc actuellement reconnu que la dépression peut prédire l'apparition d'événements cardiovasculaires chez des individus sains aussi bien que diminuer le pronostic de ceux qui souffrent de troubles cardiovasculaires établis [30-33]. Malgré l'évidence de ce que la dépression et les maladies cardiovasculaires sont épidémiologiquement liées, les mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent cette association restent mal compris. Pourtant une meilleure compréhension de ces facteurs pourrait avoir un impact significatif en terme pronostic ou thérapeutique. Par exemple, la dépression est associée à un grand nombre de facteurs de risque cardiovasculaire incluant des facteurs comportementaux tels que la non-compliance aux traitements médicaux ou le tabagisme mais également des facteurs physiologiques tels que le diabète et l'hypertension. Le stress peut également représenter un mécanisme sous-jacent au développement à la fois de la dépression et de maladies cardiovasculaires. La dépression est également associée à des modifications physiologiques incluant des perturbations du système nerveux autonome (SNA) et de l'axe hypothalamo-hypophyso-surénalien (HPA) mais également une inflammation systémique et une hypercoagulabilité qui influencent de façon négative le système cardiovasculaire [34-37]. De plus, à cause des risques cardiovasculaires adverses associés à la dépression, les praticiens doivent être très prudents dans le choix du traitement chez les patients présentant une comorbidité dépressive et cardiovasculaire. En effets, certaines médications antidépressantes et notamment les AD tricycliques (TCA) présentent de nombreux effets cardiovasculaires indésirables. Bien que les AD inhibiteurs sélectifs de recapture de la sérotonine (SSRI) ne semblent pas avoir d'effet cardiovasculaire indésirable, l'utilisation de ce traitement chez les patients souffrant à la fois de dépression et de maladies cardiovasculaires ne semble pas améliorer le pronostic cardiovasculaire et alors qu'un fort taux de résistance au traitement est

observé chez ce type de patients, il peut dans ce cas augmenter la morbidité cardiovasculaire [2, 38-40].

Etant donné que la dépression et les pathologies cardiovasculaires représentent deux des principales causes d'invalidité dans le monde, l'interaction entre ces deux pathologies pose un vrai problème de santé publique. Dans cette première partie, nous allons décrire de façon précise la relation entre la dépression et les maladies cardiovasculaires et présenter les principales études qui ont permis d'évoquer la réalité et la nature de ce lien. Dans une deuxième partie, nous discuterons les différentes hypothèses physiopathologiques qui ont été proposées pour expliquer la relation entre la dépression et les maladies cardiovasculaires ainsi que l'interconnexion de ces mécanismes physiopathologiques entre eux. Dans une troisième partie nous poserons la question de l'implication thérapeutique du lien entre ces deux pathologies en posant les limites des différents traitements actuellement disponibles. Finalement, en soulevant les limites de nos connaissances sur la comorbidité entre la dépression et les maladies cardiovasculaires, nous discuterons de l'intérêt d'utiliser une approche préclinique dans l'étude de cette relation. En effet, peu d'études ont jusqu'à ce jour tenté d'explorer le lien entre la dépression et les maladies cardiovasculaires dans des modèles animaux.

Dépression et maladies cardiovasculaires : lien bidirectionnel

Les résultats de nombreuses études cliniques et épidémiologiques convergent pour indiquer l'existence d'une association entre la dépression et les pathologies cardiovasculaires. D'une part, les maladies cardiovasculaires représentent un facteur de risque pour le développement de troubles affectifs tels que la dépression et d'autre part, la dépression est actuellement reconnue comme un facteur de risque de morbidité et de mortalité cardiovasculaire. Depuis les années 1960, de nombreuses études cliniques et épidémiologiques ont cherché à mieux comprendre les déterminants de cette relation complexe et bidirectionnelle entre la dépression et les maladies cardiovasculaires.

1/ PREVALENCE DE LA DEPRESSION CHEZ LES PATIENTS SOUFFRANT DE PATHOLOGIES VASCULAIRES

1.1 Dépression post accident vasculaire cardiaque

Depuis la fin des années 1960, la présence de symptômes dépressifs a été documentée chez des patients souffrant de pathologies cardiovasculaires. Les premières études se sont intéressées aux patients hospitalisés dans les unités de soins intensifs suite à un infarctus. Ces études, en mettant en évidence des réactions dites « catastrophiques » chez ces patients, ont commencé à associer la dépression à une réponse spécifique de la maladie [41, 42]. Cependant, le taux de dépression post infarctus mis en évidence au cours de ces études est très hétérogène, entre 10 et 87% [41-43]. Différents critères peuvent expliquer ce taux de variation, comme les méthodes de diagnostic utilisées, le nombre de jours post-infarctus à partir duquel la dépression est évaluée, l'âge des participants à l'étude et les critères d'inclusion et d'exclusion.

Cependant, malgré l'inconsistance des conclusions citées précédemment, de nombreuses études ont mis en évidence un taux de dépression post infarctus du myocarde significatif (Tableau 1). En utilisant le RDC (Research Diagnostic Criteria) le taux de dépression entre 8 et 10 jours après l'infarctus du myocarde est de 45%. Ce taux diminue à 33% 4 mois après l'infarctus [44]. En outre, des études utilisant d'autres méthodes de diagnostic ont mis en évidence un taux de dépression post infarctus de 19% avec le DSM-IV [45] et un taux entre 15 et 30% avec le BDI (Beck Depression Inventory) [25-27, 46]. Le taux de prévalence de dépression retrouvé chez les patients souffrant d'insuffisance coronarienne est comparable à celui observée suite à un infarctus du myocarde. Carney et al.

[47] montrent que 18% des patients dont l'angiographie indique une maladie des artères coronaires souffrent de dépression majeure. Gonzales et al. [48] ainsi que Hance et al. [49] démontrent que les patients présentant une maladie coronarienne développent, dans un délai de 12 mois, une dépression majeure dans 23% et 17% des cas respectivement. De la même façon, le taux de dépression suite à une décompensation d'insuffisance cardiaque reste similaire à ceux trouvés lors d'un infarctus du myocarde ou de syndromes coronariens aigus [50]. De nombreux facteurs pourraient expliquer l'occurrence de dépression chez les patients souffrant de maladies cardiovasculaires, incluant le degré d'affaiblissement fonctionnel suite à l'infarctus du myocarde [48], une première histoire d'infarctus du myocarde [43, 46] et une histoire familiale de psychopathologie [48].

Study	Diagnostic method	Study participant	Percentage with major depression	Depression associated with cardiac status?	Impact of depression prognosis	Adjustments for 1) Cardiac status 2) Overall medical comorbidity
Carney et al 1987 and 1988	Modified DIS	Outpatients with CAD	17%	Depression not associated with NYHA functional class or severity of stenosis	Depression correlated with worse cardiac outcome	1) Extent of coronary disease, LVEF 2) None
Schleifer et al 1989	SADS/RDC	Post-MI patients	18%	Depression not associated with LVEF, presence of Q waves, prior MI	No impact	Not reported
Forrester et al 1992	Prevent State Exam	Post-MI patients	19%	Patients with depression more likely to have large infarct	Not reported	Not reported
Frasure-Smith et al 1993	Modified DIS	Post-MI patients	16%	Depressed patients more likely to be prescribed warfarin	At 6 months hazard ratio for mortality 3.44	1) Left ventricular function and prior MI 2) None
Frazure-Smith et al 1995	Same as above	Same as above	Same as above	Same as above	At 18 months odds ratio for mortality for BDI \geq 10 = 6.64	Same as above
Gonzalez et al 1996	Modified DIS	Inpatients with CAD	23%	Not reported	Not reported	Not reported
Hance et al 1996	Modified DIS	Outpatients with CAD	17%	Patients with MDD do not have greater extent of coronary disease	Not reported	Not reported
Kaufman et al 1999	Modified DIS	Post-MI patients	27.2%	Not reported	Depression as an independent predictor of mortality	1) History of prior MI, current CHF, LVEF 2) Diabetes, stroke
Lesperance et al 2000	Modified DIS	Inpatients with unstable angina	15.1%	Depression not associated with cardiac disease severity	For BDI \geq 10, odds ratio for cardiac events or cardiac death = 6.73	1) EKG, history of CABG or angioplasty, LVEF, extent of CAD, cardiac medicines 2) None
Connerney et al 2001	Modified DIS	Post-CABG patients	20%	Major depression not associated with LVEF or history of MI, depression associated with functional class	At 1 year, RR for cardiac death events 2.3	1) Functional class, LVEF, complexity of surgical procedure 2) None

DSI, Diagnosed Interview Schedule; CAD, Coronary Artery Disease; NYHA, New York Heart Association; LVEF, Left Ventricular Ejection Fractions; SADS, Schedule for Affective Disorder and Schizophrenia; MI, Myocardial Infarction; BDI, Beck Depression Inventory; MDD, Major Depressive Disorder; CHF, Congestive Heart Failure; EKG, Electrocardiogramme; CABG, Coronary Artery Bypass; RR, Relative Risk; RDC, Research Diagnostic Criteria.

Table 1: Caractéristiques des études cliniques sur la relation entre la dépression et les maladies cardiovasculaires. D'après Rudisch & nemeroff, 2003 [51].

Il semble important de distinguer deux types de dépressions post accidents cardiovasculaires. Tout d'abord la dépression transitoire pour laquelle un rétablissement est observé quelques mois après l'hospitalisation et la dépression persistante, similaire à celle observée chez les sujets sains d'un point de vue cardiovasculaire. De nombreuses études longitudinales ont démontré que la présence de symptômes d'une dépression majeure pouvait persister 2 ans après l'hospitalisation [44, 49]. Dans l'étude de Schleifer et al. [44], le suivi des patients diagnostiqués pour une dépression post infarctus du myocarde, sur une période de 3 mois, a démontré que 83% des patients continuent de présenter soit une dépression majeure, soit une dépression mineure. Une première histoire de morbidité psychiatrique [52] et un manque de support social post-infarctus [53] pourraient expliquer la persistance d'une dépression majeure.

1.2 Dépression post accident vasculaire cérébral

De nombreuses études ont révélé un taux de dépression élevé suite à un accident vasculaire cérébral ischémique. Par exemple, Robinson et al. [54, 55] ont montré que 27% des patients ayant subi un infarctus cérébral souffrent de dépression majeure et que deux ans plus tard 32% de ces patients souffrent toujours de dépression (14% de dépression majeure et 18% de dépression mineure). D'autres études, qui multiplient les critères diagnostiques utilisés, indiquent des résultats similaires avec un taux de dépression majeure de 27% entre 2 et 4 mois post-accident vasculaire cérébral [56, 57]. De plus, Gainotti et al. [57] ont montré que cette prévalence augmente entre 4 et 6 mois après l'infarctus cérébral pour atteindre un taux de dépression majeure de 40%.

D'autres études ont rapporté une augmentation significative du taux de dépression chez des sujets victimes d'un infarctus cérébral comparé avec des sujets contrôles examinés en même temps. Un mois après l'accident vasculaire cérébral, le taux de dépression majeure est de 11% vs 7.5% [58]. Alors que la prévalence de la dépression chez des patients après un infarctus cérébral augmente en fonction du temps, celle des sujets sains n'évolue pas. Le taux de dépression post-accident vasculaire cérébral passe à 23% dans les 4 mois et à 41% 1 an après l'accident vasculaire tandis que celui des sujets sains reste entre 7 et 8% [59, 60].

L'importance de la prévalence de la dépression post-accident vasculaire cérébral a poussé de nombreuses études à établir un lien entre la localisation et la taille de la lésion et l'apparition de la dépression. Robinson et Szetela [61] ont mis en évidence une corrélation entre la présence de lésions au niveau du lobe frontal gauche et les symptômes dépressifs. Plusieurs études ont décrit les mêmes résultats [61-63], tandis que d'autres font le lien dans

l'hémisphère droit [64] et d'autres ne trouvent pas d'association [65]. Une revue sur la question conclut toutefois que l'association entre localisation de la lésion et risque de dépression reste discutable [66]. Cependant, une étude réalisée en IRM montre que les sujets souffrant de symptômes dépressifs suite à un accident vasculaire cérébral, présentent une augmentation du nombre et du volume des lésions affectant le circuit fronto-sous cortical. Cette étude met donc en évidence un lien entre l'infarctus au niveau frontal, spécifiquement s'il touche les circuits fronto-sous corticaux, avec la dépression post-accident vasculaire cérébral.

2/ LA DEPRESSION PREDISPOSE A LA MORTALITE ET LA MORBIDITE VASCULAIRE

2.1 Chez des patients avec des troubles cardiovasculaires établis

Dans le début des années 1990, de nombreuses études ont montré un lien entre la présence de symptômes dépressifs et la précipitation d'évènements cardiaques chez des patients présentant des troubles cardiovasculaires établis. La dépression pourrait augmenter chez ces patients la mortalité et la morbidité par maladies cardiovasculaires. En 1988, Carney et al. [67] conduisent une étude sur des patients dont l'angiographie démontre systématiquement une maladie des artères coronaires. Parmi ces patients, 20% présentent des critères de dépression majeure et ont 2.5 fois plus de chance de développer de sérieuses complications cardiaques dans l'année qui suit [67]. Cependant, l'effectif de cette étude était trop faible pour contrôler d'autres facteurs de risque, ce qui a été corrigé dans les études suivantes utilisant la même stratégie. Ahern et al. [68] ont notamment étudié les taux d'anxiété et de dépression chez des patients souffrant d'arythmie ventriculaire suite à un infarctus du myocarde. Les patients qui survivront à l'infarctus du myocarde après la première année présentent un taux de dépression plus bas que les non survivants après contrôle des facteurs de risques médico-sociaux [68]. D'autres études analysant des patients post-infarctus du myocarde ont mis en évidence une augmentation de la mortalité associée à la dépression [25, 26, 69-73].

Les plus convaincantes de ces études sont celles réalisées par Frasure-Smith et al. [25, 26] sur une cohorte de patients souffrant de dépression majeure (Figure 1A). Dans ces deux études, les patients sont examinés 5 à 15 jours après l'infarctus du myocarde et recontactés 6 et 18 mois après leur hospitalisation. 16% de ces patients montrent des critères de dépression majeure de 5 à 15 jours post-infarctus. A 6 mois post-infarctus, le taux de mortalité est de 17% pour les patients dépressifs comparé à 3% pour les patients non dépressifs. Après

contrôle des facteurs de risque, le taux de mortalité des patients dépressifs est 3.5 fois plus élevé. De la même façon, à 18 mois post-infarctus, la dépression reste prédictrice de la mortalité. Plus récemment, une étude longitudinale de 17 ans sur des patients diagnostiqués pour des maladies coronariennes considérés comme une population à haut risque, a mis en évidence que la dépression était associée à une diminution des chances de survie. Par rapport aux patients non dépressifs, les patients dépressifs ont 69% de chance de plus de mourir par maladies cardiovasculaires et 78% de mourir d'autres causes. De plus, comparés aux non dépressifs, les patients présentant des critères de dépression allant de modérée à sévère ont 84% de probabilité de plus de mort cardiaque entre 5 et 10 ans après hospitalisation et 72% après 10 ans [17]. Lesperance et al. [29] mettent en évidence une association dose-dépendante entre le niveau de symptômes dépressifs et le taux de mortalité à long terme chez des patients suite à un infarctus du myocarde (Figure 1B).

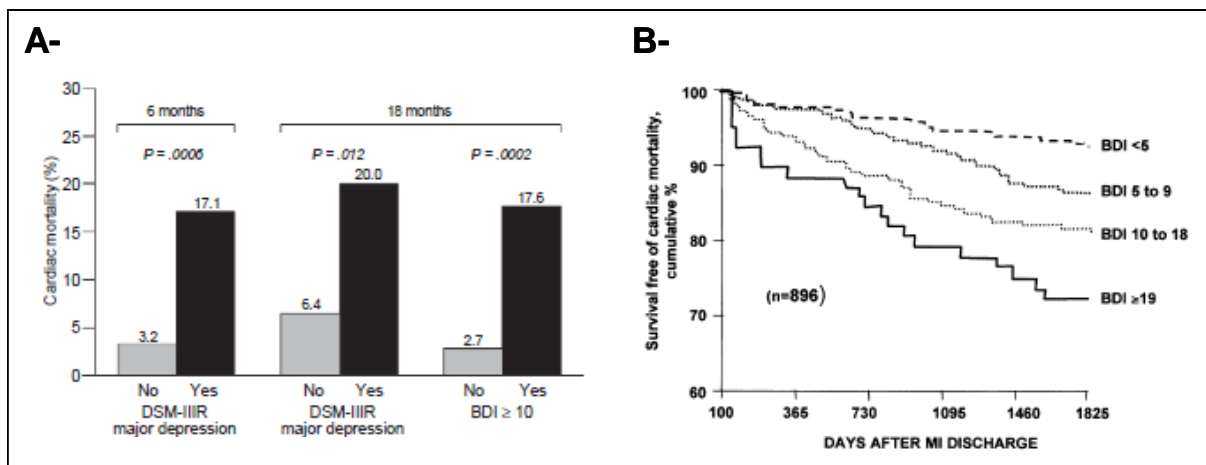


Figure 1: mortalité cardiovasculaire associée à la dépression suite à un infarctus du myocarde. A- Taux de mortalité cardiaque de patients avec ou sans dépression majeure définie avec le DSM-III-R à 6 et 18 mois suite à un infarctus du myocarde et de patients présentant un score au BDI > 10 ou < 10 18 mois suite à un infarctus du myocarde. Résultat de Frazure-Smith et al, 1993 et de Frazure-Smith et al, 1995 [25, 26]. B- Relation dose-réponse entre les symptômes dépressifs, définie par le score BDI et le pronostic cardiovasculaire à long terme suite à un infarctus du myocarde. BDI, Beck Depression Inventory. Résultats de Lesperance et al, 2002 [29].

Ces différentes études établissent un lien convaincant entre dépression, maladies cardiovasculaires et mortalité. Ces études examinent spécifiquement des patients avec des maladies cardiovasculaires préexistantes et montrent un taux de mortalité plus élevé chez les patients dépressifs. Ces études contrôlent également les facteurs médico-sociaux et le lien est d'autant plus fort suite à un infarctus du myocarde.

2.2 Chez des patients sans antécédents de pathologies cardiovasculaires

L'idée de considérer la dépression en tant que facteur de risque indépendant pour le développement de maladies cardiovasculaires chez des individus sans antécédent a émergé à la fin des années 1960. Bien que deux méta-analyses réalisées dans les années 1980 n'ont pas été capables d'établir ce lien [74, 75], de nombreuses études épidémiologiques et prospectives effectuées depuis sur des patients dépressifs sans antécédents de pathologies cardiovasculaires ont permis de mettre en évidence que la dépression pourrait augmenter la morbidité et la mortalité par maladies cardiovasculaires en agissant comme un facteur de risque vasculaire indépendant. Une des premières études, réalisée par Week et al, en 1979 [76], a montré un taux de mortalité par maladies cardiovasculaires important (50%) chez des patients dépressifs. Dans les années 1980 et 1990, les études suivantes ont confirmé cette augmentation de la mortalité [77-80]. Cependant, la dépression n'est pas uniquement considérée comme un prédicteur de la mortalité par maladies cardiovasculaires mais également comme un facteur de risque pour le développement de maladies cardiovasculaires.

Malgré des conclusions similaires, les études élaborées dans le but de définir la dépression en tant que facteur de risque vasculaire indépendant peuvent être divisées en trois catégories en fonction des critères diagnostiques d'évaluation de la dépression utilisés. Plusieurs études utilisant différentes échelles d'évaluation de la dépression ont démontré une augmentation de la présence de maladies coronariennes (infarctus du myocarde ou maladies ischémiques du cœur) et/ou de la mortalité cardiaque chez les patients dépressifs [19, 22, 81, 82]. D'autres études appliquant les échelles de dépression du centre d'études épidémiologiques (CES-D) chez les personnes âgées ont mis en évidence une augmentation de l'apparition tardive de maladies coronariennes [21, 23, 83, 84]. Finalement, l'utilisation des critères de diagnostic de la dépression permette également de démontrer une augmentation significative de maladies cardiovasculaires chez les sujets dépressifs [16, 20, 24]. Une méta-analyse récente regroupant 11 études prospectives, effectuées sur des patients sans antécédent de pathologies cardiovasculaires (de 750 à 7894 sujets par étude), et dans lesquelles la dépression a été évaluée par des procédures cliniques standardisées, a permis d'étudier les conséquences de la dépression sur la morbidité et la mortalité cardiaque sur une durée comprise entre 3 et 37 ans. Les résultats montrent que le risque relatif de développer une maladie cardiovasculaire est de 1.64 [85]. Une seconde méta-analyse regroupant 28 études prospectives a aussi permis de considérer la dépression comme un facteur de risque vasculaire indépendant [86]. Finalement, Rozanski et al. [87] ont pu montrer que la

dépression clinique est comparable aux facteurs de risques vasculaires traditionnels observés dans l'étude Framhington (Figure 2).

La dépression ne semble pas uniquement prédire l'apparition de maladies coronariennes mais également celle de maladies cérébrovasculaires. En effet, une étude prospective sur 10 ans montre que les sujets présentant des symptômes dépressifs ont 2.7 fois plus de risque de souffrir d'une maladie cérébrovasculaire durant cette période même après ajustement des facteurs de risques vasculaires traditionnels [88]. Une autre étude sur 16 ans a démontré des résultats similaires [89].

L'existence d'une relation dose-réponse entre la dépression et les maladies cardiovasculaires représente un argument supplémentaire en faveur d'un lien causal entre ces deux entités. Parmi les études citées précédemment, plusieurs ont mis en évidence une corrélation positive entre le risque de développement de maladies cardiovasculaires et la sévérité de la dépression [19, 22, 82-84]. De plus, dans les études de Pratt et al. [16] et de Penninx et al. [20], le risque de développer une maladie cardiovasculaire est élevé uniquement dans le cas de dépression majeure et non de dépression mineure. Finalement, dans la méta-analyse citée précédemment [85], les auteurs démontrent que les études incluant les individus avec un diagnostic de dépression établie présentent un risque de développement de maladies cardiovasculaires plus important que celles incluant des sujets avec des symptômes dépressifs (2.69 vs 1.49).

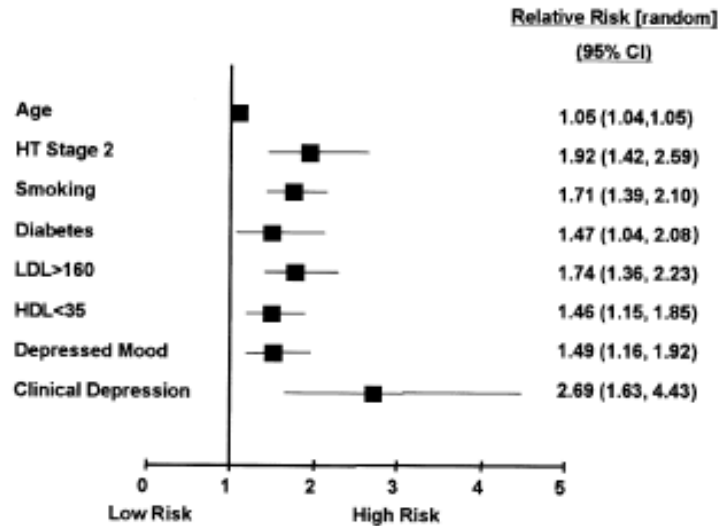


Figure 2: Le risque de mortalité due à une maladie cardiovasculaire, un infarctus du myocarde, une insuffisance coronarienne ou une angine de poitrine pour les facteurs de risque cardiovasculaire traditionnels proviennent de l'étude Framingham. Les risques de mortalité par maladies cardiovasculaires et par infarctus du myocarde pour les symptômes dépressifs et la dépression clinique proviennent de la méta-analyse de Rugulies et al. CI = Confidence Interval ; HT= Hypertension ; LDL = Low-density lipoprotein ; HDL = High-density lipoprotein. D'après Rozanski et al, 2005 [87].

L'ensemble de ces études indiquent de façon convaincante que la dépression représente un facteur de risque vasculaire indépendant pour le développement de maladies coronariennes et d'infarctus du myocarde [30, 32, 34, 90, 91]. L'augmentation de maladies coronariennes est plus forte chez les jeunes adultes mais est également présente chez les personnes âgées, ainsi l'augmentation du risque apparaît plus grande chez les patients avec des épisodes dépressifs cliniquement significatifs que ceux avec des symptômes dépressifs (dépression mineure).

3/ LE CONCEPT DE DEPRESSION VASCULAIRE

3.1 Phénotype de la dépression gériatrique à début tardif

La dépression chez les personnes âgées, appelée "dépression gériatrique", est une pathologie psychiatrique extrêmement fréquente. L'incidence annuelle de la dépression gériatrique augmente avec l'âge. Elle représente un taux de 17 % chez les personnes entre 70 et 79 ans et un taux de 44 % chez les personnes entre 79 et 85 ans [92]. La prévalence de dépression gériatrique dans la population générale est de 1.8 % pour la dépression majeure, de 9.8% pour la dépression mineure et de 13.5% pour les symptômes dépressifs cliniquement significatifs [93, 94]. Il a été suggéré de distinguer les tableaux de dépression gériatrique en fonction de l'âge d'apparition du premier épisode dépressif [95-98]. On distingue ainsi la

dépression gériatrique à début précoce, définie par l'apparition du premier épisode dépressif à l'âge adulte et par la récurrence des épisodes à partir de 50 ans, de la dépression gériatrique à début tardif avec apparition du premier épisode dépressif à partir de 50 ans. Alors que la dépression gériatrique à début précoce est plus fréquemment associée à un faible niveau social [99], des troubles de la personnalité [100, 101] et une mortalité clinique élevée [102], la dépression gériatrique à début tardif est associée à des troubles cognitifs tels que des troubles des fonctions exécutives, de la parole, ou de la mémoire de rappel, une augmentation du ratio cerveau-ventricule avec une hyper-intensité de la substance blanche en neuro-imagerie et une évolution fréquente vers la démence [103].

3.2 Contribution de la neuroimagerie

La taille et la localisation de lésions cérébrales ainsi que leur manifestation clinique ont souvent été étudiées en relation avec l'occurrence de symptômes dépressifs et notamment suite à un infarctus cérébral [59, 60, 104]. Des infarctus cérébraux silencieux et de petite taille ont également été associés à une augmentation des risques d'apparition de dépression. Au cours des années 1980, les lésions les plus fréquemment décrites en IRM sont des signaux d'hyper-intensité de l'espace périventriculaire, de la substance blanche et des ganglions de la base [105]. Ces images ont été initialement considérées comme « des objets lumineux non identifiés », puis redéfinies comme leucoencéphalopathie [106], leuco-araïose [107] ou encéphalomalacie sous-corticale [108]. Ces signaux d'hyper-intensité de la substance blanche, associés aux facteurs de risque cardiovasculaire [109], sont liés à différents types de lésions anatomiques en fonction de leur taille. Les petites lésions sont plus fréquemment associées à un élargissement de l'espace périventriculaire tandis que les lésions plus larges seraient d'origine ischémique [108, 110]. Il semble que le volume et la localisation des lésions (préférentiellement au niveau des ganglions de la base et de la substance blanche frontale) soient corrélés à la présence de symptômes dépressifs et leur sévérité [111, 112]. Ainsi, ces lésions impliquent un dysfonctionnement des circuits fronto-striataux, pouvant être responsables de certains troubles cognitifs observés dans la dépression gériatrique à début tardif. De la même façon, une association des signaux d'hyper intensité de la substance blanche avec le phénotype de la dépression gériatrique à début tardif a été documentée par de nombreuses études [106, 113-118]. Thomas et al. [119] ont notamment montré que les signaux d'hyper-intensité de la substance blanche profonde correspondent à des lésions ischémiques chez les sujets dépressifs alors que moins d'un tiers de ces lésions sont ischémiques chez les sujets non dépressifs. Plus particulièrement, alors que les lésions les plus

larges sont d'origine ischémique chez l'ensemble des sujets, les petites lésions le sont uniquement chez les sujets dépressifs. Ainsi, non seulement ces signaux sont plus fréquents chez les sujets dépressifs, plus particulièrement chez les sujets atteints de dépression gériatrique à début tardif, mais sont également représentatifs d'une atteinte cérébrovasculaire.

3.3 Vers un diagnostique de la « dépression vasculaire »

Les résultats des études citées précédemment sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle la dépression gériatrique, et plus particulièrement sa forme à début tardif, serait d'origine vasculaire. Le terme de "dépression vasculaire" a donc été simultanément proposé par deux équipes distinctes en fonction des profils cliniques spécifiques et la présence de maladie cardiovasculaire ou de signaux d'hyper-intensité de la substance blanche en IRM [120, 121]. Cependant, ce diagnostique de « dépression vasculaire » n'inclut aucune relation causale ou temporelle entre l'apparition du premier épisode dépressif et les modifications cérébrovasculaires. Bien qu'il semble y avoir certaines évidences expérimentales montrant que les risques cardiovasculaires pourraient être prédictifs de l'apparition d'une dépression gériatrique à début tardif, le concept de "dépression vasculaire" repose sur des évidences de contingences plutôt que causales. De plus, il existe également des indices d'association entre la dépression gériatrique et d'autres maladies vasculaires ainsi que des associations entre la dépression chez les sujets jeunes ou âgés et les maladies vasculaires [91, 122, 123].

Les hypothèses physiopathologiques du lien entre la dépression et les maladies cardiovasculaires

Malgré le fait que l'association entre la dépression et les maladies cardiovasculaires soit actuellement clairement reconnue, les mécanismes physiopathologiques sous-jacents de cette association ne sont pas clairement définis. En effet, la ou les causes de cette forte comorbidité entre la dépression et les maladies cardiovasculaires ne sont pas connues. Cependant, il existe de nombreux points de convergence dans l'étiologie et la progression de chacune de ces pathologies. De même l'implication de mécanismes physiopathologiques communs aux deux pathologies ne peut être exclue.

1/ MECANISMES ETIOPATHOLOGIQUES COMMUNS

1.1 Facteur étiologique de la dépression : le stress

Définition et phénoménologie de la réponse au stress

Le stress représente une notion ambiguë car il peut aussi bien représenter l'agent responsable, la réponse comportementale à cet agent ou encore l'état physiologique dans lequel se trouve l'organisme soumis à cet agent. Seyle (1956), qui a introduit le terme « stress » en médecine et en biologie, définit alors l'agent causal comme le « stressor » et la condition résultante (la réponse comportementale et physiologique) comme le « stress » [124]. En général, les stressors peuvent être divisés en quatre catégories : 1) Les stressors physiques tels que le froid ou la chaleur, le bruit, les radiations, ... qui peuvent avoir une composante psychologique négative ou, dans certaines situations, positive ; 2) Les stressors psychologiques qui reflètent une réponse à des conditions expérimentales aversives. Ils affectent les processus émotionnels et peuvent provoquer des modifications comportementales tels que l'anxiété, la peur ou la frustration ; 3) Les stressors socio environnementaux tels que la perte d'emploi, le divorce et d'autres interactions sociales perturbées ; et 4) Les stressors qui contrarient l'homéostasie cardiaque et métabolique tels que l'exercice, l'orthostasie (chute de la pression artérielle), ou d'hypoglycémie [125-127]. En terme de durée, il est possible de distinguer les stressors aigus, de nature simple, intermittente et dont l'exposition est limitée dans le temps et les stressors chroniques de nature intermittente mais dont l'exposition est prolongée. Cependant, beaucoup des stressors décrits précédemment sont mixtes et agissent de concert.

Dans les différentes définitions du stress, ou de la réponse à un stressor, on trouve les notions de réponse non spécifique, de réponse adaptative, et d'état homéostatique. Ainsi, le stress peut être défini comme une réponse non spécifique de l'organisme capable de modifier l'homéostasie. Cette définition implique un syndrome de réponse au stress commun à tous les stressors que Seyle (1956) définit comme le « syndrome général d'adaptation », et qui est toujours d'actualité [124, 128]. Ce modèle dénombre trois principales étapes dans la réaction de l'organisme face à un stressor : la réaction d'alarme, la phase de résistance et la phase d'épuisement. Une fois que l'organisme a intégré l'apparition d'un stressor provenant soit du milieu interne, soit du milieu externe, une réaction d'alarme se met en place. Cette réaction mobilise dans un premier temps le système nerveux périphérique en stimulant la libération de noradrénaline (NA) par le système nerveux sympathique et d'adrénaline (Ad) par la glande médullosurrénale. Ainsi, la NA et l'Ad vont stimuler les organes impliqués dans la défense de l'organisme (système cardiovasculaire, poumons, foie, muscles) et inhiber l'activité d'autres organes moins nécessaires (appareil digestif et uro-génital). La seconde étape est la phase de résistance au cours de laquelle l'activation de l'axe HPA et la libération d'hormones corticoïdes par les glandes corticosurrénales ont pour but de permettre à l'organisme de s'adapter pour retrouver un état physiologique normal. Par contre, si les capacités psychologiques, physiologiques ou émotionnelles ne permettent pas à l'organisme de s'adapter, il entre dans la phase d'épuisement au cours de laquelle les ressources énergétiques s'épuisent et certains processus physiologiques se retrouvent anormalement hyperactifs, pouvant alors conduire à un état pathologique ou à la mort. Ce syndrome d'adaptation généralisée représente la composante non spécifique de la réponse au stress, générale et commune à tous les stressors. Cependant cette théorie implique également une réponse individuelle au stress médiée par différents facteurs de confusion tel qu'une prédisposition génétique.

Mc Ewen (1998) reprend la théorie de Sterling et Eyer (1981) sur la notion d'allostase, qu'il différencie de l'homéostasie, dans la définition du stress [129-131]. Alors que l'homéostasie s'applique à tous les mécanismes vitaux dont la stabilité est essentielle pour la survie de l'organisme, tels que le pH, l'osmolarité et la température, la régulation allostatique est beaucoup plus large et ne dépend pas de mécanisme « set-point » (de valeur seuil). L'allostase fait référence aux systèmes de réponse de l'organisme tel que le SNA et l'axe HPA qui vont conduire à la protection et l'adaptation de l'organisme face à un stressor interne ou environnemental. Ces systèmes de réponses peuvent varier en fonction des besoins et agir à différents niveaux (taux d'hormones, rythme cardiaque, système immunitaire,

neurotransmetteurs) afin d'assurer le maintien de l'homéostasie et donc des fonctions vitales. Ainsi, durant un stress, une réponse adaptative compensatoire de l'organisme est activée afin de maintenir l'homéostasie. Cette réponse adaptative, qui reflète l'activation de circuits centraux spécifiques (SNA et HPA), est programmée génétiquement et modulée par les facteurs environnementaux. Lorsque le cerveau perçoit une expérience comme stressante, des réponses physiologiques et comportementales se mettent en place, conduisant à l'allostasie. Si la réponse allostatique est suffisante, l'organisme s'adapte aux changements de l'environnement ou du milieu interne pour assurer l'équilibre des systèmes vitaux et sa survie. Par contre, dans une situation où la réponse allostatique est excessive, inefficace ou en absence d'inactivation des processus allostatiques, une charge allostatique se met en place. La charge allostatique est définie comme le coût payé par l'organisme afin de s'adapter aux situations psychosociales ou physiques aversives. Il en résulte un état allostatique, c'est-à-dire une mauvaise adaptation de l'organisme dûe à l'activité élevée ou perturbée des médiateurs de l'allostasie. Ainsi, lorsque la charge allostatique s'accumule, l'organisme devient incapable de faire face et de mettre fin à la situation stressante, la surexposition aux médiateurs neuronaux, endocriniens et immunologiques peut alors conduire ou contribuer à l'établissement de conditions physiopathologiques. Les effets protecteurs des médiateurs du stress à court terme peuvent donc s'avérer néfastes à long terme et induire des perturbations de l'homéostasie de l'organisme (Figure 3).

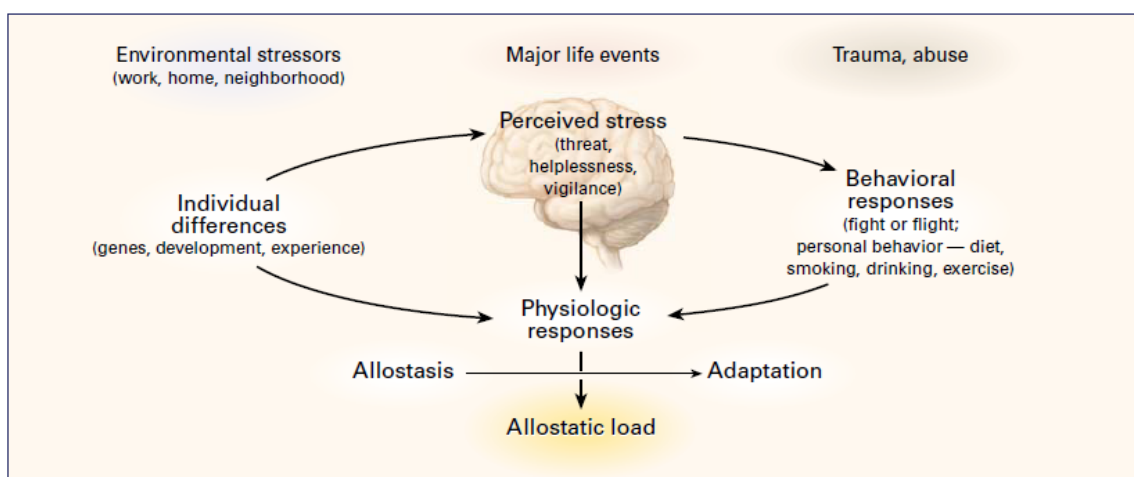


Figure 3: La réponse au stress et le développement de la charge allostatique. La perception d'un stress est influencée par des facteurs génétiques, comportementaux et expérimentaux. Lorsque le cerveau perçoit une expérience comme stressante, des réponses physiologiques et comportementales sont initiées, conduisant aux processus d'allostase et d'adaptation. Au cours du temps, la charge allostatique peut s'accumuler, et la surexpression de médiateurs neuronaux, endocriniens et immunitaires peut avoir des effets adverses sur de nombreux organes et conduire au développement de pathologies. D'après Mc Ewen et al, 1998 [129].

Il est maintenant bien établi et reconnu que le stress joue un rôle important dans la pathogenèse de maladies chroniques. Plus spécifiquement, le stress, par son influence au niveau du système nerveux central et de la régulation cardiovasculaire peut conduire à des déséquilibres homéostatiques favorisant l'apparition de troubles psychiatriques comme la dépression et de troubles cardiovasculaires [35, 132-135].

Implication du stress dans la dépression

Le stress est aujourd'hui considéré comme le facteur environnemental majeur pouvant précipiter un épisode dépressif et influencer la sévérité, la durée et la récurrence de cet épisode. En particulier, le stress, en réponse à des facteurs émotionnels et socio-environnementaux, est connu pour déclencher et exacerber les états dépressifs [129, 130]. Le nombre de traumatismes de l'enfance augmente le risque de développer une dépression à l'âge adulte. Les stress environnementaux à l'âge adulte peuvent contribuer à l'émergence d'un épisode dépressif, lequel est renforcé lorsque ceux-ci revêtent un caractère chronique ou traumatique [136, 137]. Il a été montré que la vulnérabilité d'un individu face à la dépression va également dépendre de l'intensité et de la quantité de mémoire émotionnelle, de remémorations d'échecs, ainsi que d'expériences aversives et traumatiques qu'il a pu subir.

Conséquences cardiovasculaires du stress

Le stress contribue également aux développements de maladies cardiovasculaires et aux facteurs de risques associés [1, 138]. En effet, qu'il soit aigu ou chronique, de nature psychologique ou socio-environnemental, le stress augmente et précipite les risques de maladies coronariennes et d'infarctus du myocarde [139-142]. Les effets délétères du stress sur le système cardiovasculaire impliquent des conséquences comportementales en favorisant les comportements à risque comme le tabagisme, l'alcoolisme et une alimentation riche en lipide. Le stress est également associé aux facteurs de risques vasculaires traditionnels et peut favoriser l'hypertension, l'obésité ou le diabète [143, 144]. Le stress affecte le système cardiovasculaire en augmentant les besoins cardiaques, par son action sur la fréquence

cardiaque et la pression artérielle, et en même temps en diminuant les apports sanguins, par un rétrécissement du diamètre (vasoconstriction) des artères et une diminution des apports sanguins périphériques. Le stress peut provoquer alors un défaut de perfusion cardiaque qui conduit à l'infarctus. Le stress est également impliqué dans les mécanismes physiopathologiques qui contribuent à la formation et à la progression d'athérosclérose [145]. Le stress favorise l'apparition d'un profil lipidique athérogène, d'un dysfonctionnement endothélial, d'une activation plaquettaire et de modifications de l'hémostase, ainsi que d'une activation des mécanismes inflammatoires et immunitaires [31, 146].

La réponse au stress est principalement régulée par l'axe HPA et le système nerveux autonome, suggérant que les effets délétères d'une hyperactivité de ces systèmes sur le système cardiovasculaire peuvent être induits ou augmentés par le stress [138]. Les conséquences de l'activation de ces deux systèmes sur la régulation cardiovasculaire et l'humeur (détaillées plus spécifiquement dans une seconde partie) pourraient expliquer au moins en partie la relation entre stress, dépression et maladies cardiovasculaires (Figure 4). Cependant, de nombreux mécanismes physiopathologiques impliqués dans la réponse au stress, comme par exemple la libération de cytokines, peuvent également expliquer cette relation.

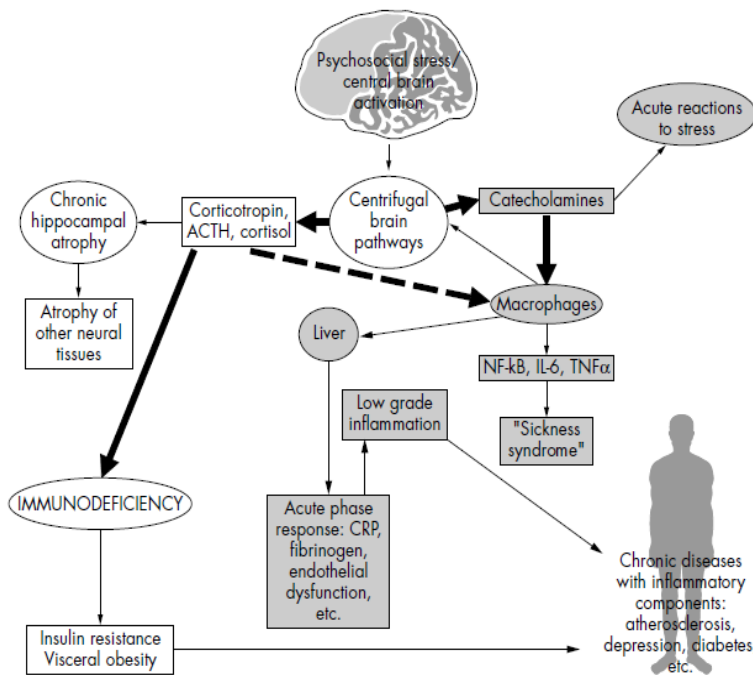


Figure 4: Les composantes de la réponse au stress: l'activation de l'axe hypothalamo-hypophysé surrénalien et du système nerveux autonome en réponse au stress entraînant respectivement la libération de glucocorticoïdes et de catécholamines peuvent induire des maladies chroniques dans lesquelles la composante inflammatoire représente un des principaux mécanismes physiopathologiques. La ligne en gras et en pointillée correspond à un mécanisme d'inhibition ; les lignes en continu représentent des mécanismes d'activation. NFκB, nuclear factor κB; IL-6, interleukin 6; TNFα, tumour necrosis factor α; CRP, C reactive protein. D'après S Vale, 2004 [1].

1.2 Facteurs de risques cardiovasculaires

Les nombreux facteurs, connus pour augmenter les risques de développement de maladies cardiovasculaires, peuvent être divisés en risques biologiques parmi lesquels on trouve les facteurs de risques vasculaires traditionnels (hypertension, diabète, obésité et hypercholestérolémie) et les risques comportementaux tels que le tabac et la consommation abusive d'alcool, les habitudes alimentaires, le manque d'activité physique et la médication. De nombreuses études suggèrent que la relation entre la dépression et les maladies cardiovasculaires pourrait en partie être expliquée par la présence d'un ou plusieurs de ces facteurs de risques cardiovasculaires puisque les patients dépressifs ont une plus grande probabilité d'avoir un ou plusieurs facteurs de risque que les patients non dépressifs. De plus, bien que la plupart des études examinant le lien entre la dépression et les maladies cardiovasculaires contrôlent les facteurs de risques, la présence de facteurs de risque multiples peut être inadéquatement contrôlée.

Facteurs de risque physiologiques

L'hypertension, défini par une augmentation de la pression artérielle (Systole >140 mmHg et diastole > 90 mmHg) touchait 972 millions de personnes dans le monde en 2000 et on estime une augmentation de 1.56 millions d'ici 2025. L'hypertension, classée au 3ème rang d'incapacité, représente un facteur de risque majeur pour le développement et la précipitation de maladies cardiovasculaires et est une des principales cause de décès dans le

monde [147]. En effet, une pression artérielle suboptimale, soit une pression artérielle systolique >115 mmHg, est responsable de 62% des maladies cérébro-vasculaires et de 49% des maladies ischémiques du cœur [148]. De plus, une augmentation prolongée de la pression diastolique de 10mmHg est associée à une augmentation de 37% de risque de maladies cardiovasculaires [149]. La plupart des études qui ont étudié la relation entre la dépression et la pression artérielle se sont basées sur l'hypothèse selon laquelle l'hyperactivité du système nerveux autonome, observée chez les patients anxieux et dépressifs, entraînerait au niveau du système cardiovasculaire, une augmentation de la pression artérielle. Cependant, les résultats sont controversés. Beaucoup d'études ont échoué à mettre en évidence une association entre la dépression et l'hypertension [150-153]. Cependant, Davidson et al.[154] et Jonas et al.[155] ont montré que la présence de symptômes dépressifs était associée à une augmentation du risque de développer de l'hypertension dans les 5 et 20 ans respectivement. La dépression représenterait ainsi un facteur de risque d'hypertension [156]. Inversement, l'hypertension pourrait également prédire l'apparition de symptômes dépressifs. Rabkin et al. [157] et Coelho et al. [158] ont montré que les patients hypertendus présentent un risque trois fois plus élevé de développer une dépression.

Le diabète est une pathologie chronique qui s'installe lorsque le pancréas ne produit plus suffisamment d'insuline (diabète de type I) ou lorsque l'insuline produite n'est pas utilisée de façon efficace par l'organisme (diabète de type II). La prévalence du diabète, de 171 millions de personnes en 2000, est en constante augmentation à cause de l'accroissement et du vieillissement de la population, de l'urbanisation et de l'augmentation de la prévalence de l'obésité et de l'inactivité physique [159]. Le diabète entraîne de multiples complications et la mort prématurée, représentant au moins 10% des dépenses des services médicaux dans de nombreux pays. Le taux global de mortalité lié au diabète était de 2.9 millions de décès en 2000, ce qui représente 5.9% des décès totaux dans le monde [160]. Plus spécifiquement, le diabète augmente de 3 à 4 fois les risques de morbidité et de mortalité cardiovasculaires [161]. Le diabète, principal facteur de risque cardiovasculaire est associé de façon bidirectionnelle à la dépression. En effet, la prévalence de la dépression est deux fois plus importante chez les diabétiques que chez les non diabétiques [162]. Les sujets diabétiques présentent un taux de dépression de 14%, ce qui est significativement plus important que chez les non diabétiques [163]. L'apparition de la dépression chez les personnes diabétiques pourrait être une conséquence des modifications biochimiques liées à la maladie et/ou de l'impact psychosocial et des facteurs psychologiques liés à la maladie. En effet, le diabète et

la dépression présentent des mécanismes physiopathologiques communs parmi lesquels on peut citer une hyperactivité de l'axe HPA, une altération du métabolisme des neurotransmetteurs et une réduction de l'utilisation du glucose par l'organisme ainsi qu'une augmentation de la résistance à l'insuline. La dépression dans le diabète pourrait également résulter des contraintes émotionnelles et psychosociales dues aux complications de la maladie plutôt que de la maladie elle-même [164]. Cependant, alors que dans le diabète de type I la dépression serait une conséquence de la maladie, dans le diabète de type II, il semblerait plutôt que la dépression précède le diagnostic de la maladie. En effet, la dépression augmenterait le risque de développer un diabète de type II [165]. Eaton et al [166], dans une étude épidémiologique sur 13 ans, suggèrent un risque 2.23 plus élevé de développement d'un diabète chez les individus dépressifs en comparaison aux témoins, bien que ce résultat ne soit pas statistiquement significatif ($p=.11$; 95% CI, .90-5.55). La dépression a une influence négative sur le contrôle de la glycémie chez les patients diabétiques [167] et la dépression augmente le risque de complications incluant une néphropathie, une neuropathie et une rétinopathie [168].

L'obésité représente un facteur de risque pour de nombreuses pathologies telles que le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires, et elle peut conduire à une mort prématurée. Une étude récente a montré que les sujets obèses (BMI > 30) ou présentant un poids excessif (BMI 25.0-29.9) ont un risque de développer des maladies cardiovasculaires de 1.64 et de 1.2 respectivement, en comparaison à des sujets avec un poids normal (BMI 18.5-24.8) [169]. Bien que le lien entre l'obésité et le développement de maladies psychologiques reste peu connu, des études récentes ont mis en évidence une augmentation du risque de dépression parmi les obèses [170, 171]. Une étude prospective montre que l'obésité prédit l'apparition de symptômes dépressifs pendant une période de 1 an, après contrôle d'autres facteurs de risque [171]. De plus, dans l'étude d'observation sur 5 ans de Roberts et al [172], l'obésité est associée avec une augmentation des risques de dépression. Une autre étude, s'intéressant à l'association entre l'obésité et les indicateurs de poids sur la santé mentale chez des sujets âgés de 50 ans et plus, montre que les sujets obèses ont une augmentation des risques de développement de dépression dans les 5 ans [173]. D'autres études ont également montré que l'obésité chez les adolescents prédit l'apparition tardive de dépression à l'âge adulte [174, 175]. Ainsi, l'obésité à la fois chez les adultes et les adolescents semble prédictive de l'apparition de dépression. Dans la plupart des études citées précédemment, la dépression ne représente pas un facteur de risque d'un développement futur d'obésité. De

plus, Patten et al [174] ont montré que la prise d'AD était associée à une augmentation des risques d'obésité. Cependant, certaines études ont tout de même permis de placer la dépression comme un facteur de risque d'obésité. Noppa et Hällström [176], dans une étude longitudinale sur 6 ans chez la femme adulte, trouvent que la présence d'une dépression sévère induit un risque de prise de poids plus élevé. Chez l'homme, une corrélation positive entre l'obésité abdominale et les symptômes dépressifs a également été mise en évidence [177]. A l'adolescence, la présence de symptômes dépressifs entraîne un risque plus élevé de développement et de persistance d'obésité pendant l'adolescence [170]. La dépression et l'obésité, deux pathologies favorables au développement de maladies cardiovasculaires, présentent des dysfonctionnements neuroendocriniens similaires.

L'hypercholestérolémie est également un facteur de risque établi pour le développement de maladies cardiovasculaires. Une augmentation de 10 mg/dl du cholestérol plasmatique entraîne une augmentation de 9% de la mortalité par maladies cardiovasculaires [178]. De nombreuses études ont mis en évidence une modification significative du taux de cholestérol chez les patients dépressifs en comparaison à des sujets sains. Les premières études effectuées sur le lien entre la dépression et le taux de cholestérol ont montré soit une augmentation du taux de cholestérol [179, 180] soit un taux de cholestérol normal [181-183] parmi les patients dépressifs. Dans l'étude de Oxenkrug et al, alors que l'âge et le genre influencent le taux de cholestérol, la dépression ne semble pas représenter un facteur d'influence du métabolisme du cholestérol [183]. Cependant, la majorité des études récentes suggère que la dépression est associée non pas avec un taux de cholestérol élevé mais plutôt avec un faible taux de cholestérol (≤ 4.5 mmol/l) [184-196]. En effet, Maes et al. [185] ont mis en évidence un taux de cholestérol HDL significativement faible chez les patients dépressifs. Le niveau de cholestérol estérifié est également relativement faible dans la dépression, suggérant une composante génétique [192]. De plus, un faible taux de cholestérol sanguin augmenterait les risques d'apparition de la dépression [196, 197], serait corrélé à la sévérité des symptômes dépressifs [191-193] et à l'augmentation des risques de suicides chez les patients dépressifs [191, 196, 198]. Olusi et Fido [186] ont montré que le rétablissement clinique de la dépression était associé à un retour à la normale du taux de cholestérol (5.27 ± 1.18 à 6.12 ± 1.2 mmol/l). Le lien entre l'homéostasie du cholestérol et le métabolisme de la sérotonine pourrait expliquer l'interaction entre la dépression et les modifications du taux de cholestérol. Une hypothèse serait que le tryptophane, précurseur de la sérotonine, est en compétition avec les acides gras sanguins lors de la fixation à l'albumine. Ainsi, lorsque le

taux de cholestérol est faible, la faible concentration d'acide gras dans le sang entraîne une augmentation de la disponibilité de l'albumine pour fixer le tryptophane, ce qui a pour conséquence une diminution du tryptophane disponible au niveau du SNC et donc une diminution de la synthèse de sérotonine. Pour confirmer cette hypothèse, Steegmans et al. [199] ont mis en évidence qu'une diminution du taux de cholestérol pouvait induire une diminution du niveau de sérotonine cérébral.

Facteurs de risques comportementaux

Le tabac est associé à une augmentation des risques de morbidité et de mortalité par maladies cardiovasculaires. Le risque relatif de mortalité cardiovasculaire associé avec chaque paquet additionnel de cigarettes fumées par jour est de 1.39 [200]. Une étude de 1998 a suggéré qu'une histoire de dépression majeure triple le risque de devenir fumeur, et la consommation quotidienne de tabac double le risque de dépression [201]. La prévalence de la dépression chez les fumeurs, de 30% à 40% est significativement plus importante que les 5% à 10% observé dans la population générale [202, 203]. Les fumeurs dépressifs ont moins de chance de stopper leur consommation de tabac et ont plus de chance d'expérimenter les symptômes du sevrage durant l'effort d'abstinence [204]. Tous ces facteurs combinés démontrent que la prévalence du tabac est plus importante dans la population dépressive.

Le profil de risque cardiovasculaire de la consommation d'alcool semble biphasique. En effet, un grand nombre d'études prospectives ont mis en évidence une relation inverse entre l'augmentation de la fréquence de consommation d'alcool et une diminution des risques cardiovasculaires. La consommation d'un verre d'alcool standard (10 g) tous les deux jours semble avoir des effets coronariens protecteurs. Au contraire, une consommation abusive d'alcool est associée soit à une diminution des effets protecteurs soit à une augmentation des risques de morbidité et de mortalité cardiovasculaire. Une consommation d'alcool importante et abusive sur une courte période entraîne des risques d'événements coronariens et cérébrovasculaires importants [205]. L'augmentation des risques cardiovasculaires chez les consommateurs abusifs d'alcool inclut les cardiomyopathies, l'hypertension, l'arythmie ventriculaire, les accidents cérébrovasculaires hémorragiques et la crise cardiaque [206, 207]. En plus de ces effets sur le système cardiovasculaire, une intoxication à l'alcool produit des symptômes dépressifs sévères durant les épisodes de consommation abusive [208]. Une consommation abusive d'alcool, provoquant des « saouleries » avec une intoxication, des « gueules de bois » ou des évanouissements déclenche des symptômes dépressifs dans la population générale. La fréquence des « gueules de bois » représente le meilleur prédicteur de

l'apparition des symptômes dépressifs [209]. De plus, la relation entre la consommation d'alcool et le taux de mortalité sur 11 ans révèle une interaction importante de la dépression pour les consommateurs abusifs d'alcool [210]. Ainsi, bien que de nombreuses études aient mis en évidence un taux de dépression élevé parmi la population dépendante à l'alcool [211-215], il est difficile de distinguer si la consommation abusive d'alcool précède l'apparition des symptômes dépressifs ou si la dépression déclenche cette consommation abusive d'alcool.

De nombreuses évidences suggèrent que la dépression précipite le développement de maladies cardiovasculaires par de nombreux mécanismes physiopathologiques tels que la dérégulation du SNA, les modifications plaquettaires, l'inflammation et le dysfonctionnement endothélial (tous ces mécanismes sont revus en détail dans une seconde partie). Il est possible que des facteurs diététiques affectent à la fois la dépression et les maladies cardiovasculaires à travers ces mécanismes. Un des facteurs diététiques potentiel sont les acides gras poly-insaturés oméga-3 [216]. En effet, des anomalies métaboliques induites par une réduction de la prise d'acides gras essentiels prédisposent à la fois aux maladies cardiovasculaires [217, 218] et à la dépression [219]. L'oméga-3 que l'on retrouve principalement dans le poisson semble exercer un effet vasculaire protecteur. En effet, une augmentation des risques cardiovasculaires est associée à une faible concentration en oméga-3 plasmatique [220]. De plus, une consommation régulière de poisson améliore le pronostic cardiovasculaire en augmentant la variabilité de la fréquence cardiaque par ses effets anti-arythmique, anti-thrombotique et anti-inflammatoire. L'augmentation de la consommation d'oméga-3 améliore également la relaxation endothéliale induite par l'oxyde nitrique [216]. Une étude a également démontré qu'un supplément alimentaire en oméga-3 réduisait significativement la mortalité ainsi que le développement d'infarctus du myocarde et cérébral [221]. D'un autre côté, depuis que la consommation en oméga-3 par le poisson et autres sources est en déclin dans certaines populations, l'incidence de dépression majeure a augmenté [222]. En effet, une corrélation inverse entre la consommation annuelle de poisson et la prévalence de dépression majeure existe dans de nombreux pays. D'autres études ont mis en évidence une association entre la consommation d'oméga-3 et la dépression post-partum [223, 224] ou les troubles bipolaires [225]. Une étude réalisée sur des patients après un événement cardiaque montre que les patients dépressifs présentent une concentration en oméga-3 significativement plus faible que les patients non dépressifs [226]. De plus, l'acide écosapentanoïc (EPA) que l'organisme convertit en acide docosahexaénoïc (DHA) sont deux acides gras oméga-3 qui présentent des

propriétés antidépressives chez l'homme. Un supplément alimentaire en oméga-3 stimule l'amélioration de l'humeur chez les patients dépressifs [227].

L'inactivité physique est un mécanisme qui semble commun à la dépression et aux maladies cardiovasculaires [35]. Il a été proposé de décrire sous le terme de "syndrome de fatigue chronique" un tableau clinique caractérisé par une fatigue persistante non soulagée par le repos, un sommeil non réparateur, des perturbations mnésiques et de concentration, des maux de tête, des maux de gorge fréquents ou récurrents, un gonflement des ganglions lymphatiques, des douleurs musculaires ou articulaires et la présence de symptômes dépressifs [228]. Ce syndrome de fatigue chronique est souvent présent chez les patients dépressifs [229]. Les similarités comportementales de la dépression et du syndrome de fatigue chronique suggèrent que ces deux pathologies peuvent impliquer des mécanismes physiopathologiques communs. Un traitement AD à la fluoxétine représente également un traitement efficace du syndrome de fatigue chronique. Le syndrome de fatigue chronique peut apparaître chez les individus vulnérables à la dépression ; cependant les perturbations psychologiques pourraient être une conséquence plutôt qu'une cause du syndrome de fatigue chronique [230]. Un tel excès de fatigue, particulièrement chez les personnes âgées, peut jouer un rôle important dans l'interaction entre la dépression et les maladies cardiovasculaires. En effet, un excès de fatigue est considéré comme prédicteur de l'infarctus du myocarde et de la crise cardiaque [231, 232]. L'épuisement, caractérisé par une diminution de la vitalité et de la libido, une indolence, de la fatigue et une augmentation de l'irritabilité [232], représente un facteur de risque à court terme pour le développement récurrent d'infarctus du myocarde. De plus, une étude effectuée sur des patients avec des maladies cardiovasculaires, a démontré que presque tous les patients qui sont également dépressifs présentent des critères d'épuisement [233]. La possibilité que l'inactivité physique et la fatigue influencent la relation entre la dépression et les maladies cardiovasculaires est également supportée par le fait que l'exercice physique est une composante des programmes de traitement à la fois de la dépression et des maladies cardiovasculaires [234-236]. En effet, l'entraînement forcé améliore l'humeur et l'estime de soi des patients en réhabilitation cardiaque [237]. L'exercice physique améliore également la fréquence cardiaque, la sensibilité des barorécepteurs, la pression artérielle et la fonction vasculaire, qui ont une implication à la fois dans le développement de maladies cardiovasculaires et dans la dépression [238, 239].

La non-compliance, dans sa forme la plus massive, s'exprime par un refus du traitement et un abandon du suivi médical. La non-compliance à un régime médical précipite le pronostic de maladies cardiovasculaires. Deux études ont montré que le risque de mortalité pouvait doubler ou tripler chez les patients refusant leur traitement dans l'année qui suit un infarctus du myocarde. Selon les études, chez des patients cardiaques mais également chez les patients avec d'autres maladies telles que le syndrome d'immunodéficience acquis (SIDA) et l'asthme, la présence de dépression augmente les risques de non-compliance. De plus, les patients déprimés refusent plus souvent d'adhérer au programme de réhabilitation suite à un infarctus du myocarde. Cependant, la non-compliance elle-même, plutôt que la non-compliance associée à un traitement médical spécifique, pourrait être nuisible. En effet, l'adhérence à un traitement placebo a été associée à une amélioration du pronostic cardiovasculaire, suggérant que la non-compliance chez les malades cardiaques ou les patients à risque cardiovasculaire pourrait être un marqueur du pronostic cardiovasculaire.

2/ PHYSIOPATHOLOGIE DE LA DEPRESSION ET SES LIENS AVEC LA PATHOLOGIE VASCULAIRE

2.1 L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA)

L'axe HPA, identifié comme le principal système de réponse au stress, contrôle un grand nombre de fonctions centrales et périphériques telles que la régulation cardiovasculaire, la respiration, l'appétit, les comportements liés au stress et à l'humeur, la régulation du flux sanguin, l'analgésie liée au stress, ... Cependant, les changements d'activité de l'axe HPA accompagnent ceux d'autres systèmes biologiques centraux et périphériques qui jouent également un rôle important lors de la réponse physiologique au stress.

Fonctionnement de l'axe HPA

Lors de l'apparition d'un stress, les projections directes et indirectes des circuits corticolimbiques vers l'hypothalamus sont stimulées. Les médiateurs chimiques tels que la noradrénaline, la sérotonine et l'acétylcholine sont libérées pour activer les cellules du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus. Ce noyau possède deux types de neurones : les neurones magnocellulaires sécrétant l'ocytocine ou la vasopressine directement dans la circulation sanguine au niveau de la neurohypophyse (hypophyse postérieure) et les neurones parvocellulaires sécrétant le CRF (Corticotropin-released factor), la vasopressine ou le TRH (tyrotropine releasing hormone) dans le système porte hypothalamo-hypophysaire. Le CRF,

principal médiateur de la réponse au stress rejoint l'adénohypophyse (hypophyse antérieure) pour activer la sécrétion de l'hormone adrénocorticotrope (adrenocorticotropic hormone, ACTH) dans la circulation sanguine. La vasopressine, co-sécrétée par les neurones à CRF agit en synergie avec le CRF en tant que sécrétagogue de l'ACTH. Une fois libérée dans la circulation sanguine, l'ACTH parvient au niveau des glandes corticosurrénales pour stimuler la libération des hormones corticostéroïdes, acteur final de l'activation de l'axe HPA. Les hormones corticostéroïdes, principalement le cortisol chez l'homme et la corticostérone chez les rongeurs, agissent sur de multiples organes et structures cérébrales à travers deux types de récepteurs, les récepteurs de type I ou minéralocorticoïdes (MR) et les récepteurs de type II ou glucocorticoïdes (GR) (Figure 5).

En retour, les corticostéroïdes initient une boucle de rétrocontrôle négatif sur l'axe HPA afin d'atténuer la réponse au stress une fois que la situation stressante est passée, si bien qu'une forte libération de ces hormones aboutit, par le biais d'une cascade d'inhibition impliquant l'hypothalamus et l'hypophyse antérieure mais aussi d'autres structures centrales telles que le cortex préfrontal, l'amygdale et l'hippocampe, à une réduction de leur sécrétion subséquente [240, 241]. Les deux récepteurs MR et GR semblent tous les deux impliqués dans le rétrocontrôle de l'axe HPA [242]. En condition basale, lorsque le taux de cortisol ou de corticostérone est bas, ces hormones se lient principalement au récepteur de haute affinité le MR. Par contre, lors d'un stress et lorsque le taux est haut, le récepteur GR est également recruté. Ainsi, le rétrocontrôle négatif impliquerait une activité plus importante des GR, en requérant probablement la saturation concomitante des récepteurs MR. L'intervention des GR dans ce phénomène est largement corroborée par l'utilisation clinique de la dexaméthasone, qui a un effet agoniste assez important pour les GR et relativement faible pour les MR, dans l'évaluation du rétrocontrôle négatif sur l'axe HPA [243, 244]. Enfin, les neurones à CRF et à vasopressine du PVN établissent également des projections vers d'autres structures cérébrales et contribuent ainsi directement à la réponse au stress en agissant sur le comportement, l'humeur, le flux sanguin cérébral, le système cardiovasculaire, la respiration et l'appétit mais aussi sur le rétrocontrôle négatif de l'axe HPA [245, 246].

En condition physiologique, l'activation de l'axe HPA est un processus adaptatif nécessaire au maintien de l'homéostasie. L'action des glucocorticoïdes peut être divisée en trois rôles. Tout d'abord, les glucocorticoïdes auraient un rôle de régulateurs des composantes métaboliques, autonomiques, psychologiques, hémostatiques et cardiovasculaires de la réponse au stress. Cette action permissive aurait pour but de faciliter les effets vasculaires et métaboliques d'autres hormones telles que les catécholamines, le glucagon et l'angiotensine

II. Le second rôle des glucocorticoïdes serait suppressif en inhibant les processus inflammatoires, la prolifération cellulaire, la réparation tissulaire et l'effondrement circulatoire (collapsus). Le dernier rôle des glucocorticoïdes est de préparer l'organisme à une privation prolongée de nourriture en facilitant la protéolyse et la résistance à l'insuline au niveau musculaire. Cependant, lors d'une activation chronique de l'axe HPA, par exemple lors d'un stress fréquent, excessif ou lors d'un dysfonctionnement de ces médiateurs hormonaux, l'action des glucocorticoïdes peut devenir maladaptative et conduire à l'apparition de pathologies.

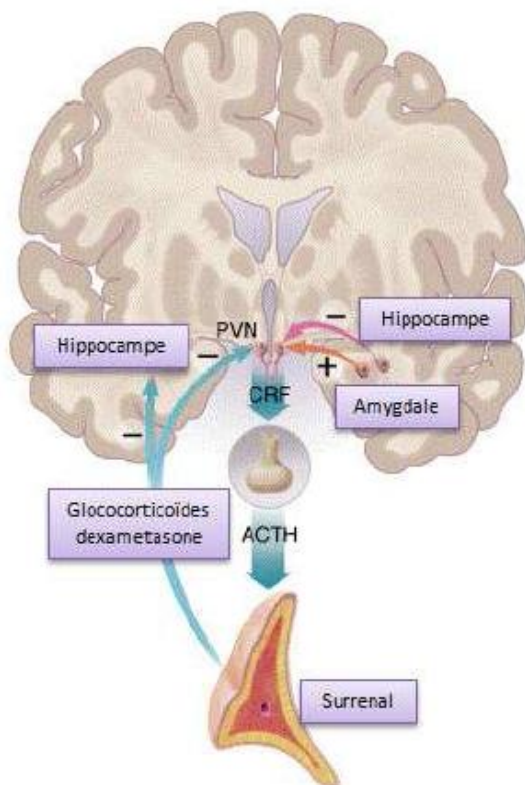


Figure 5 : Fonctionnement de l'axe HPA. Les neurones à CRF du PVN (paraventriculaire) intègrent l'information afférente excitatrice de l'amygdale et inhibitrice de l'hippocampe en réponse à un stress. D'autres entrées importantes peuvent provenir de la voie monoaminergique ascendante (non indiquée). Le CRF est libéré par ces neurones dans le système porte hypophysaire et agit sur les récepteurs CRF de l'hypophyse antérieure ; leur activation va entraîner la libération de l'ACTH. L'ACTH atteint le cortex surrénalien par voie sanguine, où elle stimule la libération de glucocorticoïdes. En plus de ces nombreuses fonctions, les glucocorticoïdes (y compris les formes synthétiques comme la dexaméthasone) répriment la synthèse et la libération de CRF et d'ACTH directement au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse mais aussi au niveau corticolimbique (hippocampe, cortex préfrontal, amygdale). De cette façon, les glucocorticoïdes peuvent inhiber leur propre synthèse. À des niveaux supérieurs, les glucocorticoïdes peuvent aussi affaiblir, et même endommager en cas d'excès, ces régulateurs ce qui pourrait maintenir les états hypercortisolémiques retrouvés fréquemment dans la dépression. Modifié d'après Nestler et al, 2002 [3].

Anomalies de l'axe HPA dans la dépression

La dépression est très fréquemment associée à des altérations neuroendocriniennes, en particulier une hyperactivité de l'axe HPA et un déficit du rétrocontrôle négatif (Figure 6). Ces observations suggèrent un lien causal entre ce dysfonctionnement et l'apparition de troubles dépressifs, ce qui est renforcé par la forte occurrence de symptômes dépressifs chez les sujets présentant un Syndrome de Cushing (hypertrophie des glandes surrénales à l'origine d'une hypersécrétion chronique de corticostéroïdes) [247]. Les patients dépressifs présentent une augmentation de la concentration plasmatique salivaire et urinaire de cortisol, une diminution fonctionnelle de l'activité des récepteurs GR et MR, une sensibilité exagérée des

glandes surrénales à la stimulation par l'ACTH, une diminution de la réponse de l'hypophyse par le CRF, une augmentation du volume des glandes surrénales et hypophysaires et un déficit du rétrocontrôle négatif [248]. L'altération du rétrocontrôle négatif, donnée la mieux répliquée chez les patients dépressifs, est basée sur une diminution de la suppression des corticostéroïdes par la dexaméthasone [243, 244]. Le test de suppression à la dexaméthasone (DST), consiste à injecter un corticostéroïde exogène -la dexaméthasone- ce qui induit dans les heures suivantes une diminution des glucocorticoïdes endogènes grâce à l'activation du rétrocontrôle négatif. Ce test montre qu'une grande proportion de patients dépressifs conserve une concentration en glucocorticoïdes endogènes élevée, indiquant une altération du rétrocontrôle négatif de l'axe HPA. De plus, la rémission clinique chez les patients présentant des anomalies de l'axe HPA est toujours associée à la normalisation de l'activité et du rétrocontrôle de l'axe HPA [244]. Afin de renforcer l'hypothèse d'une hyperactivité de l'axe HPA et d'une diminution du rétrocontrôle négatif, des études post mortem sur des patients dépressifs ont montré une diminution de l'expression des GR au niveau de l'hippocampe et du cortex préfrontal mais également du PVN et de l'hypophyse [249, 250]. De plus, de nombreuses études ont mis en évidence une implication du CRF et de la vasopressine dans la pathophysiologie de la dépression. Alors que le CRF serait recruté lors d'un stress aigu, la vasopressine serait impliquée lorsque ce stress devient chronique [251]. Les patients dépressifs présentent une augmentation du nombre de neurones à CRF et du nombre de neurones co-sécrétant le CRF et la vasopressine dans le PVN, ainsi qu'une augmentation du niveau d'expression du CRF dans les neurones du PVN [252, 253]. Les effets de cette élévation du système CRF pourraient directement contribuer à l'apparition de plusieurs signes et symptômes dépressifs puisque les effets des AD sont également liés à des modifications du système CRF. Les traitements AD diminuent la concentration de CRF dans le liquide céphalo-rachidien et facilitent la diminution de la synthèse de CRF à la suite d'une stimulation des récepteurs aux corticostéroïdes [254, 255]. De plus, l'utilisation d'antagoniste du CFR semble efficace dans certains modèles animaux de dépression et en clinique [256]. Le niveau de vasopressine et le nombre de neurones du PVN exprimant la vasopressine sont également élevés chez les patients dépressifs [257, 258]. Les différentes anomalies de l'axe HPA présentées semblent préexistantes à l'apparition des premiers symptômes dépressifs [243]. Ces résultats suggèrent que ces anomalies ne sont pas seulement corrélées aux troubles dépressifs mais peuvent les précipiter (Figure 6).

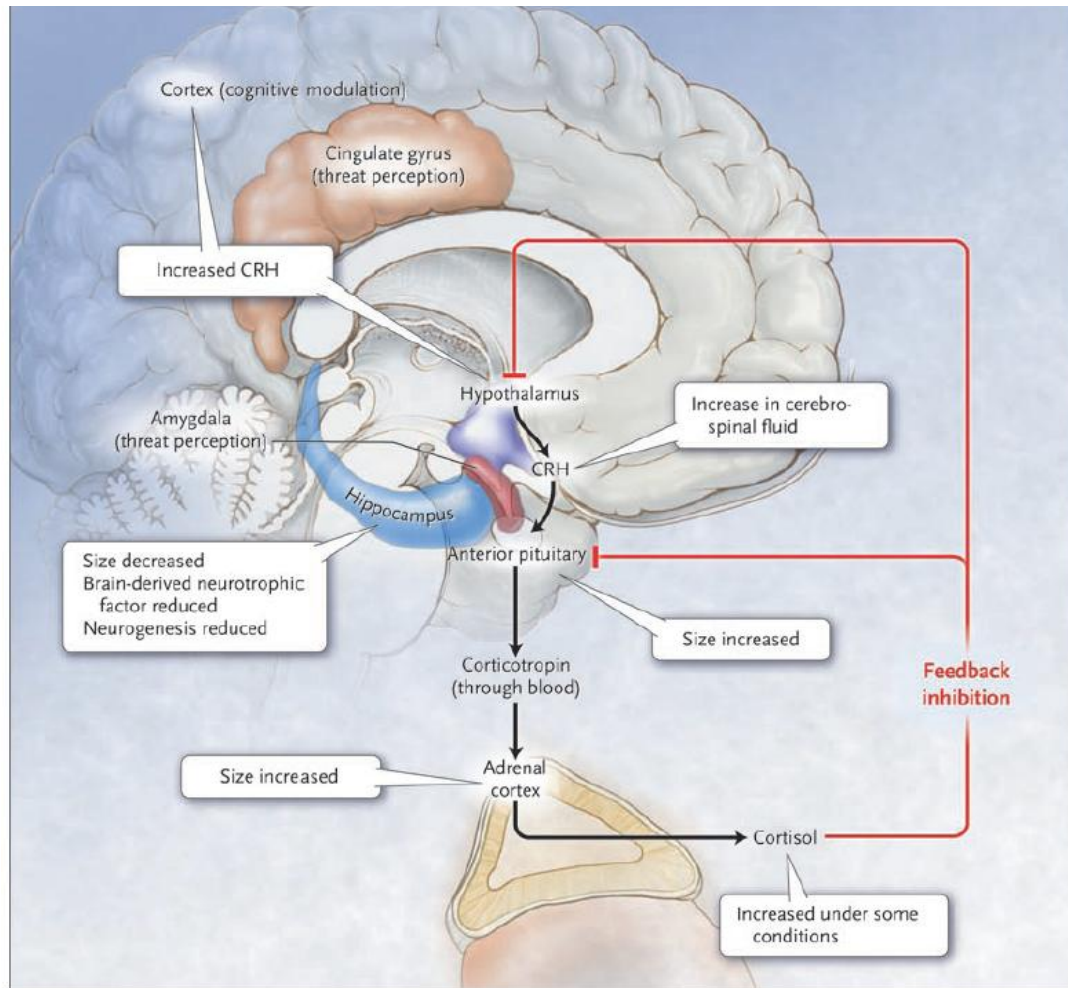


Figure 6: L'axe HPA dans la dépression. L'hypothèse d'un rôle de l'axe HPA dans la dépression postule que des anomalies de la réponse du cortisol puissent sous-tendre la dépression. Les flèches noires montrent qu'en réponse au stress qui a préalablement été perçu et identifié comme tel par les structures corticolimbiques impliquées dans cette réponse comme l'amygdale, le cortex préfrontal (dont le gyrus cingulaire) et l'hippocampe, le CRF et accessoirement la vasopressine (non représentée ici) vont être libérés. En atteignant l'hypophyse, ces deux molécules vont être à l'origine de la libération de l'ACTH dans le système circulatoire. Cette dernière va permettre aux glandes surrénales de sécréter le cortisol. Les lignes rouges indiquent que le cortisol, en retour, supprime la libération du CRF et du cortisol lui-même via l'hypophyse antérieure, l'hypothalamus mais aussi les structures corticolimbiques précitées. Les études sur la dépression indiquent que les niveaux de cortisol sont fréquemment augmentés dans la dépression sévère, les niveaux de CRF et de vasopressine sont également élevés. La taille, le nombre de neurones ou de cellules gliales ainsi que l'intégrité fonctionnelle des régulateurs corticolimbiques de la réponse au stress sont perturbés lors de la dépression notamment des anomalies de la régulation qu'ils exercent sur l'axe HPA. D'après Belmaker & Agam, 2008 [259].

Conséquences cardiovasculaires des anomalies de l'axe HPA

Un déficit en glucocorticoïdes, résultant généralement d'une altération des glandes surrénales ou hypophysaires peut induire une hypotension, une perte de poids, une hypoglycémie et la mort, spécifiquement au cours d'une situation stressante [260]. Inversement, un excès de glucocorticoïdes peut contribuer au développement d'hypertension, de résistance à l'insuline, d'hyperglycémie et de prise de poids [261, 262]. Ainsi, une

sécrétion excessive ou affaiblie de cortisol peut entraîner des conséquences néfastes sur la régulation cardiovasculaire.

Une activation de l'axe HPA peut accélérer le développement de maladies cardiovasculaires [263, 264]. Des études épidémiologiques ont montré une accélération de la formation d'athérosclérose lors d'une exposition prolongée et excessive aux glucocorticoïdes. En effet, les patients souffrant d'arthrite rhumatoïde ou de lupus traités aux glucocorticoïdes présentent des lésions d'athérosclérose plus fréquemment que les patients non traités aux stéroïdes [265, 266]. Dans ce cas, le risque d'athérosclérose est lié à la dose cumulative de corticostéroïdes. Dans les modèles animaux, les glucocorticoïdes peuvent également induire la formation d'athérosclérose [267]. De plus, dans le syndrome de Cushing, la mort par infarctus du myocarde ou cérébrale est plus fréquente que dans la population générale [268].

L'action des glucocorticoïdes sur le système cardiovasculaire passe par une multitude d'effets sur le métabolisme des lipides et des carbohydrates, la fonction endothéliale, le stress oxydatif, l'hémostase, les processus inflammatoires et de réparation tissulaire [263] (Figure 7). L'implication de chacun de ces mécanismes sur la régulation cardiovasculaire sera revue en détail dans une seconde partie. L'augmentation de l'adiposité viscérale et la diminution de la masse musculaire observées au cours du vieillissement pourraient résulter en partie d'une augmentation de l'activité des glucocorticoïdes [269, 270]. L'obésité viscérale chez les jeunes patients dépressifs pourrait s'expliquer par les effets tissulaires d'une hypercortisolémie [271]. Les glucocorticoïdes ont également un effet direct sur les lipides et les lipoprotéines en augmentant le niveau de LDL (en diminuant la concentration de récepteurs aux LDL), de triglycérides (en augmentant la production et la sécrétion de VLDL par le foie), et de HDL (en augmentant la synthèse des apolipoprotéines A du foie) [272-274]. Sur le métabolisme du glucose, les glucocorticoïdes induisent une résistance à l'insuline au niveau musculaire et hépatique et peuvent ainsi précipiter une hyperglycémie [275].

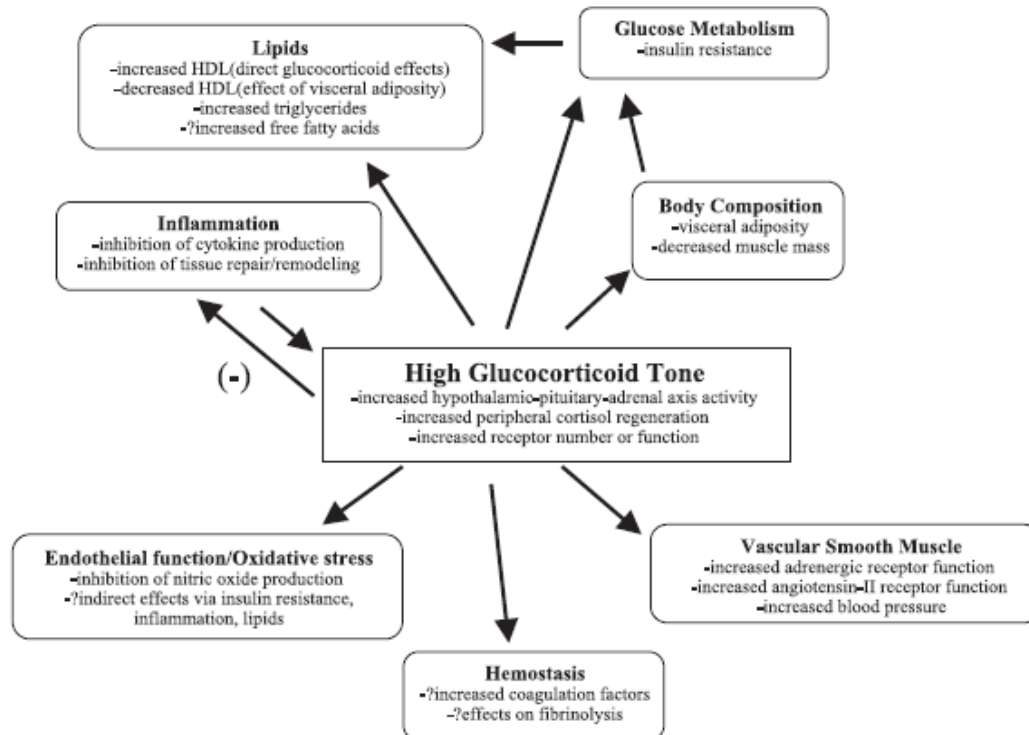


Figure 7: Effets des glucocorticoïdes sur les facteurs de risques cardiovasculaires. D'après Girod & Brotman, 2004 [263].

Les effets directs des glucocorticoïdes sur les organes cardiovasculaires impliquent une diminution de la prolifération et de la migration des cellules musculaires lisses ainsi qu'une augmentation de leur contractilité en réponse à la NA [276-280]. Au niveau des cellules endothéliales, les glucocorticoïdes induisent une diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium et une diminution de l'activité des NOSynthase ainsi qu'une augmentation de la libération de vasoconstricteurs tels que l'endothéline 1 [281-283]. Cette altération de la fonction endothéliale pourrait s'expliquer par une augmentation du stress oxydatif par les glucocorticoïdes [284]. Les glucocorticoïdes agissent également sur le tonus vasculaire par des mécanismes indépendants de l'endothélium, en augmentant la pression artérielle et les résistances périphériques via l'augmentation de l'activité des catécholamines, de l'angiotensine II et de l'endothéline 1 [285-287]. Sur les mécanismes hémostatiques, les glucocorticoïdes induisent une augmentation d'un grand nombre de facteurs impliqués dans les processus de coagulation tels que le vWf, le PAI, les complexes thrombine-antithrombine, les complexes plasmine-antiplasmine et certains facteurs tissulaires [288-293]. Finalement, les glucocorticoïdes agissent au niveau des mécanismes inflammatoires. Cependant la relation entre glucocorticoïdes, inflammation et maladies cardiovasculaires est complexe [294]. Une injection aigue de glucocorticoïdes est associée avec une diminution du

niveau circulant de cytokines (IL-1, IL-6, TNF- α) [295, 296]. De la même façon, une exposition à court terme aux glucocorticoïdes atténue la sécrétion d'un grand nombre de médiateurs de lésions vasculaires : l'expression des molécules d'adhésion cellulaire (ICAMs, Sélécine), la chemotaxie et la phagocytose des monocytes, l'oxydation des LDL, l'activation des cellules T, le dépôt de matrice extracellulaire et de collagène, la prolifération des cellules musculaires lisses et l'activation des métalloprotéïnases de la matrice [297-301]. Cependant, cet effet anti-inflammatoire des glucocorticoïdes peut décroître lors d'une exposition à long terme [302]. En effet, bien que la majorité des études cliniques considèrent l'action des glucocorticoïdes comme anti-inflammatoire, il est devenu de plus en plus évident que les glucocorticoïdes n'agissent pas de façon monolytique pour supprimer l'activation in vivo de la réponse immunitaire inflammatoire. Des études récentes mesurant l'action des glucocorticoïdes sur la réponse inflammatoire supportent l'hypothèse selon laquelle les glucocorticoïdes pourraient stimuler les médiateurs de la réponse inflammatoire à une lésion et une infection, et plus particulièrement la réponse inflammatoire immunitaire innée. Inversement, la libération de cytokines au niveau du site de lésions est capable d'activer l'axe HPA en stimulant la libération de CRH, d'ACTH et de cortisol [303-309]. Les principales cytokines impliquées dans cette réponse précoce, IL-1, IL-6 et TNF- α , représenteraient le lien majeur entre l'axe HPA et le système inflammatoire.

Ainsi, une sur-activation de l'axe HPA impliquant une sécrétion chronique et excessive de glucocorticoïdes, comme observé chez certains patients dépressifs, agit à différents niveaux sur le système cardiovasculaire en accélérant les processus physiopathologiques responsables de la formation d'athérosclérose et accélérateurs de maladies cardiovasculaires. Les glucocorticoïdes contribuent également au développement de facteurs de risques cardiovasculaires tels que le diabète, l'obésité et l'hypertension. Ainsi, aussi bien les effets cardiovasculaires d'un excès de glucocorticoïdes, que les effets des cytokines inflammatoires libérées au cours d'une lésion vasculaire sur l'activation de l'axe HPA pourraient expliquer le lien bidirectionnel entre la dépression et les maladies cardiovasculaires.

2.2 Le système nerveux autonome (SNA)

Physiologie du SNA

Le système nerveux autonome (SNA), via ses divisions en système sympathique et parasympathique, influence la fonction de presque tous les systèmes organiques afin de maintenir l'homéostasie [310]. Cette fonction est réalisée grâce à l'intégration plutôt complexe d'informations sensorielles autonomes et somatiques et d'informations descendant des centres supérieurs du système nerveux central (SNC). Le SNA est considéré comme le système nerveux efférent contrôlant les fonctions viscérales et plus particulièrement la fonction cardiaque, gastro-intestinale et des glandes sécrétrices. Cependant, les fonctions du SNA ne sont pas uniquement représentées par un système moteur étant donné que les innervations viscérales présentent également des fibres afférentes fournissant un rétrocontrôle au SNC. En effet, l'activité afférente du SNA est largement régulée par des réflexes autonomes. Dans la plupart de ces réflexes, l'information sensorielle est transmise aux centres de contrôle homéostatique, en particulier ceux localisés dans l'hypothalamus et le tronc cérébral. Une fois l'information sensorielle intégrée au niveau de l'hypothalamus ou du tronc cérébral, la réponse est réalisée par la transmission d'un signal nerveux modifiant l'activité des neurones autonomes préganglionnaires et provoquant une modification de l'activité du SNA. Ainsi, beaucoup de variations de l'organisme (fréquence cardiaque, pression artérielle, température corporelle, faim, soif, osmolarité) sont enregistrées et régulées au niveau de l'hypothalamus et du tronc cérébral. Un exemple de réflexe autonome important est celui des barorécepteurs, récepteurs sensoriels localisés dans les artères systémiques majeures qui ont pour but d'enregistrer les variations de pression artérielle. Ainsi, si la pression artérielle diminue, le nombre de pulse sensoriels transmis par les barorécepteurs au centre vasomoteur du tronc cérébral diminue également. En réponse aux variations de stimulations des barorécepteurs et des entrées sensorielles du tronc cérébral, l'activité du SNA au niveau du cœur et des vaisseaux sanguins est ajustée, induisant une augmentation de la fréquence cardiaque et des résistances vasculaires. Ainsi, la pression artérielle augmente également pour revenir à la normale. Cependant, les centres nerveux contrôles de l'hypothalamus et du tronc cérébral sont également sous l'influence de centres cérébraux supérieurs. Plus spécifiquement, le cortex cérébral et le système limbique influencent l'activité du SNA associée aux réponses émotionnelles par les voies relais de l'hypothalamus et du tronc cérébral.

Le SNA est donc composé de deux systèmes, le système sympathique et le système parasympathique, ayant des fonctions parallèles mais dont l'organisation des voies et les

neurotransmetteurs sont différents. Les axones préganglionnaires du système sympathique naissent des régions thoracique et lombaire de la moelle épinière et leurs axones passent par les racines ventrales pour former des synapses sur les ganglions de la chaîne sympathique qui longe la colonne vertébrale. En revanche, les neurones préganglionnaires du système parasympathique émergent du tronc cérébral et de la partie sacrée de la moelle épinière et leurs axones se prolongent dans les nerfs crâniens aussi bien que dans les nerfs de la moelle sacrée, de telle manière que les deux systèmes apparaissent de ce point de vue comme anatomiquement complémentaires. Les neurones préganglionnaires des deux systèmes sympathique et parasympathique, libèrent le même neurotransmetteur, l'acétylcholine capable d'activer les neurones postganglionnaires en se fixant sur ces récepteurs nicotiniques. Par contre, les cellules post ganglionnaires des deux systèmes utilisent des neurotransmetteurs différents. Les neurones postganglionnaires du système parasympathique libèrent de l'acétylcholine qui en se fixant à ces récepteurs muscariniques induit des effets très localisés sur ces cibles, alors que les neurones postganglionnaires du système sympathique utilisent en grande partie la noradrénaline qui a une influence beaucoup plus diffuse, y compris dans le sang où elle circule librement. Les cibles du système nerveux autonome couvrent pratiquement toutes les régions du corps. Ainsi, il est notable que les systèmes sympathique et parasympathique :

- Innervent les glandes sécrétrices (salivaires, sudoripares, et diverses glandes sécrétant du mucus) ;
- Innervent le cœur et les vaisseaux sanguins pour contrôler la pression artérielle et le flux sanguin ;
- Innervent les bronches dans les poumons, pour s'adapter au besoin énergétique du corps notamment en terme d'apport d'oxygène ;
- Contrôlent les fonctions digestives et métaboliques du foie, du tractus gastro-intestinal et du pancréas ;
- Contrôlent le rein, la vessie, le gros intestin et le rectum ;
- Jouent un rôle essentiel dans la réponse sexuelle des organes génitaux et de la reproduction ;
- Sont en interaction avec le système immunitaire.

Ces deux systèmes sont actifs de façon tonique, ils produisent des entrées nerveuses à un tissu donné de façon continue. Ainsi, la fréquence de décharge des neurones de chacun des systèmes peut soit augmenter ou diminuer. En réponse, l'activité du tissu sera stimulée ou inhibée. Étant donné que les systèmes sympathiques et parasympathiques ont des effets

opposés sur un tissu donné, l'augmentation de l'activité d'un système est accompagnée simultanément de la diminution de l'autre système résultant un contrôle précis et rapide de la fonction du tissu cible (figure 8). Ainsi, chaque système est dominant dans certaines conditions différentes. Le système sympathique prédomine durant l'émergence de réactions « flight or fight » (fuir ou combattre) par exemple lors d'une situation stressante et durant l'activité physique. En général, dans ces conditions, la fonction du système sympathique est de préparer l'organisme aux réactions de défense ou à une activité physique vigoureuse. Le système parasympathique quant à lui prédomine en condition de repos. En général, sa fonction est de conserver et de stocker l'énergie et de réguler les fonctions de base de l'organisme.

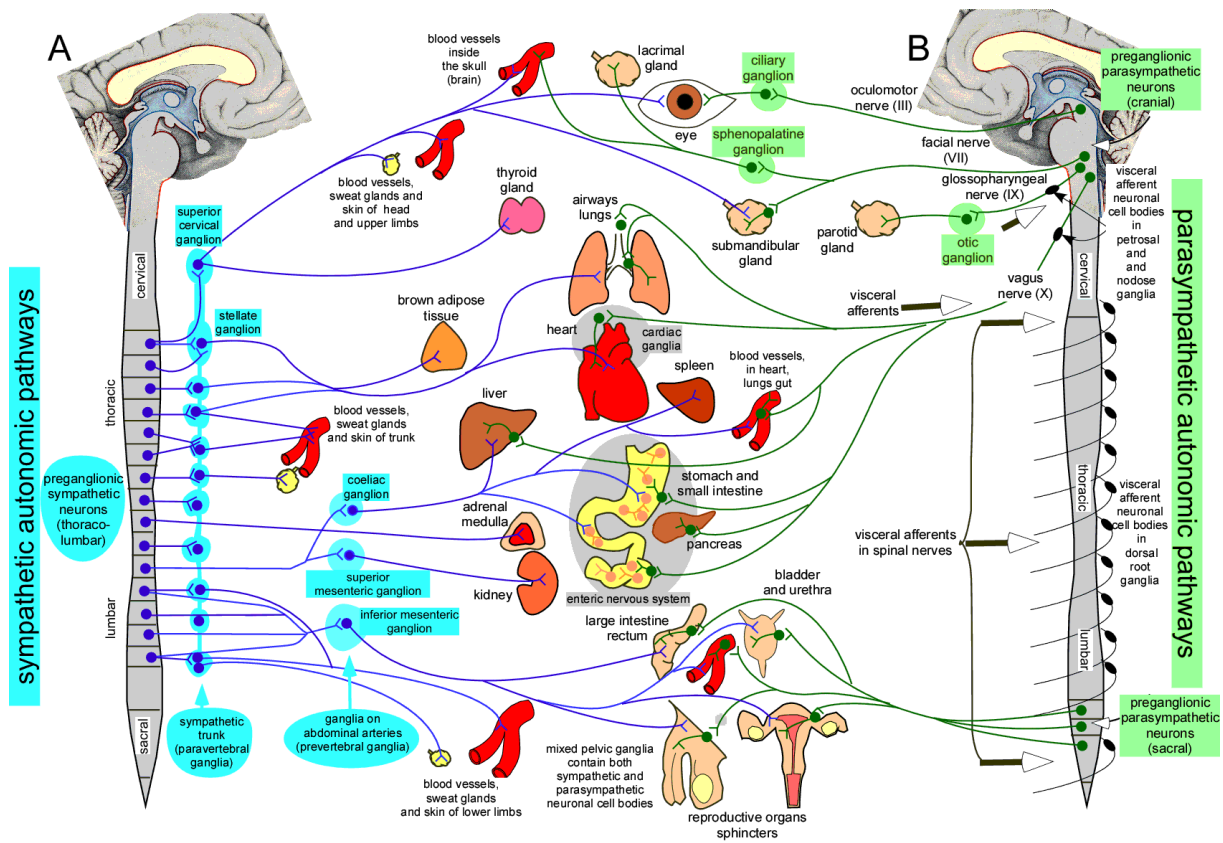


Figure 8: Résumé des innervations neuronales autonomiques des systèmes nerveux sympathique (A) et parasympathique (B). Figure adaptée de Gray's Anatomy 31st Edition 1954, et de Cannon and Rosenblueth Physiology of the Autonomic Nervous System, 1937.

Physiopathologie du SNA et dépression

Un déséquilibre des fonctions autonomes, associé à la morbidité et la mortalité cardiovasculaire, a également été mis en évidence dans la dépression [311]. En effet, de

nombreuses études ont montré une augmentation du taux de noradrénaline plasmatique et urinaire chez les patients dépressifs en comparaison à une population témoin [312-316]. Veith et al. [317] ont démontré que l'augmentation du taux de NA plasmatique circulante chez les patients dépressifs reflète une augmentation de l'activité globale du système nerveux sympathique. De la même façon, en comparaison aux patients non dépressifs, les patients dépressifs présentent une augmentation de la fréquence cardiaque ainsi qu'une diminution de sa variabilité [315, 318, 319]. Les patients dépressifs présentant une angine de poitrine ou une récente histoire d'infarctus du myocarde ont également une variabilité de la fréquence cardiaque plus basse que les patients non dépressifs. Peu d'études ont étudié les effets de la dépression sur les deux autres paramètres reflétant une modulation cardiaque du SNA : la fonction des barorécepteurs et la repolarisation ventriculaire. Grossman et al. [320] ont montré que la dépression est associée à une diminution du contrôle baroréflexe du cœur chez les patients souffrant de maladie coronarienne. Pitzalis et al. [321] ont trouvé également une réduction de la fonction des barorécepteurs chez les patients présentant une dépression post infarctus du myocarde. Sur 24h, la variabilité QT à l'électrocardiogramme est significativement plus élevée chez les patients dépressifs souffrant de maladie coronarienne que chez les non dépressifs sur 2 des 8 périodes d'enregistrement [322].

Physiopathologie du SNA et pathologies cardiovasculaires

En effet, l'importance de l'innervation du SNA dans l'organisme et notamment l'innervation cardiovasculaire laisse supposer qu'un dérèglement du SNA serait impliqué dans la pathogenèse de nombreuses maladies et notamment des maladies cardiovasculaires. En effet, un déséquilibre des fonctions autonomes, mis en évidence par une augmentation de l'activité du système sympathique et une diminution de l'activité du système parasympathique, est associé d'une part aux facteurs de risques cardiovasculaires tels que l'hypertension, une augmentation de l'indice de masse corporelle et l'augmentation du glucose sanguin et d'autres part aux évènements cardiovasculaires aigus et chroniques incluant l'athérosclérose, l'infarctus du myocarde, l'arythmie et l'insuffisance cardiaque [323]. Plusieurs paramètres tels que l'augmentation de la concentration plasmatique et de l'enrichissement (spillover) en noradrénaline, l'augmentation de la fréquence cardiaque et la diminution de sa variabilité et l'altération de la sensibilité des barorécepteurs reflètent les modulations du SNA et plus spécifiquement l'augmentation de l'activité sympathique chez les patients cardiaques.

En plus de son action directe sur les rythmes cardiovasculaires, un dérèglement du SNA est associé avec des événements physiopathologiques majeurs impliqués dans l'initiation du processus d'athérosclérose. En effet, une activation exacerbée du système nerveux sympathique peut altérer la fonction endothéliale et augmenter les processus athérogéniques médiés par l'endothélium. Inversement, une altération de la fonction endothéliale peut influencer le SNA en modifiant la libération et la recapture des neurotransmetteurs ainsi que la sensibilité de leurs récepteurs. L'altération du SNA est également associée à une augmentation de l'activation plaquettaire, ce qui contribue à l'agrégation et à l'adhésion plaquettaire au niveau de la paroi des vaisseaux. Le stress oxydatif contribue également à l'altération de la fonction du SNA. L'oxydation peut induire la mort des cellules nerveuses et plus spécifiquement, le péroxynitrite (formé de l'interaction entre un anion superoxyde avec le NO) représente le principal agent oxydant capable d'induire l'apoptose des neurones du SNA [324].

Ainsi, de nombreuses évidences viennent appuyer l'hypothèse d'une dérégulation du SNA dans la dépression qui pourrait être responsable de la comorbidité entre la dépression et les maladies cardiovasculaires : une augmentation de la fréquence cardiaque basale, une augmentation de la fréquence cardiaque sur 24h, une augmentation de la fréquence cardiaque en réponse à un stress physique, une diminution de la variabilité de la fréquence cardiaque, une diminution de la sensibilité des barorécepteurs et une variabilité élevée de la repolarisation ventriculaire sont tous des facteurs associés avec une augmentation de la mortalité et morbidité cardiaque, et plus spécifiquement chez des patients vulnérables post infarctus du myocarde.

2.3 Les systèmes de neurotransmissions monoaminergiques centraux

Les systèmes de neurotransmission monoaminergique, et plus spécifiquement noradrénergique et sérotoninergique, participent à un grand nombre de fonctions centrales et périphériques. Ils jouent un rôle global de régulateur de l'organisme en contribuant aux variations des rythmes chronobiologiques de fonctions vitales en réponse aux informations qu'il reçoit : cognition, attention, humeur/anxiété, veille/sommeil, comportement alimentaire, comportement sexuel, activité cardiovasculaire, activité viscérale. Les corps cellulaires des neurones sérotoninergiques et noradrénergiques sont situés très majoritairement au niveau du tronc cérébral respectivement dans les noyaux du raphé et dans le locus coeruleus; ils

innervent, à partir de leurs fibres ascendantes, une grande partie des structures cérébrales dont les réseaux du circuit limbique, du striatum, et du cortex préfrontal.

Hypothèse monoaminergique de la dépression

L'implication des monoamines dans l'étiopathogenèse de la dépression a été établie au milieu du XXème siècle grâce à l'utilisation de la réserpine, un alcaloïde utilisé dans le traitement de l'hypertension artérielle. En effet, l'administration de cette substance produisait une altération de l'humeur et des symptômes dépressifs chez 15% des patients traités, associée à une déplétion de la neurotransmission monoaminergique cérébrale. Ces observations ont abouti à l'hypothèse qu'un déficit monoaminergique pouvait être à l'origine de la dépression. Cette hypothèse allait recevoir un crédit supplémentaire avec la mise en évidence dans les années 1950 des propriétés antidépressives d'inhibiteurs de la monoamine oxydase (IMAO) comme celle de l'isoniazide, un traitement antituberculeux [325]. Les IMAO agissent en réprimant la dégradation oxydative de neurotransmetteurs monoaminergiques comme la 5-HT, la NA et la dopamine. Les effets de ces substances ont d'abord été testés chez des patients atteints de tuberculose, et ont ensuite été étudiés chez des dépressifs non tuberculeux, aboutissant à l'observation que cette substance était efficace dans le traitement de la dépression. A la même époque, une autre molécule s'est révélée capable d'améliorer l'humeur de patients déprimés. Il s'agissait de l'imipramine, un composé tricyclique capable d'inhiber l'activité des transporteurs de la 5-HT et de la NA suspendant leur recapture [326]. Puis, au fil des années, l'amélioration de la spécificité des molécules synthétisées a conduit à l'apparition des IMAO sélectifs et réversibles, ainsi qu'à celles des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la 5-HT (SSRI) et/ou de la NA [327-329].

Toutes ces observations ont permis de proposer une hypothèse monoaminergique de la dépression qui suppose que la dépression est due à un déficit de la neurotransmission monoaminergique et qu'elle peut être traitée par des traitements qui augmentent cette activité [330-332]. Cependant, cette théorie présente plusieurs limites. Premièrement, il existe certains composés capables d'augmenter l'activité monoaminergique tel que la cocaïne et les amphétamines mais qui n'ont aucun effet clinique dans le traitement de la dépression. Deuxièmement, tous les patients dépressifs ne répondent pas de façon équivalente au même traitement AD puisque l'efficacité thérapeutique des AD existe chez seulement 30 à 40% des patients. Finalement, alors que les modifications du niveau des monoamines dans la synapse apparaissent quelques heures après l'administration de l'AD, l'efficacité thérapeutique nécessite une administration continue du traitement pendant plusieurs semaines [333]. Pour

toutes ces raisons, l'hypothèse monoaminergique de la dépression a été modifiée (Figure 9) ; elle suggère actuellement que l'augmentation aiguë du niveau de monoamine synaptique représenterait uniquement une étape précoce de la cascade d'évènements complexes qui permettrait aux AD d'acquérir une efficacité thérapeutique [334, 335]. L'augmentation aiguë des monoamines au niveau synaptique induirait une désensibilisation des récepteurs inhibiteurs entraînant une activité monoaminergique importante, qui coïncide avec l'apparition de la réponse thérapeutique. Ces modifications adaptatives responsables des effets thérapeutiques des AD dépendent de la disponibilité des monoamines au niveau synaptique puisque la déplétion de ces monoamines est reversée par un traitement AD et elle peut causer une rechute lors de l'arrêt du traitement. De plus, le blocage des autorécepteurs au niveau somatodendritique ou des terminaisons nerveuses entraîne une augmentation du taux de réponse au traitement et une diminution du taux de dépression résistante aux AD. Ces éléments supportent l'hypothèse selon laquelle l'effet des AD résulterait d'un changement adaptatif à long terme des autorécepteurs et des hétérorécepteurs monoaminergiques. Ainsi, les recherches effectuées sur les mécanismes impliqués dans la dépression à travers l'étude des effets à long terme des AD, de la fonction et de la densité des récepteurs et sur les tissus post-mortem de patients dépressifs, suggèrent un rôle important des monoamines dans la dépression.

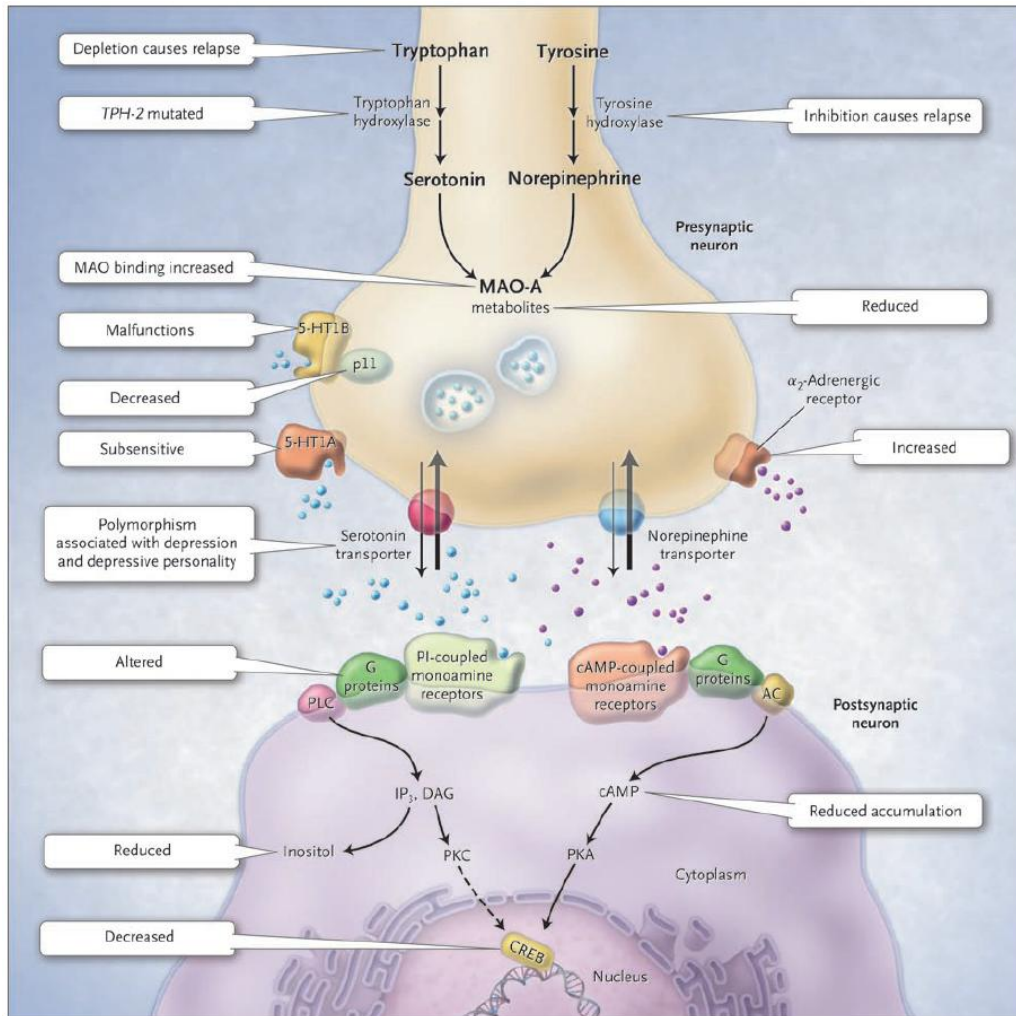


Figure 9: Hypothèse de la déplétion monoaminergique dans la dépression. L'hypothèse monoaminergique de la dépression postule un déficit en neurotransmetteurs sérotoninergique et noradrénergique dans le cerveau. La neurotransmission monoaminergique est médiée par la libération de sérotonine (5HT) et de noradrénaline (NA) au niveau des neurones présynaptiques. La 5HT est synthétisée à partir du tryptophane avec comme étape clé la catalisation par la tryptophane hydroxylase alors que la NA est synthétisée à partir de la tyrosine avec comme étape clé la catalisation par la tyrosine hydroxylase. Ces deux neurotransmetteurs sont stockés dans des vésicules au niveau du neurone présynaptique et libérés dans l'espace synaptique pour agir à la fois au niveau des neurones pré et post synaptiques. L'arrêt de l'action synaptique des neurotransmetteurs est mise en place grâce à leur recapture par les transporteurs spécifiques de la 5HT et de la NA ainsi que par un rétrocontrôle de leur libération par les récepteurs 5HT_{1A} et 5HT_{1B} pour la 5HT et α₂-NA pour la NA. La monoamine oxydase A (MAO-A) catalyse les monoamines au niveau présynaptique et en conséquence régule le contenu des vésicules. La protéine p11, qui interagit avec les récepteurs 5HT_{1B} augmente leur fonction. Au niveau post-synaptique, la 5HT et la NA se fixe à deux types de récepteurs couplés aux protéines G, les récepteurs couplés à l'AMP cyclique (cAMP) qui activent l'adénylate cyclase afin de générer de l'AMPC et les récepteurs couplés à la phosphatidylinositol (PI) qui activent la phospholipase C (PLC) pour générer l'inositol triphosphate (IP₃) et la diacylglycérol (DAG) ; La cAMP active la protéine kinase A (PKA) alors que l'IP₃ et la DAG activent la PKC. Les deux PK affectent la réponse CREB. Les observations chez les patients dépressifs supportant l'hypothèse d'une déplétion monoaminergique dans la dépression ont mis en évidence chez les patients dépressifs : l'inhibition de la tyrosine hydroxylase ou une déplétion en tryptophane alimentaire, une augmentation de la fréquence de mutation affectant la TPH-2, une augmentation de la fixation des ligands à la MAO, une diminution de la sensibilité des récepteurs 5HT_{1A}, un mauvais fonctionnement des récepteurs 5HT_{1B}, une diminution du niveau de p11, un polymorphisme des transporteurs à la 5HT, une réponse inadéquate des protéines G, une diminution du niveau de cAMP, d'inositol, et de CREB dans les cerveaux post mortem de patients dépressifs. D'après Belmaker et Agam, 2008 [259].

Implication des systèmes monoaminergiques dans les troubles cardiovasculaires

Le rôle des systèmes de neurotransmissions monoaminergiques, et plus spécifiquement noradrénergiques et sérotoninergiques, ne se limite pas à la régulation de l'humeur. Les monoamines centrales sont impliquées dans un grand nombre de fonctions centrales et périphériques et il apparaît qu'un dysfonctionnement de la transmission monoaminergique centrale peut être délétère pour le système cardiovasculaire. Les systèmes noradrénergique et sérotoninergique sont recrutés et activés en réponse au stress ce qui pourrait expliquer qu'ils soient affectés dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires tels que l'infarctus du myocarde ou l'hypertension. De nombreuses études ont mis en évidence un lien entre certaines pathologies du système cardiovasculaire et les systèmes de neurotransmissions monoaminergiques, spécifiquement sérotoninergiques et noradrénergiques qui pourraient expliquer le lien entre dépression et maladies cardiovasculaires.

En ce qui concerne le système noradrénergique, de nombreuses études ont tenté de faire le lien entre la transmission noradrénergique centrale et de nombreux mécanismes physiologiques et pathophysiologiques qui peuvent soit directement endommager le système cardiovasculaire soit être délétères lorsque le système cardiovasculaire est déjà affecté. Au moins trois mécanismes ressortent de la littérature, notamment la régulation de l'activité du système nerveux sympathique, l'interférence avec l'homéostasie de l'eau et du sel et la modulation des réflexes cardiovasculaires qui sont également contrôlés par le système sympathique.

Au niveau du système nerveux central, les deux principaux sous types de récepteurs sérotoninergiques impliqués dans la modulation cardiaque et le contrôle vasculaire sont les récepteurs 5HT_{1A} et 5HT_{2A}. Le système sérotoninergique interagit avec les fonctions endocrines et autonomiques pour influencer la régulation cardiovasculaire. En effet, les AD qui altèrent la fonction sérotoninergique peuvent également altérer la concentration circulante d'ACTH et de cortisol ou de corticostérone. Ces effets semblent être médiés par l'innervation sérotoninergique des neurones au CRF dans le noyau paraventriculaire de l'hippocampe. L'action de la 5HT dans l'hypothalamus peut jouer un rôle dans la régulation hormonale en réponse au stress. La destruction des neurones 5HT augmente l'effet inhibiteur de la dexamétasone en réponse au stress. Il a également été démontré que les vaisseaux sanguins présentant des lésions dues à de l'hypertension ou de l'athérosclérose sont hypersensibles aux effets vasoconstricteurs de la 5HT. Une altération du niveau de 5HT dans le système nerveux central est observée chez les rongeurs lors d'une ischémie du myocarde. Un polymorphisme

des transporteurs à la 5HT est associé avec un risque élevé d'infarctus du myocarde. Finalement, un dysfonctionnement des plaquettes, en partie régulées par la 5HT et qui influence la pathogenèse de maladies cardiovasculaires a été décrit chez les patients dépressifs. Ces observations font le point sur le lien entre la dépression et la régulation neuroendocrinienne et autonome impliquant la 5HT, qui peut finalement affecter le système cardiovasculaire.

2.4 Angiogenèse et neurogenèse

Mécanismes d'interaction

Au niveau du système nerveux central, les vaisseaux et les nerfs sont localisés à proximité l'un de l'autre et agissent en coordination pour former un réseau neurovasculaire approprié (Figure 10). Une coordination neurovasculaire requière le partage de mécanismes de signalisations majeurs impliqués dans la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire. Un grand nombre de facteurs impliqués dans le développement du système nerveux central incluant les molécules de guidance axonale et les neurotrophines, fonctionnent également comme régulateurs du système vasculaire (Table 2). Inversement, de nombreux facteurs pro et anti-angiogéniques tels que le VEGF et l'Ang-1, sont également impliqués dans le développement et la fonction du système nerveux (Table 3) [336]. Il est actuellement reconnu que certains facteurs impliqués dans la signalisation du guidage des axones sont responsables du remodelage vasculaire. En particulier, l'éphrine B2 contribue à la spécification veine-artère, au recrutement de cellules murales, au développement de vaisseaux lymphatiques et à l'angiogenèse tumorale [337]. La sémaphorine influence l'angiogenèse soit en l'inhibant par un mécanisme de compétition au niveau des récepteurs du VEGF, soit en la stimulant [338, 339]. Les neurotrophines, bien connues en tant que facteurs trophiques impliqués dans la prolifération neuronale et la survie neuronale jouent également un rôle dans de nombreux tissus non-neuronaux, spécifiquement au niveau des vaisseaux sanguins. Le NGF est connu pour participer à la prolifération et à la migration des cellules endothéliales *in vitro* et pour stimuler l'angiogenèse *in vivo* [340]. Le rôle du NGF sur l'angiogenèse est en partie causé par son cross-talk avec la signalisation au VEGF. Au niveau neuronal, le NGF stimule l'expression du VEGF et en conséquence stimule l'angiogenèse [341, 342]. Finalement, le BDNF est également exprimé au cours d'une lésion ischémique et son hyper-expression favorise la revascularisation du tissu endommagé [343, 344]. Le VEGF quant à lui, bien connu en tant que facteur angiogénique capable de stimuler l'angiogenèse présente un

rôle neurotrophique. Le VEGF favorise d'une part la prolifération axonale et la survie neuronale et d'autre part présente un rôle de protection des neurones vis-à-vis d'un large rang de dommages [345].

Molécules	Recepteurs	Effets
VEGF	Flk-1, Nrp1	Axonal growth, Neuron survival, Neurogenesis
FGF-2	FGFR-1, FGFR-2	Neurogenesis, Neuroprotection, SNC proliferation
IGF-1	IGF-1R	Neurogenesis
Ang-1	Tie-2	Neuroprotection
TSP-1/2	CD47/IAP? LRP1?	Synaptogenesis

Table 2: Facteurs angiogéniques affectant le système nerveux. Ang-1, angiopoïetin-1; FGF, fibroblast growth factor; IGF, insulin-like growth factor; VEGF, vascular endothelial growth factor. D'après Lee et al, 2009 [336].

L'interaction au niveau du système nerveux central des réseaux vasculaires et neuronaux ne se limite pas à des mécanismes de signalisation communs mais également par une augmentation fonctionnelle du flux sanguin médiés par les astrocytes. Les astrocytes qui sont les cellules les plus abondantes du cerveau jouent également un rôle actif dans de nombreuses fonctions cérébrales ; les astrocytes peuvent fonctionner comme les cellules souches neurales adultes dans certaines situations, participent à la formation et à la modulation des synapses et par le processus de 'gliotransmission', ils génèrent et distribuent des signaux chimiques excitateurs. Les astrocytes régulent également la barrière hémato-encéphalique, et en modulant le couplage neurovasculaire jouent un rôle dans le maintien de l'homéostasie cérébrale. Anatomiquement, les astrocytes s'étendent vers les neurones et les vaisseaux. Ainsi, un astrocyte peut être en contact avec de nombreuses synapses, en plus des vaisseaux sanguins, rendant possible l'intégration de signaux générés à la fois par les neurones et les vaisseaux. En conséquence, les astrocytes représentent un médiateur clé dans la coordination neurovasculaire [336].

Molecules	Receptors	Effects
Axon guidance cues		
Ephrin-B4	EphB4	Arterial-Venous specification, Mural cell recruitment, Lymphatic vessel development, Tumor angiogenesis
SEMA3A	Neurophilin 1 (NP1)	Inhibit angiogenesis
SEMA3F	Neurophilin 2 (NP2)	Inhibit angiogenesis
SEMA4D	Plexin B1 (PLEXB1)	Induce tumor angiogenesis
Slit-2	Robo-4 and Robo-1	Repulsion or attraction of endothelial cell migration, tumor angiogenesis
Netrin-1	UNC5B, NeogeninA2b	Vascular pathfinding, inhibit or induce angiogenesis
Neurotrophins		
NGF	TrkA	Promote endothelial cell proliferation and migration, induce angiogenesis
BDNF	TrkB	Cardiac vessel development, chemotactic for haematopoietic precursor cells
NT-3	TrkC	Inhibit proliferation of cerebral endothelial cell

Table 3: Facteurs neurogéniques affectant le système vasculaire. BDNF, brain-derived neurotrophic factor; NGF, nerve growth factor; NT, neurotrophins; SEMA, semaphorin. D'après Lee et al, 2009 [336].

De plus, bien que les neurones matures ne soient pas en contact direct avec les vaisseaux sanguins, la niche de cellules souches neurales est située à proximité des vaisseaux sanguins [346]. Les cellules souches neurales chez l'adulte sont localisées dans certaines régions appelées niche de cellules souches telles que la zone subgranulaire de l'hippocampe et la zone subventriculaire. Une analyse anatomique de ces niches suggère que l'environnement à proximité et plus particulièrement l'environnement vasculaire est important pour la survie, la prolifération et la différenciation des cellules souches neurales. De façon intéressante, des cellules souches endothéliales sont présentes dans les niches de cellules souches, indiquant que ces niches de cellules souches possèdent un potentiel à la fois neural et angiogénique important [347]. Ces observations indiquent que l'angiogenèse et la neurogenèse partagent des signaux communs et que les vaisseaux sanguins en générant des stimulations environnementales contribuent aux comportements des cellules souches neurales. Des effets directs des cellules endothéliales sur les cellules souches neurales ont été mis en évidence *in vitro*. Lorsque des cellules souches neurales sont placées en co-culture avec des cellules endothéliales, elles démontrent une plus grande activité proliférative suivie d'une neurogenèse étendue [348]. Ces résultats suggèrent que l'environnement vasculaire avec l'aide de facteurs solubles contribue à la survie, la prolifération et la différenciation des cellules souches neurales.

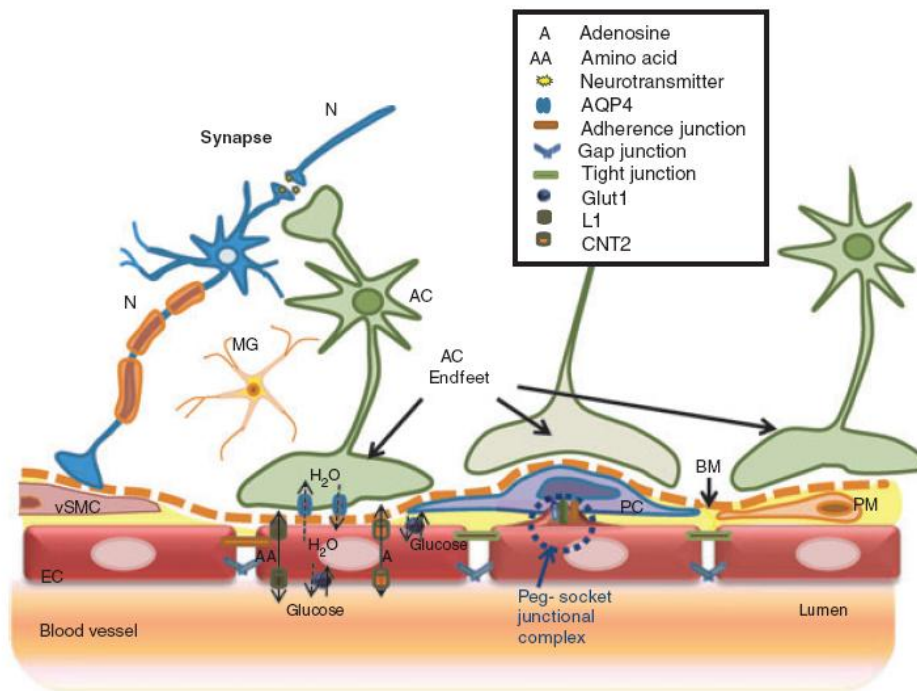


Figure 10: Communication cellulaire dans l'interface neurovasculaire. L'unité neurovasculaire est constituée de neurones (N), de cellules endothéliales (EC) et d'autres types cellulaires localisés dans la neurovasculature, i.e. astrocytes (AC), péricytes (PC), cellules musculaires lisses vasculaires (vSMC), microglie (MC) et macrophages périvasculaires (PM). D'après Lee et al, 2009 [336].

Neurogenèse, angiogenèse et dépression

L'utilisation de traitements AD de façon chronique, et non aigue, augmente la naissance de nouveaux neurones dans l'hippocampe [349-351]. Cette sur-régulation de la neurogenèse hippocampique s'observe avec différentes classes d'AD, incluant aussi bien les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la NA que la thérapie électroconvulsive. D'autres analyses sur les différents aspects de la neurogenèse démontrent que les AD augmentent à la fois la prolifération et la survie des nouveaux neurones hippocampiques [350, 352]. A contrario de l'action des AD, le stress quant à lui entraîne une diminution de la neurogenèse au niveau de l'hippocampe [353]. Différents types de stress ont été utilisés pour démontrer la diminution de la neurogenèse incluant le stress du résident et de l'intrus [354], l'odeur de prédateur [355], la séparation maternelle [356], les chocs électriques [357] et le stress chronique imprédictible [358, 359]. L'inhibition de la neurogenèse par le stress est alors bloquée par un traitement chronique aux AD [360, 361]. Il existe de nombreux facteurs de croissance et neurotrophiques qui peuvent être sous jacents aux effets du stress et des AD sur la neurogenèse. De nombreuses études ont démontré que le stress diminue la régulation du BDNF dans l'hippocampe chez le rat [362]. Cette diminution du niveau de BDNF associée à une augmentation de glucocorticoïdes contribue à l'atrophie et à la perte cellulaire dans

l'hippocampe [363]. Au contraire, un traitement AD chronique, incluant à la fois des inhibiteurs de la recapture de la 5-HT et de la NA, augmente l'expression de BDNF dans l'hippocampe et cet effet est consistant avec le délai d'apparition des effets thérapeutiques des AD [364]. D'autres facteurs tels que l'IGF, le VEGF et le FGF sont également capables d'augmenter la neurogenèse adulte [365-367]. Ces observations basées sur des études précliniques ont permis de proposer une hypothèse neurogénique / neurotrophique de la dépression. Cette hypothèse postule que la dépression pourrait en partie résulter d'une diminution de la neurogenèse et/ou d'une déplétion en facteurs neurotrophiques qui conduiraient éventuellement aux anomalies structurelles et aux fonctions neuronales compromises observées chez les patients dépressifs [368, 369]. Des études histologiques post-mortem ou d'imagerie par résonance magnétique de cerveaux de patients souffrant de dépression ont démontré des anomalies structurelles incluant une réduction du volume de l'hippocampe, une diminution du nombre de cellules gliales et de la taille des neurones dans le cortex frontal, le cortex cingulaire et dans l'amygdale [370-375]. Des études post mortem de cerveaux de patients dépressifs ont également mis en évidence une diminution du niveau de BDNF [376] alors qu'une augmentation de sa régulation a été mise en évidence chez les patients dépressifs soumis à un traitement AD [377]. Ainsi, la réduction du niveau de BDNF et d'autres facteurs neurotrophiques pourrait contribuer à l'atrophie des structures limbiques. Cependant, il n'est pas clairement établi que la réduction du volume de l'hippocampe observée chez les patients dépressifs serait due à une déficience en neurogenèse plutôt qu'à une atrophie cellulaire.

Etant donné que la prolifération cellulaire adulte prend place à proximité de la vasculature et que l'angiogenèse et la neurogenèse sont modulées par des facteurs trophiques similaires, certains auteurs ont cherché à identifier le rôle de la vasculature sur la diminution par le stress de la prolifération cellulaire. Les résultats ont montré que 32% des cellules prolifératives de l'hippocampe sont associées à la vasculature et que les effets du stress sont majoritairement observés sur cette population de cellules indiquant que les modifications de proliférations cellulaires induites par le stress sont dépendantes de facteurs angiogéniques [378]. De plus, une étude très récente a démontré à la fois une diminution du nombre de microvaisseaux dans l'hippocampe et de la capillarisation de la zone subgranulaire chez des animaux soumis au stress chronique indiquant que le stress affecte la microvasculature nécessaire à la neurogenèse hippocampique [379]. De la même façon que le stress, un traitement aux glucocorticoïdes entraîne des altérations synaptiques, une atrophie dendritique et une diminution de la gliogenèse et de la neurogenèse [380-382]. Un traitement aux

glucocorticoïdes, en plus de ses effets sur la neurogenèse, diminue de façon dramatique la prolifération de cellules endothéliales au niveau de l'hippocampe et du cortex préfrontal [383, 384]. Au contraire, un traitement AD par thérapie électroconvulsive entraîne une augmentation de la prolifération de cellules endothéliales et stimule l'angiogenèse [385-387]. La fonction principale des vaisseaux sanguins étant l'approvisionnement des tissus en oxygène et en nutriments, toute condition susceptible de compromettre la fonction vasculaire peut engendrer des dysfonctionnements cellulaires et éventuellement une atrophie tissulaire similaire à celle observée chez les patients dépressifs. L'hypothèse d'une altération de la fonction vasculaire et de l'angiogenèse chez les patients dépressifs a trouvé un élément de preuve supplémentaire par les résultats d'une étude récente qui a mis en évidence une diminution des taux circulants de cellules endothéliales progénitrices chez les patients dépressifs [388].

Ainsi, une atteinte des mécanismes d'angiogenèse et de neurogenèse dans la dépression associée à une déplétion en facteurs trophiques soulève une hypothèse intéressante dans le contexte du lien entre la dépression et les pathologies cardiovasculaires. En effet, une altération des mécanismes d'angiogenèse et de neurogenèse, considérés comme des mécanismes de réparation activés suite à une lésion cérébrale ischémique pourrait expliquer l'augmentation de la mortalité et de la morbidité vasculaire observée chez les patients dépressifs présentant des antécédents vasculaires.

Neurogenèse et angiogenèse au cours d'une ischémie cérébrale

L'angiogenèse, la prolifération des cellules endothéliales induisant une augmentation de la vascularisation est un processus crucial au cours du développement. Dans le cerveau adulte, les cellules souches endothéliales restent généralement quiescentes et se divisent rarement. Cependant, en situation où la balance entre la disponibilité en oxygène et la demande métabolique est altérée, l'angiogenèse peut également se mettre en place dans le cerveau adulte. En conditions d'apprentissage moteur ou sensoriel, la stimulation de l'angiogenèse entraîne alors une augmentation de la densité capillaire. En situation pathologique, une hypoxie ou une ischémie peut également induire l'angiogenèse dans de nombreux tissus incluant le système nerveux central. Une ischémie cérébrale, si elle est suffisamment sévère peut conduire à la mort neuronale notamment les neurones de la région CA1 de l'hippocampe et conduire à un infarctus cérébral caractérisé par des perturbations neurologiques persistantes et des dommages de certaines régions discrètes du cerveau [389]. Des études d'autopsie ont mis en évidence une stimulation de l'angiogenèse dans des

cerveaux ischémiés [390], et les modèles animaux d'infarctus cérébral suggèrent que la stimulation de l'angiogenèse devient évidente 1-2 semaines suite à l'ischémie [391]. L'induction de l'angiogenèse, observée dans un premier temps à la frontière de la zone ischémiée où le flux sanguin est réduit mais non absent, augmente l'approvisionnement en oxygène et en nutriments du tissu lésé. De plus, la génération de nouveaux vaisseaux sanguins facilite hautement les processus neurorestoratifs tels que la neurogenèse et la synaptogenèse qui à leur tour facilitent le rétablissement fonctionnel [392]. En effet, une ischémie cérébrale stimule également la neurogenèse et dirige la migration des nouveaux neurones au niveau des sites de lésions [393-396]. Ainsi, les mécanismes d'angiogenèse et de neurogenèse mis en place au cours d'une lésion cérébrale vasculaire pourraient représenter des mécanismes de réparation importants pour contrecarrer la mort tissulaire et réduire les déficits neurologiques associés à de telles lésions. L'interdépendance des deux systèmes pourrait rendre compte de l'altération des capacités de réparation vasculaires chez les sujets déprimés, et inversement expliquer pour partie la vulnérabilité à la dépression ou la moindre réponse aux AD des patients avec lésions vasculaires.

3/ PHYSIOPATHOLOGIE DE LA PAROI VASCULAIRE ET SES LIENS AVEC LA DEPRESSION

3.1 La fonction endothéliale

Physiopathologie de la fonction endothéliale

L'endothélium vasculaire est la couche la plus interne des vaisseaux sanguins, des cavités et des valves cardiaques. L'endothélium, connu pour synthétiser et libérer des substances vaso-actives qui contribuent à la régulation vasculaire locale, joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie cardiovasculaire. Il régule de nombreuses fonctions physiologiques telles que le tonus vasculaire, la prolifération des cellules musculaires lisses, l'inflammation, l'agrégation plaquettaire (thrombose et fibrinolyse), le stress oxydatif et l'angiogenèse.

Un dysfonctionnement endothélial est alors caractérisé par une altération de la balance entre la libération de facteurs relaxants (NO, PGI₂, EDHF) et contractants (angiotensine, endothéline,...) pro-coagulants (endothéline, PAI-1, ROS,..) et anti-coagulants (NO, vWf,...), anti-prolifératifs (NO, Prostacycline,...) et pro-prolifératifs, pro-inflammatoires (CAM, sélécine, cytokine, chemokine...) et anti-inflammatoires (Figure 11). Le terme de

dysfonctionnement endothélial fait alors référence à de nombreux processus physiopathologiques, cependant majoritairement un dysfonctionnement endothélial fait référence à une altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium induite par une diminution de la biodisponibilité en oxyde nitrique (NO). Cependant, bien que le NO représente le facteur relaxant endothélium-dépendant majoritaire, le dysfonctionnement endothélial est également caractérisé par toute altération de la contribution des autres facteurs relaxants et contractants dérivés de l'endothélium cités précédemment. Le NO synthétisé et libéré par les cellules endothéliales agit comme un facteur relaxant au niveau des cellules musculaires lisses. En plus de ces fonctions relaxantes, le NO agit en tant que facteur anti-prolifératif, anti-thrombotique et anti-inflammatoire. Une diminution de la biodisponibilité en NO a donc pour principale conséquence une diminution de la vasodilatation mais favorise également le recrutement et l'agrégation plaquettaire et des leucocytes au niveau du site de lésion et la prolifération des cellules musculaires lisses [397]. L'altération de la biodisponibilité en NO peut donc être induite par une diminution de sa libération ou une augmentation de sa dégradation. L'inhibition de la NO synthase par les lipoprotéines, cytokines, les glucocorticoïdes peut être responsable d'une diminution de la libération de NO par les cellules endothéliales. D'un autre côté, une production excessive de réactif oxydant ou d'anion super oxyde et de cholestérol LDL oxydé, aussi bien qu'une diminution des mécanismes antioxydants, peuvent tous être responsables d'une augmentation de la dégradation du NO [398, 399].

La fonction endothéliale peut être évaluée par l'utilisation de techniques invasives et non invasives. La technique la plus utilisée est la mesure de la FMD (flow mediated dilatation) décrite par Celemajer et al, en 1992 [400]. Cette technique étudie la réponse vasodilatatrice de l'artère brachiale suite à une pression ischémique du bras par des ultrasons à haute résolution. Cette réponse dépendante de l'endothélium est largement induite par le NO et liée à la fonction endothéliale. Un dysfonctionnement endothélial qui se manifeste par une diminution de la FMD est associé à tous les facteurs de risques cardiovasculaires, présents avant les manifestations cliniques d'athérosclérose et prédit la présence de maladies des artères coronaires. Parallèlement, étant donné le rôle global d'un dysfonctionnement endothélial dans le maintien de l'homéostasie vasculaire, un grand nombre de marqueurs circulants représentatifs d'un dysfonctionnement endothélial et des processus inflammatoires vasculaires peuvent être évalués. Parmi ces marqueurs, on peut citer des facteurs impliqués dans la coagulation et l'agrégation plaquettaire tels que le von Willbrand (vWf) ou l'inhibiteur des activateurs de la plasminogène (PAI-1) mais également des molécules

d'adhésions telles que les sélectines (P-sélectine, E-sélectine) et les immunoglobines (vascular cell adhesion molecule VCMA-1, intercellular adhesion molecule ICAM-1) et des facteurs impliqués dans le remodelage vasculaire tels que les métalloprotéinases de la matrice (MMP-2, MMP-9).

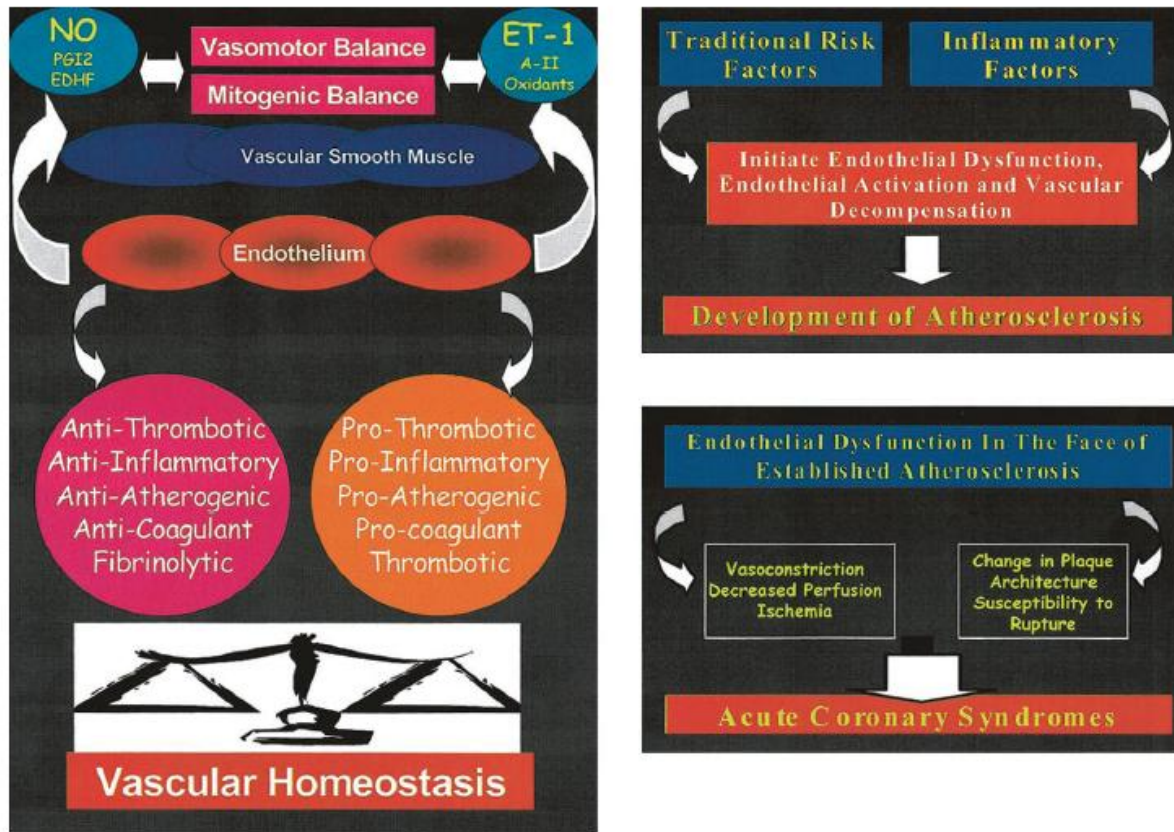


Figure 11: Le rôle de l'endothélium dans le maintien de l'homéostasie vasculaire. Les facteurs vasoactifs dérivés de l'endothélium s'accordent pour maintenir le tonus vasculaire, la prolifération des cellules musculaires, les mécanismes de thrombose, d'inflammation, de coagulation, de fibrinolyse et d'oxydation. Un dysfonctionnement endothélial est défini comme une perte d'une ou plus de ses fonctions provoquant en retour une décompensation vasculaire. A droite : Les facteurs de risque conduisant à un dysfonctionnement endothélial. Un dysfonctionnement endothélial joue un rôle intégral dans l'initiation d'athérosclérose. En bas à droite, Réponse d'une artère coronaire athérosclérotique à des stimuli dépendants de l'endothélium. De plus, un dysfonctionnement endothélial facilite l'instabilité et la rupture de la plaque d'athérome. Ces évènements peuvent conduire au développement d'un syndrome coronarien instable. D'après Verma & Anderson (2002) [397].

Implication dans le développement de maladies cardiovasculaires

Un dysfonctionnement endothélial joue un rôle particulier dans la formation d'athérosclérose et donc dans la pathogenèse des maladies cardiovasculaires. Le

dysfonctionnement endothélial est également associé aux facteurs de risques vasculaires traditionnels (Table 2).

Le rôle du NO en tant que vasodilatateur et inhibiteur de l'agrégation plaquettaire, de la prolifération des cellules musculaires lisses et de l'interaction des leucocytes et des cellules endothéliales, implique qu'une diminution de son activité contribue de façon importante à l'initiation et à la progression de lésions d'athérosclérose. De plus, les conséquences chimiques et mécaniques d'une lésion de l'endothélium induisent des processus cellulaires tels que l'inflammation qui contribuent à maintenir le dysfonctionnement endothélial et donc favoriser la formation d'athérosclérose. Cependant, la question de la relation causale entre dysfonction endothéliale et athérosclérose n'est pas claire. Le dysfonctionnement endothélial représente sûrement une conséquence des effets délétères des facteurs de risques cardiovasculaires au niveau vasculaire. Cependant, des études récentes favorisent l'hypothèse selon laquelle le dysfonctionnement endothélial pourrait précéder la formation de lésions d'athérosclérose morphologiques. Le dysfonctionnement endothélial favorise la formation d'athérosclérose en agissant sur différents mécanismes : en augmentant l'adhérence des leucocytes, la perméabilité des cellules endothéliales aux monocytes/macrophages et aux lipoprotéines qui s'accumulent dans l'intima vasculaire. Le dysfonctionnement endothélial est également lié à l'agrégation plaquettaire et à la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses impliquées dans la formation d'athérosclérose. Le dysfonctionnement endothélial joue donc un rôle majeur dans la formation et la progression des lésions d'athérosclérose mais également dans le développement de lésions ischémiques et de thrombose dans les derniers stades de la maladie.

Conditions associated with impaired endothelial function	Atherosclerosis, hypercholesterolemia, high LDL-C, low HDL-C, high lipoprotein (a), small dense LDL-C, oxidized LDL-C, hypertension, high homocysteine, aging, vasculitis, preeclampsia, metabolic syndrome, variant angina, diabetes, active smoking, passive smoking, ischemia-reperfusion, transplant atherosclerosis, cardiopulmonary bypass, postmenopausal, Kawasaki's disease, Chagas' disease, family history CAD, infections, depression, inactivity, obesity, renal failure, increased CRP, congestive heart failure, left ventricular hypertrophy, postprandial state
Interventions to improve endothelial function	ACE inhibitors, angiotensin receptor blockers, endothelin blockers, statins, tetrahydrobiopterin, folates, exercise, improving insulin sensitivity, LDL reduction, HDL augmentation, antioxidants, estrogen, L-arginine, desferoxamine, glutathione, homocysteine reduction, lowering CRP, reducing free fatty acid flux
Soluble surrogate markers of endothelial dysfunction	CAMs, von Willbrand factor, ET-1, nitrites, asymmetric dimethylarginine, CRP, tissue plasminogen activator, fibrinogen, amyloid A

Table 4: Conditions associées à un dysfonctionnement endothélial, stratégies pour contrecarrer un dysfonctionnement endothélial et marqueurs solubles d'un dysfonctionnement endothélial. D'après Verma et al, 2002 [397].

Dysfonctionnement endothélial dans la dépression

Différentes méthodes d'évaluation structurelle et fonctionnelle de l'endothélium ont été utilisées afin d'étudier la présence d'un dysfonctionnement endothélial chez des patients dépressifs. Plusieurs études ont mis en évidence une diminution significative de la FMD chez les patients dépressifs en comparaison à des sujets témoins [401-404]. Par l'utilisation d'autres techniques d'évaluation de la fonction endothéliale, plusieurs études ont également mis en évidence des altérations de la fonction vasodilatatrice dépendante de l'endothélium chez les patients dépressifs [405]. De plus, des dosages biologiques de marqueurs d'un dysfonctionnement endothélial chez les patients dépressifs démontrent une augmentation de la concentration soluble de MCP-1, d'E-sélectine, d'ICAM-1 et de VCAM-1 [402, 406] ainsi qu'une diminution du niveau de métabolites plasmatiques du NO et de l'activité de la NO-synthase [407], une diminution du nombre de cellules endothéliales progénitrices et de VEGF [388]. Une augmentation d'ICAM-1 et VCAM-1 a également été mise en évidence dans des études post-mortem au niveau du cortex préfrontal chez les patients présentant une dépression gériatrique à début tardif [408]. Seulement peu d'études n'ont pas réussi à répliquer ces résultats, en particuliers ceux obtenus en utilisant la FMD ou le taux d'expression sanguins de molécules d'adhésion (CAMs) [409]. Ces observations démontrent la présence d'un dysfonctionnement endothélial chez les patients dépressifs sans pouvoir expliquer s'il pourrait être une cause ou une conséquence du développement de pathologies cardiovasculaires chez ces patients.

3.2 Fonction plaquettaire et hémostasie

Physiopathologie de la fonction plaquettaire

Les plaquettes sont des cellules sanguines spécialisées qui jouent un rôle central dans les processus physiologiques et physiopathologiques de l'hémostasie, l'inflammation, les tumeurs métastatiques, les guérisons de blessures et les défenses immunitaires. Elles sont alors activées et mobilisées rapidement afin de former un agrégat plaquettaire. Sécrétées par la moelle, les plaquettes circulent dans les vaisseaux pendant 7-10 jours sans interaction spécifique avec l'endothélium vasculaire. Au cours d'une lésion vasculaire, aux différents stades d'adhésion, d'activation et d'agrégation plaquettaires, les plaquettes expriment et sécrètent de nombreuses molécules qui contribuent à la formation d'un agrégat plaquettaire et à la réparation du tissu vasculaire lésé. Cependant, les plaquettes contribuent rapidement au processus physiopathologique lors la mise en place du processus d'athérosclérose et de la

rupture de la plaque d'athérome, exposant le sang à des substances thrombogènes. Les plaquettes sont capables de libérer un grand nombre de substances actives telles que l'adénosine diphosphate (ADP), la sérotonine, le thromboxane A₂, la thrombospondine, le fibrinogène, le facteur von Willibrant, les facteurs de coagulation, les chemokines, et les facteurs de croissance. En retour, les plaquettes possèdent des récepteurs pour une pléthore d'agonistes et de ligands.

Le processus de coagulation, impliquant l'activation, l'adhésion, et l'agrégation des plaquettes au niveau vasculaire a pour conséquence la formation d'un caillot de fibrine au niveau du site de lésion vasculaire (Figure 12). La coagulation est physiologiquement régulée par 3 processus majeurs d'anti-coagulation et par la fibrinolyse. Les facteurs tissulaires (TF), initiateurs de la coagulation, conduisent à la formation de petits amas de thrombine et jouent un rôle central dans la coagulation en stabilisant le thrombus par activation de la fibrine. Les 3 principaux systèmes anticoagulants sont les inhibiteurs de facteurs tissulaires (TFPI), l'antithrombine et la protéine C. La protéine C requiert un récepteur transmembranaire, la thrombomoduline pour être activée. Les TFPI et la thrombomoduline sont exprimées par les cellules endothéliales alors que l'antithrombine et les protéines C sont circulantes. Le système de fibrinolyse a pour rôle d'éliminer le caillot de fibrine de la circulation pour maintenir le flux sanguin. La fibrinolyse requiert l'activation du plasminogène en plasmine grâce aux activateurs de la plasminogène de type tissulaire (tPA) ou de type urokinase (uPA) afin d'induire la lyse du caillot de fibrine en générant des produits de la dégradation de la fibrine (FDP). L'inhibiteur majeur de la fibrinolyse est l'inhibiteur des activateurs du plasminogène (PAI-1), en addition de α 2-antiplasmine et de l'inhibiteur de la fibrinolyse activé par la thrombine (TAFI) qui limite la fibrinolyse. Une altération ou surexpression des facteurs impliqués dans les processus pro-coagulant, anti-coagulant ou de fibrinolyse a donc pour conséquence un défaut de la régulation de la formation du caillot sanguin entraînant soit une hémorragie, soit une thrombose.

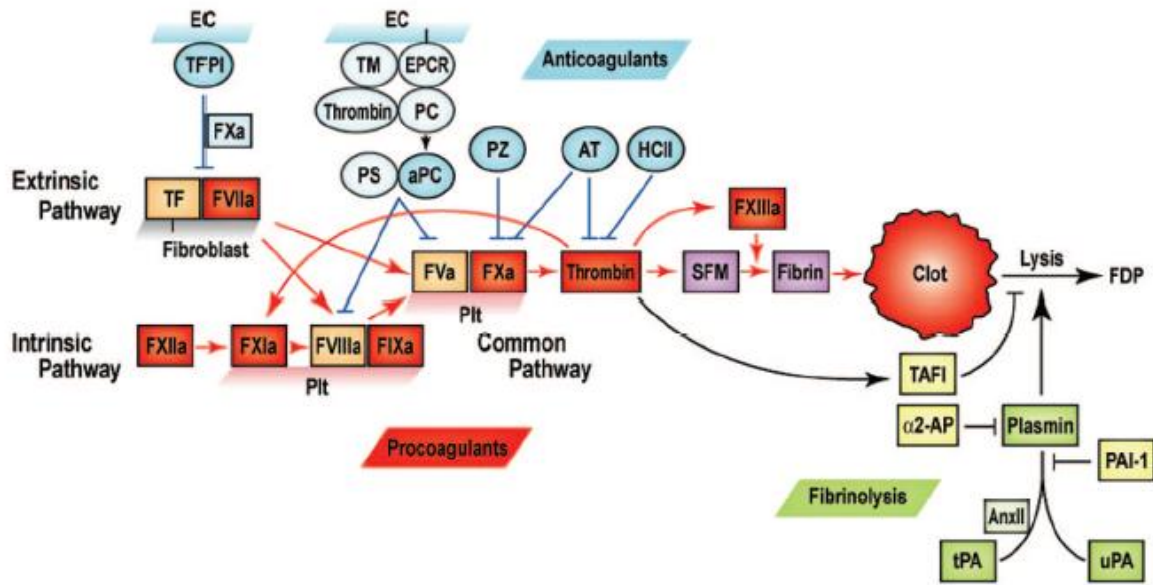


Figure 12: Formation et lyse d'un caillot sanguin riche en fibrinogène. D'après Mackman, 2005 [410].

Implication dans le développement de maladies cardiovasculaires

En plus de ses fonctions dans la régulation hémostatique à travers ses propriétés pro et anticoagulante et de fibrinolyse, l'activation et l'agrégation plaquettaire jouent un rôle dans la formation d'athérosclérose mais également dans la rupture de la plaque d'athérome et la formation de thrombus en sécrétant des facteurs d'adhésion (fibrinogène, fibronectine, vWf, thrombospondine, P-sélectine, vitronectine, intégrine), des facteurs de croissance (platelet derived growth factor, transforming growth factor β , epidermal growth factor, basic fibroblaste growth factor), des chemokines (RANTES, PF-4, MIP-1), des cytokines (IL-1 β , CD40L, thromboglobuline- β), et des facteurs de coagulation (FV, FXI, PAI-1, plaminogène, protéine S). La libération de ces différentes substances favorise le recrutement des leucocytes, la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses, l'expression et la sécrétion par l'endothélium de molécules d'adhésion et de chemokines et l'estérification des LDL-oxydés. De plus, au niveau du site de rupture de la plaque d'athérome, les plaquettes libèrent certains agonistes plaquettaires tels que l'ADP, la 5-HT ou les TXA2 conduisant au recrutement, à l'activation et à l'agrégation de plaquettes supplémentaires ainsi qu'à favoriser la mise en place d'une vasoconstriction [410-415].

Les composants de l'hémostase (coagulation, anti-coagulation, fibrinolyse et activité plaquettaire) sont donc cruciaux dans le développement et la progression de maladies cardiovasculaires [416, 417]. La dérégulation de l'un de ces processus entraîne un état

d'hyper-coagulation, qui a pour conséquence de promouvoir la formation de dépôt de fibrine au niveau vasculaire. Une augmentation des taux de facteurs pro-coagulant (fibrinogène, FT-VII, FT-VIII, vWf, PAI-1, α 2-antiplasmine) est corrélée à l'apparition de syndrome coronarien tel que l'infarctus du myocarde [418]. L'importance du processus d'hyper-coagulation dans le pronostic de maladies coronariennes est documentée par la mise en évidence des bénéfices thérapeutiques des traitements anti-coagulants et des thérapies fibrinolytiques chez des patients présentant à la fois des syndromes aigus et chroniques [419, 420].

Hémostase et dépression

De nombreuses dérégulations de l'hémostase ont été mises en évidence chez les patients dépressifs, en particulier une hyper coagulation par activation des facteurs pro-coagulants et inhibition de la fibrinolyse. En effet, les symptômes dépressifs sont associés à une augmentation du niveau de facteurs pro-coagulants tels que le FTVII, le complexe thrombine-antithrombine (TAT) et le D-dimer impliqués dans la génération de thrombine et la formation de fibrine [421, 422]. De plus, l'inhibition de la fibrinolyse dans la dépression a été mise en évidence par une diminution du taux de tPA, principale enzyme impliquée dans la formation de thrombine, et une augmentation de l'expression de son inhibiteur, la PAI-1[421, 423]. La dépression est également associée à une augmentation de l'activation et de l'adhésion plaquettaire déterminée par une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion tels que le fibrinogène et la P-sélectine et de chemokines / cytokine tel que le PF-4 et la β -TG [422, 424-428]. La modification de l'expression de ces différents facteurs dans la dépression favorise l'adhésion plaquettaire à l'endothélium, l'agrégation plaquettaire et le recrutement et l'adhésion des leucocytes aux plaquettes ainsi que leur migration à travers la couche de cellules endothéliales. D'ailleurs, Morel-Kopp et al (2009), ont démontré une augmentation du nombre d'agrégats plaquette-leucocyte chez les patients dépressifs. Ce degrés d'activation plaquettaire observé chez les patients dépressifs est similaire à celui des patients présentant de l'athérosclérose [429].

La dépression est également associée à une augmentation de la densité des récepteurs plaquettaires 5HT_{2A}, effet qui se normalise après rémission [430-432]. De plus la réactivité plaquettaire en réponse à une stimulation par la sérotonine ou l'ADP augmente chez les patients dépressifs [424, 433]. Ces observations sont particulièrement intéressantes étant donné l'implication d'un dérèglement du système 5HT dans la pathophysiologie de la dépression. L'agrégation plaquettaire et la vasoconstriction coronarienne au niveau des artères

malades sont partiellement régulées par les récepteurs plaquettaire à la 5HT. L'effet de la 5HT principalement thrombogénique est également nécessaire pour amplifier la réponse plaquettaire à d'autres agents thrombogéniques. Ainsi, il apparaît que la 5HT ne joue pas uniquement un rôle majeur dans la neurobiologie de la dépression mais influence également la thrombogénèse [434].

3.3 Inflammation et immunité

Physiopathologie du système inflammatoire immunitaire

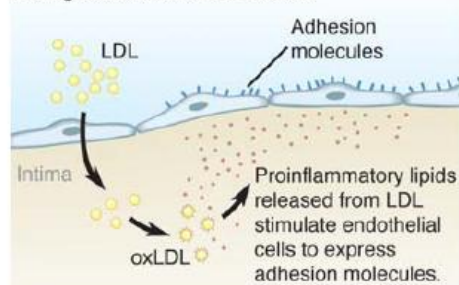
Les processus inflammatoires, représentés par « une série complexe d'interactions entre des facteurs solubles et cellulaires qui peut survenir dans tous les tissus en réponse à un traumatisme, une infection, une ischémie, une lésion toxique ou auto-immune » apparaissent impliqués dans les différents stades du développement d'athérosclérose [4, 435, 436]. Les processus inflammatoires, au cours d'une lésion vasculaire sont activés lors des différentes étapes de rétention et de modification des LDL, de l'activation endothéliale et plaquettaire ainsi que du recrutement, de l'adhésion et de la migration des leucocytes. En effet, l'oxydation des LDL au niveau de l'intima de la paroi vasculaire induit la sécrétion de phospholipides pro-inflammatoires permettant l'activation des cellules endothéliales [437-439]. Les cellules endothéliales et les plaquettes activées expriment à leur tour des molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1, RANTES, vWf...), favorisant le recrutement et la migration des leucocytes, et des chemokines chemoattractantes (MCP-1, PF-4,...) afin de stimuler l'infiltration des leucocytes, monocytes et lymphocytes, au niveau de l'intima [440, 441].

La différenciation des leucocytes en macrophages au niveau de l'intima de la paroi vasculaire lésée est réalisée par une cytokine, facteur de croissance, le M-CSF. Ce processus de différenciation est associé à une sur-régulation du pattern de récepteurs impliqués dans la reconnaissance de l'immunité innée [442, 443]. D'une part, la surexpression de récepteurs scavenger conduit à l'endocytose et à l'accumulation des LDL oxydés et induit la formation de cellules spumeuses. D'autre part, la surexpression de récepteurs toll-like induit l'activation des macrophages dont la conséquence est la sécrétion de marqueurs pro-inflammatoires impliqués dans les réactions de stress oxydatif (Oxygen reactive, nitrogen species), d'activation des cellules endothéliales et des plaquettes (Cytokine pro-inflammatoire et substances vasoactives), de recrutement de leucocytes supplémentaires et de dégradation de la matrice extracellulaire (protéase) [444-447]. Deux méthodes d'activation des leucocytes se mettent en place au niveau des parois vasculaires lésées, par les macrophages activés présents

au niveau du site de lésion et par les lymphocytes T. Les lymphocytes T activés se fixent aux macrophages afin d'induire un grand nombre de réponses effectrices parmi lesquelles la réponse T helper-1 est majoritaire dans la formation d'athérosclérose [448]. Cette réponse, via la libération de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ , TNF, CD40L,...), favorise la formation et la rupture de la plaque d'athérome, en favorisant l'activation des cellules endothéliales, la formation de thrombus, le recrutement des leucocytes, l'activation des macrophages, la formation de cellules spumeuses et la dégradation de la matrice extracellulaire (Figure 13).

Endothelial activation

LDL penetrates endothelium and is retained in the intima, where it undergoes oxidative modification.



Circulating monocytes adhere to endothelial cells expressing VCAM-1 and other adhesion molecules. . .

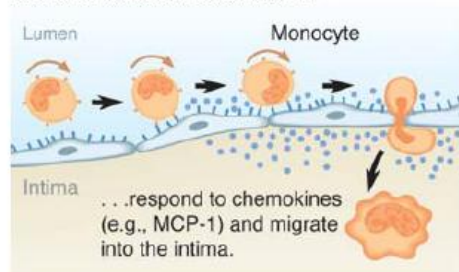
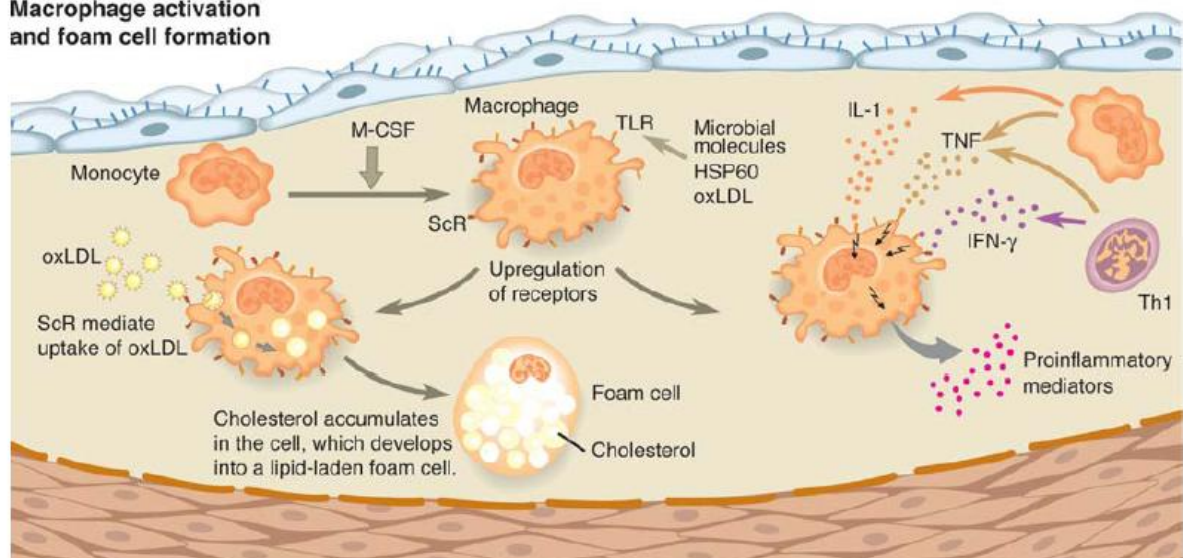


Figure 13: Recrutement et activation des macrophages dans la formation d'athérome. Les macrophages sont recrutés à partir des monocytes sanguins en traversant la surface de l'endothélium. Dans les lésions très avancées, les micro-vaisseaux de la plaque d'athérome peuvent également représenter un passage pour que les monocytes pénètrent. Un grand nombre de molécules d'adhésion et de chemokines gouvernent le processus de recrutement, qui est suivie par la différenciation des monocytes en macrophages. Au cours de ce processus, le pattern de reconnaissance, tel que les récepteurs scavenger (ScRs) sont sur-régulés. Les ScRs médient la capture des LDL oxydés (oxLDL) et entraînent une accumulation du cholestérol dérivé des LDL et la formation de cellules spumeuses. D'autres macrophages sont activés par les cytokines des cellules T, l'interféron γ (IFN- γ). Ces macrophages sont activés par un pattern de molécules pathogène-associées qui se fixent aux récepteurs Toll-like (TLRs) aussi bien que par des cytokines pro-inflammatoires tel que l'interleukine-1 (IL-1) et le TNF (Tumor necrosis factor). En conséquence de cette activation, les macrophages libèrent des médiateurs pro-inflammatoires, incluant des ROS (reactive oxygen species) et des RNS (Reactive nitrogen species), des cytokines pro-inflammatoires, des molécules vasoactives et différents types de protéases. Th1, T helper-1; MCP, monocyte chemoattractant protein-1; M-CSF, macrophage-colony-stimulating factor; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1; HSP60, heat shock protein 60. D'après Hansson et al, 2006 [4].

Macrophage activation and foam cell formation



Implication dans le développement de maladies cardiovasculaires

Le processus inflammatoire impliqué dans la formation d'athérosclérose peut conduire à un niveau détectable dans le sang de protéines pro-inflammatoires et de réactifs de la phase aigüe. Les patients avec une angine de poitrine ou un infarctus du myocarde présentent un taux élevé de marqueurs inflammatoires tels que la C-réactive protéine, l'IL-6, l'IL-7, l'IL-8, le CD40L, et le niveau d'élévation de ces facteurs prédit un mauvais pronostic [449-452]. De plus, des cellules lymphocytaires T sont détectées et la proportion de CD4+CD28^{null}, sous type de lymphocytes T pro-inflammatoires est surexprimée dans le sang de ces patients [453, 454]. Ces observations suggèrent qu'une réponse inflammatoire auto-immune est impliquée dans l'athérosclérose et les maladies coronariennes. Cependant, puisque plusieurs marqueurs avec des activités biologiques différentes contribuent au risque de maladies des artères coronaires [455, 456], il est difficile de conclure dans quelle mesure ces différents marqueurs représentent des risques de développement de ces maladies ou contribuent à leur progression. L'activation de la réponse inflammatoire immunitaire représente néanmoins un initiateur du syndrome coronarien, au cours duquel le niveau de marqueurs inflammatoires circulants reflète le décours clinique de la maladie.

Implication dans la dépression

De nombreuses études ont mis en évidence une dérégulation du système inflammatoire immunitaire dans la dépression suggérant une covariance. Cependant, la nature de cette relation n'est pas claire [332, 457, 458]. Comme cité précédemment, la dépression est associée à une augmentation des molécules d'adhésion et des chemokines endothéliales et plaquettaires nécessaires au recrutement et à la migration des leucocytes à travers l'endothélium. De nombreux résultats indiquent également que la dépression est accompagnée d'une activation des cellules immunitaires. Une augmentation du nombre de leucocytes, neutrophiles et de monocytes accompagnée par une augmentation spécifique du taux de lymphocytes T est observée dans la dépression. De plus, l'augmentation de certains marqueurs d'activation des cellules immunitaires telles que la néoptérine et plus spécifiquement d'activateur des monocytes / macrophages (PGE2, TXA2) supporte l'hypothèse d'une activation des cellules immunitaires dans la dépression. D'autres études, toujours dans le but de mettre en évidence une activation des systèmes inflammatoires et immunitaires, ont mis en évidence une augmentation de la sécrétion de cytokine (IL-1, IL-2, IL-6) par les macrophages activés et d'interférons par les lymphocytes T chez les patients dépressifs [457, 458].

La question de causalité, c'est-à-dire l'implication de l'activation du système immunitaire sur les mécanismes de la dépression ou les effets de la dépression sur le système immunitaire reste mal documentée [459]. L'hypothèse selon laquelle une activation du système immunitaire est capable d'induire des symptômes dépressifs est soutenue par la théorie des macrophages de la dépression [460]. En effet, l'administration de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 et TNF ou d'interféron induit des symptômes dépressifs tels qu'une anhédonie, des troubles de l'appétit et du sommeil, des modifications de l'humeur et une diminution du niveau d'activité [461-463]. De plus, un traitement aux statines qui contribue à inhiber les complications cardiovasculaires en atténuant les processus inflammatoires est associé à une diminution du risque de développement de dépression [464, 465]. Cependant l'hypothèse selon laquelle la dépression pourrait activer le système immunitaire peut également être soutenue. En effet, une tache de stress mental, considérée comme une émotion négative au même titre que la dépression est capable de favoriser les processus inflammatoires [466]. De plus, une diminution des cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 et IL-6 a été observée chez les patients dépressifs soumis à un traitement AD [467]. De plus, les cytokines pro-inflammatoires sont capables d'activer le système HPA et en retour, une augmentation de glucocorticoïdes peut altérer le fonctionnement des cellules immunitaires.

Les implications thérapeutiques du lien entre la dépression et les maladies cardiovasculaires

La complexité du lien entre la dépression et les pathologies cardiovasculaires ainsi que le manque d'information précise sur les causes de cette relation rend le traitement des patients souffrant de cette comorbidité difficile. En effet, il semble exister une moins bonne réponse aux traitements AD dans le cas d'une association de la dépression avec une pathologie vasculaire. Par ailleurs les médicaments efficaces dans le traitement de la dépression peuvent avoir des effets indésirables cardiovasculaires et une importante interaction pharmacologique en association avec certains traitements utilisés dans les troubles cardiovasculaires. Inversement, certains composés utilisés dans le traitement des pathologies cardiaques sont connus pour induire des troubles psychiatriques dont des symptômes dépressifs. Il semble donc important de comprendre les mécanismes d'action, les sites d'effets et les interactions des traitements utilisés dans ces deux types de pathologies.

1/ IMPACT DES TRAITEMENTS AD SUR LE SYSTEME CARDIOVASCULAIRE

Un grand nombre de médicaments sont disponibles dans le traitement de la dépression tels que les AD tricycliques (TCA), les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (SSRI), les inhibiteurs de la recapture de la 5HT et de la NA (SNRI) et les inhibiteurs des monoamines oxydase (IMAO). Etant donné l'utilisation préférentielle des TCA et des SSRI dans le traitement des troubles dépressifs, les conséquences cardiovasculaires de ces deux classes d'AD ont majoritairement été étudiées dans le contexte du traitement des patients dépressifs présentant des troubles cardiovasculaires.

1.1 Les antidépresseurs tricycliques (TCA)

Les AD TCA sont associés avec une augmentation des risques de mortalité chez les patients présentant des maladies coronariennes. Les conséquences cardiovasculaires des TCA sont nombreuses incluant une hypotension orthostatique, un ralentissement de la conductance cardiaque, une activité anti-arythmique de type Ia et une augmentation de la fréquence cardiaque (Table 5). En bloquant les récepteurs α -adrénergiques, les TCA induisent une hypotension orthostatique et un réflexe de tachycardie chez 20% des patients. Les résultats de l'étude CAST (Cardiac arrhythmia suppression trial) suggèrent que l'activité anti arythmique de type Ia (allongement du potentiel de repos et de l'intervalle QT à l'ECG) de certains

composés, incluant les TCA, entraîne une augmentation de la mortalité des patients présentant des troubles ischémiques du cœur. Les TCA affectent également la fréquence cardiaque en diminuant toutes les composantes de la variabilité de la fréquence cardiaque et en augmentant la variabilité de l'intervalle QT, composantes associées à une augmentation de la mortalité par fibrillation ventriculaire et par crise cardiaque. Plusieurs études de comparaison de la nortriptyline, un TCA, et de la paroxétine, un SSRI, ont clairement démontré que les TCA entraînent une augmentation de la fréquence cardiaque chez les patients dépressifs présentant des troubles cardiovasculaires. La nortriptyline entraîne une augmentation de 11% de la fréquence cardiaque et une réduction de 14% de la variabilité de la fréquence cardiaque. D'ailleurs, 18% des patients traités à la nortriptyline ont dû arrêter le traitement suite à l'apparition d'événements cardiovasculaires néfastes comparé à 2% des patients dans le groupe paroxétine. De plus, en interaction avec des médicaments cardiaques, les TCA interfèrent avec la recapture neuronale de la clonidine et de la guanéthidine, deux substances utilisées dans le traitement des maladies cardiovasculaires, et donc antagonisent leur action antihypertensive. Les TCA peuvent également potentialiser l'effet antihypertenseur de la prozazine et les effets de bouche sèche peuvent gêner l'absorption de nitrates sublinguaux (Table 6). En prenant en compte toutes ces informations, les TCA sont actuellement proscrits chez les patients cardiaques car malgré leur efficacité dans le traitement de la dépression, un traitement aux TCA induit une toxicité capable d'aggraver le pronostic cardiovasculaire des patients dépressifs.

Agent	Starting dose	Maximum dose	General side effects	Cardiovascular effects
Serotonin reuptake inhibitor				
Sertraline	12.5- 25 mg/day	200 mg/day	Sexual dysfunction, nausea, diarrhoea, headache	Benign bradycardia
Fluoxetine	5- 10 mg/day	80 mg/day	Anxiety, agitation, insomnia, somnolence, sedation	
Paroxetine	10 mg/day	50 mg/day	Tremor	
Tricyclics				
Amitriptyline	10- 25 mg at baseline	300 mg/day	Sedation, somnolence, dry mouth, blurry vision	Increase QT, PR, QRS interval, Decrease T wave amplitude, arrhythmias, postural hypotension
Imipramine	10- 25 mg at baseline	300 mg/day	Constipation, urinary retention	
Nortriptyline	10 mg/day	150 mg/day	Anxiety, insomnia, weight gain	
Desipramine	25 mg/day	300 mg/day		
Psychostimulant				
Methylphenidate	2.5 mg twice a day	20 mg twice a day	Anxiety, agitation, insomnia, anorexia, paranoia	Tachycardia (mild), hypertension (mild)
Other agents				
Bupropion	75 mg/day	150 mg three time a day	Anorexia, nausea, anxiety, agitation, insomnia, seizure	Hypertension (dose related)
Venlafaxine	12.5 mg twice a day	125 mg three time a day	Headache, sexual dysfunction, anxiety, insomnia, somnolence, dizziness	
Trazadone	25 mg/day	600 mg/day	Sedation, nausea, headache, priapism (rare)	Postural hypotension, arrhythmias (rare)
Mirtazepine	15 mg every hour of sleep	45 mg every hour of sleep	Sedation, somnolence, dry mouth, anticholinergic effect, dizziness, agranulocytose (rare)	

Table 5: Antidépresseurs généralement utilisés, dosages, effets secondaires généraux et cardiovasculaires. D'après Shah et al, 2004 [434].

1.2 Les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (SSRI)

L'introduction des SSRI a énormément augmenté l'efficacité pharmacologique des traitements de la dépression. Les SSRI qui sont beaucoup mieux tolérés et du fait de leur moindre toxicité sont actuellement recommandés dans le traitement de la dépression des patients cardiaques. Chez des patients sains, les SSRI n'ont pas d'effet néfaste sur la contractilité et la conductance cardiaque et ils ne présentent aucune cardiotoxicité en overdose (Table 5). Chez les patients avec des pathologies cardiovasculaires, il n'y a pas de modification au niveau de l'électrocardiogramme et de la pression artérielle bien qu'ils puissent ralentir la fréquence cardiaque. Les SSRI ont cependant la capacité d'interagir avec un grand nombre de médicaments utilisés dans le traitement des troubles cardiaques car ils inhibent l'iso enzyme hépatique du cytochrome P450 (Table 6). L'enzyme CYP450 joue un rôle important dans l'oxydation et l'élimination d'un grand nombre de médicaments incluant

les SSRI eux-mêmes. Leur association avec des médicaments à visée cardiovasculaire doit tenir compte des risques d'accumulation ou de métabolisation trop rapide de ces derniers. Par ailleurs, la diminution du métabolisme des SSRI augmente le risque de syndrome sérotoninergique [468].

Medication	Effect on cardiac agent
Interaction involving tricyclic antidepressant	
Type Ia antiarrhythmic	Potentiate delay in cardiac conduction, heart block
Antihypertensive: Guanetidine, clonidine	Antagonise antihypertensive effect, potentiate orthostatic hypotension
Reserpine	Orthostatic hypotension
Sublingual nitrates	Oral absorption hindered by dry mouth
A-Adrenergic blocking agents	Potentiate anti-hypertensive effect
Interaction involving serotonergic antidepressant	
Lipophilic β -blockers	Increase blood levels due to decrease hepatic degradation
Type Ic antiarrhythmic	
Angiotensin converting enzyme inhibitors	
Warfarin	
Digitoxin	Increase bioavailability due to displacement from protein-binding site

Table 6: Interaction entre médication cardiaque et psychotrope : interaction impliquant les antidépresseurs tricycliques et sérotoninergiques. D'après Shah et al, 2004 [434].

1.3 Les médicaments cardiaques

De nombreuses médications cardiovasculaires ont montré des effets neuropsychiatriques, les β -bloquants présentant les effets les plus importants. Alors qu'ils sont utilisés dans le traitement des troubles anxieux, ils peuvent exacerber les symptômes de patients présentant une dépression. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, les antagonistes des canaux calciques et la méthyl dopa peuvent également induire ou exacerber des symptômes dépressifs.

2/ AMELIORATION DES SYMPTÔMES DEPRESSIFS CHEZ LES PATIENTS SOUFFRANTS DE PATHOLOGIES VASCULAIRES

La dépression majeure est une pathologie qui revêt un aspect récurrent sur toute la vie pour plus de 75% des patients, en général caractérisée par une succession de phases de rémission et de rechute [11]. Les patients rétablis à la suite d'un premier épisode dépressif présentent un risque de récurrence dans les 6 mois évalué à 50% en cas d'arrêt du traitement [12]. Il est classique de considérer plusieurs modalités d'évolution sous traitement antidépresseur. La notion de réponse rend compte habituellement d'une diminution de 50% à un score d'échelle d'intensité de la dépression (HDRS ou MADRS). La rémission se définit

par le retour du score à une échelle de dépression sous un score seuil (score de HDRS ou de MADRS ≤ 10). L'épisode de dépression est considéré comme guéri en cas de maintien de la rémission sur une période suffisamment longue (habituellement de 6 mois à un an). Cette terminologie permet ainsi de définir la rechute comme la réapparition de la symptomatologie dépressive après réponse ou rémission, et avant que l'épisode puisse être considéré comme guéri. La récurrence ou récidence traduit l'apparition d'un nouvel épisode à distance de la guérison [469] (Figure 14). La résistance aux AD a été définie de nombreuses façons dans la littérature [470]. Un échec dans la réponse à un simple essai de monothérapie est la définition la plus inclusive, le model "five-stage" de Thase et Rush's est plus restrictive puisqu'elle considère l'échec de la réponse à deux ou plus monothérapies [471]. Environ 50% des patients dépressifs présentent une réponse adéquate, environ 15% ont une réponse partielle mais entre 20 et 35% des patients sont classifiés comme non-répondeurs [472]. De plus, certains patients deviennent dépressifs plus sévèrement après l'initiation du traitement. Ainsi, il existe une large variété de réponses aux traitements de la dépression qui s'étend d'une rémission complète à une réponse partielle, de la non réponse à la détérioration.

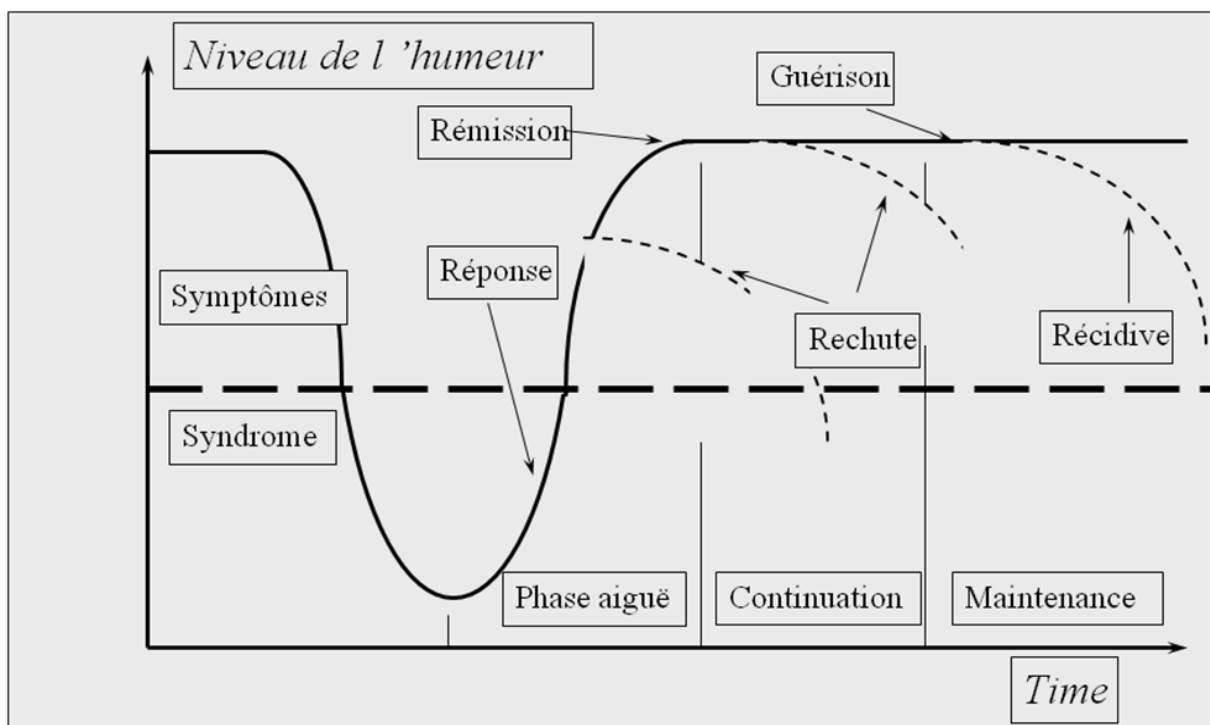


Figure 14: Les différentes phases du traitement de la dépression. D'après Kupfer, 1991 [469].

L'efficacité des traitements AD chez les patients dépressifs avec des maladies cardiovasculaires ne se limite pas uniquement à leur capacité à réduire la mortalité et la

morbidité cardiovasculaire mais surtout à l'amélioration des troubles dépressifs. En effet, d'une part, les formes de dépression résistantes aux AD peuvent être considérées comme un marqueurs de risque cardiaque étant donné que la dépression majeure résistante aux traitements est associée à un haut risque de mortalité et de morbidité cardiovasculaires chez les patients suite à un syndrome coronarien aiguë et d'autre part, plusieurs marqueurs de risques cardiovasculaires peuvent prédire un risque élevé de résistance aux antidépresseurs. Ainsi, la résistance aux AD est fréquemment décrite chez les patients suite à une maladie coronarienne et semble augmenter chez ces patients le taux de morbidité et de mortalité cardiaque.

2.1 Événements cardiaques et résistance aux antidépresseurs

De nombreuses études ont récemment démontré que la dépression majeure résistante aux AD est associée à une augmentation des risques de morbidité et de mortalité par maladies cardiovasculaires. Parmi ces études, nous pouvons citer l'étude ENRICH (the enhancing recovery in coronary heart disease) menée afin de déterminer si le traitement de la dépression peut réduire le risque de récurrence d'infarctus ou de décès suite à un infarctus du myocarde. Dans cette étude, des patients présentant une dépression majeure ou mineure ou un faible support social ont été aléatoirement assignés à un lot correspondant à des soins habituels ou à un lot correspondant à une intervention par thérapie comportementale cognitive de 6 mois (« Groupe intervention »). De plus, dans le groupe intervention, un traitement à la sertraline a été donné aux patients présentant une dépression sévère au début de l'étude et à ceux dont le score BDI ne s'est pas amélioré d'au moins 50% après 6 séances de thérapie. Cette étude n'a pas permis de mettre en évidence une différence significative entre les groupes pour la mortalité par re-infarctus dans les 29 mois. Cependant, parmi les patients présentant une dépression majeure dans le groupe intervention, ceux qui n'ont pas expérimenté une réponse au traitement présentent un risque de mortalité plus élevé que ceux qui répondent au traitement. Les patients pour qui la sévérité de la dépression s'est aggravée malgré le traitement ont 1.7 fois plus de chance de décès dans les mois qui suivent que ceux dont le score BDI n'a pas évolué et 2.5 fois plus de chance de décès que ceux qui ont amélioré leur score. Cet effet est alors indépendant du score initial, de l'AD utilisé, et des prédictors de mortalité suite à un infarctus du myocarde incluant la fraction d'éjection ventriculaire, l'âge, et une histoire préalable d'infarctus du myocarde. Curieusement, bien qu'il y ait une forte relation entre les modifications du score BDI et le taux de mortalité dans le « groupe intervention », cette relation n'est pas significative dans le groupe de soin habituel (Figure

15). Bien que moins de sujets dans le groupe intervention (15%) ne montrent aucune amélioration au score à la BDI que dans le groupe de soin habituel (26%), le taux de mortalité chez les patients qui ne répondent pas au traitement est plus élevé dans le groupe intervention (21%) que dans le groupe de soin habituel (10%). Les résultats de cette étude sont en accord avec ceux de nombreuses études telles que la MIN-D (The myocardial infarction and depression intervention trial), la SADHART (The Sertraline Antidepressant Heart Attack Randomized Trial) et la MHART (The Montréal Heart Attack Readjustment Trial) démontrant que la résistance au traitement AD après hospitalisation pour un syndrome coronarien identifie un sous-groupe de patients à haut risque de mortalité cardiaque.

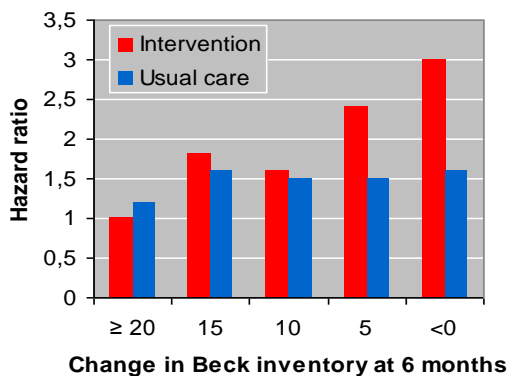


Figure 15: Relation entre les modifications au score de dépression et le risque de mortalité reporté dans l'étude ENRICHD (Enhanced Recovery in Coronary Heart Disease). D'après Carney & Freedland, 2009 [2].

2.2 Facteurs de risques cardiovasculaires et résistance aux antidépresseurs

A ce jour il n'y a pas d'explications claires de pourquoi un taux de résistance élevé aux AD est associé à un plus grand risque de mortalité et de morbidité cardiaque. Cependant un grand nombre de marqueurs biologiques associés à une faible réponse aux AD ont également été identifiés comme des marqueurs de risques cardiovasculaires. Il semble possible que les patients avec une maladie coronarienne qui ne répondent pas au traitement aient une forme de dépression qualitativement différente de ceux qui répondent au traitement. C'est aussi le cas dans les dépressions dites "vasculaires", la présence de lésions périventriculaires ou corticales d'origine vasculaires qui prédisposent, précipitent et perpétuent ce sous-type de dépression, ayant un impact négatif sur la réponse aux traitements AD. [120-122].

La résistance aux AD est également associée avec la présence de facteurs de risques cardiovasculaires traditionnels. Une augmentation de l'incidence de dépression a été mise en évidence lorsque celle-ci est associée avec le nombre total de facteurs de risques cardiovasculaires [473]. Le score de risques cardiovasculaires, représenté par la somme des facteurs de risques incluant l'âge, le tabac, une histoire familiale de pathologie vasculaire, de

l'hypertension, du diabète et une hypercholestérolémie est associé à un faible taux de remissions (Table 7) [474]. En effet, un manque d'amélioration des symptômes dépressifs et un faible taux de remissions aux SSRI ont été associés avec la cumulation des facteurs de risques cardiovasculaires et peut être prédit par le fardeau de maladie cardiaque [475, 476]. De plus, bien que un faible taux de cholestérol est reporté chez les patients dépressifs, dans plusieurs études, l'hypercholestérolémie est associée à un faible taux de réponse aux AD [477, 478].

	Lack of clinical response					Lack of medical remission				
	Coefficient	X ²	p	OR	95% CI	Coefficient	X ²	p	OR	95% CI
Total cardiovascular risk	0.24	5.39	.020*	1.27	1.04-1.55	0.23	4.88	.027*	1.25	1.03-1.53
Age (male≥45, female≥55)	0.32	0.86	.32	1.38	0.70-2.70	0.58	2.81	.094	1.78	0.91-3.51
Smoking	0.37	1.65	.20	1.45	0.82-2.55	0.55	3.58	.059	1.72	0.98-3.03
Hypertension	-0.23	0.51	.47	0.79	0.42-1.50	-0.18	0.28	.60	0.84	0.44-1.60
Family history pf cardiovascular disease	0.27	1.15	.28	1.32	0.80-2.17	0.10	0.16	.69	1.11	0.67-1.85
Diabetes mellitus	-1.72	2.31	.13	0.18	0.02-1.6	-2.08	3.32	.068	0.13	0.01-1.17
Hypercholesterolemia	0.46	7.84	.005*	1.58	1.15-2.17	0.47	8.15	.004*	1.59	1.16-2.2

Response = reduction in the 17-items Hamilton score for depression (Ham-D-17) ≥50%; Remission = final Ham-D-17 ≤7; OR = odds ratio; CI = confidence interval.

*p<.05.

^a For the first logistic regression, the covariates were the cardiovascular risk score, age of onset of MDD, and baseline severity of depression (Ham-D-17 score). For the second logistic regression, the covariate were the 6 cardiovascular risk factors (age, hypertension, family history, smoking, diabetes and hypercholesterolemia, age of onset of MDD and baseline severity of depression).

Table 7: Correlation entre les conséquences du traitement (réponse et remission) et les facteurs de risque cardiovasculaire^a. D'après Iosifescu et al, 2005 [474].

Finalement, une élévation de marqueurs inflammatoires [479-481], une dérégulation de l'axe HPA [482] et du système nerveux autonome [483, 484] ainsi qu'un faible taux d'hormone thyroïdienne ou d'acide gras oméga-3 [485] sont associés à une réponse pauvre à une variété d'AD incluant des SSRI et des TCA. Dans des études séparées, ils ont également été identifiés comme des facteurs de risque de morbidité et de mortalité cardiaque.

3/ AMELIORATION DU PRONOSTIC CARDIAQUE

Ainsi, l'absence d'effets cardiovasculaires néfastes des SSRI fait qu'ils sont en général recommandés en première intention dans le traitement des patients dépressifs souffrant de troubles cardiovasculaires. Cependant, leur capacité à améliorer le pronostic cardiovasculaire et à diminuer le taux d'événements cardiaques futurs n'est pas clairement établie. L'étude

SADHART (The Sertraline Antidepressant Heart Attack Randomized Trial) est une des plus larges études sur l'effet des traitements AD chez les patients souffrant de pathologies coronariennes (infarctus du myocarde ou une angine de poitrine instable). Dans cette étude, un traitement à la Sertraline n'a pas d'effet significatif sur la fonction ventriculaire, la pression artérielle, la conductance cardiaque et sur la fréquence cardiaque. L'incidence d'événements cardiovasculaires indésirables (infarctus du myocarde ou cérébral, angor ou maladie coronarienne) est numériquement plus grande dans le groupe placebo (22.4%) comparé au groupe Sertraline (14.5%). Cependant, bien que cette étude soit l'une des plus larges études cliniques, cette différence n'apparaît pas significative étant donné la petite taille des échantillons. Plusieurs revues de la littérature et méta-analyses ont tenté d'évaluer les effets des SSRI sur l'incidence d'événements cardiaques indésirables. Von Ruden et al. (2008) [40] identifient 13 études parmi lesquelles 5 études concluent que l'utilisation de SSRI diminuent la mortalité et la morbidité cardiovasculaires, 2 études au contraire ont démontré une aggravation du pronostic cardiovasculaire chez les patients traités aux SSRI et 6 études concluent qu'il n'y a pas d'association significative entre l'utilisation des SSRI et le pronostic cardiovasculaire. Ainsi, bien que les résultats de ces études semblent prometteurs, ils sont insuffisants à l'heure actuelle pour déterminer si l'utilisation des SSRI affecte le système cardiovasculaire. De plus, dans une revue systématique sur les études des AD chez les patients à hauts risques cardiovasculaires (infarctus du myocarde ou cérébral, diabète, âge, fumeur, alcool, obésité), Swenson et al. (2006) [486] ne peuvent pas conclure si les SSRI sont associés avec un plus grand ou un moindre risque d'événement cardiovasculaire adverse. Ainsi, malgré le nombre d'études qui ont examiné la relation entre les SSRI et la morbidité et la mortalité par maladies cardiovasculaires, les limites des protocoles expérimentaux utilisés empêchent de répondre de façon définitive à cette question. Un rapport publié récemment par un groupe d'expert interdisciplinaire convoqué par « the national Heart, Lung, and Blood Institutut » pour développer des recommandations pour l'évaluation et le traitement des patients dépressifs avec des maladies coronariennes recommande : « RCT is needed to determine whether SSRI, psychotherapy or combined treatment can reduce risk of CVD events and mortality associated with depression in CHD patients ».

Vers une modélisation des liens entre la dépression et les maladies cardiovasculaires

1/ INTERET D'UNE APPROCHE PRECLINIQUE

1.1 Direction de l'interaction entre la dépression et les maladies cardiovasculaires

L'interaction d'un grand nombre de facteurs de risque aussi bien chez les patients dépressifs que chez les patients souffrant de pathologies cardiovasculaires pose la question de la direction de l'interaction entre la dépression et les maladies cardiovasculaires. L'exemple le plus représentatif qui peut être cité est la comorbidité entre la dépression et les facteurs de risques cardiovasculaires traditionnels. En effet, les patients dépressifs présentent généralement un grand nombre de facteurs de risque traditionnels incluant des facteurs physiologiques tels que l'hypertension ou des facteurs comportementaux comme la consommation excessive d'alcool ou de tabac. Bien que la plupart des études ajustent le pronostic cardiovasculaire par exclusion de ces facteurs, cette comorbidité rend difficile de conclure sur la dépression en tant que facteur de risque cardiovasculaire indépendant. Ainsi, une première limite aux études cliniques est l'absence de réponse claire sur la direction du lien entre la dépression et les maladies cardiovasculaires. Plusieurs hypothèses ont alors été proposées (Figure 16). Un premier modèle propose que chacune des deux pathologies, provoquées par des sous-produits différents, produit en retour la seconde pathologie. Le second modèle suggère qu'un facteur commun serait capable de provoquer les deux pathologies. Finalement, le troisième modèle propose que soit la dépression soit les pathologies cardiovasculaires induisent un ou plusieurs facteurs qui seraient communs aux deux pathologies et pourraient induire la seconde pathologie. L'utilisation de modèles animaux permettrait de s'affranchir de l'interaction des différents facteurs de risque dans le but de tester ces modèles hypothétiques sur la directionnalité du lien entre la dépression et les maladies cardiovasculaires.

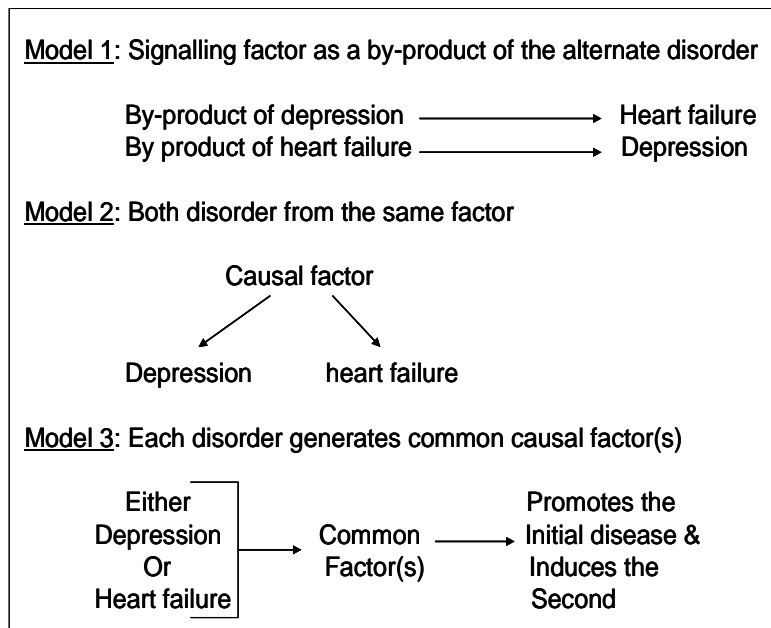


Figure 16: Trois hypothèses non exclusives pour expliquer la co-morbidité entre la dépression et les maladies cardiovasculaires. D'après Johnson & Grippo, 2006 [36].

1.2 Le grand nombre d'hypothèses physiopathologiques

Une association claire qui semble bidirectionnelle existe entre la dépression et les maladies cardiovasculaires. Cependant, la nature exacte de cette relation reste difficile à définir étant donné le grand nombre de mécanismes physiopathologiques proposés dans le but d'expliquer ce lien. La figure 17 présente un modèle physiopathologique intégratif des mécanismes importants pouvant influencer l'association entre la dépression et les dérégulations du système cardiovasculaire et illustre les différentes hypothèses proposées pour expliquer cette interaction. Des mécanismes centraux qui incluent les systèmes de neurotransmission, l'axe HPA ou le SNA jouent un rôle majeur dans l'étiologie de la dépression et des dérégulations cardiovasculaires. Des mécanismes périphériques majoritairement contrôlés par des mécanismes centraux et dont la dérégulation conduit à des événements cardiaques sont également observés chez les patients dépressifs. Le feed-back du système cardiovasculaire au niveau central perpétue alors le cycle de dérégulation et peut conduire à l'apparition de symptômes dépressifs. L'influence de stressseurs exogènes seuls ou couplés à des prédispositions génétiques joue également un rôle dans l'initiation de la dépression et dans la pathogenèse de troubles cardiovasculaires. Ces effets sur l'humeur et le système cardiovasculaire sont alors médiés par des dérégulations à la fois au niveau central et périphérique. Ce modèle physiopathologique illustre la complexité de la relation entre la dépression et les maladies cardiovasculaires étant donné la bidirectionnalité de ce lien, le grand nombre de mécanismes hypothétiques et surtout l'imbrication et l'influence de ces

différents mécanismes entre eux. Ces différentes hypothèses pathophysiologiques ont majoritairement émergé d'études cliniques et le manque de recherche expérimentale dans ce domaine rend difficile l'élaboration d'un cadre théorique cohérent pour décrire les mécanismes d'interaction entre la dépression et les maladies cardiovasculaires.

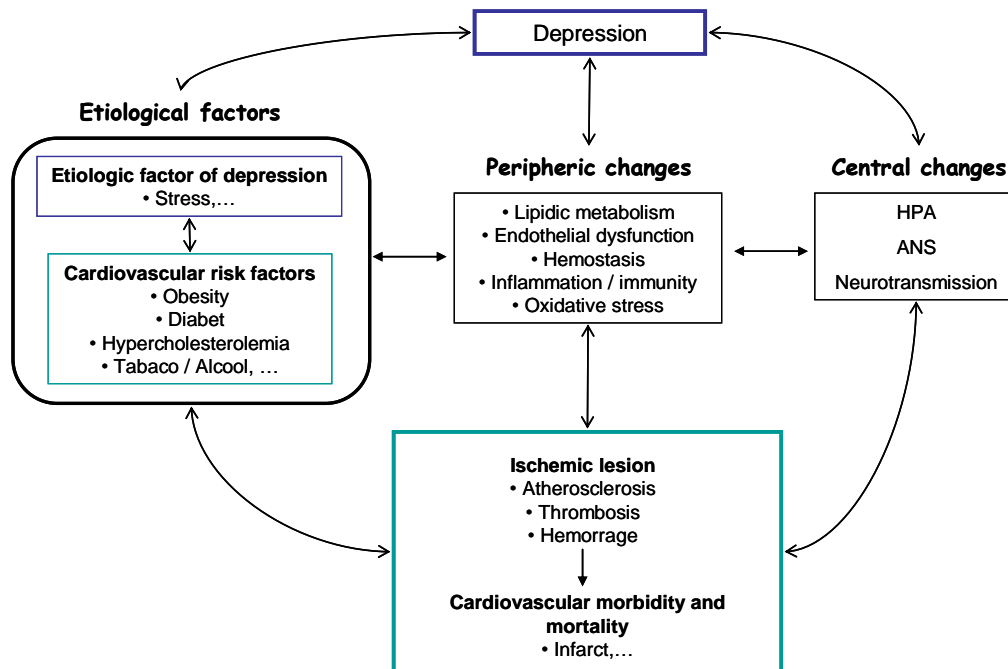


Figure 17: Modèle physiopathologique des mécanismes dont l'implication a été proposée pour expliquer la relation entre la dépression et les maladies cardiovasculaires.

1.3 Les limites thérapeutiques des traitements

Finalement, il existe un problème de médication important pour les patients dépressifs présentant des troubles cardiovasculaires puisque les traitements AD sont souvent associés à des effets cardiovasculaires indésirables. De plus, l'efficacité thérapeutique des AD semble affaiblie par la présence à la fois de lésions cardiovasculaires et de facteurs de risques cardiovasculaires. On peut faire l'hypothèse qu'une meilleure compréhension des mécanismes de résistance aux traitements, s'appuyant sur la connaissance que nous avons des mécanismes d'action des AD, pourrait éclairer sur la nature des liens entre dépression et maladie vasculaire. En conséquence, il semble particulièrement intéressant de développer un modèle animal qui permette d'étudier spécifiquement les mécanismes responsables de l'association entre les maladies cardiovasculaires et la dépression et de développer de nouvelles pistes thérapeutiques pour cette population de patients.

2/ MODELISATION DE LA DEPRESSION MAJEURE

2.1 Les critères de validation d'un modèle animal

Un modèle animal est défini comme « une préparation expérimentale développée dans une espèce, dans le but d'étudier les phénomènes qui se produisent dans une autre espèce » [487]. Dans le cas de la dépression, les modèles animaux sont utilisés à la fois comme test de screening afin de découvrir et de développer de nouveaux AD et comme simulateur afin d'étudier les différents aspects neurobiologiques de la dépression ainsi que les mécanismes neuropharmacologiques impliqués dans les effets des AD [488]. Cliniquement, un épisode de dépression est fréquemment précipité par une exposition au stress, aigue et sévère ou chronique et modérée [9]. Partant de ce constat, plusieurs modèles précliniques de dépression ont été développés sur la base d'une exposition d'animaux à différents types de stressseurs, induisant des changements comportementaux analogues à ceux observés dans la dépression et reversés par un traitement AD [489, 490].

Actuellement, l'évaluation de la validité d'un modèle animal de dépression se réfère à trois principaux critères, la validité prédictive (predictive validity), la validité apparente (face validity) et la validité de construction (construct validity) [488, 489, 491, 492]. Le concept de validité prédictive implique que les manipulations connues pour influencer l'état pathologique doivent avoir des effets similaires dans le modèle. La validité apparente fait référence aux similarités phénoménologiques entre le modèle et la pathologie à modéliser. La validité de construction doit présenter une pertinence théorique rationnelle. Actuellement, dans l'étude des pathologies psychiatriques, le critère de validité de construction repose sur les hypothèses neurobiologiques supposées être à l'origine de l'anxiété ou de la dépression [493].

Critères de validité prédictive

En pratique, la validité prédictive d'un modèle animal de dépression est principalement déterminée par sa réponse aux AD. Pour être valide, le modèle doit être spécifique : un modèle de dépression doit répondre aux AD cliniquement efficaces et doit échouer dans sa réponse à d'autres agents inefficaces dans le traitement de la dépression. Par exemple, il est actuellement reconnu que le traitement le plus efficace dans la dépression est la thérapie électroconvulsive donc un point de départ important pour tester la validité d'un modèle animal de dépression est de vérifier s'il répond positivement à ce traitement. De plus, malgré que 30% des patients dépressifs sont résistants aux traitements AD pharmacologiques [494, 495], la validité prédictive d'un modèle qui ne répond pas aux AD tricycliques (TCA)

de référence, aux inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (SSRI) ou aux inhibiteurs de la recapture de la noradrénaline et de la sérotonine (SNRI) pourra être remise en question. Cependant, la réponse du modèle aux AD n'est pas suffisante pour définir un modèle animal de dépression car ce seul critère n'est pas suffisant pour conférer au modèle une validité discriminative. De nombreux AD sont également efficaces dans les modèles animaux d'anxiété et de panique suite à un traitement chronique [496, 497]. Il est donc crucial pour établir la validité prédictive d'un modèle animal de dépression de démontrer que ce modèle ne réponde pas aux benzodiazépines. Finalement, le modèle doit être sensible et répondre, pour un large nombre de composés structurellement différents, aux doses thérapeutiques. Il est actuellement reconnu qu'aucun modèle ne possède un taux de prédiction de 100%, bien que certains paradigmes expérimentaux s'approchent de ce niveau de prédictibilité. La validité d'un modèle animal de dépression repose également sur l'efficacité de sa réponse à l'administration chronique d'un traitement AD. En effet, la pharmacothérapie de la dépression requiert un traitement chronique aux AD puisque cliniquement l'effet thérapeutique des AD augmente au cours du temps. Les effets chroniques d'un traitement peuvent être associés à des changements adaptatifs au niveau des récepteurs de certains neurotransmetteurs alors que ces modifications ne sont pas induites suite à l'administration aiguë d'AD. Ainsi, en comparaison aux effets d'un traitement chronique, les effets aigus observés dans un modèle animal peuvent être opposés, orthogonaux ou encore absents. Sans tenir compte de sa réponse précoce, la validité d'un modèle animal de dépression dépend donc de sa réponse à l'administration chronique d'un traitement. De plus, la tolérance aux effets d'un traitement chronique aux AD n'étant pas observée en clinique, la réponse dans le modèle doit pouvoir être maintenue jusqu'à l'arrêt du traitement.

Critères de validité apparente

La validité apparente d'un modèle animal de dépression fait référence aux degrés de ressemblance symptomatologique entre le modèle et les conditions cliniques. Le DSM-IV représente un outil intéressant pour évaluer ces similitudes. Cependant, l'ensemble des symptômes de la dépression évalué par un rapport verbal subjectif tel que l'auto-évaluation, les sentiments de culpabilité excessive et les pensées morbides et suicidaires, ne peut pas être modélisé chez l'animal [489, 490]. D'après le DSM-IV, les deux principaux symptômes de la dépression sont l'humeur dépressive et la perte d'intérêt ou de plaisir (l'anhédonie). Etant donné que seul l'anhédonie peut être mimée chez l'animal, ce symptôme assure une position centrale pour l'évaluation de la validité d'un modèle animal de dépression. Les symptômes

subsidiaries de la dépression tels que les changements psychomoteurs, la fatigue ou la perte d'énergie et les perturbations du sommeil ou de la prise alimentaire peuvent également être modélisés chez l'animal. Cependant, la considération de ces symptômes comme une caractéristique majeure ou unique de la validité du modèle manque de rigueur car des modifications diamétralement opposées ont été citées dans différents modèles animaux [498]. Ce manque de précision est soutenu par les caractéristiques cliniques de ces modifications comportementales qui peuvent augmenter ou diminuer. En supplément des symptômes dépressifs définis dans le DSM-IV, la validité de face d'un modèle animal de dépression peut s'appuyer sur l'étude des marqueurs physiologiques fortement associés à la dépression tels que l'augmentation de l'activité de l'axe HPA [499], habituellement détectée par un test de suppression à la dexaméthasone ; des anomalies de l'architecture du sommeil [500], le mieux établi étant la diminution de la latence d'entrée dans la première période de mouvement rapide des yeux, et une variété de marqueurs immunologiques [501].

Critères de validité de construction

Les théories de la dépression utilisées pour évaluer la validité théorique d'un modèle animal de dépression sont reliées aux mécanismes neurobiologiques, étiologiques ou psychologiques de la dépression. Cependant, la validation d'un modèle animal de dépression est limitée par l'absence de théorie bien établie sur les mécanismes étiologiques et physiologiques de la dépression. En effet, il existe peu d'éléments dans la littérature sur les anomalies neurochimiques ou les marqueurs biologiques associés à la dépression qui constituent un standard théorique contre lequel confronter les modèles animaux. La validation étiologique d'un modèle animal de dépression reste également difficile par le fait que la pathogenèse de la dépression soit multifactorielle. Elle implique à la fois des facteurs psychologiques tels que des événements de vie indésirables, l'exposition chronique et modérée au stress, des expériences aversives durant l'adolescence, des traits de personnalité introvertis ou impulsifs et des facteurs biologiques tels que l'influence génétique, et un grand nombre de pathologies et de médicaments [502]. Ce point a largement été étudié dans la construction des modèles animaux de dépression dans lesquels généralement un seul facteur de risque est utilisé alors que peu de facteurs étiologiques identifiés semblent suffisants pour précipiter la dépression chez des individus dépourvus d'autres risques potentiels. Bien que les attentes pour évaluer la validité théorique des modèles animaux de dépression soient limitées par le manque de structure théorique au niveau clinique, un grand nombre de généralisations restent possibles. La plupart des modèles animaux de dépression sont basés sur les réponses à

différents type de stressseurs, et généralement justifiés en faisant référence au rôle des évènements de vie stressants dans l'étiologie de la dépression [503, 504]. Cependant, la pertinence d'un modèle animal de dépression augmente avec l'utilisation chronique de stressseurs écologiquement pertinents.

2.2 Tests des phénotypes de la dépression

Avant de discuter la validité étiologique, symptomatologique et pharmacologique des différents modèles animaux de la dépression, il est important de discuter la validité des tests utilisés dans l'étude des différents phénotypes de la dépression. La distinction entre un modèle et un test n'étant pas toujours claire, certains tests sont parfois considérés comme des modèles. Un modèle est défini par deux variables, une variable indépendante représentée par une manipulation (ex : exposition à un stress chronique) et une variable dépendante représentée par les conséquences comportementales et/ou neurochimiques de cette manipulation. Les modifications durables induites dans le modèle peuvent alors être détectées à l'aide de certains tests. Différents tests comportementaux ont alors été développés dans le but d'explorer certaines dimensions cliniques de la dépression, puisqu'ils évaluent généralement un seul symptôme ou marqueur de la dépression. Parmi les dimensions cliniques de la dépression usuellement modélisées, on peut citer l'anhédonie, qui représente un des principaux symptômes de la dépression mais également d'autres symptômes subsidiaires à la dépression tels que les altérations psychomotrices, les troubles anxieux et les comportements de désespoir.

Mesure des comportements anhédoniques

Test de préférence au sucrose

L'anhédonie, définie comme une perte des capacités à éprouver du plaisir représente un des principaux symptômes de la dépression chez l'homme. Elle peut être modélisée chez l'animal en mesurant sa réactivité pour une récompense, un stimulus agréable, comme dans le test de préférence au sucrose. Dans ce test, les animaux ont accès à deux bouteilles, l'une contenant de l'eau ordinaire et l'autre une solution sucrée. On peut alors mesurer la préférence des animaux pour la solution sucrée ainsi que le taux de consommation. Dans les différents modèles de dépression présentés ci-dessous et notamment dans le modèle de stress chronique, la préférence des animaux pour la solution palatable (qui procure une sensation agréable lors de sa consommation) est altérée, démontrant la présence d'un symptôme similaire à l'un des symptômes présents dans un état de type dépressif dans ces modèles [505, 506]. De plus, cette

perte de réactivité face à une récompense est reversée par un traitement chronique, et non aigu, aux différentes classes d'AD. Cependant, la validité de ce test en tant que test d'anhédonie peut être discutée car il semble difficilement répliquable et aussi en raison de la difficulté d'interprétation des résultats [507]. En effet, la mesure la plus courante et la plus reproductible est représentée par la consommation de sucrose plutôt que par la préférence en elle-même, ce qui pose problème pour la considérer comme une stricte mesure d'anhédonie. De plus, lors d'un stress chronique, cette diminution de la consommation pourrait être induite par l'effet aigu et non spécifique des stressseurs puisque la consommation de sucrose se normalise dès la fin de la procédure de stress chronique [508].

Le « reward maze test »

Ce paradigme comportemental a été développé chez la souris dans le but d'évaluer la motivation des animaux pour un stimulus palatable [509]. Dans un dispositif à trois compartiments différents séparés par des portes, un morceau de gâteau au chocolat est placé dans le troisième compartiment tandis que le point de départ est représenté par le premier compartiment. Le passage de l'animal dans le deuxième compartiment déclenche la fermeture de la porte. Ensuite, la latence des animaux pour croquer la récompense ainsi que le nombre de fois où l'animal vient goûter le gâteau sont mesurés. Le test est ensuite répliqué quatre fois sur une période de 9 jours. Ce test est sensible au stress chronique puisque les animaux soumis au stress présentent une augmentation de la latence pour venir croquer le gâteau au cours des sessions. Cet effet est reversé par un traitement AD et n'est pas observé pour une croquette de nourriture habituelle. Ce test permet d'évaluer trois dimensions comportementales : (1) les comportements d'anxiété et d'exploration d'un nouvel environnement au cours de la première séance, (2) l'habituation à un nouvel environnement (diminution de la latence pour passer la première porte au cours des sessions) et (3) une anhédonie (latence pour croquer le gâteau vs la croquette de nourriture habituelle) en interaction avec l'habituation à l'environnement (latence pour croquer le gâteau au cours des sessions). Ce test représente donc un paradigme valable pour étudier l'anhédonie induite dans un modèle animal de dépression car il présente l'avantage de tester plusieurs mesures au cours de plusieurs sessions.

Les tests de réponses opérantes

Les symptômes anhédoniques observés dans la dépression suggèrent que ce désordre est associé à une altération des systèmes de récompense. Ainsi, dans le but de modéliser

l'anhédonie induite par la dépression chez l'animal, de nombreuses études ont tenté d'évaluer la recherche de plaisir chez l'animal à travers des procédures de conditionnement opérant en mesurant le taux de réponses pour un renforçateur. L'animal apprend à appuyer sur un levier dans le but d'obtenir soit une récompense telles qu'une solution ou une nourriture palatable ou une auto-stimulation intra-cranienne des zones cérébrales de récompense [493].

Mesure du comportement sexuel

L'anhédonie peut également être mesurée chez l'animal en étudiant le comportement sexuel du mâle [510, 511]. Dans ce test, une femelle rendue proceptive (qui sollicite activement la copulation) par administration d'oestrogène et de progestérone est placée dans la cage du mâle et le comportement sexuel de celui-ci est observé à travers les comportements de monte, d'intromission et d'éjaculation. Plusieurs études ont mis en évidence une diminution de l'activité sexuelle du mâle suite à un stress chronique bien que ces altérations ne soient pas systématiques. De plus, bien que ces altérations du comportement sexuel soient reversées par un traitement chronique à la mélatonine, aucune étude n'a testé les effets d'un traitement chronique aux AD [512] (qui eux mêmes sont à l'origine de dysfonctions sexuelles).

Mesure de comportements associés à d'autres symptômes de la dépression

Comportements de désespoir : tests de la nage forcée (FST) et de suspension par la queue (TST)

Le test de la nage forcée (aussi appelé test de porsolt ou test de désespoir, FST : Forced Swimming Test) et le test de suspension par la queue (TST : Tail Suspension Test) sont classiquement utilisés dans l'étude de la dépression, en raison de leur rapidité d'utilisation, de leur facilité de mise en œuvre et de leur reproductibilité [493, 513]. Dans ces deux différents paradigmes, les animaux sont placés dans une situation dont ils ne peuvent s'échapper (FST : cylindre rempli d'eau, TST : suspension par la queue). En réponse à cette situation inéluctable, les animaux vont tout d'abord se débattre vigoureusement puis, au bout de quelques minutes, ils développent une posture d'immobilité. Ce comportement d'immobilité est qualifié de « comportement de résignation ou de désespoir ». Ces tests sont donc utilisés comme des screeneurs phénotypiques des comportements liés à la dépression : une diminution du comportement d'immobilité est interprétée comme un phénotype de type AD alors qu'à l'inverse une augmentation de ce comportement est assimilée à une

augmentation des comportements de type dépressif [514-516]. Cependant, la signification précise ainsi que la pertinence du comportement d'immobilité dans l'étude de la dépression fait toujours l'objet de nombreuses discussions. De plus, ces tests sont sensibles aux différentes classes d'AD (pharmacologiques et non pharmacologiques) dont l'administration permet de retarder l'apparition du comportement de résignation. Ces paradigmes sont donc très populaires dans le screening de nouveaux composés potentiellement AD. Cependant, il existe une limite pharmacologique de ces tests pour l'étude de la dépression puisqu'ils sont sensibles à l'administration aigue d'AD alors que les traitements chez l'homme ne sont efficaces qu'après plusieurs semaines. Le FST et le TST sont également sensibles à de nombreux facteurs qui influencent ou qui sont altérés dans la dépression tels qu'une prédisposition génétique, une exposition préalable au stress, une altération de l'architecture du sommeil et une anhédonie induite par le sevrage aux drogues.

Comportements d'anxiété : le novelty-suppressed feeding test (NSF)

Le NSF test, ou test d'hypophagie induite par la nouveauté, a tout d'abord été développé pour étudier les effets anxiolytiques de certains composés tels que les benzodiazépines [517]. Toutefois, il est également utilisé comme test de dépression car il répond aux effets chroniques des AD. Cependant, il est possible que ce test ne révèle que les propriétés anxiolytiques des AD. Dans ce test, l'animal est placé dans un nouvel environnement dans lequel une pastille de nourriture est placée au centre du dispositif. Ce test permet donc d'évaluer la réactivité émotionnelle face à un nouvel environnement et induit un conflit motivationnel entre l'envie de manger la pastille de nourriture et la peur de s'aventurer au centre du dispositif. Ce test est sensible au stress chronique qui induit une augmentation de la latence des animaux pour aller croquer la pastille de nourriture et cet effet est reversé par un traitement chronique aux AD [361, 509].

Comportement autocentré : le test du splash

Ce test a été mis au point pour étudier le comportement de nettoyage, plus précisément chez la souris, qui est considéré comme reflétant la composante motivationnelle des comportements dirigés vers soi. Dans ce test, les animaux sont éclaboussés avec une solution de sucrose et la latence de nettoyage ainsi que sa fréquence et sa durée sont mesurées. Ce test est également sensible au stress chronique qui induit des altérations du comportement de nettoyage, effet reversé par un traitement chronique aux AD [509, 518].

2.3 Les modèles de dépression

L'idéal pour qu'un modèle animal de dépression soit proche de la pathologie humaine serait qu'il soit basé sur des causes identiques, qu'il induise des profils symptomatologiques similaires et qu'il soit sensible aux mêmes traitements que ceux qui sont efficaces dans la pathologie humaine. De nombreux modèles éthologiques tels que les modèles de séparation maternelle ou de stress chronique imprédictible, ont donc tenté de reproduire ces similarités en se basant sur les effets de stress socio-environnementaux comme facteur étiologique de la dépression afin d'induire l'apparition de phénotype dépressif mesuré à l'aide des tests cités précédemment. Cependant, d'autres modèles, considérés comme empiriques tels que le modèle de bulbectomie olfactive ou les modèles génétiques, ont été fondés non pas en tentant d'imiter l'étiologie de la pathologie humaine mais sur l'apparition d'un phénotype « dépressif- » ou « antidépressif-like ». Ainsi en comparaison aux modèles éthologiques, ces modèles empiriques ont l'inconvénient de présenter peu de relation avec les étiologies cliniques de ce trouble.

Les modèles empiriques

Les modèles de bulbectomie olfactive

L'anosmie résultant d'une lésion bilatérale des bulbes olfactifs entraîne chez les rongeurs une série d'altérations comportementales, neurochimiques, neuroendocrines et neuroimmunes, dont la majorité est comparable aux changements observés dans la dépression. De plus, de nombreuses études ont mis en évidence une atténuation des altérations comportementales et biochimiques suite à un traitement chronique aux AD alors qu'un traitement aigu n'a pas d'effet [519-521].

Les modèles génétiques

Parmi les modèles génétiques utilisés dans l'étude de la neurobiologie et de la pharmacologie de la dépression, il est possible de distinguer les modèles génétiques naturels, représentés par des lignées de souris consanguines ou des lignées sélectionnées chez le rat, et les modèles de manipulations génétiques basés sur l'invalidation ou la surexpression d'un gène [513, 522]. En effet, certaines souches de rongeurs présentent des caractéristiques de type « dépressif » dont la plus connue est la souche Flinder chez le rat [523, 524]. Ces animaux présentent une réponse anormale au stress, des modifications du sommeil et des rythmes circadiens et des altérations de l'activité locomotrice, notamment dans le FST. On peut également citer la souche Wistar Kyoto qui présente des altérations comportementales et

neuroendocriniennes assimilées à celles observées dans la dépression [525]. De façon intéressante, toutes ces altérations, observées dans ces modèles, peuvent être reversées par un traitement AD. Cependant, ces souches sont sélectionnées initialement pour un phénotype précis ou un gène unique et ne sont pas représentatives d'une population générale. La découverte de la technique d'inactivation de gènes, au début des années 90, a permis de multiplier l'utilisation de souris dans les tests précliniques. Cette approche a permis d'évaluer l'implication de certaines protéines, récepteurs ou transporteurs dans la neurobiologie de la dépression et donc de découvrir de nouvelles cibles moléculaires pour l'action des AD [493]. On peut citer les modèles d'inactivation du gène TRK-1 [526] et P11 [527], des gènes des récepteurs aux glucocorticoïdes et au CRF ou du transporteur de la 5-HT [528], dans lesquels une atténuation ou une résistance aux AD est observée. Cependant, l'ablation d'un gène unique ne modélise que très imparfaitement l'étiologie d'un état dépressif chez l'Homme, puisque cette pathologie est plurifactorielle.

Les modèles éthologiques de la dépression

Les modèles basés sur des stress sociaux

➤ Les modèles de séparation maternelle

Les modèles de séparation maternelle infantile chez les primates non humains représentent les premiers modèles d'état dépressif basés sur les effets d'expériences socialement et environnementalement stressantes. La séparation maternelle induit chez le petit des modifications comportementales qui évoluent vers un comportement de désespoir [529]. Ces expériences de séparation maternelle, reproduites dans d'autres espèces comme les rongeurs [530], conduisent également à une réponse endocrine telle qu'une augmentation du CRF et une diminution de glucocorticoïdes dans différentes régions du cerveau [531]. Ces modifications comportementales et endocrines induites par le stress d'une expérience de séparation maternelle et assimilées à un état de type dépressif semblent persister à l'âge adulte ce qui modélise un facteur de risque pour la dépression [532]. De plus, alors que la phase initiale est atténuée par les anxiolytiques, les comportements de désespoir sont quant à eux réduits suite à un traitement AD [533].

➤ Les modèles d'isolement social prolongé

Les expériences d'isolement social prolongé chez les rongeurs ont permis de mettre en évidence des comportements d'agression [534, 535]. Et bien que l'agression ne soit pas considérée comme un des principaux symptômes de la dépression, certaines formes d'irritabilité et d'agression qui peuvent être reversées par un traitement AD ont été mises en évidence chez les adolescents. Une expérience d'isolement social induit également une hyperactivité chez le rat qui peut être assimilée aux perturbations locomotrices décrites dans le DSM-IV puisque que l'hyperactivité induite par l'isolement social est également réduite par un traitement AD [489, 536, 537].

➤ Les modèles basés sur la hiérarchie sociale et la subordination

Parmi les modèles animaux de dépression basés sur des expériences socialement stressantes, on peut également citer les modèles qui s'appuient sur des expériences de compétition au sein du milieu social [538]. Ces modèles d'état dépressif basés sur la hiérarchie sociale et la subordination ont démontré que les animaux subordonnés présentent un grand nombre de modifications comportementales et physiologiques qui peuvent être assimilées aux perturbations observées dans la dépression tels qu'une diminution de la prise alimentaire et une perte de poids, une diminution des comportements dirigés vers soi-même comme par exemple une diminution du comportement de nettoyage, et une hypoactivité ainsi que des modifications neuroendocrines comme une augmentation du niveau de cortisol et une diminution du taux de testostérone [539]. De plus, l'administration répétée d'un traitement AD permet à l'individu soumis de devenir plus compétitif ainsi que d'antagoniser les modifications comportementales et physiologiques induites par une expérience de compétition sociale [360, 540].

➤ Les modèles de défaite sociale

Le paradigme du résident et de l'intrus a été développé afin de définir chez les rongeurs des animaux agressifs, soumis et neutres sur la base de leurs interactions sociales [541]. Par la suite, l'exposition des animaux à différents stressseurs socio-environnementaux provoque une réponse anhédonique (diminution de la préférence au sucrose) qui est moins importante de 40% pour les animaux agressifs en comparaison aux animaux soumis. Le modèle de défaite sociale est une variante de ce paradigme dans lequel les animaux sont délibérément placés dans la cage d'un individu plus agressif, provoquant l'attaque et la défaite de l'intrus [542, 543]. Cette expérience de défaite sociale négative, renforcée par la répétition de contacts sociaux avec l'agresseur, induit des changements comportementaux,

neurologiques et neuroendocrinologiques à long terme ressemblant aux désordres dépressifs chez l'homme. En effet, l'expérience de défaite sociale répétée provoque une suppression de la réponse au test de la dexaméthasone [544], une diminution de la fonction des récepteurs 5-HT_{1A} [545], une diminution de la réponse immune humorale suite à des chocs électriques [546] ainsi que des comportements anhédoniques [547]. Malgré l'existence d'une reversion de ces modifications comportementales de type dépressif par un traitement AD chronique et non aigu, l'administration chronique d'anxiolytique est également capable d'atténuer l'aversion sociale induite par une défaite sociale répétée. Ces observations peuvent donc suggérer l'apparition d'un phénotype anxieux plutôt que dépressif dans le modèle de défaite sociale puisque l'administration chronique d'AD est également capable d'induire des effets anxiolytiques.

Les modèles basés sur des stress environnementaux

➤ La résignation acquise

Le modèle de résignation acquise est basé sur l'exposition répétée des animaux à des stimuli aversifs de type chocs électriques de façon inévitable et incontrôlable. Cette procédure induit des déficits motivationnels puisque les animaux deviennent passifs pour éviter les chocs lorsque la situation le leur permet et des altérations comportementales telles que des vocalisations et des perturbations du sommeil [548, 549]. Un traitement AD est alors capable de restaurer une latence d'évitement normale et d'atténuer les défaillances comportementales. Cependant, seulement un certain pourcentage d'animaux vont présenter des comportements de résignation acquise et dans ce cas celle-ci persiste sur une courte période de 2 à 3 jours [493]. Il existe donc une susceptibilité interindividuelle importante dans ce paradigme qui suggère que plutôt que de représenter un modèle de dépression, le modèle de résignation acquise pourrait être considéré comme un modèle de susceptibilité. En effet, il semble plus apte à mettre en évidence des phénotypes comportementaux de susceptibilité au stress plutôt qu'un état de type dépressif [550].

➤ Le stress chronique modéré imprédictible (UCMS, unpredictable chronic mild stress)

En dehors de conditions exceptionnelles tels que la guerre ou les désastres naturels, les personnes sont plus souvent exposées à des périodes plus ou moins longues de stress durant leur vie plutôt qu'à des stressseurs intenses et brefs. Certaines personnes deviennent moins résilientes à ce type de stressseurs et peuvent être vulnérables à des stress prolongés mais modérés [9]. Un modèle animal de dépression recherchant à simuler ces conditions

environnementales a donc initialement été proposé et développé par Katz et ces collaborateurs dans lequel des rats sont soumis pendant une période de plusieurs semaines à différents stressseurs tels que des chocs électriques, une immersion dans de l'eau froide, une inversion du cycle jour/nuit, un isolement, des changements de cages successifs, des pincements de la queue. Par la suite, les animaux sont exposés à des lumières et des sons de forte intensité provoquant une hypermobilité des animaux stressés en comparaison aux animaux non stressés. Les animaux soumis au stress réduisent également leur consommation de saccharine. Cette anhédonie induite par une exposition chronique au stress est atténuée par des traitements AD [551-554]. Le modèle de stress chronique modéré et imprédictible (UCMS) a ensuite été développé par Willner sur la base de la procédure de Katz [489]. Cependant, dans ce modèle la sévérité des stressseurs employés a été diminuée. Dans une expérience typique, les rats ou les souris sont exposés de façon séquentielle et relativement continue à une variété de stressseurs d'intensité faible, qui sont présentés de façon aléatoire sur une période de plusieurs semaines. Ainsi, l'utilisation chronique pendant plusieurs semaines de stressseurs sociaux et environnementaux d'intensité faible et le fait que l'efficacité du modèle dépende plus de la chronicité et de l'imprédictibilité des stressseurs que de leurs caractéristiques individuelles confère à l'UCMS une forte validité de construction. Par la suite, l'exposition au CMS induit des altérations comportementales : (1) une diminution de la consommation de sucrose assimilée à une anhédonie, (2) des altérations dans d'autres mesures de réactivité hédonique tels que le conditionnement de préférence de place ou la stimulation cérébrale des circuits de récompense, (3) des changements caractéristiques dans une variété de comportements qui peuvent être assimilés aux symptômes observés dans la dépression tels qu'une altération des comportements sexuels et d'agression, une diminution des comportements autocentrés (comportement de toilettage), de l'anxiété et des altérations de l'architecture du sommeil. Le stress chronique modéré induit également des altérations de la plasticité neuronale, neuroendocrines, neurochimiques et moléculaires (modification de la balance monoaminergique, augmentation du niveau de glucocorticoïdes et diminution de la prolifération cellulaire et de la neurogenèse hippocampique) persistantes qui ressemblent à celles observées chez les sujets dépressifs [555]. De plus, toutes ces altérations comportementales et biochimiques sont reversées par un traitement chronique, et non par un traitement aigu, à toutes les différentes classes d'AD efficaces en clinique. Par contre, les composés inefficaces en tant qu'AD n'ont pas d'effet. L'évaluation de cette procédure suggère donc qu'elle est la seule à obtenir la combinaison des trois critères de validité prédictive (profil pharmacologique), de validité apparente (profil symptomatologique) et de

validité de construction (compatibilité avec un modèle théorique pertinent). De plus, ce modèle induit un état "dépressif-like" avec un large pattern d'altérations alors que la plupart des autres paradigmes n'utilisent en général qu'une seule mesure. L'UCMS est donc un modèle approprié quand il s'agit d'étudier précisément les mécanismes neurobiologiques liés à la pathophysiologie et au traitement de la dépression.

3/ ETUDES PRECLINIQUES DES LIENS ENTRE LA DEPRESSION ET LES MALADIES VASCULAIRES

Le modèle UCMS qui représente le modèle animal de dépression le plus robuste a largement été utilisé dans l'étude des mécanismes neurobiologiques de la dépression et des AD. Cependant, l'utilisation du modèle UCMS s'élargit dans le but d'étudier les conséquences physiologiques de la dépression. Par exemple, Solberg et al. [525] ont mis en évidence une altération des rythmes circadiens chez les souris exposées à l'UCMS. Deux groupes de recherche jusqu'à présent ont tenté d'examiner le lien entre la dépression et les maladies cardiovasculaires en utilisant les modèles animaux de la dépression. Grippo et al. [556] se sont particulièrement intéressés au système de régulation du système nerveux autonome cardiaque dans le modèle UCMS chez le rat (Table 8) alors que Shively et al. [557] ont plus spécifiquement étudié les perturbations cardiovasculaires associées à la formation d'athérosclérose chez le primate non humain (Figure 17).

Des études récentes utilisant le modèle UCMS indiquent que des mécanismes autonomes spécifiques pourraient lier la dépression et les dérégulations cardiovasculaires. Comparé à des animaux contrôle non stressés, l'exposition pendant 4 semaines à l'UCMS induit chez les rats adultes des altérations cardiaques basales, incluant une augmentation de la fréquence cardiaque et une diminution de sa variabilité. De plus, lorsque les animaux sont perturbés par un jet d'air, une exagération de la réactivité de la pression et de la fréquence cardiaque est observée chez les animaux préalablement exposés à l'UCMS. Bien que les modifications comportementales associées à l'UCMS ne nécessitent pas plus de quelques semaines après la cessation des stress pour retrouver un niveau basal, les perturbations cardiovasculaires persistent pendant une longue période. Ces résultats sont totalement en accord avec l'étude clinique de Carney et al, qui suggèrent que bien que la fréquence cardiaque et la variabilité de la fréquence cardiaque peuvent s'améliorer chez les patients dépressifs sous traitement AD, ils ne retrouveront jamais leur niveau de base. Cette expérience de Grippo, et al a permis de conclure qu'une exposition à l'UCMS induit des modifications cardiaques de base et une réactivité cardiovasculaire exagérée à des stressseurs

environnementaux. De plus, ces modifications cardiaques en situation de base ou en réactivité à un stress dans le modèle UCMS sont médiées directement par une augmentation de la régulation sympathique. Des protocoles impliquant l'inhibition pharmacologique du système sympathique par le propranolol (inhibiteur des récepteurs β -adrénergique) ont permis de démontrer une atténuation des effets de l'UCMS sur la fréquence cardiaque et sa variabilité indiquant que l'élévation de la régulation sympathique dans le modèle UCMS médie directement l'augmentation de la fréquence cardiaque et la diminution de la variabilité. Grippo et al ont également étudié la vulnérabilité à une arythmie ventriculaire dans le modèle UCMS. Le protocole expérimental implique une administration intraveineuse d'aconitine, un agent pro-arythmique capable d'induire une arythmie ventriculaire. Suite à 4 semaines d'exposition à l'UCMS ou à la condition témoin, l'aconitine a été administrée et le temps d'apparition des différentes arythmies a été enregistré. A la fois une contraction ventriculaire prématurée simple et complexe et une arythmie par tachycardie ventriculaire sont développées de façon précoce chez les animaux UCMS. Ces résultats suggèrent que l'exposition à l'UCMS induit une augmentation de la susceptibilité au développement d'arythmie ventriculaire lorsque le système cardiovasculaire est perturbé.

Behavioural Changes

- Anhedonia
- Psychomotor retardation

Cardiovascular Changes

- Elevated resting heart rate
- Reduced heart rate variability
- Increased cardiovascular reactivity
- Elevated sympathetic activity
- Increased vulnerability to cardiac arrhythmia

Neurohumoral Changes

- Elevated pro-inflammatory cytokines
- Activation of the rennin-angiotensin-aldosterone axis
- Elevated glucocorticoids

Dissociation of behavioural and Cardiovascular changes during recovery from CMS

- Behavioural changes recover 2-3 weeks after cessation of CMS
- Cardiovascular changes do not recover within 4 weeks after cessation of CMS

Dissociation of behavioural and cardiovascular changes during selective serotonin reuptake inhibitor treatment in CMS

- Fluoxetine treatment prevent anhedonia
 - Fluoxetine only partially attenuates cardiovascular changes
-

Table 8: Le stress chronique modéré (CMS) induit des modifications comportementales, physiologiques et biochimiques reliées aux maladies cardiovasculaires et à la dépression. D'après Johnson & Grippo, 2006 [36].

D'autres études réalisées chez le primate non humain et utilisant le modèle de subordination sociale ont tenté d'étudier le lien entre le stress, la dépression et les perturbations cardiovasculaires. Ces expériences de subordination chez le singe montrent que

les comportements de type dépressif sont majoritairement observés chez les animaux subordonnés (61%) comparés aux dominants (10%). Dans ce modèle, les animaux qui présentent un état dépressif-like présentent également une augmentation du taux de cortisol en réponse au test de suppression par la dexaméthasone, une augmentation de la fréquence cardiaque, une augmentation du taux de cholestérol total circulant et une diminution des HDL circulant ainsi qu'une augmentation de la surface d'athérosclérose au niveau des artères coronaires. Dans ces études, la formation d'athérosclérose est alors corrélée aux comportements dépressifs, à la concentration circulante de cholestérol et à la fonction sérotoninergique neuronale. Ainsi, les comportements de type dépressif observés chez les animaux répondant au stress social sont accompagnés de perturbations de l'axe HPA, du SNA, du système sérotoninergique et du métabolisme des lipides, des altérations qui sont directement ou indirectement associées à une augmentation de la formation d'athérosclérose au niveau des artères coronaires (Figure 18).

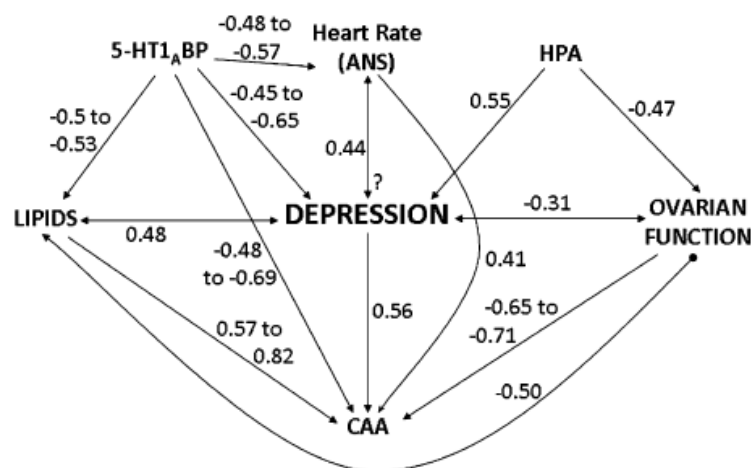


Figure 18: Représentation schématique des hypothèses sur la relation entre les variables mesurées chez le primate non humain dans le modèle de subordination sociale, entre la dépression et la formation d'athérosclérose. L'amplitude de l'association est évaluée par un test de corrélation de Pearson. Les variables étudiées présentent une corrélation d'au moins 0.4 avec soit la dépression soit l'athérosclérose. La direction des hypothèses sur la relation est basée sur le fait que l'activité neuronale du SNA et de l'axe HPA sont des facteurs précipitants, et la dépression et la formation d'athérosclérose les conséquences. Cependant la direction de certaines relations n'est pas bien comprise, elles sont notées par « ? ». Les prédictors de la formation d'athérosclérose chez les femelles primates sont la fonction ovarienne, les comportements dépressifs, la concentration de cholestérol circulant et la fonction sérotoninergique. Données analysées à partir de Shively et al, (1997, 2005, 2006, 2008). D'après Shively et al, 2009 [557].

Par l'utilisation de modèles animaux de dépression, ces études reproduisent certaines données cliniques sur les altérations du système nerveux, de l'axe HPA, du SNA et du système de neurotransmission sérotoninergique observées chez les patients dépressifs. Ces

études représentent une première étape dans la modélisation des liens entre la dépression et les maladies cardiovasculaires. Cependant, bien que les études de Shively et al. tentent de faire le lien entre les altérations du SNC et la formation de lésions d'athérosclérose, l'implication exacte de ces altérations dans le développement de pathologies cardiovasculaires reste toujours à élucider. De la même façon, l'implication de mécanismes physiopathologiques périphériques associée dans la formation d'athérosclérose et le développement de pathologies cardiovasculaires tels que les fonctions plaquettaire et endothéliale, qui ne représentent pas uniquement des mécanismes sous jacents aux altérations centrales, n'ont jamais été explorées dans les modèles animaux de dépression.

OBJECTIFS

Nous avons illustré précédemment la complexité du lien entre la dépression et les pathologies cardiovasculaires qui rend compte de la nécessité d'utiliser des modèles animaux dans le but de résoudre trois problèmes majeurs que sont : mieux décrire le sens de cette relation, mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques sous-jacents, et en conséquence dégager des pistes d'amélioration de la prise en charge thérapeutique des patients souffrants de cette comorbidité.

La dépression est actuellement considérée comme un facteur de risque indépendant pour le développement de pathologies cardiovasculaires. Les patients dépressifs présentent de multiples altérations physiologiques de la paroi vasculaire impliquées dans la pathophysiologie de l'athérosclérose dont témoignent une diminution de la réponse vasodilatatrice dépendante de l'endothélium associée à une diminution de l'activité de l'eNOS (Endothelial nitric oxide synthase), une augmentation d'un grand nombre de bio-marqueurs endothéliaux et plaquettaires circulants tels que certaines molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1, E-sélectine), des chemokines / cytokines (PF-4 et la β -TG), des protéases (MMP) et des facteurs de coagulation (tPA, PAI-1). Les altérations physiologiques de la paroi vasculaire observées chez les patients dépressifs, impliquées dans le recrutement des leucocytes, l'agrégation plaquettaire et la mise en place d'une vasoconstriction vont contribuer au développement et à la progression d'athérosclérose. La dépression est également associée à une augmentation des risques de développer des maladies des artères coronariennes indiquant des altérations morphologiques de type athérosclérose. Par ailleurs, la comorbidité entre la dépression et les altérations cardiovasculaires rend le traitement de ces patients difficile. Alors que certaines classes d'AD telles que les TCA présentent des conséquences cardiovasculaires néfastes, l'efficacité des SSRI dans l'amélioration du pronostic cardiovasculaire n'a pas été clairement démontré. La question du traitement est d'autant plus complexe que certaines études ont mis en évidence que la présence de troubles cardiovasculaires ou de facteurs de risques cardiovasculaires augmentait le taux de dépression résistante aux AD, elle-même associée à une augmentation des risques de mortalité cardiovasculaire. L'objectif du présent travail est dans un premier temps de considérer la dépression en tant que facteur de risque cardiovasculaire indépendant afin de modéliser les altérations cardiovasculaires observées chez les patients dépressifs et dans un second temps de modéliser la résistance aux AD observée chez les patients dépressifs souffrant de troubles cardiovasculaires.

Dans ce but, nous avons utilisé le modèle UCMS chez la souris, un modèle animal de dépression validé au niveau comportemental et neurobiologique mais dont les conséquences

cardiovasculaires ont très peu été explorées. Le modèle UCMS est basé sur l'exposition chronique à des stressors socio environnementaux, imitant le rôle du stress dans l'émergence de la dépression. Plus spécifiquement, l'application randomisée de différents stress socio-environnementaux légers pendant plusieurs semaines induit un syndrome chez la souris réminiscent aux symptômes de la dépression et capable d'être reversé par un traitement chronique aux AD en respectant le délai d'apparition des effets thérapeutiques. Ce modèle animal de dépression représente donc un outil intéressant dans l'étude du lien entre la dépression et le développement de pathologies cardiovasculaires.

Par l'utilisation du modèle UCMS, les objectifs spécifiques du présent travail sont :

- 1) de modéliser les conséquences cardiovasculaires de la dépression en tant que facteur de risque indépendant**, en étudiant les conséquences physiologiques et morphologiques de l'UCMS sur la paroi vasculaire,
- 2) de tester les effets d'un traitement AD sur le pronostic cardiovasculaire**, en étudiant la capacité d'un traitement chronique à la fluoxétine à reverser les altérations cardiovasculaires induites par l'UCMS,
- 3) d'évaluer l'impact de facteurs de risques ou de lésions vasculaires sur le profil de réponse aux AD**, en étudiant la capacité d'un traitement chronique à la fluoxétine à reverser les altérations comportementales de type dépressif induites par l'UCMS en présence de facteurs de risques cardiovasculaires.

Dans un premier temps, nous avons donc utilisé le modèle UCMS en tant que facteur de risque cardiovasculaire indépendant afin d'étudier à la fois, par quels mécanismes la dépression est capable d'affecter le système cardiovasculaire et les effets d'un traitement AD sur les conséquences cardiovasculaires de la dépression. A l'aide du modèle UCMS, nous avons tenté de reproduire les altérations physiologiques et morphologiques de la paroi vasculaire observée chez les patients dépressifs. Plus spécifiquement, nous avons étudié les conséquences de l'UCMS sur l'expression de bio-marqueurs endothéliaux et plaquettaires, sur la vaso-réactivité de l'endothélium ainsi que sur la formation d'athérosclérose. Nous avons également testé les capacités d'un AD, un inhibiteur spécifique de la recapture de la sérotonine (fluoxétine), à reverser les effets cardiovasculaires de l'UCMS.

Dans un second temps, nous avons tenté de modéliser la résistance aux AD observée chez les patients dépressifs présentant des risques cardiovasculaires établis. Dans le but de créer un modèle animal de résistance aux AD lié à une entité sub-nosographique de la

dépression, nous avons étudié la capacité de la fluoxétine à reverser les effets comportementaux de l'UCMS dans une situation de challenge cardiovasculaire. Nous avons donc couplé l'UCMS à un régime alimentaire saturé en graisse, un facteur de risque cardiovasculaire capable d'induire une hypercholestérolémie ainsi que des altérations vasculaires de type athérosclérose.

RESULTATS

Modélisation des conséquences cardiovasculaires de la dépression

Dans une première série d'expériences, nous avons étudié la dépression comme un facteur de risque vasculaire indépendant en examinant les effets de l'UCMS sur le système cardiovasculaire et la capacité d'un AD à reverser ces effets. Cependant, le concept de la dépression en tant que facteur de risque cardiovasculaire indépendant pose la question du profil temporel d'apparition des troubles cardiovasculaires chez les patients dépressifs ainsi que les caractéristiques psychiatriques associés à la mortalité et la morbidité cardiovasculaires et à la dépression. En effet, il semble que les altérations cardiovasculaires observées chez les patients dépressifs ne soient pas immédiates mais différées par rapport à l'épisode de dépression. Pratt et al. [16] ont montré que parmi des patients sans antécédents de pathologies cardiovasculaires, les patients qui expérimentent un épisode de dépression présentent un risque 4 fois plus élevé de développer un événement cardiaque mais ceci dans les 14 ans qui vont suivre l'apparition de l'épisode dépressif. De plus, la sévérité du désordre dépressif ainsi que la persistance de la dépression augmentent le risque de mortalité cardiovasculaire indiquant que la récurrence des épisodes dépressifs représente un facteur de risque supplémentaire [558]. Dans cette première série d'expérience nous avons alors étudié le délai d'apparition des altérations cardiovasculaires dans le modèle UCMS en évaluant les conséquences cardiovasculaires à court terme et à long terme d'un épisode UCMS. De plus, nous avons étudié si le nombre d'épisode d'UCMS influençait les altérations cardiovasculaires en comparant les effets d'un épisode d'UCMS à deux épisodes d'UCMS.

Une première expérience a cherché à documenter les effets à court terme et à long terme d'un épisode d'UCMS sur l'expression de marqueurs endothéliaux et plaquettaires. Plus spécifiquement, sur l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1, de la protéase MMP-9 et de l'inhibiteur de la fibrinolyse PAI-1, impliqués dans les différentes étapes de la formation et de la progression d'athérosclérose. Dans cette expérience, des souris *DBA/2j* ont été exposées à sept semaines d'UCMS et à un traitement à la fluoxétine au cours des 5 dernières semaines. Les effets de l'UCMS et de la fluoxétine ont alors été évalués par des mesures physiques (état du pelage) et comportementales (test du splash). Dans cette expérience, l'UCMS a induit une détérioration de l'état du pelage, un effet reversé par la fluoxétine. Cependant, les souris *DBA/2j* présentent une certaine résistance aux effets de l'UCMS puisqu'elles ne sont pas capables de répondre aux effets comportementaux de l'UCMS. Par ailleurs, les résultats ont montré que l'UCMS n'entraînait pas de modification

immédiate de l'expression des différents marqueurs évalués dans cette étude. Cependant, cette étude a permis de mettre en évidence une augmentation tardive de l'expression du PAI-1 après l'UCMS, indiquant un effet retardé de l'UCMS sur le système cardiovasculaire, indépendant de l'effet de l'âge sur l'augmentation de ces marqueurs. Ainsi, alors qu'un épisode d'UCMS est capable d'altérer l'expression de ce marqueur au cours du vieillissement malgré une absence prolongée d'événements stressants, le traitement à la fluoxetine n'est pas capable de reverser les effets retardés de l'UCMS sur l'expression des marqueurs de dysfonction endothéliale, en particulier du PAI-1 (**Article 1**).

Dans une seconde expérience, afin d'étudier plus spécifiquement les conséquences de l'UCMS sur la fonction endothéliale, nous avons étudié les propriétés relaxantes et contractiles de l'endothélium vasculaire. Des souris *BALB/c* ont été exposées à huit semaines d'UCMS et les effets de l'UCMS ont été évalués par des mesures physiques (état du pelage, poids) et comportementales (test du splash, test d'hippophagie à la nouveauté et activité locomotrice). Les résultats montrent que l'UCMS induit des altérations physiques et comportementales reversées par la fluoxetine. Par ailleurs, dans le groupe stressé non traité, il existe une altération des propriétés relaxantes de l'aorte (**article 2**). Ce résultat démontrant un dysfonctionnement endothélial induit par l'UCMS est en concordance avec de nombreuses études cliniques suggérant que cette altération de la relaxation dépendante de l'endothélium serait médiée par une diminution de la biodisponibilité en NO, principal médiateur vasorelaxant de l'endothélium vasculaire. Cependant, d'autres facteurs tels que des facteurs hyperpolarisant dépendant de l'endothélium (EDHF) et les prostacyclines (PGI₂) peuvent également jouer un rôle important dans la régulation de la réactivité vasculaire et plus particulièrement lorsque les effets médiés par le NO sont compromis. Ainsi, dans une seconde expérience, par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques, nous avons étudié l'implication de ces différents médiateurs vasodilatateurs sur les propriétés relaxantes de l'endothélium.

Afin d'examiner l'évolution du dysfonctionnement endothélial au cours d'épisodes de dépression successifs, nous avons étudié les conséquences de deux périodes d'UCMS associées ou non à un traitement à la fluoxetine sur les propriétés contractiles et relaxantes de l'endothélium vasculaire ainsi que sur la formation d'athérosclérose. Les résultats montrent que deux épisodes d'UCMS induisent des altérations comportementales de type dépressif qui sont reversés par un traitement à la fluoxetine. De plus, cette étude a permis de confirmer les données cliniques en démontrant que l'altération des propriétés relaxantes de l'endothélium vasculaire induite par l'UCMS est dépendante d'une diminution de la relaxation dépendante

du NO. Cependant, au cours de deux épisodes d'UCMS successifs, de façon surprenante un mécanisme de compensation par l'EDHF, un facteur relaxant également dépendant de l'endothélium, vient masquer l'altération induite par l'UCMS. Dans ce cas, la fluoxétine restaure la relaxation dépendante de l'endothélium mais cette fois-ci par un mécanisme de compensation dépendant du NO. Cependant, cette expérience ne nous a pas permis d'associer ces altérations physiologiques à la présence d'altérations morphologiques de type athérosclérose dans le modèle UCMS (**Article 3**).

Ces observations montrent que le modèle UCMS est capable de reproduire les altérations physiologiques de la paroi vasculaire observées chez les patients dépressifs mais que ces altérations ne sont pas suffisantes pour induire des altérations morphologiques de type athérosclérose. Par ailleurs, alors qu'un traitement à la fluoxétine est capable de reverser les modifications comportementales de types dépressives observées dans le modèle UCMS, ces effets sur les altérations vasculaires sont dépendants de la modification observée. La fluoxétine restaure la relaxation vasculaire dépendante de l'endothélium ; par contre, elle n'a pas d'effets sur l'augmentation de l'expression tardive du PAI-1.

**ARTICLE 1 : EARLY AND LATE-ONSET EFFECT OF
CHRONIC STRESS ON VASCULAR FUNCTION IN MICE : A
POSSIBLE MODEL OF THE IMPACT OF DEPRESSION ON
VASCULAR DISEASE IN AGEING.**

Early and late-onset effect of chronic stress on vascular function in mice: a possible model of the impact of depression on vascular disease in ageing.

Elsa Isingrini, MSC^{1,2}, Catherine Belzung, Prof^{1,2}, Alexandre d'Audiffret, MD^{3,4},
Vincent Camus, MD Prof^{1,2,5}.

¹UMRS INSERM U930, CNRS ERL 3106, 37000 Tours, France.

²Université François Rabelais, 37200 Tours, France.

³Center for interdisciplinary research in cardiovascular Sciences, West Virginia University,
Morgantown, WV, USA.

⁴Department of Surgery, Division of Vascular and Endovascular Surgery, West Virginia
University, Morgantown, WV, USA.

⁵Clinique Psychiatrique Universitaire, CHRU de Tours, 37044 Tours, France.

Abstract

Depression is recognized as a predictor of increased cardiac morbidity and mortality. In addition, depressed patients exhibit an increase in the serum markers of endothelial dysfunction and platelet activation involved in the cascade of events leading to atherosclerosis. The purpose of this study was to determine the early and late-onset expression of various vascular markers in a rodent model of depression.

Male DBA/2J mice were exposed to either 7 weeks of controlled living conditions or unpredictable chronic mild stress (UCMS), and subsequently given daily fluoxetine (10 mg/kg) or NaCl (9%) during the last 5 weeks of the experiment. Depressive-like behaviour was evaluated by using motivational and self-care behaviour, including the assessment of the animal's coat state and grooming behaviour. Enzyme-linked immunoassay was used to quantify matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression either immediately after the end of the UCMS procedure (short term condition) or 10 month later (long term condition).

Results indicate that 1) UCMS procedure induces depressive-like behaviour in mice, defined as coat state deterioration, an effect which is prevented by fluoxetine treatment; 2) UCMS procedure has no effect on the short term expression of the studied markers, however, UCMS increases expression of PAI-1 only in the long term group; 3) fluoxetine treatment is unable to counteract this UCMS-induced change; 4) ageing induces behavioural perturbation, defined as a decrease in grooming motivation, and an increase of all the vascular markers and 5) pre-treatment with fluoxetine has no protective effects on ageing-induced behavioural and vascular alterations.

Thus, in this model of depression-like behaviour, UCMS appears to induce late-onset physiologic changes, which are consistent with human studies indicating that depression is a risk factor for the development of heart disease.

KEY WORDS: Depression, Ageing, Cardiovascular disease, Chronic stress, Rodent model, Vascular markers.

OBJECTIVE

Depression and vascular disease are among the two most prevalent health problems in the world today. Although these diseases commonly coexist (1, 2), several epidemiologic studies have shown depression to be an independent risk factor for the development of vascular disease in healthy patients and to increase morbidity and mortality in patients with pre-existing coronary artery disease (3-6). Moreover, several clinical studies suggested a delayed effect of depression on the vascular system. Pratt and colleagues (7) found that among patients free of heart disease, those who had previously experienced an episode of depression were 4 times more likely to suffer a cardiac event within the following 14 years. In addition, the risk of myocardial infarction remains increased up to 10 years after the onset of the first depressive episode (8).

While the association between depression and cardiovascular diseases is well recognized, the underlying pathophysiological mechanisms remain essentially unexplored. Several hypotheses have been proposed, including endothelial dysfunction, inflammatory processes and prothrombotic events (9). Indeed, over the past decade, it has been shown that endothelium dysfunction, platelet alteration, and a prothrombotic state are present in patients suffering from depression. Specifically, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) activity, a prothrombotic marker, is increased in depressed subjects, suggesting a possible impairment in fibrinolysis (10). Studies also showed an increase in adhesion molecules, including intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) mediating adhesion and transmigration of leukocytes to the vascular endothelial wall and promoting plaque growth and instability, in elderly depressed patients (11-15). A significant relationship has also been found between coronary heart disease and several inflammatory markers such as C-reactive protein (CRP), Interleukine-6 (IL-6), IL-1 and tumour necrosis factor- α (TNF) (16-18). Major depression is also consistently associated with a similar elevation in inflammatory markers (19-21). Finally, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), implicated in all stages of atherosclerosis, is secreted by smooth muscle cells in response to TNF and IL-1 and is as a predictor of cardiac mortality (22). On the other hand, elevated MMP-9 level is associated with depressive feeling and behaviour measured with The center of epidemiologic studies depression scale (CES-D) (23).

Patients with depressive disorders and cardiovascular disease however often have multiple confounding risks factors, although the specific role played by depression on the development of cardiovascular disease is difficult to define. As a result, it is particularly

attractive to use an animal model to further study the mechanisms responsible for the association between cardiovascular diseases and depression. Among the animal models of depression, the unpredictable chronic mild stress (UCMS) protocol has been shown to be valid, reliable and sensitive (24). In this procedure, mice are exposed to several unpredictable mild stressors in order to induce behavioral and physiological changes mimicking human depressive symptoms (25, 26). Interestingly, these behavioural changes are reversed by the use of both antidepressive agents (26) and tramadol (27).

Because several studies demonstrate delayed effects of depression on vascular changes, the purpose of this study was to determine if the early and late-onset UCMS-effects on the cardiovascular system show signs of physiological changes similar to the ones observed in patients suffering from depression. Therefore, this animal model will allow the examination of candidate mediators of depression and heart disease in order to find new therapeutic which act to improve these two medical conditions.

The main aims of the study are to assess 1) the early and late-onset effect of UCMS-induced depression-like behaviour on the expression of vascular markers and 2) the potential reversal effects of fluoxetine treatment, a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI), on the UCMS-induced behavioural and vascular disturbances. Depression-like behaviour was assessed in DBA/2j mice submitted to 7-weeks of a UCMS procedure by using physical measures (Coat state, weight) and a behavioural test (grooming behavioural in the splash test). The expression of multiple vascular markers implicated in the process of atherosclerosis (PAI-1, ICAM-1, VCAM-1 and MMP-9) were measured to assess the short term (at the end of the UCMS procedure, early effect) and the long term (10 months later, late-onset effect) effects of UCMS-induced vascular disturbances. Treatment with vehicle or fluoxetine (10 mg/kg) was administrated daily from the second week of the UCMS procedure to assess the efficiency of chronic antidepressant treatment in UCMS-induced both behavioural and vascular disturbances.

METHODS

Animals

Seven weeks-old male DBA/2j mice (Centre d'élevage Janvier, Le Genest Saint Isle, France) weighing 22-23 g at their arrival at the laboratory were housed in groups of 4 and maintained under standard laboratory conditions (12 hrs. light-dark cycle, light on at 20:00; T = 22 +/- 2°C). Food and water were freely available. All behavioural testing occurred during the dark phase of the light-dark cycle. All experiments were carried out in strict compliance with the European Community Council directive 86/609/EEC and with French legislation from the Ministère de l'Agriculture.

General procedure and experimental groups (Figure 1)

The mice were kept in the laboratory for a one week of acclimatization and then randomized into the control (n=35) and UCMS (n=32) groups. The control and UCMS groups were maintained in the same standard laboratory conditions. However, the control mice were housed in group of 3 or 4 in standard laboratory cages (42 cm × 28 cm × 18 cm) while mice in the UCMS group were placed in small individual cages (8 cm × 13.5cm × 8.1 cm). After two weeks, each group was separated into two subgroups, one treatment group which received fluoxetine (10 mg/kg, i.p.) and a vehicle group which received NaCl (0.9%, i.p.) injection (UCMS, NaCl n=22; UCMS, Fluoxetine n=13; Control, NaCl n=17; Control, Fluoxetine n=15). Treatment was administered daily for the final 5 weeks of the UCMS protocol. During the 7-week of the UCMS protocol, the animal's body weight and coat-state were assessed weekly. During the final week, depressive-like behaviour was assessed by using the Splash test (Test 1) which measures grooming motivation. UCMS exposure and fluoxetine treatment continued during the behavioural week. The week following the behavioural test, each group was semi-randomly divided in two subgroups: the Short term group (ST) (n=40) which was sacrificed immediately (3 months old) and the long term group (LT) (n=27) sacrificed 10 months later (13 months old). At the end of the UCMS procedure and until sacrifice, long-term mice were housed in group of 3 or 4 in standard laboratory cages and treatment was discontinued. A second splash test was performed just prior to sacrifice the long term mice (Test 2).

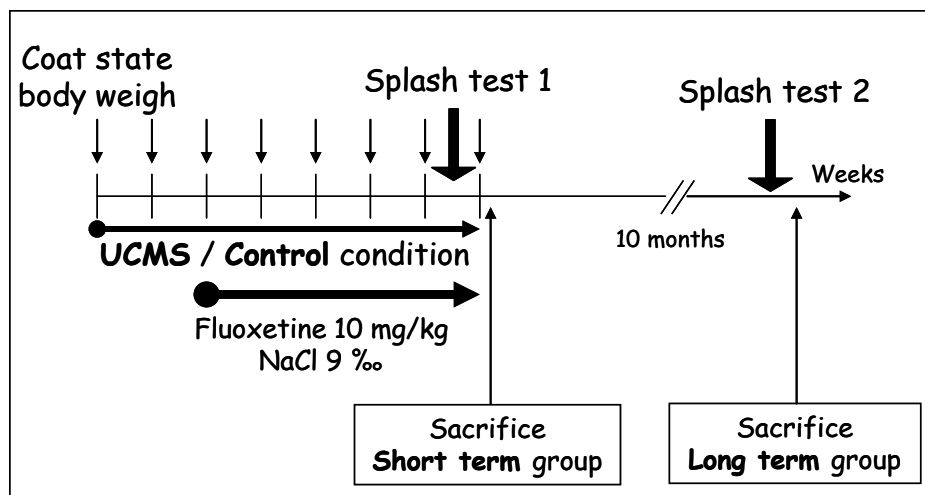


Figure 1 Experimental design: The Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS) regimen lasted 7 weeks. Each week, the coat state was evaluated and the body weight measured. The first 2 weeks of UCMS regimen were drug-free. Fluoxetine (10 mg/kg/day, i.p.) or vehicle (0.9% NaCl, i.p.) treatments began after 2 weeks of UCMS and was administrated daily until the end of the experiment (week 7). The week before the end of the UCMS regimen, behaviour was assess by using the splash test (test 1). Towards the end of the UCMS regimen, half of the animals were sacrificed (short term groups) and the other half were keep in a standard laboratory conditions and sacrificed 10 months later (long term groups). Splash test was performed a second time just before sacrifice (Test 2).

Unpredictable chronic mild stress

The UCMS regimen used is a variation of the procedure previously described which is adapted to mice (27-29). Several times a day during the 7 weeks of the UCMS procedure, the mice were exposed to various socio-environmental mild stressors such as damp sawdust, sawdust changing, cage without sawdust, a bath (substitution of sawdust with 21°C water), switching cages, cage-tilting at 45°C, predator sounds for 15 minutes, inversion of the light/dark cycle and lights on for a short time during the dark phase. The presentation of the different stressors was randomized each week to maximize their unpredictability. For ethical reasons, the stress procedure did not involve food and water deprivation.

Drugs

Fluoxetine hydrochloride (Eli Lilly, Indianapolis, IN, USA) was prepared fresh every day and administrated intraperitoneally (IP, 10 mg/kg) daily for the last 5 weeks of the UCMS regimen in a volume of 10 ml/kg. Fluoxetine was dissolved in 0.9% saline. Vehicle animals received an IP injection of 0.9 % saline in a volume of 10 ml/kg.

The assessment of Depressive-like behaviour

Coat state and body weight

Before and during the UCMS, the coat-state and the body weight of each animal were evaluated every Monday. The evaluation of the coat-state was carried out by the assessment of eight different body parts: head, neck, dorsal coat, ventral coat, tail, forepaws, hind paws and genital region. A score of 0 was attributed for a coat in good state or a score of 1 for a dirty coat in each of these areas. The total score was defined as the sum of the scores for each body part.

Splash Test

This test was established to assess UCMS-induced effects on the animal's motivation for self-care behaviour. It consists of squirting a 10% sucrose solution on the dorsal coat of each mouse in their home cage and recording the grooming frequency during the 5 minutes after vaporisation. This test was performed under red light (230V, 15W). Because of its viscosity, the sucrose solution dirties the fur of the animal and the mouse normally initiates grooming behaviour.

Expression of Vascular markers

Blood collection

Mice were sacrificed by CO₂ infusion a day after the behavioural test (short term group) or ten month later (long term group). Following decapitation, blood was collected into a tube containing 1/10 sodium citrate at 0.138 M. The samples were centrifuged for 20 minutes at 3200 rpm (1000g). The separated plasma samples were stored at -80°C until assayed for circulating vascular markers.

Analysis of vascular markers

The plasma levels of MMP-9, PAI-1, ICAM-1 and VCAM-1 were studied in duplicate in the same assay using the multiplex immunoassay kit (Millipore Corporate, USA). The samples were diluted to 1:100 and quantified by mean of Antibody-Immobilized beads and Luminex MAP technology. The sensitivity for the analyses was: MMP-9 4 pg/ml, and PAI-1 2 pg/ml, ICAM-1 3 pg/ml, VCAM-1 12 pg/ml.

Statistics

Results are expressed in the tabular form as the mean +/- SD (Standard deviation) and in the figure as the mean +/- SEM (standard error from the mean). Two-way repeated measure ANOVAs were performed for the analysis of coat state and body weight, by using environment (Control *vs* UCMS) and treatment (NaCl *vs* Fluoxetine) as main factors and weeks of UCMS (1 to 7) as repeated factors. The results of the grooming frequency in the splash test performed at the end of the UCMS procedure (ST and LT grouped) were analysed with a two-way ANOVA by using environment (Control *vs* UCMS) and treatment (NaCl *vs* Fluoxetine) as main factors. For the long term groups in which the splash test was conducted both at 3 months and 13 months on the same animals, two-way repeated measure ANOVA was performed for the analysis of the grooming frequency, by using environment (Control *vs* UCMS) and treatment (NaCl *vs* Fluoxetine) as main factors and test (Test 1 *vs* Test 2) as repeated factor. The expression of vascular markers were analysed with a three-way ANOVA, by using environment (Control *vs* UCMS), treatment (NaCl *vs* Fluoxetine) and age of sacrifice (ST *vs* LT) as main factors. The analysis of variance was followed by a Fisher *post hoc* analysis ($p < 0.05$).

RESULTS

Results (Mean +/- SD) and main statistical effect (UCMS, fluoxetine and ageing effect) of coat state, the splash test and the expression of the vascular markers for all groups (control and UCMS, treated or not with fluoxetine) are presented table 1.

	Control		UCMS	
	NaCl N = 22	Fluoxetine N = 13	NaCl N = 17	Fluoxetine N = 15
Coat state				
w 0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
w 1	0 (0)	0 (0)	0.23 (0.31)	0.16 (0.31)
w 2	0.02 (0.11)	0.04 (0.14)	0.76 (0.36) ^a	0.73 (0.62)
w 3	0.27 (0.37)	0.08 (0.19)	1.15 (0.61) ^a	1 (0.5)
w 4	0.39 (0.41)	0.27 (0.33)	1.59 (0.64) ^a	1.2 (0.62)
w 5	0.31 (0.39)	0.15 (0.24)	1.94 (0.56) ^a	1.3 (0.82) ^b
w 6	0.59 (0.45)	0.38 (0.46)	2.09 (0.77) ^a	1.5 (0.65) ^b
w 7	0.39 (0.37)	0.42 (0.49)	2.56 (0.56) ^a	1.77 (0.68) ^b
Splash test				
Test 1	49.4 (16.4)	33 (29.8)	45.4 (14.7)	41.3 (9.11)
Test 2	29.7 (11.9) ^c	22.2 (8.4) ^c	26.9 (11.6) ^c	31.5 (10.2) ^c
Markers expression				
MMP-9	ST : 17,2 (10.6)	ST : 12,4 (5.4)	ST : 9,2 (3.2)	ST : 14,1 (5.1)
	LT : 67,7 (76.6) ^c	LT : 88,2 (49.9) ^c	LT : 89,1 (70.5) ^c	LT : 59,5 (41.3) ^c
ICAM-1	ST : 19.7 (10.1)	ST : 14.7 (3.3)	ST : 14.8 (3.3)	ST : 21.9 (9.1)
	LT : 97.2 (50.6) ^c	LT : 74.5 (51) ^c	LT : 130.6 (87.5) ^c	LT : 122.2 (76.3) ^c
VCAM-1	ST : 737.9 (214.8)	ST : 704.9 (108.4)	ST : 682.4 (94.3)	ST : 148.9 (152.4)
	LT : 4048.4 (1807.8) ^c	LT : 2617.6 (930.9) ^c	LT : 3125.9 (928.8) ^c	LT : 3563.6 (1822.4) ^c
PAI-1	ST : 1.5 (0.6)	ST : 1.2 (0.6)	ST : 1.9 (0.9)	ST : 1.5 (0.9)
	LT : 6.01 (2.9) ^c	LT : 1.7 (0.4) ^c	LT : 12.2 (11.1) ^{a,c}	LT : 11.2 (9.1) ^{a,c}

ANOVA : ^a $p < 0.05$: UCMS effect (significant difference in comparison to the control group)
^b $p < 0.05$: Fluoxetine effect (significant difference in comparison to the UCMS, NaCl group)

Table 1: Coat state score, grooming time in the splash test and expression of the vascular markers (mean +/- SD).

Assessment of Depressive-like behaviour

Coat state and body weight

Statistical analysis indicates a coat state degradation in each group which increased in amplitude with time [week effect: $F_{6, 378} = 85.74, p < 0.001$]. The UCMS procedure and fluoxetine treatment differentially influenced the coat state degradation according to groups [environment x treatment x week effect: $F_{6, 378} = 2.85, p < 0.05$] (Figure 2).

Post-hoc test indicate increased coat state degradation in the UCMS groups compared to control groups after two weeks, an effect that remained until the end of the protocol [Control, NaCl vs UCMS, NaCl: week 2, $T_{(37)} = 2.1, p < 0.05$; week 3, $T_{(37)} = 6.0, p < 0.001$; week 4, $T_{(37)} = 7.1, p < 0.001$; week 5, $T_{(37)} = 9.1, p < 0.001$; week 6, $T_{(37)} = 7.5, p < 0.001$; week 7, $T_{(37)} = 12.6, p < 0.001$]. A protective effect of fluoxetine on UCMS-induced coat state degradation was observed after 3 weeks of treatment, an effect that remained until the end of the protocol [UCMS, NaCl vs UCMS, fluoxetine: week 5, $T_{(30)} = 3.3, p < 0.001$; week 6, $T_{(30)} = 2.8, p < 0.01$; week 7, $T_{(30)} = 4.2, p < 0.001$]. However, fluoxetine had no effect on the coat state in the unstressed condition [Control, NaCl vs Control, Fluoxetine: for each week, $0.0 < T_{(33)} < 1.2, 0.25 < p < 1, ns$].

Statistical analysis revealed an overall gain in body weight with time in each group [week effect, $F_{7, 441} = 126.2, p < 0.01$]. However, neither the UCMS regimen nor treatment with fluoxetine was associated with weight changes between groups during the 7 weeks of observation [UCMS x treatment x weeks effect: $F_{7, 441} = 0.58, p = 0.77, ns$] (data not shown).

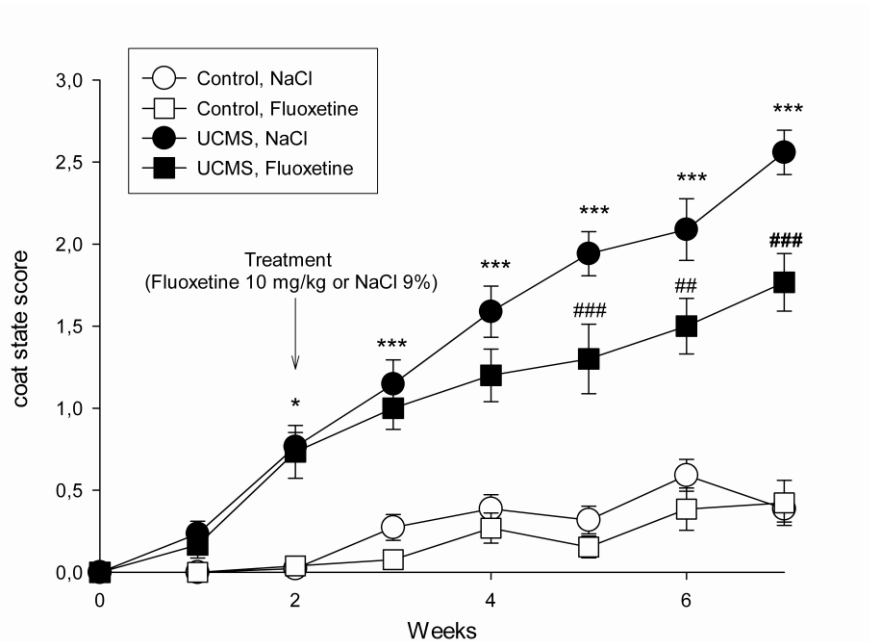


Figure 2 Results (mean \pm sem) of the coat state at baseline and during the 7-week of the unpredictable chronic mild stress (UCMS) in UCMS (■, ●) and control (○, □) groups which receive either fluoxetine (10 mg/kg, i.p.) (□) or NaCl (0.9%, i.p.) (○) treatment. Statistical analysis using a two-way repeated ANOVA revealed a significant interaction between the factors environment, treatment and week of experiment [$F_{6, 378}=2.85, p<0.05$]. The Fisher post-hoc test indicates that UCMS induced a significant impairment of the coat state after 2 weeks of experiment [$*p<0.05, ***p<0.001$: Comparison between control, NaCl and UCMS, NaCl groups]. UCMS-induced coat state degradation was attenuated after 3 weeks of fluoxetine treatment [$##p<.01, ###p<.001$: comparison between UCMS, NaCl and UCMS, Fluoxetine groups].

Splash Test

At the end of the UCMS procedure, grooming frequency was not significantly influenced by UCMS regimen or fluoxetine treatment [UCMS effect: $F_{1, 63}=0.13, p=0.72, ns$; treatment effect: $F_{1, 63}=2.46, p=0.12, ns$] (data not shown). However, in the LT groups, grooming frequency was significantly affected during the second test performed 10 months after the end of UCMS in comparison to the first test performed immediately after the UCMS procedure [test effect: $F_{1, 26}= 13.6, p<0.01$] (Figure 3) since the grooming frequency was decreased in the LT condition in comparison to the ST condition.

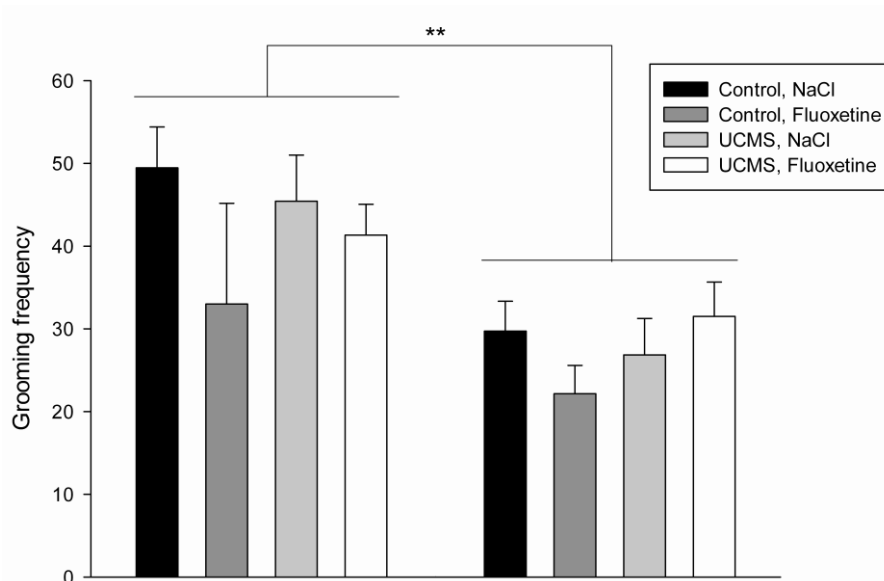


Figure 3 Results (mean \pm sem) of the grooming frequency in the splash test performed in the test 1 at the end of the unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedure and the test 2 at 10 months later. Results are shown for the long term UCMS and control groups which receive either Fluoxetine (10 mg/kg, i.p.) or NaCl (0.9%, i.p.) treatment. Statistical analysis using a two-way repeated ANOVA revealed a significant test effect [$F_{6, 378}=2.85$, $p<0.01$], indicating a decreased of the grooming frequency in the test 2 [$**p<0.01$: Comparison between test 1 and test 2].

Expression of Vascular markers

Figure 4 displays the vascular expression of MMP-9, PAI-1, ICAM-1 and VCAM-1 in the ST groups (3 months old) and in the LT groups (13 months old).

The expression of MMP-9, ICAM-1 and VCAM-1 were not influenced by UCMS regimen or fluoxetine treatment both in the ST and in the LT conditions [UCMS effect: MMP-9: $F_{1, 55}=0.10$, $p=0.75$; ICAM-1: $F_{1, 58}=3.6$, $p=0.06$; VCAM-1: $F_{1, 59}=0.007$, $p=0.93$. fluoxetine effect: MMP-9: $F_{1, 55}=0.04$, $p=0.83$; ICAM-1: $F_{1, 58}=0.43$, $p=0.51$; VCAM-1: $F_{1, 59}=1.07$, $p=0.30$]. However, MMP-9, ICAM-1 and VCAM-1 expression were affected with ageing [age effect: MMP-9: $F_{1, 55}=34.87$, $p<0.001$; ICAM-1: $F_{1, 58}=64.9$, $p<0.001$; VCAM-1: $F_{1, 59}=107.4$, $p<0.001$] since the expression of these markers was significantly increased in the LT groups in comparison to the ST groups.

PAI-1 expression was differentially influenced by UCMS regimen and age [UCMS x age effect: $F_{1, 51}=6.9$, $p<0.05$]. Both in the control and UCMS groups, PAI-1 expression was significantly increased in the LT conditions in comparison to the ST conditions [ST vs LT: Control, $T_{(28)}=2.3$, $p<0.05$; UCMS, $T_{(25)}=5.6$, $p<0.001$]. Moreover, although UCMS procedure had no effect in the ST group, UCMS worsened the increased expression of PAI-1

in the LT condition and this effect was independent of fluoxetine treatment [Control vs UCMS: ST, $T_{(30)}=0.27$, $p=0.8$, *ns*; LT, $T_{(23)}=3.6$, $p<0.01$].

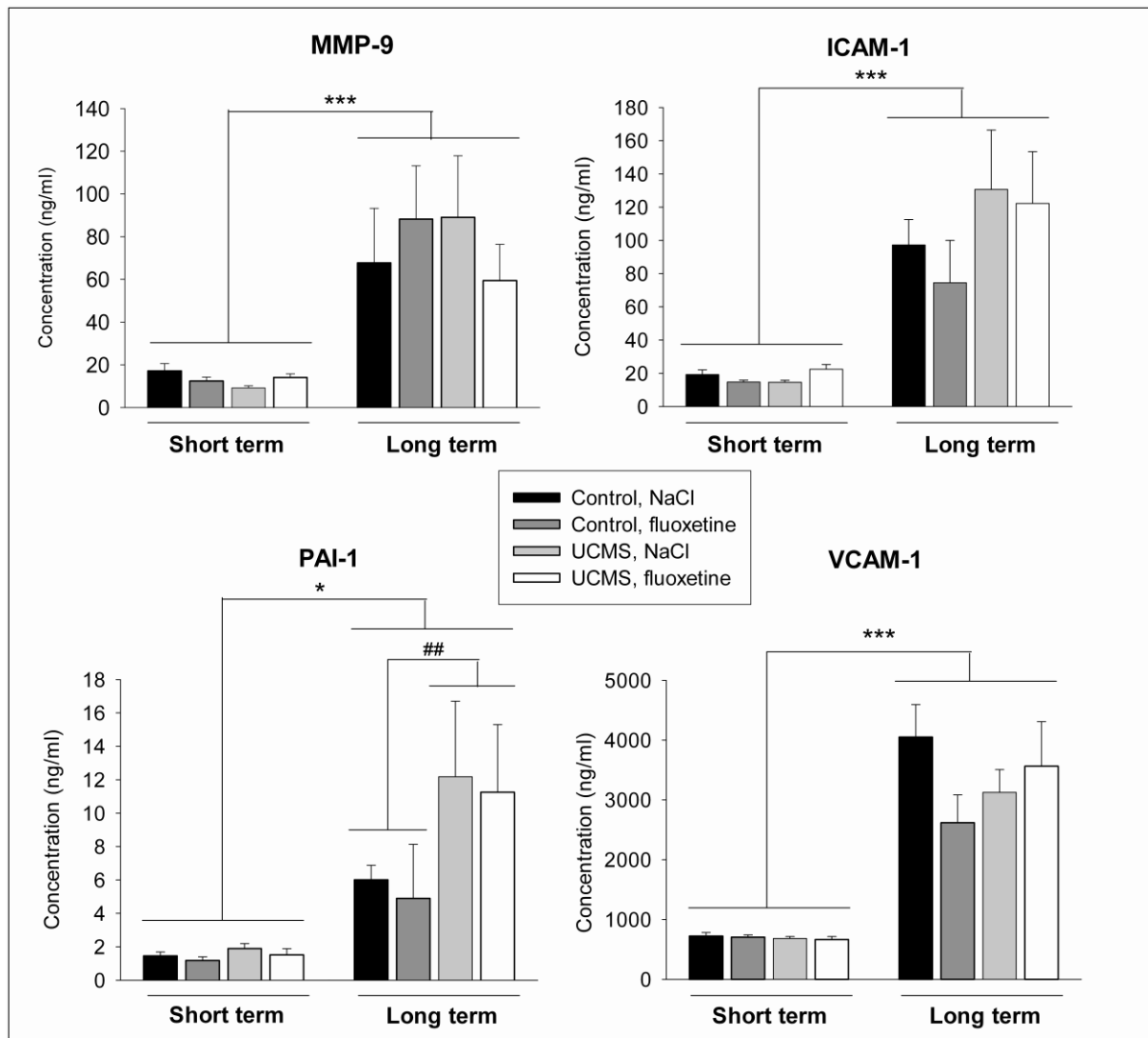


Figure 4 Results (mean \pm sem) of the circulating expression of MMP-9, PAI-1, ICAM-1 and VCAM-1 in the short term (ST) and the long term (LT) conditions for the control and UCMS groups treated with either NaCl (9%) or fluoxetine (10 mg/kg). Statistical analysis using a three-way ANOVA revealed an age-dependent effect on the expression of MMP-9, ICAM-1 and VCAM-1 indicating a significant increase of each marker in the LT condition [*** $p < .001$: comparison between ST and LT conditions]. The three-way ANOVA revealed a significant interaction between the factors environment and age on the expression of PAI-1. The Fisher post-hoc test indicates an age-dependent impairment of the expression of PAI-1, an effect worsened by UCMS regimen independently of the pre-treatment with fluoxetine [* $p < .05$: comparison between ST and LT conditions and ## $p < .01$: Comparison between the control and UCMS conditions].

CONCLUSIONS

The aim of this study was to investigate the link between depression and different cardiovascular disease markers using the UCMS procedure which is considered to be a reliable animal model of depression. This study raises a number of interesting points:

First of all, our results demonstrate that UCMS-induces a significant coat state degradation, an effect which is reversed by fluoxetine treatment. However, DBA/2J mice are not very sensitive to the UCMS protocol since we failed to find effects in the splash test. Given the high levels of anxiety in the DBA strain (30, 31), contrary to the coat state test, the anxiety component of the splash test can hide the behavioural alterations and the differential effect obtained in these two tests. However, our results are in accordance with other studies which demonstrate that the DBA/2j strain only respond to the UCMS protocol by coat state degradation and not in other behavioural tests such as grooming behaviour, locomotor activity and weight change (32).

Secondly, the UCMS regimen had no effect on the early expression of MMP-9, PAI-1, ICAM-1, or VCAM-1. However, in the long term condition, UCMS only induced an increase of PAI-1 expression and this late-onset UCMS-effect was not reversed by fluoxetine treatment. Finally, in the long term conditions, ageing induced behavioural perturbations (decrease of grooming frequency in the splash test) as well as an increase of all the vascular markers expression and fluoxetine treatment had no protective effect on these age-dependent perturbations of both behaviour and vascular markers expressions.

Early effect of UCMS on the expression of vascular markers

Considering the results of a number of clinical studies which demonstrate an increase in atherogenic vascular markers in patients suffering from depression, the UCMS procedure, which induces depression-like behaviour in mice, should lead to an increase in the expression of vascular markers. However, we found no effect of the UCMS procedure in the early expression of PAI-1, ICAM-1, VCAM-1 and MMP-9.

Depression is a recurrent disease for 75% of patients, characterised by the succession of remission phase and relapse (33). Patients with treated depression after the first episode presents a risk of relapse up to 50% in the 6 months following the cessation of treatment (34). A series of secondary analysis of clinical trials of depression and survival following acute coronary syndrome focused on whether the depressive episode was either the first or a recurrent episode. Most of these studies found that first depressive episodes are more

predictive of mortality and morbidity than the recurrent episodes (35). This observation precludes the hypothesis that a recurrent episode of UCMS is more efficacious inducing alterations of vascular markers than only one episode of UCMS. A number of other hypotheses can explain the negative result obtained in the short-term condition.

First, the absence of response in the behavioural test used in this study suggests that the DBA/2j strain are relatively resilient to the effects of UCMS in a general way; this may explain the absence of short term UCMS-effect and the minimal impact of long term UCMS we found on the expression of vascular markers. If this is the case, another strain, such as the BALB/c strain should be tested to see if strain-sensitivity is implicated in the physiological impact of the UCMS protocol. However, the relative resistance of the BALB/c strain for developing vascular disease, in contrast to the DBA/2j strain (36), constitutes a confounding factor which illustrates the difficulty in establishing a valid model for studying the implications of depression on the cardiovascular system.

Secondly, the markers measured in our study are up-regulated by a dysfunctional endothelium whereas pro-inflammatory cytokines such as IL-6 and TNF- α represent early inflammatory markers which are secreted before the appearance of both arterial injury and atherosclerosis (37). In addition, several studies found a strong association between IL-1, IL-6 and TNF- α and depressive disorders (19-21). To date, only one study has shown increased circulating levels of pro-inflammatory cytokine in rats exposed to 4 weeks of UCMS (38). However, this study did not test the adhesion molecule, the coagulation factor or matrix metalloproteinase.

Thirdly, while several epidemiologic studies considered depression to be an independent risk factor for the development of vascular disease, the role played by depression in the development of atherosclerosis as an independent risk factor has remained difficult to establish in subjects with multiple co-morbidities (39). Depression can also be a confounding factor which potentiates the effects of multiple, traditional risk factors including diabetes mellitus, obesity and hypertension, as well as behavioural risk factors such as smoking, alcohol abuse and insufficient physical activity (6, 40-44).

Finally, several clinical studies suggested a delayed effect of depression on the vascular system. Pratt and colleagues (7) found an increased risk of cardiac events in the 14 years following the first episode of depression. In addition, the risk of myocardial infarction remains increased up to 10 years after the onset of the first depressive episode (8). Several studies also found that adult subjects with moderate to severe symptoms of depression at a

baseline assessment were more likely to develop disorders recognized as cardiovascular risk factors, such as type-2 diabetes mellitus, during a 5 to 10 year follow-up period (45, 46).

Late-onset effects of UCMS on the expression of vascular markers

Since depression appears to increase the risk to develop cardiovascular disease later in life, we studied the late-onset effect of UCMS on the expression of vascular markers. Interestingly, UCMS induced a late-onset increase of the expression of PAI-1 but not of ICAM-1, VCAM-1 and MMP-9. These results reproduce the delayed effect of depression on cardiovascular complications observed in the clinic. Indeed, UCMS procedure, like an episode of depression, is sufficient to increase the expression of vascular markers even after a long time absence of external stressful events. Moreover, the delayed effect of UCMS on PAI-1 expression was not counteracted by the pre-treatment with fluoxetine. This result indicates an effect of fluoxetine on one hand on mood behaviour and on the other hand on the vascular system. Therefore, the vascular alterations observed in depressed subjects can be considered as a trait marker rather than a state marker since they are not altered by fluoxetine treatment.

During the atherosclerotic process, the main cause in the development of cardiovascular disease, platelets become activated and release multiple inflammatory markers into the local microenvironment, thereby altering endothelial cell properties (47-49). Platelets secrete adhesion proteins (fibrinogen, P-selectin, vWf), growth factors (PDGF, TGF- β , EGF), chemokines (RANTES, platelet factor 4), cytokines (IL-1 β , CD40 ligand) and coagulation factors (factor V and XI, PAI-1, plasminogen, protein S). These proteins act together to promote platelet adhesion and coagulation and induce a proatherogenic phenotype in endothelial cells. In response, endothelial cells release chemokines (MCP-1) and adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1) enabling leukocytes recruitment into the inflamed side (50). Finally, pro-inflammatory cytokine release by platelets initiates the expression and release of matrix-degrading enzymes, the MMPs. These enzymes, which degrade the extra cellular matrix proteins, significantly contribute to destruction and remodelling of inflamed tissue (51). Thus, PAI-1 which is the major physiologic inhibitor of fibrinolysis is released immediately after platelet activation to contribute to platelet aggregation and stabilization of blood clot. These observations suggest that during vascular lesion, the coagulation factors, including PAI-1, are among the earliest released compounds, before discharge of adhesion molecules (ICAM-1 and VCAM-1) by endothelial cells and matrix-degrading enzymes

(MMP-9) by smooth muscle cells. This temporal pattern of expression of vascular markers may explain the preferential effect of UCMS on PAI-1 expression.

Age-dependent behavioural and vascular alterations

Independently of UCMS, ageing induces an increase of both MMP-9, PAI-1, ICAM-1 and VCAM-1. This ageing-induced increase of vascular marker expression is associated with behavioural alterations. Age-related grooming behavioural alterations can be explained by an age-dependent locomotor decline (52), by ageing-induced impairment of self-care (53), or by the increased prevalence of anxiety and depression in elderly (1). The re-treatment with fluoxetine had no effect on ageing-induced both behavioural and vascular alterations.

The incidence of cardiovascular disease increases with ageing, a tendency dependent of the age related changes in vascular and haemostatic systems. A significant age dependent decrease in fibrinolytic activity involving an increase in PAI-1 has been documented in several studies (54, 55). Moreover, the structural and functional alterations in the vasculature, including dysfunction of both the vascular endothelium and smooth muscle cells appears to occur as age progresses (56-58). This progressive age-related decline involves up-regulation of numerous substances implicated in inflammatory and atherosclerosis processes such as adhesion molecules, matrix metalloproteinase and pro-inflammatory cytokines (59). Several studies in rats have confirmed our results by finding an age-related increase of ICAM-1 and VCAM-1 with a significant effect from 12 months old (60, 61). Finally, in support of our results, studies demonstrate MMP increasing, including MMP-9, and tissue inhibitor metalloproteinase (TIMP) decreasing in age-related manner, suggesting increase extra cellular matrix degradative capacity (62).

Absence of fluoxetine effect on UCMS- and ageing-induced vascular alterations

The use of selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) treatment in this study demonstrates an absence of protective effects of fluoxetine on both the increased expression of all markers induced by ageing and on the increased expression of PAI-1 induced by the late onset effect of UCMS.

The SSRI are increasingly being used to treat a spectrum of depressed patients. As a class, SSRI have comparable efficacy to other antidepressants such as tricyclic, against depression but are generally better tolerated (63). Because of their efficacy, favourable side effect profile and relatively benign cardiac adverse effect profile in patients without cardiac

disease, a number of studies have been conducted to determine if the cardiac safety of the SSRI extends to depressed patients with cardiovascular complications. Even if the mortality and morbidity risk seems to be fewer in patients treated with SSRI the difference failed to be statistically significant (64). More specifically, regarding the SSRI effects on platelet/endothelial biomarkers, results indicate that treatment with SSRI does not improve the level of ICAM-1 and VCAM-1 even if in some cases it was associated with a decreased release of others markers including P-selectin, β -thrombomodulin (65, 66). However, Although PAI-1 and MMP-9 specifically have been studied in the context of major depression (10, 23), the effect of depression treated with SSRI on the expression of these markers was never investigated. Our results indicate that fluoxetine treatment is unable to improve the alteration of these markers induced by both UCMS and ageing. However, in order to definitely confirm this result, future studies should use other antidepressant drugs including other SSRIs but also other classes of antidepressant.

In conclusion, given the public health burden that both heart disease and depression currently represent, we need a better understanding of the interactions between cardiovascular diseases and depressive disorders. By demonstrating a late-onset effect of UCMS, a valid animal model of depression, on vascular disturbances, we suggest a model of the impact of depression on vascular disease in ageing. Along with other animal models which have been used in a variety of behavioural studies, the consequences of chronic stress on the cardiovascular system using the UCMS protocol merits future study. The lessons learned from this initial step should prove to be useful for designing studies in the future.

ACKNOWLEDGMENT

The authors gratefully acknowledge the institute of Health research IFR 65 (Hospital Saint-Antoine, France) for their technical assistant. This study was supported by the medical research foundation (FRM) grant to E.I.

REFERENCES

1. Camus V, Kraehenbuhl H, Preisig M, et al: Geriatric depression and vascular diseases: what are the links? *Journal of affective disorders* 2004; 81:1-16
2. Nemeroff CB: The curiously strong relationship between cardiovascular disease and depression in the elderly. *Am J Geriatr Psychiatry* 2008; 16:857-860
3. Hemingway H, Marmot M: Evidence based cardiology: psychosocial factors in the aetiology and prognosis of coronary heart disease. Systematic review of prospective cohort studies. *BMJ (Clinical research ed)* 1999; 318:1460-1467
4. Rugulies R: Depression as a predictor for coronary heart disease. a review and meta-analysis. *Am J Prev Med* 2002; 23:51-61
5. Jonas BS, Mussolino ME: Symptoms of depression as a prospective risk factor for stroke. *Psychosomatic medicine* 2000; 62:463-471
6. Lett HS, Blumenthal JA, Babyak MA, et al: Depression as a risk factor for coronary artery disease: evidence, mechanisms, and treatment. *Psychosomatic medicine* 2004; 66:305-315
7. Pratt LA, Ford DE, Crum RM, et al: Depression, psychotropic medication, and risk of myocardial infarction. Prospective data from the Baltimore ECA follow-up. *Circulation* 1996; 94:3123-3129
8. Ford DE, Mead LA, Chang PP, et al: Depression is a risk factor for coronary artery disease in men: the precursors study. *Archives of internal medicine* 1998; 158:1422-1426
9. Isingrini E, Desmidt T, Belzung C, et al: Endothelial dysfunction: A potential therapeutic target for geriatric depression and brain amyloid deposition in Alzheimer's disease? *Curr Opin Investig Drugs* 2009; 10:46-55
10. Lahlou-Laforet K, Alhenc-Gelas M, Pornin M, et al: Relation of depressive mood to plasminogen activator inhibitor, tissue plasminogen activator, and fibrinogen levels in patients with versus without coronary heart disease. *The American journal of cardiology* 2006; 97:1287-1291
11. Thomas AJ, Ferrier IN, Kalaria RN, et al: Elevation in late-life depression of intercellular adhesion molecule-1 expression in the dorsolateral prefrontal cortex. *The American journal of psychiatry* 2000; 157:1682-1684
12. Thomas AJ, Perry R, Kalaria RN, et al: Neuropathological evidence for ischemia in the white matter of the dorsolateral prefrontal cortex in late-life depression. *International journal of geriatric psychiatry* 2003; 18:7-13

13. Thomas AJ, Morris C, Davis S, et al: Soluble cell adhesion molecules in late-life depression. *International psychogeriatrics / IPA* 2007; 19:914-920
14. Dimopoulos N, Piperi C, Salonicioti A, et al: Elevation of plasma concentration of adhesion molecules in late-life depression. *International journal of geriatric psychiatry* 2006; 21:965-971
15. Krieglstein CF, Granger DN: Adhesion molecules and their role in vascular disease. *American journal of hypertension* 2001; 14:44S-54S
16. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, et al: Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 2000; 101:1767-1772
17. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, et al: C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *The New England journal of medicine* 2000; 342:836-843
18. Kim JS: Cytokines and adhesion molecules in stroke and related diseases. *J Neurol Sci* 1996; 137:69-78
19. Kop WJ, Gottdiener JS, Tangen CM, et al: Inflammation and coagulation factors in persons > 65 years of age with symptoms of depression but without evidence of myocardial ischemia. *The American journal of cardiology* 2002; 89:419-424
20. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysohoou C, et al: Inflammation, coagulation, and depressive symptomatology in cardiovascular disease-free people; the ATTICA study. *European heart journal* 2004; 25:492-499
21. Shimbo D, Chaplin W, Crossman D, et al: Role of depression and inflammation in incident coronary heart disease events. *The American journal of cardiology* 2005; 96:1016-1021
22. Galis ZS, Johnson C, Godin D, et al: Targeted disruption of the matrix metalloproteinase-9 gene impairs smooth muscle cell migration and geometrical arterial remodeling. *Circulation research* 2002; 91:852-859
23. Garvin P, Nilsson L, Carstensen J, et al: Plasma levels of matrix metalloproteinase-9 are independently associated with psychosocial factors in a middle-aged normal population. *Psychosomatic medicine* 2009; 71:292-300
24. Willner P: Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology* 1997; 134:319-329

25. Willner P, Towell A, Sampson D, et al: Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology* 1987; 93:358-364
26. Ducottet C, Griebel G, Belzung C: Effects of the selective nonpeptide corticotropin-releasing factor receptor 1 antagonist antalarmin in the chronic mild stress model of depression in mice. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 2003; 27:625-631
27. Yalcin I, Aksu F, Belzung C: Effects of desipramine and tramadol in a chronic mild stress model in mice are altered by yohimbine but not by pindolol. *Eur J Pharmacol* 2005; 514:165-174
28. Willner P, Muscat R, Papp M: Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 1992; 16:525-534
29. Santarelli L, Saxe M, Gross C, et al: Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science (New York, N.Y)* 2003; 301:805-809
30. De Boer SF, Koolhaas JM: Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. *Eur J Pharmacol* 2003; 463:145-161
31. Capone F, Venerosi A, Puopolo M, et al: Behavioral responses of 129/Sv, C57BL/6J and DBA/2J mice to a non-predator aversive olfactory stimulus. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2005; 65:29-38
32. Ibarguen-Vargas Y, Surget A, Touma C, et al: Multifaceted strain-specific effects in a mouse model of depression and of antidepressant reversal. *Psychoneuroendocrinology* 2008; 33:1357-1368
33. Frank E, Thase ME: Natural history and preventative treatment of recurrent mood disorders. *Annu Rev Med* 1999; 50:453-468
34. Frank E, Kupfer DJ, Perel JM, et al: Three-year outcomes for maintenance therapies in recurrent depression. *Archives of general psychiatry* 1990; 47:1093-1099
35. Carney RM, Freedland KE: Treatment-resistant depression and mortality after acute coronary syndrome. *The American journal of psychiatry* 2009; 166:410-417
36. Paigen B, Ishida BY, Verstuyft J, et al: Atherosclerosis susceptibility differences among progenitors of recombinant inbred strains of mice. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex)* 1990; 10:316-323
37. Nilupul Perera M, Ma HK, Arakawa S, et al: Inflammation following stroke. *J Clin Neurosci* 2006; 13:1-8

38. Grippo AJ, Francis J, Beltz TG, et al: Neuroendocrine and cytokine profile of chronic mild stress-induced anhedonia. *Physiology & behavior* 2005; 84:697-706
39. Mast BT, Neufeld S, MacNeill SE, et al: Longitudinal support for the relationship between vascular risk factors and late-life depressive symptoms. *Am J Geriatr Psychiatry* 2004; 12:93-101
40. Li C, Ford ES, Strine TW, et al: Prevalence of depression among U.S. adults with diabetes: findings from the 2006 behavioral risk factor surveillance system. *Diabetes Care* 2008; 31:105-107
41. Sharkey JR, Ory MG, Wang S: Double strain of severe obesity and depression on perception of increased diabetes burden among homebound older women. *J Nutr Elder* 2006; 26:123-130
42. Lehto S, Koukkunen H, Hintikka J, et al: Depression after coronary heart disease events. *Scand Cardiovasc J* 2000; 34:580-583
43. Glassman AH, Helzer JE, Covey LS, et al: Smoking, smoking cessation, and major depression. *Jama* 1990; 264:1546-1549
44. Camacho TC, Roberts RE, Lazarus NB, et al: Physical activity and depression: evidence from the Alameda County Study. *American journal of epidemiology* 1991; 134:220-231
45. Eaton WW, Armenian H, Gallo J, et al: Depression and risk for onset of type II diabetes. A prospective population-based study. *Diabetes Care* 1996; 19:1097-1102
46. Kawakami N, Takatsuka N, Shimizu H, et al: Depressive symptoms and occurrence of type 2 diabetes among Japanese men. *Diabetes Care* 1999; 22:1071-1076
47. Gawaz M, Langer H, May AE: Platelets in inflammation and atherogenesis. *The Journal of clinical investigation* 2005; 115:3378-3384
48. Gawaz M, Brand K, Dickfeld T, et al: Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis* 2000; 148:75-85
49. Gawaz M: Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovascular research* 2004; 61:498-511
50. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, et al: CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998; 391:591-594
51. May AE, Kalsch T, Massberg S, et al: Engagement of glycoprotein IIb/IIIa (alphaIIb)beta3) on platelets upregulates CD40L and triggers CD40L-dependent matrix degradation by endothelial cells. *Circulation* 2002; 106:2111-2117

52. Mian OS, Baltzopoulos V, Minetti AE, et al: The impact of physical training on locomotor function in older people. *Sports medicine (Auckland, N.Z)* 2007; 37:683-701
53. Galson SK: Self-management programs: one way to promote healthy aging. *Public Health Rep* 2009; 124:478-480
54. Mehta J, Mehta P, Lawson D, et al: Plasma tissue plasminogen activator inhibitor levels in coronary artery disease: correlation with age and serum triglyceride concentrations. *Journal of the American College of Cardiology* 1987; 9:263-268
55. Gleerup G, Winther K: The effect of ageing on platelet function and fibrinolytic activity. *Angiology* 1995; 46:715-718
56. Yildiz O: Vascular smooth muscle and endothelial functions in aging. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2007; 1100:353-360
57. Ferrari AU, Radaelli A, Centola M: Invited review: aging and the cardiovascular system. *J Appl Physiol* 2003; 95:2591-2597
58. Lundberg MS, Crow MT: Age-related changes in the signaling and function of vascular smooth muscle cells. *Experimental gerontology* 1999; 34:549-557
59. Challah M, Nadaud S, Philippe M, et al: Circulating and cellular markers of endothelial dysfunction with aging in rats. *The American journal of physiology* 1997; 273:H1941-1948
60. Zou Y, Jung KJ, Kim JW, et al: Alteration of soluble adhesion molecules during aging and their modulation by calorie restriction. *Faseb J* 2004; 18:320-322
61. Zou Y, Yoon S, Jung KJ, et al: Upregulation of aortic adhesion molecules during aging. *The journals of gerontology* 2006; 61:232-244
62. Lindsey ML, Goshorn DK, Squires CE, et al: Age-dependent changes in myocardial matrix metalloproteinase/tissue inhibitor of metalloproteinase profiles and fibroblast function. *Cardiovascular research* 2005; 66:410-419
63. Roose SP, Glassman AH, Attia E, et al: Cardiovascular effects of fluoxetine in depressed patients with heart disease. *The American journal of psychiatry* 1998; 155:660-665
64. Glassman AH, O'Connor CM, Califf RM, et al: Sertraline treatment of major depression in patients with acute MI or unstable angina. *Jama* 2002; 288:701-709
65. Serebruany VL, Glassman AH, Malinin AI, et al: Platelet/endothelial biomarkers in depressed patients treated with the selective serotonin reuptake inhibitor sertraline after acute coronary events: the Sertraline AntiDepressant Heart Attack Randomized Trial (SADHART) Platelet Substudy. *Circulation* 2003; 108:939-944

66. van Zyl LT, Lesperance F, Frasura-Smith N, et al: Platelet and endothelial activity in comorbid major depression and coronary artery disease patients treated with citalopram: the Canadian Cardiac Randomized Evaluation of Antidepressant and Psychotherapy Efficacy Trial (CREATE) biomarker sub-study. *Journal of thrombosis and thrombolysis* 2009; 27:48-56

**ARTICLE 2 : ALTERED AORTIC VASCULAR REACTIVITY
IN THE UNPREDICTABLE CHRONIC MILD STRESS MODEL
OF DEPRESSION IN MICE**

Altered aortic vascular reactivity in the unpredictable chronic mild stress model of depression in mice

UCMS causes relaxation impairment to ACh

Elsa Isingrini ^a, Catherine Belzung ^a, Jefferson Frisbee ^{b,c}, James O'Donell ^d, Vincent Camus ^a, Alexandre d'Audiffret ^{c,e}.

^a INSERM U930 and, Université François Rabelais de Tours, 37200 Tours, France.

^b Department of Physiology and Pharmacology, West Virginia University, School of Medicine, Morgantown, WV 26506, USA.

^c Center for Interdisciplinary Research in Cardiovascular Sciences, West Virginia University, School of Medicine, Morgantown, WV 26506, USA.

^d Department of Behavioral Medicine & Psychiatry, West Virginia University, School of Medicine, Morgantown, WV 26506, USA.

and ^e Department of Surgery, Division of Vascular and Endovascular Surgery, West Virginia University, School of Medicine, Morgantown, WV 26506, USA.

ABSTRACT

Major depression is an independent risk factor for the development of cardiovascular disease. An endothelial dysfunction hypothesis has been proposed to explain this link. Endothelial dysfunction, defined as an impairment of endothelium-dependent vasorelaxation, represents a reliable predictor of atherosclerosis. Interestingly, depressed patients exhibit endothelial dysfunction. This study aims to investigate aortic vascular reactivity in mice submitted to the unpredictable chronic mild stress (UCMS) model of depression. The results confirm the effectiveness of the UCMS procedure to induce neuroendocrine, physical and behavioural depression-like alterations. Moreover, UCMS-induces a significant decrease of acetylcholine-induced vasorelaxation but has no effect on phenylephrine-induced vasoconstriction. In this study, we demonstrate altered vascular reactivity in an animal model of depression-like behaviour, suggesting endothelial dysfunction as observed in depressed patients.

KEY WORDS: Depression; cardiovascular disease; endothelial dysfunction, vasorelaxation, rodent model, chronic stress.

INTRODUCTION

In developed countries, major depression is the second leading cause of death and disability after coronary heart disease (Murray and Lopez 1997). Interestingly, these two pathologies have a high co-morbidity (Lett et al. 2004; Plante 2005). Several hypotheses have been proposed to explain depression-induced cardiovascular disease including neurohormonal activation, autonomic dysfunction, immuno-inflammatory processes, platelet activation and endothelial dysfunction (Grippe 2009; Isingrini et al. 2009).

The vascular endothelium plays a key role in maintaining vascular homeostasis and consequently regulates several physiological functions, including vascular tone, smooth muscle cells proliferation, inflammation, platelet aggregation, thrombosis, fibrinolysis and oxidation. Frequently, the term endothelial dysfunction refers to an impairment of endothelium-dependant vasorelaxation caused by a loss of Nitric oxide (NO) bioavailability. While NO has vasorelaxant properties and exerts protective effects on the vasculature, endothelial dysfunction leads to an imbalance in vascular homeostasis which contributes to atherosclerosis formation (Verma and Anderson 2002).

The functional and structural assessment of endothelial dysfunction is based on studies demonstrating that normal endothelium mediates the vasodilatation effect of acetylcholine (ACh). When the endothelium is removed or altered, ACh exerts a vasoconstrictive effect by a direct action on smooth muscle (Furchgott and Zawadzki 1980). Consequently, the vasomotor response to various pharmacological or physical stimuli can be considered as surrogate markers of NO bioavailability. Using high resolution ultrasound equipment for assessing the vascular remodelling of the blood vessel, several studies demonstrate endothelial dysfunction in depressed patients (Rajagopalan et al. 2001; Broadley et al. 2002; Rybakowski et al. 2006). Moreover, the level of biological surrogate markers of endothelial dysfunction in patients with depression demonstrates increased concentrations of the soluble chemokine monocyte chemoattractant protein-1, E-selectin and ICAM-1s (Rajagopalan et al. 2001; Dimopoulos et al. 2006), as well as decreased plasma levels of NO metabolites and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity (Chrapko et al. 2004). This endothelial dysfunction is particularly interesting in the context of the main mechanistic hypothesis of the relationship between depression and cardiovascular risk.

The unpredictable chronic mild stress (UCMS) animal model is valid, reliable and sensitive (Willner 1997) for studying depressive disorders in rodents. UCMS involves subjecting mice to a period of mild socio-environmental stressors. This procedure replicates

several depression-related behavioural and physiological impairments which are reversed by chronic, but not acute, antidepressant treatment (Ibarguen-Vargas et al. 2008).

The aim of the present study was to investigate the effect of UCMS, intended to induce depression-like behaviour, on the vaso-reactive properties of the thoracic aorta, including the vasoconstriction to phenyleprine (L-Phe) and the vasodilatation to acetylcholine (ACh). We hypothesise that UCMS, as observed in depression, can alter endothelium vascular reactivity by impairing acetylcholine-induced vasodilatation.

METHODS

Animals

Seven week-old male BALB/cJ mice were housed in groups of 4 at their arrival and allowed to become used to their new environment for 2 weeks. The animals had free access to water and food in standard laboratory conditions (12 hours day/night cycle, light on at 08:00; T = 22 +/- 2°C). All protocols were approved by the West Virginia University IACUC.

General procedure

The mice were randomized into the control group (n=18), kept in standard laboratory conditions or the UCMS group (n=18) subjected to 8 weeks of random daily socio-environmental stressors. The control mice were housed in groups of 4 in standard laboratory cages (42 cm × 28 cm × 18 cm) while mice in the UCMS group were singularly housed in individual cages (8 cm × 13.5cm × 8.1 cm). The coat state and body weight of each animal were evaluated every Monday in a blind manner. The total score of coat state was computed by attributing a score of 0 (clean coat) or 1 (dirty coat) to eight different body parts (head, neck, dorsal coat, ventral coat, tail, forelimb, hind-limb, and genital region) (Ibarguen-Vargas et al. 2008; Surget et al. 2008). At the seventh week, after performance in the reward maze test (anhedonic test), 8 animals per group were sacrificed for a plasma corticosterone radioimmunoassay. During the last week, after the splash test, the novelty suppression of feeding (NSF) test and locomotor activity test, the other half of the animals (UCMS, n=10 and control n=10) were sacrificed for the vascular reactivity study.

Unpredictable chronic mild stress

The UCMS regimen used is a variation of the procedure previously described (Willner et al. 1992; Santarelli et al. 2003; Yalcin et al. 2005) and adapted to mice. Several times a day

during the 8 weeks of the UCMS procedure, the mice were exposed to various socio-environmental mild stressors. The stressors were: altered bedding (change or removal of sawdust, damp sawdust, substitution of sawdust with 2 cm of 21 °C water), cage tilting (45°), social stress (mice were placed in the empty cage of another male), altered length and time of light/dark cycle (inversion of the light/dark cycle and lights on for a short time during the dark phase). The presentation of the different stressors was randomized each week to maximize their unpredictability (table 1). For ethical reasons, the stress procedure did not involve food and water deprivation.

WEEK	Friday	Saturday	Sunday	Monday	Tuesday	Wednesday	Thursday
1	coat state, weighing (10h) social stress (12h)	4 light/dark succession every 30 min. (9h30-11h30) without sawdust (9h-16h)	social stress (9h)	social stress (12h)	cages tilt at 45° (9h-10h30)	bath (15 min)(10h) social stress (13h)	damp sawdust (9h30-11h)
	without sawdust (15h-17h)	dark (4h-6h)	social stress (16h) 4 light/dark succession every 30 min.(23h30-1h30, 4h-6h)	damp sawdust (15h-18h) + social stress (16h30) light/dark succession (15 min-22h-23h15) (30 min -9h30-11h30)	social stress (15h) light (15h30-17h)	light/dark succession every 15 min (14h-17h) without sawdust (17h-8h)	cages tilt at 45° (14h-15h30) light/dark succession every 15 min (23h-2h)

Table 1: The unpredictable chronic mild stress protocol during the first week of the experiment.

Behavioural testing

All behavioural testing was performed during the light phase of the light/dark cycle and were recorded using video equipment.

The reward maze test is used to assess UCMS-induced effects on the motivation to obtain a reward. It requires a device containing three aligned compartments with the same dimension (20x20x20cm). Only the colors of the walls and the floor are different: white for the first one, grey for the second one and black for the third one. The three compartments are linked by two openings controlled by the experimenters. The device is illuminated with 200-lux white light. Four and half weeks before the first session, a small portion (2g±1) of a chocolate cookie (Pepito, Lu, France) was placed in the home cage every two days during 2.5 weeks in order to familiarize the mice with the palatable stimulus. The last two weeks before the first session were cookie-free. One hour before testing, food was removed in order to avoid inter-individual differences in the drive for feeding (hunger). At the time of testing, a

small amount ($2g \pm 1$) of chocolate cookie (or of regular food in a supplemental control experiment) was positioned at the center of the black room. The white room was the compartment of the departure where the mouse is placed with its head facing the opposite side to the opening. Four sessions of testing are performed within 9 days, each session being separated from the previous one by 3 days. Each session lasted five minutes; the door of the first opening was closed after the transition of the mouse within a maximum time of 2 minutes (at 2 min, the mouse was gently guided to the second room when required). The cookie consumption (number of bites) was recorded within the 5min test period. The validation of this test was demonstrated by the stronger drive to chew a chocolate cookie than to chew a regular food pellet as a robust increase of the chewing frequency with the chocolate cookie when compared with the regular food (Surget and Belzung 2008).

The splash test evaluates the grooming behaviour after spraying the animal with two sprays of an atomizer containing a 10% sucrose solution. The latency and frequency of grooming bouts were recorded during a 5-minute period. Observations demonstrate that stressed animals exhibit increased grooming latency and decreased grooming frequency and duration (Surget et al. 2008).

The NSF test is a modified version of the test used by Santarelli et al. (2003). This test induces a motivational conflict between eating behaviour and the fear of novelty. Latency to initiation of sniffing and eating a food pellet is used as an index of depressive-like behaviour since chronic antidepressant treatment decreases this measure (Ibarguen-Vargas et al. 2008; Surget et al. 2008). This test was conducted in an open-field ($30 \times 30 \times 30$ cm) with a sawdust covered floor and under a red light (230V, 15W). Twelve hours before testing, the mice were food restricted. At the start of testing, a single food pellet was placed on a white paper (2×2 cm) at the centre of the apparatus. Mice were placed in a corner of the open field. The sniffing and eating latency were recorded during the 5-min testing period. Immediately after, each animal was transferred to an individual cage for 3 minutes before replaced in his home cage and the amount of food consumed was measured in order to assess change in appetite as a confounding factor.

The measurement of locomotor activity was performed using an open-field chamber. The floor of the open-field chamber ($50 \times 50 \times 25$ cm), made of white Plexiglas, was divided into 16 identical squares. The naive mouse was placed at one corner of the chamber and allowed to explore for 5 min. We recorded the number of line crossings (with all four paws crossing the line) they made.

Corticosterone radioimmunoassay

The animals were killed by CO₂ asphyxiation and then decapitated (between 4.00 pm and 6.30 pm). The trunk blood was collected and spun at 1200xg for 12min to separate the plasma, which was stored at -20°C until corticosterone radioimmunoassay. Plasma were analyzed for total corticosterone levels using a ¹²⁵I-labeled corticosterone double-antibody radioimmunoassay kit (MP Biomedicals, NY) according to the manufacturer's protocol. To avoid inter-assay variability, all the samples were run in a single assay (the intra-assay variability was 5.9%).

Vascular reactivity study

Mice were anaesthetized with sodium pentobarbital (60 ml/kg, i.p.) and after thoracotomy, the thoracic aorta was removed. Segments (length 2-3 mm) were immediately placed into ice-cold physiological salt solution (PSS, which contained in mM: 120 NaCl, 25 NAHCO₃, 11.1 Glucose, 4.76 KCL, 1.18 MgSO₄, 1.18 KH₂PO₄, 2.5 CACL₂), cleaned of all visible connective tissue and mounted in an organ bath myographs (myobath II- 8 channel, WPI; Transbridge Force Analyzer, WPI) for measurement of isometric tension. Equilibration of the rings for at least 1 h under a 2-g tension measured, in PSS maintained at 37°C and gassed with 5% CO₂/95% O₂, was performed. Contractions were assessed using a high potassium (K⁺, 80mM) depolarising solution. Aortic rings that did not contract up to 0.010 mN/mm were discarded.

A cumulative response to L-Phe (10⁻⁹ M to 10⁻⁵ M) was generated. Then, after precontraction with 10⁻⁷ M of L-Phe for 10 minutes (time necessary to reach a plateau), a cumulative response to ACh (10⁻⁹ M to 10⁻⁵ M) was generated and expressed as tension change from the baseline L-Phe precontraction. As a control, preparations where endothelium was removed by rubbing did not relax following incubation with ACh up to 3.10⁻⁵M. The segments were normalized by weight. Average weight was used and the response multiplied by the normalization coefficient.

Statistical analysis

The results are presented as mean ± SEM. One-way ANOVA with UCMS as a main factor was used except when there was a repeated measure. One-way repeated measures ANOVA, with UCMS as a main factor, followed by a Fisher post-hoc analysis were performed to study 1) the evolution of the coat state and the body weight (with the 8-week of experiment as repeated factor), 2) the frequency to chew the cookie in the reward maze test

(with the 4-session as repeated factor) and 3) the dose-dependent response to L-Phe and ACh (with dose of L-Phe or ACh as repeated factor). A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Coat Status and Body Weight.

ANOVA revealed a significant main effect of UCMS ($F_{1, 34} = 28.5, p < 0.001$) and weeks ($F_{7, 238} = 43.5, p < 0.001$) and a significant interaction between the factor week and UCMS ($F_{7, 238} = 5.6, p < 0.001$). The UCMS protocol resulted in a deterioration of the coat state, with the difference between the control and UCMS groups reaching significance from week 4 and this persisted until the end of the procedure (Figure 1A, $p < 0.05$). In addition, ANOVA revealed a significant effect of UCMS ($F_{1, 34} = 11.3, p < 0.01$) and week ($F_{7, 238} = 185.8, p < 0.001$) on body weight and a significant interaction between the factors week and UCMS ($F_{7, 238} = 11.4, p < 0.001$). An overall increase in body weight with time is observed in each group and UCMS induced a significant increase of the body weight only in week 5 (Figure 1B, $p < 0.05$).

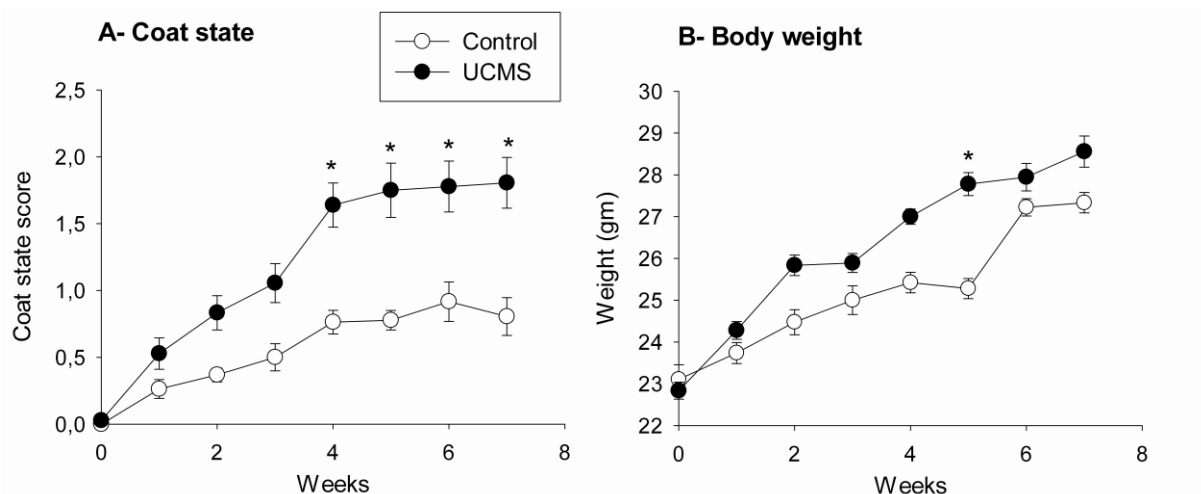


Figure 1: Results (mean \pm SEM) of the coat status (A) and the body weight (B) of mice submitted to 8 weeks of unpredictable chronic mild stress (UCMS) and control mice. * $p < 0.05$: comparison between control and UCMS groups.

Behavioral tests.

In the reward maze test, the one-way repeated measure ANOVA on the frequency to chew the cookie revealed a significant effect of UCMS ($F_{1, 14} = 5.6, p < 0.05$), of session ($F_{3, 42} = 8.2, p = 0.001$) and a significant interaction between the factors UCMS and session ($F_{3, 42} = 8.3,$

$p=0.001$). In the control group, the number of chews significantly increased over the different sessions, an effect attenuated in the UCMS group. Moreover, UCMS significantly decreased the number of chews of the cookie during the last two sessions compared to control group, indicating that UCMS induced anhedonia (Figure 2A).

The results of the NSF test (Figure 2B) reveal that mice subjected to the UCMS protocol exhibit an increase in sniffing ($F_{1, 18} = 11.6, p < 0.01$) and eating latency ($F_{1, 18} = 12.9, p < 0.01$) compared to the control group. Food consumption after the test was not influenced by the UCMS procedure ($F_{1, 18} = 0.09, p = 0.8, ns$), indicating that effects on appetite do not account for the behavioural changes observed in this test (data not shown).

The data presented in Figure 2C demonstrates that mice subjected to the UCMS protocol neglected coat grooming when compared to the control group. This is illustrated by increased latency ($F_{1, 18} = 8.7, p < 0.01$) and decreased frequency ($F_{1, 18} = 11.4, p < 0.01$) of grooming behaviour.

Finally, the results of the open-field test (Figure 2D) show increased locomotor activity in UCMS mice compared to the control mice ($F_{1, 18} = 14.4, p < 0.01$). Overall, these data indicate that the UCMS procedure was effective in inducing a depression-like behavioural state, similar to previously published reports (Yalcin et al. 2005; Surget et al. 2008).

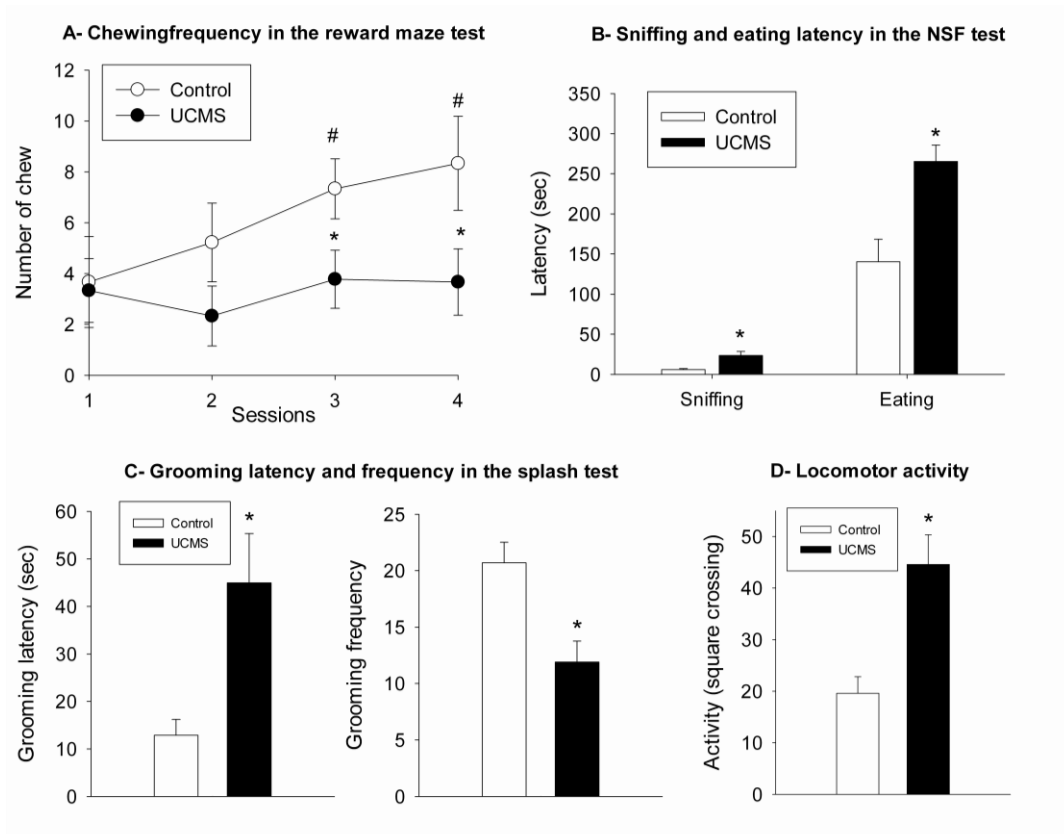


Figure 2: Results (mean \pm SEM) of the frequency to chew the chocolate cookie over the sessions in the reward maze test (A), the latency to sniff and eat the food pellet in the NSF test (B), the latency and frequency of grooming behaviour following a 10% sucrose solution spray in the splash test (C), and number of square crossings in the open field (D) in mice submitted to 8 weeks of unpredictable chronic mild stress (UCMS) and control mice. * $p < 0.05$: comparison between the control and UCMS groups. # $P < 0.05$: significant difference with the first session in the reward maze test.

Corticosterone radioimmunoassay

From blood taken between 4.00 and 6.30 PM, plasma corticosterone level was assessed by radioimmunoassay. Results indicate that UCMS induced a significant increase of the total corticosterone level in comparison to the control mice ($F_{1,9} = 9.5, p < 0.05$).

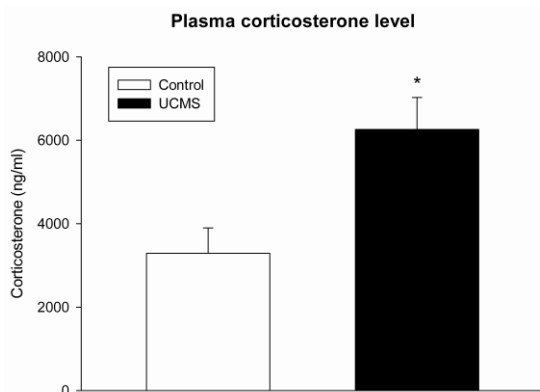


Figure 3: Results (mean \pm SEM) of the total plasma corticosterone level assessed by radioimmunoassay between 4.00 pm and 6.30 pm in mice submitted to the unpredictable chronic mild stress (UCMS) and in control mice. * $p < 0.05$: comparison between the control and UCMS groups.

Vascular Reactivity Study

L-Phe induced a similar dose-dependent contraction in the endothelium of intact aortic segments in both control and UCMS groups (Figure 3A; UCMS effect: $F_{1, 18} = 0.33, p=0.6, ns$; dose effect: $F_{8, 144} = 6.6, p<0.001$) and the EC50 did not differ between groups (Control: $1,04 \cdot 10^{-6} \pm 3,3 \cdot 10^{-7}$ vs UCMS: $3,08 \cdot 10^{-6} \pm 1,9 \cdot 10^{-6}$; $F_{1, 18} = 0.9, p=0.4, ns$; data not shown). Concerning the dose-dependent relaxation to ACh, the one-way repeated measures ANOVA revealed a significant effect of UCMS ($F_{1, 18} = 6.3, p<0.05$), dose of ACh ($F_{8, 144} = 3.9, p<0.001$) and a significant interaction between the two factors ($F_{8, 144} = 5.9, p<0.001$). The acetylcholine-induced vasorelaxation was blunted in the UCMS group with a significant difference in tension change between the control and UCMS groups for the higher concentrations $3 \cdot 10^{-6}$ M and 10^{-5} M of ACh (Figure 3B; $p<0.05$). However, the EC50 is not significantly different between groups (Control: $3 \cdot 10^{-6} \pm 3,6 \cdot 10^{-6}$ vs UCMS: $1 \cdot 10^{-6} \pm 9,7 \cdot 10^{-6}$; $F_{1, 18} = 0.5, p=0.5, ns$; data not shown). At maximal concentration, ACh induced 54.5% of relaxation in the control group whereas the maximal relaxation is significantly reduced to 9.6% in the UCMS group ($F_{1, 18} = 6.4, p<0.05$).

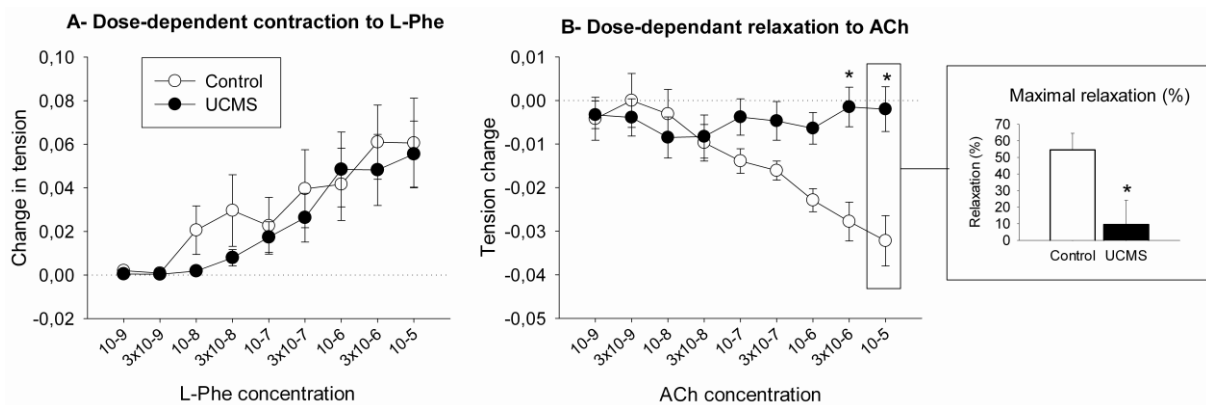


Figure 4: Results (mean \pm SEM) of the contractile response to increasing concentrations (10^{-9} to $3 \cdot 10^{-5}$ mol/L) of Phenylephrine (A) and the relaxant response to increasing concentrations (10^{-9} to $3 \cdot 10^{-5}$ mol/L) of acetylcholine (B) in mice submitted to 8 weeks of unpredictable chronic mild stress (UCMS) (n=10) and control mice (n=10). * $p<0.05$: comparison between the control and UCMS groups.

DISCUSSION

In this study we investigated the impact of a depression-like state on vascular reactivity in mice submitted to the UCMS protocol. The present observations show that UCMS led to vascular reactivity deregulation illustrated by a blunted vasorelaxation response to an acetylcholine challenge.

The validity of the UCMS procedure as an animal model of depression has been demonstrated in previously published reports (Ayensu et al. 1995; Willner 1997; Santarelli et al. 2003; Ibarguen-Vargas et al. 2008; Surget et al. 2008). Indeed, the unpredictable psychosocial stress mimics the aetiology of human depression and recruits equivalent neuroendocrine systems (Willner 1997). Moreover, the UCMS paradigm elicits behavioural and physiological alterations analogous to symptoms of depression (Ayensu et al. 1995; Santarelli et al. 2003) which are reversed by chronic antidepressant treatment (Ibarguen-Vargas et al. 2008; Surget et al. 2008). In our study, the effectiveness of the UCMS protocol was confirmed by the increase in corticosterone plasma levels. Moreover, mice subjected to UCMS developed anhedonia (Reward maze test), a core symptom of human depression. At the same time, UCMS induced a progressive deterioration of the coat state and reduced grooming behaviour (splash test) indicating a loss of motivational and self-care behaviour and an exaggerated emotional reactivity (NSF test). Mice also exhibited weight gain and increased locomotor activity; symptoms which are analogous to human depression where an increase or decrease in appetite and inhibition of activity or agitation is commonly observed. Changes in body weight due to UCMS were reported in a protocol-dependent manner with no change (Santarelli et al. 2003; Ducottet and Belzung 2005) or a reduction with the use of severe stressors such as food and water deprivation (Pothion et al. 2004) or with the application of the stressors over a 24h period (Surget et al. 2008). A bidirectional change, characterized by weight loss or gain, can occur in the different subjects within a given group of mice subjected to UCMS and explain the difference found in these studies. Through multiple behavioural and neuroendocrine readouts, UCMS elicits a depressive-like state demonstrating UCMS as a valid model to mimic the altered vascular reactivity observed in depressed subject.

Endothelial function is most commonly measured as the vasomotor response to pharmacological or physical stimuli. In our study, the UCMS procedure lead to an impairment of the aortic vasodilatation induced by acetylcholine, suggestive of an alteration of the endothelium-dependent relaxation in mice subjected to the UCMS procedure. Indeed, Furchgott and Zawadzki (1980) demonstrate that the relaxation of vascular smooth muscle

cell in response to acetylcholine is dependent on the integrity of the endothelium. However, to clearly show the impairment of endothelium-dependent relaxation in the UCMS model of depression, further studies need to demonstrate that endothelium-independent relaxation induced by sodium nitroprusside is not altered in mice subjected to UCMS. Moreover, as NO is the most important factor implicated in the endothelium-dependent relaxation of the smooth muscle cells, situations in which the relaxation to acetylcholine is altered supposed an impairment of the NO bioavailability (Behrendt and Ganz 2002; Verma and Anderson 2002). Consequently, by impairing vasorelaxation, UCMS may have a direct impact on the endothelium-dependent relaxation induced by the NO release. Assessing the response to acetylcholine in the presence of an inhibitor of eNOS such as the L-NAME, may provide an explanation on the role of NO in UCMS-induced impairment of the aortic relaxation. Demonstrating that UCMS altered relaxation is an effect dependent of the endothelium and of the release of NO will demonstrate the similarity between endothelial dysfunction in the UCMS model of depression and that observed in depressed subjects (Rajagopalan et al. 2001; Broadley et al. 2002; Chrapko et al. 2004; Rybakowski et al. 2006).

The glucocorticoid hypothesis of depression could serve as a potential pathophysiological mechanism involved in these links. Glucocorticoid-induced cardiovascular disease is mediated by endothelial alterations, NO especially is a strong candidate mediator (Mangos et al. 2000). Thus, the increased corticosterone levels observed in mice subjected to UCMS might be related to the hyposensitivity of thoracic aorta to ACh. In support of the implication of the glucocorticoid pathway in the relationship between endothelial dysfunction and depression, Broadley et al. (2006) found that metyrapone, a glucocorticoid synthesis inhibitor, improves the endothelial dysfunction observed in depressed subjects. However, other mechanisms, such as a change in sympathetic drive, already demonstrated in rat model of chronic mild stress (Grippe et al. 2002), may also contribute to this dysfunction by increasing blood pressure. It is well known that sympathetic stimulation results in sharp increases in blood pressure and heart rate, which may damage vascular endothelium and impair endothelium-dependent vasomotion (Harris and Matthews 2004).

In conclusion, these results represent an encouraging step towards elucidating the mechanism responsible for the association between depression and vascular diseases. While further investigations are required, they suggest that a decrease in endothelial NO availability could be a common factor in the main mechanistic hypotheses for this association.

REFERENCES

- Ayensu, W. K., O. Pucilowski, G. A. Mason, D. H. Overstreet, A. H. Rezvani and D. S. Janowsky. 1995. Effects of chronic mild stress on serum complement activity, saccharin preference, and corticosterone levels in Flinders lines of rats. *Physiol Behav* 57(1): 165-9.
- Behrendt, D. and P. Ganz. 2002. Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol* 90(10C): 40L-48L.
- Broadley, A. J., A. Korszun, E. Abdelaal, V. Moskvina, J. Deanfield, C. J. Jones and M. P. Frenneaux. 2006. Metyrapone improves endothelial dysfunction in patients with treated depression. *J Am Coll Cardiol* 48(1): 170-5.
- Broadley, A. J., A. Korszun, C. J. Jones and M. P. Frenneaux. 2002. Arterial endothelial function is impaired in treated depression. *Heart* 88(5): 521-3.
- Chrapko, W. E., P. Jurasz, M. W. Radomski, N. Lara, S. L. Archer and J. M. Le Melledo. 2004. Decreased platelet nitric oxide synthase activity and plasma nitric oxide metabolites in major depressive disorder. *Biol Psychiatry* 56(2): 129-34.
- Dimopoulos, N., C. Piperi, A. Salonicioti, C. Mitsonis, I. Liappas, R. W. Lea and A. Kalofoutis. 2006. Elevation of plasma concentration of adhesion molecules in late-life depression. *Int J Geriatr Psychiatry* 21(10): 965-71.
- Ducottet, C. and C. Belzung. 2005. Correlations between behaviours in the elevated plus-maze and sensitivity to unpredictable subchronic mild stress: evidence from inbred strains of mice. *Behav Brain Res* 156(1): 153-62.
- Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288(5789): 373-6.
- Grippe, A. J. 2009. Mechanisms underlying altered mood and cardiovascular dysfunction: the value of neurobiological and behavioral research with animal models. *Neurosci Biobehav Rev* 33(2): 171-80.
- Grippe, A. J., J. A. Moffitt and A. K. Johnson. 2002. Cardiovascular alterations and autonomic imbalance in an experimental model of depression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282(5): R1333-41.
- Harris, K. F. and K. A. Matthews. 2004. Interactions between autonomic nervous system activity and endothelial function: a model for the development of cardiovascular disease. *Psychosom Med* 66(2): 153-64.

- Ibarguen-Vargas, Y., A. Surget, C. Touma, R. Palme and C. Belzung. 2008. Multifaceted strain-specific effects in a mouse model of depression and of antidepressant reversal. *Psychoneuroendocrinology* 33(10): 1357-68.
- Isingrini, E., T. Desmidt, C. Belzung and V. Camus. 2009. Endothelial dysfunction: A potential therapeutic target for geriatric depression and brain amyloid deposition in Alzheimer's disease? *Curr Opin Investig Drugs* 10(1): 46-55.
- Lett, H. S., J. A. Blumenthal, M. A. Babyak, A. Sherwood, T. Strauman, C. Robins and M. F. Newman. 2004. Depression as a risk factor for coronary artery disease: evidence, mechanisms, and treatment. *Psychosom Med* 66(3): 305-15.
- Mangos, G. J., B. R. Walker, J. J. Kelly, J. A. Lawson, D. J. Webb and J. A. Whitworth. 2000. Cortisol inhibits cholinergic vasodilation in the human forearm. *Am J Hypertens* 13(11): 1155-60.
- Murray, C. J. and A. D. Lopez. 1997. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 349(9063): 1436-42.
- Plante, G. E. 2005. Depression and cardiovascular disease: a reciprocal relationship. *Metabolism* 54(5 Suppl 1): 45-8.
- Pothion, S., J. C. Bizot, F. Trovero and C. Belzung. 2004. Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress. *Behav Brain Res* 155(1): 135-46.
- Rajagopalan, S., R. Brook, M. Rubenfire, E. Pitt, E. Young and B. Pitt. 2001. Abnormal brachial artery flow-mediated vasodilation in young adults with major depression. *Am J Cardiol* 88(2): 196-8, A7.
- Rybakowski, J. K., A. Wykretowicz, A. Heymann-Szlachcinska and H. Wysocki. 2006. Impairment of endothelial function in unipolar and bipolar depression. *Biol Psychiatry* 60(8): 889-91.
- Santarelli, L., M. Saxe, C. Gross, A. Surget, F. Battaglia, S. Dulawa, N. Weisstaub, J. Lee, R. Duman, O. Arancio, C. Belzung and R. Hen. 2003. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301(5634): 805-9.
- Surget, A. and C. Belzung. 2008. Unpredictable chronic mild stress in mice. In: A.V. Kalueff and J.L. LaPorte, Editors, *Experimental Models in Neurobehavioral Research*, Nova Science, New York 79-112.
- Surget, A., M. Saxe, S. Leman, Y. Ibarguen-Vargas, S. Chalon, G. Griebel, R. Hen and C. Belzung. 2008. Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. *Biol Psychiatry* 64(4): 293-301.

- Verma, S. and T. J. Anderson. 2002. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation* 105(5): 546-9.
- Willner, P. 1997. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl)* 134(4): 319-29.
- Willner, P., R. Muscat and M. Papp. 1992. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 16(4): 525-34.
- Yalcin, I., F. Aksu and C. Belzung. 2005. Effects of desipramine and tramadol in a chronic mild stress model in mice are altered by yohimbine but not by pindolol. *Eur J Pharmacol* 514(2-3): 165-74.

**ARTICLE 3 : ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN A
RODENT MODEL OF DEPRESSION MAY UNDERLIE
ATHEROSCLEROSIS**

Endothelial dysfunction in a rodent model of depression may underlie atherosclerosis: implication of NO, EDHF and PGI₂ in chronic stress-induced vasorelaxation impairment.

Isingrini E ^{1,2}, Belzung C ^{1,2}, Freslon JL ³, Machet MC ⁴, Camus V ^{1,2,5}.

¹ INSERM U930 – CNRS FRE2448, 37000 Tours, France.

² Université François Rabelais, 37200 Tours, France.

³ EA4433, Université François Rabelais, Tours, France.

⁴ Service d'anatomie pathologique, UFR de Médecine, Université François Rabelais, Tours, France.

⁵ Clinique Psychiatrique Universitaire, CHRU de Tours, 37044 Tours, France.

ABSTRACT

Epidemiologic studies demonstrated that depressive symptoms predict incident coronary heart disease (CHD) in healthy populations. However, the exact mechanism by which depression may increase the risk of coronary events is unclear. Endothelial dysfunction, defined as impaired endothelium vasorelaxation, constitutes a key factor in atherosclerosis process and is reported as a possible link between depression and subsequent cardiovascular events since it is described in depressed subjects. Among the endothelium relaxing mediators, the most important is nitric oxide (NO); however, the prostacyclin (PGI₂) and the endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) may play an important role when NO-mediated effects are compromised. The purpose of the present study is to investigate both endothelial dysfunction and atherosclerosis formation in the unpredictable chronic mild stress (UCMS) model of depression in mice. Mice male BALB/c were submitted to two 7-week UCMS procedure separated by 6 weeks. The first two weeks of UCMS or control condition were drug free, and treatments (Fluoxetine 10 mg/kg or NaCl 9%) were performed until the end of the 7th week of each procedure. Indices of depressive like behaviours (Coat state and reward maze test) became exacerbated in UCMS mice vs control, an effect reversed by fluoxetine treatment. Acetylcholine induced vasorelaxation was examined in aortic rings in presence of (1) EDHF inhibitor (2) PGI₂ synthase inhibitor and/or (3) NO synthase inhibitor. UCMS induced a decrease NO-dependent relaxation that was partially compensated by an EDHF-dependent relaxation. Since fluoxetine *per se* increases the NO-dependent relaxation, fluoxetine was able to reverse UCMS-effect on the vascular reactivity. As an independent risk factor, UCMS reproduced the endothelial alterations observed in depressed subjects; however, this was not sufficient to induce morphological alterations. Consequently, the use of UCMS procedure could constitute a valuable model to further understand the association between depression and cardiovascular diseases.

Key words: Depression, model of chronic stress, endothelial dysfunction, vasodilatation, endothelium-derived factor, atherosclerosis

INTRODUCTION

There is a well established relationship between depression and cardiovascular diseases (Camus et al. 2004; Frasure-Smith and Lesperance 2006; Lesperance and Frasure-Smith 2007). Several lines of evidence demonstrate depression being an independent vascular risk factor for the development of cardiovascular disease including coronary heart event, myocardial infarct and stroke (Frasure-Smith and Lesperance 2005; Lett et al. 2004). However, the exact mechanisms underlying the interplay between depression and cardiovascular disease remain to be elucidated. Depression adversely affects autonomic and hormonal homeostasis, resulting in metabolic abnormalities, inflammation, increased platelet aggregation and endothelial dysfunction (Grippio and Johnson 2009; Lippi et al. 2009). All of these pathological features lead to atherosclerosis, atherothrombosis and the mentioned cardiovascular events.

The vascular endothelium, by releasing several relaxing and contractile factors is responsible for the control of blood vessel tone (Furchgott and Vanhoutte 1989; Furchgott and Zawadzki 1980; Verma and Anderson 2002). The relaxing factors include nitric oxide (NO) and prostacyclin (PGI₂) as well as an endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) which induces relaxation of the smooth muscle cells by hyperpolarisation (Feletou and Vanhoutte 2006; Moncada and Vane 1979). Among these endothelium-released mediators, the most important is NO which provides a protective effect against cardiovascular disease. Thus, endothelial dysfunction, which is considered as a reliable predictor of atherosclerosis, can be defined as the reduction of NO bioavailability impairing endothelium-dependent relaxation (Landmesser and Drexler 2005). However, EDHF and PGI₂ may play an important role in regulating the vascular tone and reactivity, especially when NO-mediated effects are compromised, behaving as a compensatory mechanisms (Cohen and Vanhoutte 1995; Hecker 2000; Needleman et al. 1978).

In order to explain depression-induced cardiovascular diseases, the endothelial dysfunction hypothesis has been extensively reviewed and looks very promising (Isingrini et al. 2009). Indeed, by using different techniques, several studies demonstrate that depression is associated with endothelial dysfunction. Both depressed subjects with and without established cardiac disease exhibit an impairment of the endothelium-dependent relaxation (Broadley et al. 2006; Broadley et al. 2002; Faramawi et al. 2007; Rajagopalan et al. 2001; Rybakowski et al. 2006; Sherwood et al. 2005). Moreover, a decreased plasma level of NO metabolites and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity are reported in depressed patients (Chrapko et al. 2004). Data of the literature suggests the impairment of the NO pathway as a possible

pathophysiological mechanism linking depression and cardiovascular disease. However, the respective implications of NO, PGI₂ and EDHF in depression-induced endothelial dysfunction are unknown.

The unpredictable chronic mild stress (UCMS) is an informative model to study depression in animals (Willner 2005), as it mimics in a naturalistic way the role of socio-environmental stressors in precipitating a depressive pathology and the time frame of therapeutic responses to antidepressants. Specifically, the random application of various environmental and social mild stressors for several weeks results in a syndrome in mice that is reminiscent of symptoms of depression, including increased fearfulness/anxiety-like behaviour, decreased consumption of palatable food, and physiological changes (Mineur et al. 2007; Pothion et al. 2004; Santarelli et al. 2003).

While the UCMS model of depression is a powerful tool to study the relationship between depression and cardiovascular disease, few studies tried to simulate the physiological and morphological vascular alterations observed in depressed subjects. In an 8-week procedure in mice, we demonstrated an UCMS-dependent impairment of the endothelium-dependent relaxation. However, the respective implication of NO, PGI₂ and EDHF in the impairment of the endothelial-dependent relaxation induced by UCMS was not assessed and neither the possible association of this UCMS-induced endothelial dysfunction with atherosclerosis formation.

The purpose of the present study was therefore to investigate both endothelial dysfunction and atherosclerosis formation in UCMS-treated mice with and without chronic exposure to antidepressant treatment with a selective serotonin reuptake inhibitor (fluoxetine). Over a period of 6 months we performed two UCMS procedures in BALB/c mice in order to induce depression-like behaviour and to examine the reversal effects of fluoxetine treatment on UCMS-induced changes. This was the time that we considered necessary for vascular risk factors to induce atherosclerosis in this strain, such as for example a high fat diet regimen (Paigen et al. 1990). Following the chronic stress, the respective contributions of NO, PGI₂ and EDHF were examined by studying the endothelium-dependent relaxation of the thoracic aorta in different conditions of inhibition of the synthesis of these endothelial factors. Finally, atherosclerosis formation was examined by using histological study of the thoracic aorta.

METHODS

Animals

Male BALB/c mice (7-9 weeks) (Centre d'élevage Janvier, Le Genest Saint Isle, France) were housed in groups of 4 and maintained under standard laboratory conditions (12 hrs. light-dark cycle, lights on at 20:00; Temperature = 22 +/- 2°C) for 1 week prior to the beginning of the experiments. Food and water were freely available. All behavioural testing occurred during the dark phase of the light-dark cycle. All experiments were carried out in strict compliance with the European Community Council directive 86/609/EEC and with French legislation from the Ministère de l'Agriculture.

Drug

The selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine hydrochloride (Sequoia) was prepared freshly every day in saline (NaCl 0.9%) and administered intraperitoneally (IP, 10 mg/kg) in a volume of 10 ml/kg. Vehicle animals received an intraperitoneal (IP) injection of 0.9 % saline in a volume of 10 ml/kg.

General procedure (figure 1)

The mice were randomized into four different groups. Control mice were kept in standard laboratory conditions and the UCMS groups underwent various socio-environmental stressors. The UCMS groups were submitted to two 7-week UCMS procedures separated by a 6-week period without stress. The control and UCMS groups were maintained in the same standard laboratory conditions. For the induction of stress, the UCMS groups were placed in small individual cages (8 x 13.5 x 8.1 cm). In each condition, mice received either fluoxetine treatment (Control, Fluoxetine (n=10) and UCMS, Fluoxetine (n=8) groups) or NaCl injections (Control, Vehicle (n=9) and UCMS, Vehicle (n=6) groups). The first two weeks of the UCMS regimen were drug-free, and treatment started from the third week of UCMS and continued until the end of the 7 week period. The same procedure was repeated during the second UCMS regimen. Coat state and body weight were assessed weekly until the end of the second UCMS regimen. During the two UCMS procedures, depression-like behaviour was assessed by using the reward maze test. Finally at the end of the second UCMS procedure, mice were sacrificed and thoracic aortas were dissected and used for both the vascular reactivity study and histological study in order to assess atherosclerosis formation.

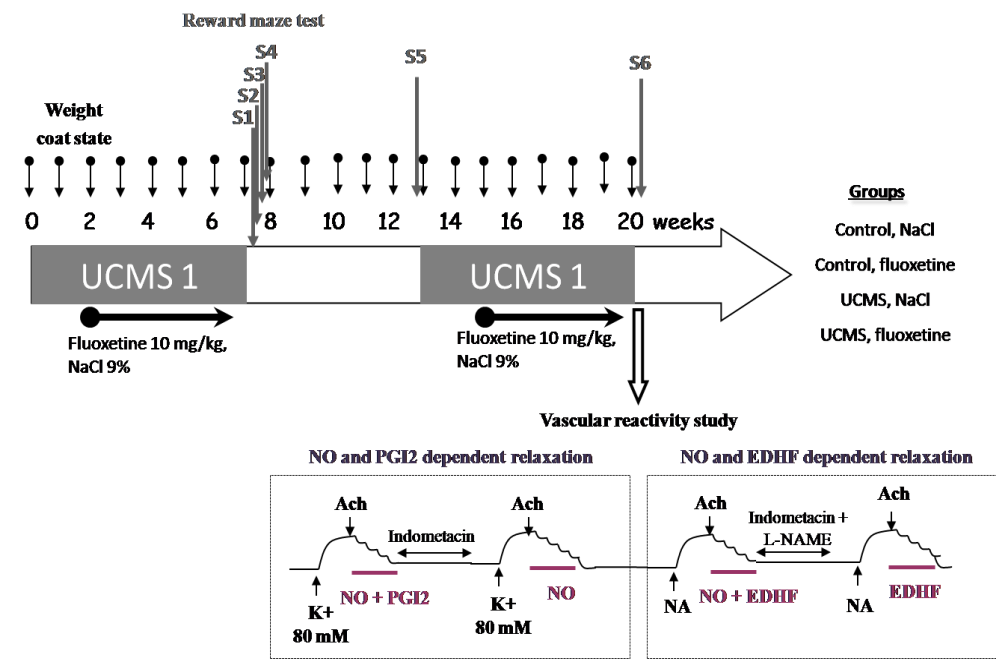


Figure 1: General procedure and experimental groups. UCMS mice were submitted to two 7-weeks of unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures separated by 6 weeks. Control mice were kept in a standard laboratory conditions. After two weeks of UCMS, mice received either fluoxetine treatment (10 mg/kg, i.p.) or vehicle treatment (NaCl, 0.9%, i.p.). Treatments were administered daily during the last 5 weeks of the procedure and the same treatment procedure was performed during the second UCMS procedure. Coat state and body weight were evaluated weekly and behaviour was assessed using the reward maze test. Four sessions of the reward maze test were performed at the end of the first UCMS procedure (S1 to S4) and one session at the beginning (S5) and at the end of the second UCMS procedure (S6). At the end of the second UCMS procedure, mice were sacrificed and thoracic aortas were dissected and used for both the vascular reactivity study and histological study.

Unpredictable chronic mild stress

Several times a day during the two 7-week UCMS procedure, mice were subjected to various and repeated unpredictable stressors. The following stressors were used: altered bedding (change or removal of sawdust, damp sawdust, substitution of sawdust with 21 °C water), cage tilting (45°), cage exchange (mice were placed in the empty cage of another male), altered length and time of light/dark cycle (Surget and Belzung 2008; Surget et al. 2008; Yalcin et al. 2005).

Coat state evaluation

The coat state and the body weight of each animal were evaluated weekly until the end of the second UCMS procedure. The evaluation of the coat-state was carried out by the assessment of eight different body parts: head, neck, dorsal coat, ventral coat, tail, forepaws, hind paws and genital region. For each body area, a score of 0 was given for a coat in good

state or a score of 1 for a dirty coat. The total score was defined as the sum of the scores for each body part. This index has been pharmacologically validated in previous studies using BALB/c mice (Surget et al. 2008; Yalcin et al. 2005; Yalcin et al. 2008).

Reward maze test

The reward maze test was established to assess UCMS-induced effects on the motivation to obtain a reward. This test consists of assessing the motivation for a palatable stimulus (a chocolate cookie) by measuring the latency to chew the cookie during four sessions. The cookie test requires a device containing three aligned chambers of the same dimensions (19x19x20 cm). Only the colours of the walls and the floor are different between the chambers: white for the first one, grey for the second one and black for the third one. The three chambers are connected by two doors whose opening is controlled by the experimenter. The device is illuminated by a 200-lux white light. Four and half weeks before the first session, a small portion of a chocolate cookie ($2g \pm 1$) is placed in the home cage of the mouse every two days during 2.5 weeks in order to familiarize the mice with the palatable stimulus. The last two weeks before the first session are cookie-free. At the time of testing, a small amount of chocolate cookie is positioned at the centre of the black chamber. The white chamber is the compartment of departure and the mouse is placed with its head facing away from the opening. The test is conducted during five minutes; the door separating the departure chamber and the intermediate chamber is closed after the transition of the mouse (if a mouse does not enter after 2 minutes, it is gently guided into the intermediate room). Latency to chew the cookie within the total 5 minutes is recorded. Four sessions of testing are performed within 9 days at the end of the first UCMS procedure, each session being separated from the previous one by 2 days. Two additional sessions are performed at the beginning and at the end of the second UCMS regimen. Previous results show that the drive for chewing is stronger with the chocolate cookie than with the regular food pellet as a robust reduction of the chewing latency was found over the sessions with the chocolate cookie when compared with the regular food (Surget and Belzung 2008). The cookie test can assess multiple behavioural dimensions: anxiety state (latency to pass the first door), locomotor and exploratory behaviour (number of passage through the second door) and anhedonia (latency to chew the chocolate cookie) with interaction to the environment habituation (latency to chew over the sessions).

Vascular reactivity study

Mice were anaesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg, i.p.). After heparinization (500 IU/kg, i.v.) and thoracotomy, the thoracic aorta was removed. Segments (length 1.5–2.5 mm) were immediately placed into cold physiological salt solution (PSS, which contained in mM: NaCl 119, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.17, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.18 and glucose 5.5). They were cleaned of all visible connective tissue and mounted in a myograph (Multi Myograph system 610 M, JP Trading, Aarhus, Denmark) for measurement of isometric tension. Data was recorded with a PowerLab interface and Chart software (ADInstruments, Castle Hill, NSW, Australia). After equilibration for at least 1 h in PSS maintained at 37 °C and gassed with 5% CO₂/95% O₂, under a 2-g tension, rings were assessed for contraction and relaxation properties. Contractions were assessed using a high potassium (K⁺, 80mM) depolarising solution. Aortic rings which did not contract up to 1.5 mN/mm were discarded. At the plateau of the contraction, preparations were challenged with acetylcholine (ACh, 10⁻⁸ to 3.10⁻⁵M) to evaluate the magnitude of the endothelium-dependent relaxation. Rings which did not relax up to 15% of the initial K⁺ pre-contraction were discarded. As a control, preparations where endothelium was removed by rubbing did not relax following incubation with ACh up to 3.10⁻⁵M. 10 animals which did not respond to this exclusion criteria were excluded for the following analysis.

Endothelium-dependent relaxation to ACh: Involvement of NO and PGI₂ (Figure 1)

To assess the involvement of NO and PGI₂ dependent relaxation, a pre-contraction to K⁺ (80mM), which inhibits EDHF effects by a depolarisation, was performed. After a 20-minute stabilisation (period necessary for the contraction curve to reach a plateau), the relaxation to increasing concentration of ACh (10⁻⁸ to 3.10⁻⁵M) induced by both NO and PGI₂ was quantified. Then, the same procedure was performed in presence of indometacin (10⁻⁵ M, 20 minutes), a PGI₂ synthesis inhibitor, in order to assess the relaxation induced by NO only in response to increasing concentrations of ACh (10⁻⁸ to 3.10⁻⁵M).

Endothelium-dependent relaxation to ACh: Involvement of NO and EDHF (Figure 1)

After contraction with increasing concentrations of nor-adrenaline (NA, 10⁻¹⁰ to 10⁻⁶ M) and in presence of indometacin, the relaxation to increasing concentrations of ACh (10⁻⁸ to 3.10⁻⁵M) induced by both NO and EDHF was assessed. Then, the same procedure was performed in presence of indometacin and L-NAME (10⁻⁴, NO synthesis-inhibitor) in order to evaluate the relaxation induced by EDHF only. 3 animals which did not contract to NA were excluded for the analysis of these results.

Endothelium-independent relaxation to SNP

After contraction to NA (10^{-7}), the endothelium-independent relaxation to a NO-donor, the sodium nitroprusside (10^{-6} M) was assessed.

Histological study of aortic lesion

All fragments of the thoracic aorta wall (3mm) were initially fixed in 4% formol solution for 24h at 4°C, then embedded in paraffin and cut into 4µm transversal sections. Paraffin sections were stained with hematoxylin-phloxin-safran for histological evaluation. Five sections for each aorta were obtained for analysis of lesion area by light microscopy.

Statistical analysis

The results are expressed as the mean +/- SEM (standard error of the mean). Since the sample-size was small and did not follow a normal distribution, we used a non-parametric analysis. Behaviour and vascular reactivity among all groups were compared using the Kruskal-Wallis test and compared among the different tests or concentrations in each group using the Friedman test (multiple samples). The Kruskal-Wallis was followed by the U of Mann-Witney test and the Friedman test was followed by the Wilcoxon test for two per two comparisons when required. We considered that results are statistically significant at $p < .05$ and trend to be significant at $p < .10$.

RESULTS

Coat state and body weight

The UCMS procedure induced a gradual deterioration of coat state which reached significance 2 weeks after beginning of the first UCMS procedure and deteriorated until the end of the second UCMS procedure [Figure 2A, week 2 to 20: $0.0 < U < 14.5$, $p < .05$]. The ability of fluoxetine to counteract UCMS-induced effects was observed after five weeks of treatment at the end of the first UCMS procedure [week 7: $U=8$, $p < .05$]. Moreover, fluoxetine improved coat state deterioration after three weeks of treatment during the second UCMS procedure and until the end of the procedure [week 18 to 20: $5.5 < U > 8$, $p < .05$].

The Friedman statistical Analysis revealed an overall gain in body weigh with time in each group [Control groups: Vehicle: $X^2(9, 20) = 114.9$, $p < .001$; Fluoxetine: $X^2(10, 20) = 159.6$, $p < .001$. UCMS groups: Vehicle: $X^2(8, 20) = 120.3$, $p < .001$; Fluoxetine: $X^2(6, 20) = 92.3$, $p < .001$]. The Kruskal-Wallis test indicates significant differences between groups during the last three weeks of the second procedure [Week 18: $H_{3, 33} = 9.3$, $p < .05$; week 19:

$H_{3, 33} = 9.1, p < .05$; week 20: $H_{3, 33} = 10.5, p < .05$]. In the control condition, fluoxetine treatment induced an increase in body weight [Week 18: $U = 15.5, p < .05$; week 19: $U = 15.5, p < .05$; week 20: $U = 7, p < .001$]. However, UCMS regimen was not associated with body weight change and fluoxetine treatment in this case had no effect [Vehicle: Control vs UCMS: week 18 to 20: $24.5 < U < 35, ns$; UCMS: Vehicle vs Fluoxetine: week 18 to 20: $19.5 < U < 22.5, ns$].

Reward maze test

The latency to pass the first door ($2.1 \leq H_{3, 33} \leq 6.7, ns$) and the number of passage through the second door ($1.1 \leq H_{3, 33} \leq 6.9, ns$) were not significantly between groups during the 6 sessions, indicating that UCMS or fluoxetine had effects on anxiety state and locomotors and exploratory behaviour (data not shown).

At the end of the first UCMS procedure (Sessions S1 to S4, Figure 2B), the latency to chew the chocolate cookie was not significantly different between groups during the four sessions (S1: $H_{3, 33} = 3.5, ns$; S2: $H_{3, 33} = 8.9, ns$; S3: $H_{3, 33} = 2.0, ns$; S4: $H_{3, 33} = 3.2, ns$). A gradual decrease of the latency was observed over the sessions for all groups (Control, Vehicle: $X^2(9, 3) = 12.6, p < .05$; Control, Fluoxetine: $X^2(10, 3) = 11.8, p < .01$; UCMS, Vehicle: $X^2(8, 3) = 12.7, p < .05$; UCMS, Fluoxetine: $X^2(6, 3) = 13.6, p < .01$), indicating similar habituation to the environment between groups.

The latency to chew the chocolate cookie differs significantly between groups only at the end of the second regimen (S5: $H_{3, 33} = 1.2, ns$; S6: $H_{3, 33} = 9.6, p < .05$, figure 2B). UCMS increased the latency to chew the cookie, indicating a loss of motivation to obtain a reward ($U = 12, p < .05$) and fluoxetine counteracts this effect ($U = 5, p < .05$).

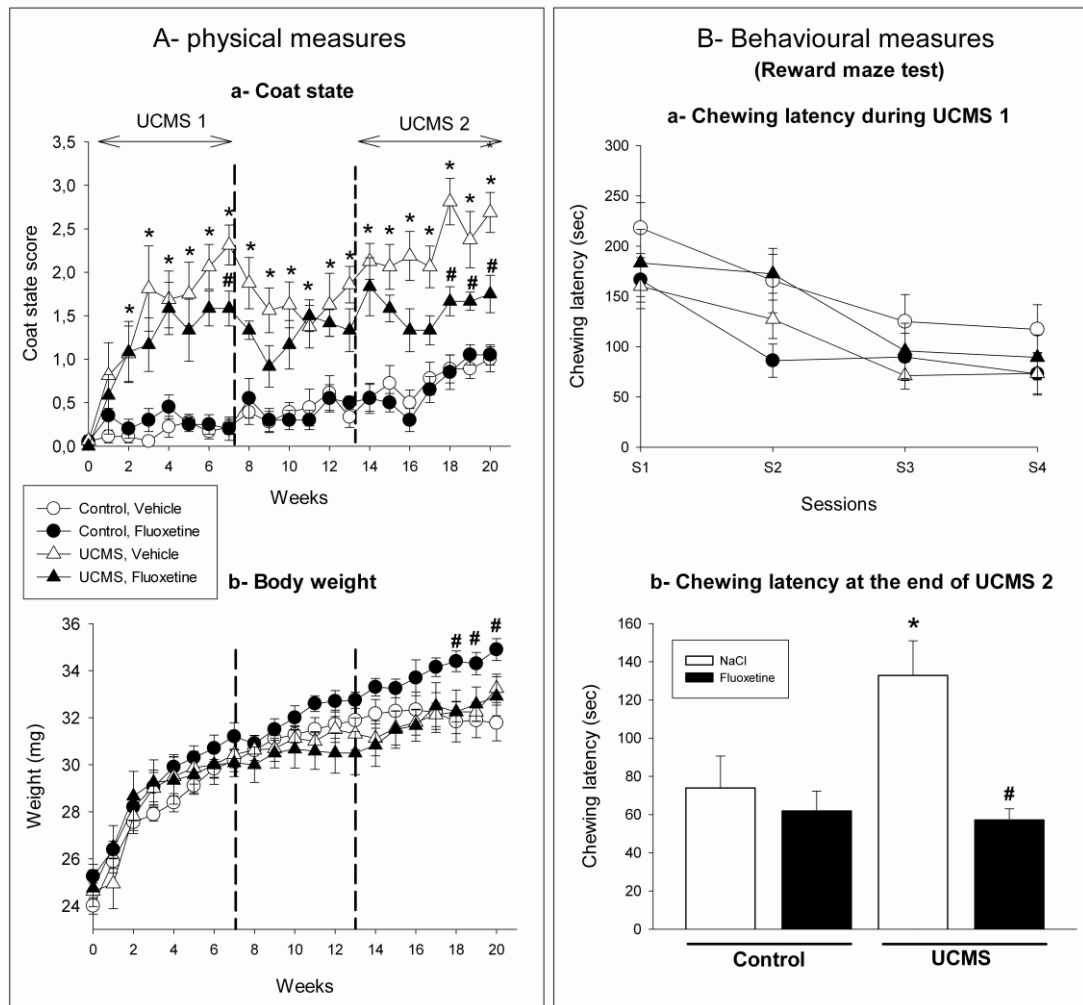


Figure 2: Physical (A) and behavioural (B) changes observed in the control and UCMS groups which receive either fluoxetine treatment (10 mg/kg, i.p.) or vehicle treatment (NaCl, 0.9%, i.p.). **Aa-** Coat state evolution (Mean \pm SEM) during the two UCMS procedures; **Ab -** body weight evolution (Mean \pm SEM) during the two UCMS procedures; **Ba -** Latency to chew the chocolate cookie (Mean \pm SEM) during the four sessions (S1 to S4) performed at the end of the first UCMS procedure; **Bb -** Latency to chew the chocolate cookie (Mean \pm SEM) during the last sessions performed at the end of the second UCMS procedure (S6). * $p < .05$: UCMS effect, comparison to the control group in the same treatment condition. # $p < .05$: fluoxetine effect, comparison to the NaCl group in the same stress condition.

Vascular reactivity study

Endothelial-dependent relaxation to ACh: involvement of NO and PGI₂:

The initial high K⁺ contraction did not differ significantly between groups both in the presence and in the absence of indometacin. Moreover, in each experimental group, indometacin did not modify the contractile response to K⁺ (Data not shown).

Figure 3A shows that the relaxation induced by both NO and PGI₂ is significantly different among groups at 3.10⁻⁵M of ACh ($H_{3,23} = 7.7, p = .05$). Moreover, Figure 3B shows

that the relaxations induced by NO only in presence of indometacin according to increasing concentration of ACh were significantly different among all groups (ACh 10^{-8} : $H_{3,23}=18.2, p<.001$; 3.10^{-8} : $H_{3,23}=11.8, p<.01$; 10^{-7} : $H_{3,23}=6.5, p=.08$; 3.10^{-7} : $H_{3,23}=9.6, p<.05$; 10^{-6} : $H_{3,23}=11.6, p<.01$; 3.10^{-6} : $H_{3,23}=12, p<.01$; 10^{-5} : $H_{3,23}=12.2, p<.01$; 3.10^{-5} : $H_{3,23}=14.9, p<.001$). The two per two comparisons indicate that fluoxetine treatment increases the relaxation in both the control and UCMS groups, an effect which became significant in presence of indometacin for the all concentration of ACh in the control groups (ACh 10^{-8} : $U=0.0, p<.001$; 3.10^{-8} : $U=17, p=.05$; 10^{-7} : $U=9, p=.05$; 3.10^{-7} : $U=6, p<.05$; 10^{-6} : $U=3, p<.01$; 3.10^{-6} : $U=3, p<.01$; 10^{-5} : $U=3, p<.01$; 3.10^{-5} : $U=3, p<.001$) and for the low and the high concentration of ACh in the UCMS groups (ACh 10^{-8} : $U=0.0, p<.001$; 3.10^{-8} : $U=0.0, p<.001$; 3.10^{-5} : $U=3.0, p=.05$).

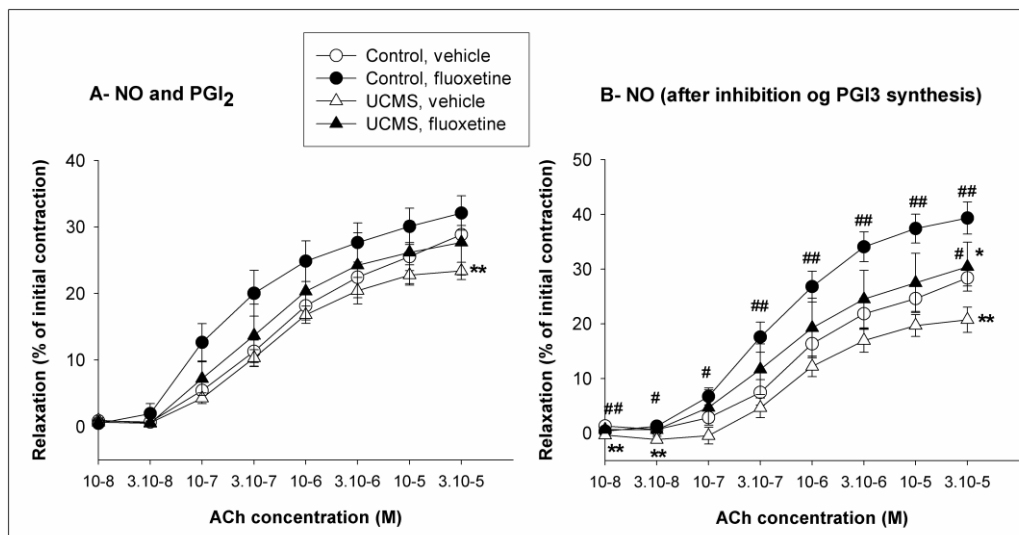


Figure 3: Relaxation (% of K⁺-induced contraction) to increasing concentrations of acetylcholine (10^{-8} to 3.10^{-5} M) induced by NO and PGI₂ (A) and NO only in presence of indometacin (10^{-5} M, B) for the control and UCMS groups which receive Fluoxetine treatment (10 mg/kg, i.p.) or vehicle treatment (NaCl, 0.9%, i.p.) during the last 5 weeks of each UCMS procedure. * $p<.05$, ** $p<.001$: UCMS effect, comparison to the control group in the same treatment condition. # $p<.05$, ## $p<.01$: fluoxetine effect, comparison to the NaCl group in the same stress condition.

In contrast, UCMS procedure induces a significant decrease of the relaxation in the vehicle groups both in absence (ACh 3.10^{-5} : $U=4.0, p<.05$) and in presence of indometacin (ACh 10^{-8} : $U=0.0, p<.01$; 3.10^{-8} : $U=0.0, p<.01$; 3.10^{-5} : $U=3, p<.05$). In the fluoxetine groups, the decreased relaxation induced by UCMS trended towards a significant effect in presence of indometacin at 3.10^{-5} M ACh ($U=4, p=.06$).

These results indicate that the increase NO-dependent relaxation induced by fluoxetine treatment is attenuated in presence of PGI₂ while the decrease NO-dependent relaxation induced by UCMS is not influenced by the presence of PGI₂. Moreover, given the antagonistic effects of UCMS and fluoxetine on the NO-dependent relaxation, fluoxetine treatment in the UCMS mice restored the relaxation to the unstressed untreated critical level.

Endothelial-dependent relaxation to ACh: involvement of NO and EDHF:

The contractile response to increasing concentrations of NA did not differ between groups both in absence and in presence of L-NAME. Moreover, in each experimental group, L-NAME did not modify the contractile response to NA (data not shown).

Figure 4 represents the relaxation to increasing concentrations of ACh induced by both NO and EDHF in presence of indometacin (A) and EDHF only in presence of indometacin and L-NAME (B). There were no statistical differences between groups in each condition.

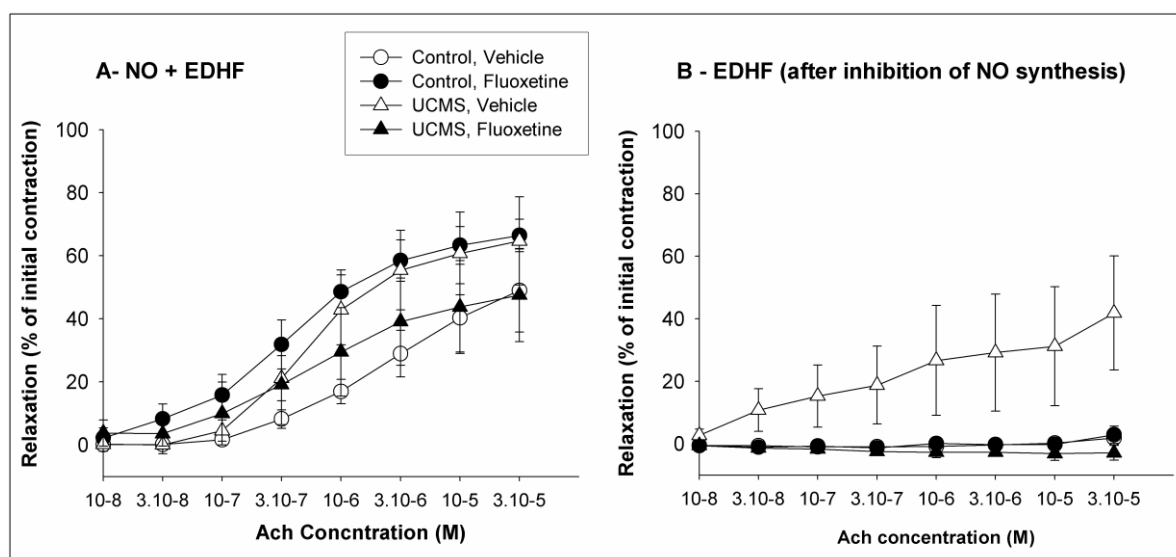


Figure 4: Relaxation (% of NA-induced contraction) to increasing concentrations of acetylcholine (10⁻⁸ to 3.10⁻⁵ M) induced by NO and EDHF (A) and EDHF only in presence of L-NAME (10⁻⁴ M, B) for the control and UCMS groups which receive fluoxetine treatment (10 mg/kg, i.p.) or vehicle treatment (NaCl, 0.9%, i.p.) during the last 5 weeks of each UCMS procedure.

However, Figure 5 compares, in each experimental group, the relaxation to increasing concentrations of ACh induced by both NO and EDHF and EDHF only. Results indicate that EDHF-dependent relaxation is almost absent for each concentration of ACh except for the UCMS vehicle group. Indeed, at 3.10⁻⁵ M of ACh, in vehicle and fluoxetine control groups,

respectively 99.5% and 94.5% of ACh-induced relaxation was NO-dependent whereas in the UCMS vehicle group, the portion of NO-dependent relaxation was significantly decreased up to 66.3% of the total endothelium-dependent relaxation. This decrease in NO-dependent relaxation was compensated by UCMS-induced increase in EDHF-dependent relaxation to 33.7% of the total endothelium-dependent relaxation. Finally, fluoxetine was able to restore this to control conditions since in the UCMS fluoxetine group, the contribution of EDHF-dependent relaxation was significantly suppressed and the total endothelium-dependent relaxation was fully relying on NO.

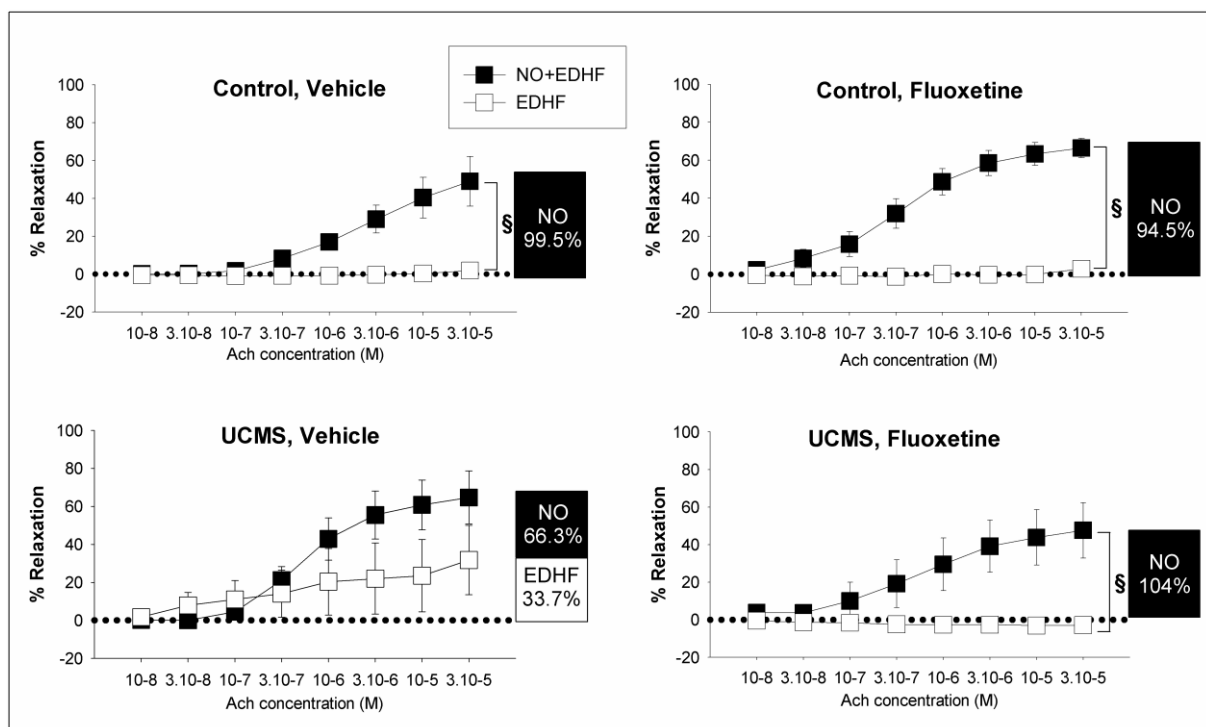


Figure 5: Comparison between the relaxation (% of the NA-induced contraction) to increasing concentrations of acetylcholine (ACh, 10-8 to 3.10-5 M) induced by NO and EDHF (black symbols) and EDHF only in presence of L-NAME (10-4 M, open symbols) for each groups control and UCMS which receive Fluoxetine treatment (10 mg/kg, i.p.) or vehicle treatment (NaCl, 0.9%, i.p.) during the last 5 weeks of each UCMS procedure. The % of ACh-induced NO-dependent relaxation and EDHF-dependent relaxation are indicated for 3.10-5 M of ACh. §*p*<.05: NO and EDHF dependent relaxation in comparison of EDHF-dependent relaxation only.

Endothelial-independent relaxation to SNP:

The relaxation to SNP was not significantly different between all groups ($H_3, 20=0.6$, *ns*), indicating that nor UCMS or fluoxetine had effect on the endothelium-independent relaxation.

Histological study

The histological study revealed no atherosclerosis lesion in both the control and UCMS groups treated or not with fluoxetine.

DISCUSSION

The UCMS model of depression

The effectiveness of the UCMS procedure was confirmed by 1) a significant deterioration of the coat state, indicating a loss of motivational and self-care behaviour paralleling apathic behaviour observed in depressed subjects and 2) a significant decrease of the motivation to obtain a palatable stimulus, indicating anhedonia which is a core symptom of human depression. Moreover, fluoxetine treatment, a selective serotonin reuptake inhibitor used to treat a spectrum of depressed patients, counteracted UCMS-induced depression-like behaviour and the improvement of the coat state occurred in a time course that paralleled therapeutic improvements in depressed subjects. This model provides a powerful tool to study the morphological and physiological vascular outcome.

The vascular reactivity study

Implication of the 5-HT pathway in the endothelium-dependent relaxation: fluoxetine inhibition of SERT

In the first set of experiments, we found a significant increase of the NO endothelium-dependent relaxation in mice treated with fluoxetine. Fluoxetine, acts by inhibiting the cell reuptake of serotonin (5-HT) both in the central nervous system and in periphery. The 5-HT transporter (SERT) is present and functional in peripheral arterial smooth cells and endothelial cells (Ni et al. 2004). By inhibiting this transporter, fluoxetine can increase the 5-HT level in the microenvironment. 5-HT which acts on the endothelial serotonergic receptor, mainly via 5HT_{2B} (Ramage and Villalon 2008), elicits a release of NO and the subsequent elevation of cyclic GMP to induce relaxation in the underlying smooth muscle cell (Vanhoutte and Scott-Burden 1994). This effect would be dependent on eNOS activation by phosphorylation (McDuffie et al. 1999; Richardson et al. 2003). This hypothesis is supported by the fact that fluoxetine treatment in depressed patients induces an increase of the plasma 5-HT level (Blardi et al. 2002). Moreover, studies demonstrate that treatment with sertraline or fluoxetine improves vascular vasodilatation and the effect of fluoxetine improving vasodilatation is dependent of the stimulation of Ca²⁺ mobilization/release in the vascular wall (Ungvari Z, 2000 and van Melle JP, 204). Given this information, we hypothesize that the increased relaxation observed in the unstressed mice treated with fluoxetine is induced by the supplemental activation of the 5-HT pathway in addition to the ACh pathway which is

only activated without fluoxetine treatment. In the control condition, ACh challenge induced release of NO to induce relaxation. When fluoxetine treatment is added, ACh challenge always induced NO-dependent relaxation but in addition, the serotonin reuptake inhibition increased 5-HT levels which also induced NO-dependent relaxation.

Moreover, we demonstrate that UCMS induced an alteration of the ACh relaxation pathway since UCMS induced a decrease of the NO-dependent relaxation. This effect of UCMS is abolished by fluoxetine treatment, since in the UCMS mice treated with fluoxetine the relaxation is restored to the unstressed untreated level. We hypothesize that in the UCMS mice treated with fluoxetine, the activation of NO-dependent relaxation by 5-HT can normalize the total relaxation and hide the decrease ACh-dependent NO relaxation induced by UCMS. Thus, the activation of the NO-dependent relaxation by the 5-HT pathway induced by fluoxetine can explain the reversal effect of fluoxetine on UCMS-induced an alteration of the NO-dependent relaxation (Figure 6).

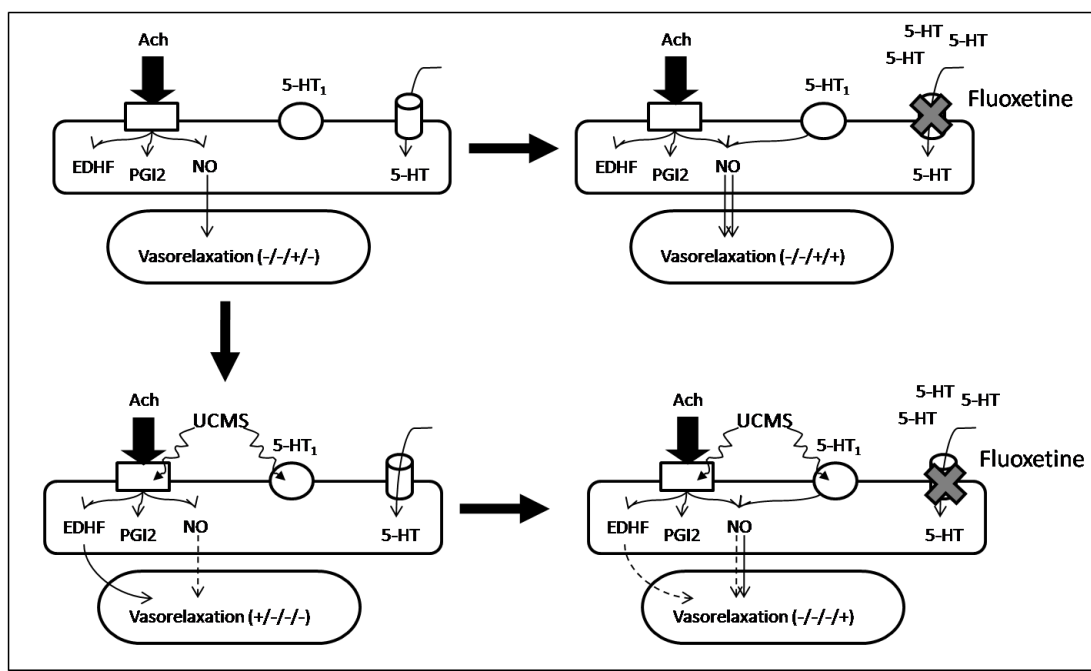


Figure 6: Hypothetical model of UCMS (unpredictable chronic mild stress) and fluoxetine modified ACh-induced relaxation. In control condition, ACh-induced relaxation is fully NO-dependent. In this condition, fluoxetine treatment increase ACh-induced relaxation probably by activating the serotonergic pathway able to activate NO-induced relaxation. On the contrary, UCMS altered NO-induced relaxation but this effect is compensated by activation of EDHF-dependent relaxation. In the UCMS condition, fluoxetine treatment restores the relaxation to the unstressed critical level, not by an EDHF-dependent mechanism but by activating NO effect by the serotonergic pathway.

The EDHF-dependent relaxation as a relay mechanism in the endothelium-dependent relaxation

Our results indicate that endothelium-dependent vasodilatation is NO dependent in unstressed mice. However, we found that a portion of the NO-dependent, endothelium-dependent vasodilatation is significantly reduced in the UCMS mice supporting the view that EDHF plays a pivotal role in UCMS-induced endothelial dysfunction.

In the present study, the NO-mediated vasodilatation is attenuated in the aorta from UCMS mice compared to control mice, whereas this effect was abolished by fluoxetine treatment. Our data support a previous study demonstrating that chronic mild stress-induced endothelial dysfunction is mainly related to a decrease in NO production by the endothelium in rat (Neves et al. 2008). Accumulating data confirm that a decrease in NO bioavailability is the major mechanism of endothelial dysfunction in depression (Isingrini et al. 2009; Le Melledo et al. 2004). Results reveal that platelet NOS activity and plasma level of NO_x levels (a NO metabolite used as a marker of vascular NO production) are dramatically lower in depressed patients compared to healthy controls, indicating an apparent decreased NO production by the endothelium (Chrapko et al. 2004). Assessment of endothelial function with a noninvasive measurement of brachial artery flow-mediated dilatation (FMD) using 2-dimensional Doppler ultrasonography is extensively used in cardiovascular research. This technique allows measuring the relaxation inferred by the NO releasing further to a pressure of the brachial artery. By using FMD, several studies demonstrate an impairment of the relaxation response in depressed patients indicating endothelial dysfunction mediated by a loss of NO-dependent relaxation (Broadley et al. 2006; Broadley et al. 2002; Rajagopalan et al. 2001). Moreover, clinical data demonstrating that antidepressant treatment increase NO product and normalizes the endothelial function impairment in depressed subjects (Lara et al. 2003; Pizzi et al. 2009), are in accordance with the fact that fluoxetine treatment reversed UCMS-decreased NO-dependent relaxation. According to our hypothesis concerning the activation of the 5-HT-dependent relaxation pathway by fluoxetine treatment, the question raised is that fluoxetine treatment in the UCMS mice normalizes the endothelial dependent relaxation by inducing NO releasing via the 5-HT pathway activation, as a compensatory mechanism in order to hide the decrease NO-dependent relaxation induced by UCMS.

Although NO has been considered as the major factor regulating endothelium-dependent relaxation, EDHF also appears to be an important mediator of vascular tone and reactivity, especially when NO-mediated dilatation is compromised (Cohen and Vanhoutte

1995; Hecker 2000). In situations where the synthesis or action of NO is reduced, such as in atherosclerosis, hypercholesterolemia, ischemia, hypertension, or diabetes mellitus, EDHF release evoked by local mediators or pulsatile stretch may become a crucial compensatory or reserve mechanism for the maintenance of nutritive myocardial blood flow (Fujii et al. 1992; Garland et al. 1995; Kamata et al. 1992; Najibi et al. 1994; Park et al. 2008). Our data show that endothelium-dependent vasodilatation is substantially absent with NO blockade in unstressed mice (0.5% of ACh-induced vasodilatation is EDHF dependent at 3.10^{-5} M of ACh), whereas it does appear with NO blockade in the UCMS aorta (33.7% of ACh-induced vasodilatation is EDHF dependent at 3.10^{-5} M of ACh), indicating that the contribution of EDHF is significantly increased in the aorta in stressed mice. This is consistent with the concept that a preserved EDHF function in the disease state may represent a compensatory response to a reduction of NO bioavailability to sustain endothelial function and tissue perfusion.

The increase in EDHF-dependent relaxation induced by UCMS could prevent the decrease of the total endothelium-dependent relaxation. The question is if the EDHF mechanism increases with time or becomes attenuated. It would be interesting to study the temporal apparition of the EDHF dependent relaxation and its evolution during additional successive UCMS procedures. In the diabetic animal model, the compensatory decrease of endothelial-dependent relaxation is observed in the premature phase of the disease and have tendency to decrease in the course of the development of the disease.

Atherosclerosis formation

Our results demonstrate that while UCMS induced endothelial dysfunction, these alterations are not sufficient to induce morphological lesion such as atherosclerosis. Mice susceptibility to vascular risk factors are dependent of the strain since in the BALB/c mice fed an atherogenic food, 6 month of exposition are necessary to induce atherosclerosis while in DBA/2j mice only

REFERENCES

- Blardi P, De Lalla A, Leo A, Auteri A, Iapichino S, Di Muro A, Dell'Erba A, Castrogiovanni P (2002) Serotonin and fluoxetine levels in plasma and platelets after fluoxetine treatment in depressive patients. *J Clin Psychopharmacol* 22: 131-6
- Broadley AJ, Korszun A, Abdelaal E, Moskvina V, Deanfield J, Jones CJ, Frenneaux MP (2006) Metyrapone improves endothelial dysfunction in patients with treated depression. *J Am Coll Cardiol* 48: 170-5
- Broadley AJ, Korszun A, Jones CJ, Frenneaux MP (2002) Arterial endothelial function is impaired in treated depression. *Heart* 88: 521-3
- Camus V, Kraehenbuhl H, Preisig M, Bula CJ, Waeber G (2004) Geriatric depression and vascular diseases: what are the links? *J Affect Disord* 81: 1-16
- Chrapko WE, Jurasz P, Radomski MW, Lara N, Archer SL, Le Melledo JM (2004) Decreased platelet nitric oxide synthase activity and plasma nitric oxide metabolites in major depressive disorder. *Biol Psychiatry* 56: 129-34
- Cohen RA, Vanhoutte PM (1995) Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation* 92: 3337-49
- Faramawi MF, Gustat J, Wildman RP, Rice J, Johnson E, Sherwin R (2007) Relation between depressive symptoms and common carotid artery atherosclerosis in American persons > or =65 years of age. *Am J Cardiol* 99: 1610-3
- Feletou M, Vanhoutte PM (2006) Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 1215-25
- Frasure-Smith N, Lesperance F (2005) Reflections on depression as a cardiac risk factor. *Psychosom Med* 67 Suppl 1: S19-25
- Frasure-Smith N, Lesperance F (2006) Recent evidence linking coronary heart disease and depression. *Can J Psychiatry* 51: 730-7
- Fujii K, Tominaga M, Ohmori S, Kobayashi K, Koga T, Takata Y, Fujishima M (1992) Decreased endothelium-dependent hyperpolarization to acetylcholine in smooth muscle of the mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 70: 660-9
- Furchgott RF, Vanhoutte PM (1989) Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *Faseb J* 3: 2007-18
- Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-6

- Garland CJ, Plane F, Kemp BK, Cocks TM (1995) Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. *Trends Pharmacol Sci* 16: 23-30
- Grippe AJ, Johnson AK (2009) Stress, depression and cardiovascular dysregulation: a review of neurobiological mechanisms and the integration of research from preclinical disease models. *Stress* 12: 1-21
- Hecker M (2000) Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor-Fact or Fiction? *News Physiol Sci* 15: 1-5
- Isingrini E, Desmidt T, Belzung C, Camus V (2009) Endothelial dysfunction: A potential therapeutic target for geriatric depression and brain amyloid deposition in Alzheimer's disease? *Curr Opin Investig Drugs* 10: 46-55
- Kamata K, Miyata N, Abiru T, Kasuya Y (1992) Functional changes in vascular smooth muscle and endothelium of arteries during diabetes mellitus. *Life Sci* 50: 1379-87
- Landmesser U, Drexler H (2005) The clinical significance of endothelial dysfunction. *Curr Opin Cardiol* 20: 547-51
- Lara N, Archer SL, Baker GB, Le Melleo JM (2003) Paroxetine-induced increase in metabolic end products of nitric oxide. *J Clin Psychopharmacol* 23: 641-5
- Le Melleo JM, Mahil N, Baker GB (2004) Nitric oxide: a key player in the relation between cardiovascular disease and major depressive disorder? *J Psychiatry Neurosci* 29: 414-6
- Lesperance F, Frasere-Smith N (2007) Depression and heart disease. *Cleve Clin J Med* 74 Suppl 1: S63-6
- Lett HS, Blumenthal JA, Babyak MA, Sherwood A, Strauman T, Robins C, Newman MF (2004) Depression as a risk factor for coronary artery disease: evidence, mechanisms, and treatment. *Psychosom Med* 66: 305-15
- Lippi G, Montagnana M, Favalaro EJ, Franchini M (2009) Mental depression and cardiovascular disease: a multifaceted, bidirectional association. *Semin Thromb Hemost* 35: 325-36
- McDuffie JE, Coaxum SD, Maleque MA (1999) 5-hydroxytryptamine evokes endothelial nitric oxide synthase activation in bovine aortic endothelial cell cultures. *Proc Soc Exp Biol Med* 221: 386-90
- Mineur YS, Belzung C, Crusio WE (2007) Functional implications of decreases in neurogenesis following chronic mild stress in mice. *Neuroscience* 150: 251-9
- Moncada S, Vane JR (1979) The role of prostacyclin in vascular tissue. *Fed Proc* 38: 66-71

- Najibi S, Cowan CL, Palacino JJ, Cohen RA (1994) Enhanced role of potassium channels in relaxations to acetylcholine in hypercholesterolemic rabbit carotid artery. *Am J Physiol* 266: H2061-7
- Needleman P, Bronson SD, Wyche A, Sivakoff M, Nicolaou KC (1978) Cardiac and renal prostaglandin I₂. Biosynthesis and biological effects in isolated perfused rabbit tissues. *J Clin Invest* 61: 839-49
- Neves VJ, Moura MJ, Tamascia ML, Ferreira R, Silva NS, Costa R, Montemor PL, Narvaes EA, Bernardes CF, Novaes PD, Marcondes FK (2008) Proatherosclerotic effects of chronic stress in male rats: Altered phenylephrine sensitivity and nitric oxide synthase activity of aorta and circulating lipids. *Stress*: 1
- Ni W, Thompson JM, Northcott CA, Lookingland K, Watts SW (2004) The serotonin transporter is present and functional in peripheral arterial smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol* 43: 770-81
- Paigen B, Ishida BY, Verstuyft J, Winters RB, Albee D (1990) Atherosclerosis susceptibility differences among progenitors of recombinant inbred strains of mice. *Arteriosclerosis* 10: 316-23
- Park Y, Capobianco S, Gao X, Falck JR, Dellsperger KC, Zhang C (2008) Role of EDHF in type 2 diabetes-induced endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295: H1982-8
- Pizzi C, Mancini S, Angeloni L, Fontana F, Manzoli L, Costa GM (2009) Effects of selective serotonin reuptake inhibitor therapy on endothelial function and inflammatory markers in patients with coronary heart disease. *Clin Pharmacol Ther* 86: 527-32
- Pothion S, Bizot JC, Trovero F, Belzung C (2004) Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress. *Behav Brain Res* 155: 135-46
- Rajagopalan S, Brook R, Rubenfire M, Pitt E, Young E, Pitt B (2001) Abnormal brachial artery flow-mediated vasodilation in young adults with major depression. *Am J Cardiol* 88: 196-8, A7
- Ramage AG, Villalon CM (2008) 5-Hydroxytryptamine and cardiovascular regulation. *Trends Pharmacol Sci*
- Richardson SM, Maleque MA, Motley ED (2003) 3-Morpholinopyrrolidine inhibits 5-hydroxytryptamine-induced phosphorylation of nitric oxide synthase in endothelial cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 49: 1385-9

- Rybakowski JK, Wykretowicz A, Heymann-Szlachcinska A, Wysocki H (2006) Impairment of endothelial function in unipolar and bipolar depression. *Biol Psychiatry* 60: 889-91
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301: 805-9
- Sherwood A, Hinderliter AL, Watkins LL, Waugh RA, Blumenthal JA (2005) Impaired endothelial function in coronary heart disease patients with depressive symptomatology. *J Am Coll Cardiol* 46: 656-9
- Surget A, Belzung C (2008) Unpredictable chronic mild stress in mice. In: A.V. Kalueff and J.L. LaPorte, Editors, *Experimental Models in Neurobehavioral Research*, Nova Science, New York 79-112
- Surget A, Saxe M, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, Chalon S, Griebel G, Hen R, Belzung C (2008) Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. *Biol Psychiatry* 64: 293-301
- Vanhoutte PM, Scott-Burden T (1994) The endothelium in health and disease. *Tex Heart Inst J* 21: 62-7
- Verma S, Anderson TJ (2002) Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation* 105: 546-9
- Willner P (2005) Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology* 52: 90-110
- Yalcin I, Aksu F, Belzung C (2005) Effects of desipramine and tramadol in a chronic mild stress model in mice are altered by yohimbine but not by pindolol. *Eur J Pharmacol* 514: 165-74
- Yalcin I, Belzung C, Surget A (2008) Mouse strain differences in the unpredictable chronic mild stress: a four-antidepressant survey. *Behav Brain Res* 193: 140-3

Résistance aux AD en situation de challenge cardiovasculaire

Plusieurs études récentes indiquent que la dépression résistante aux traitements pourrait représenter une forme distincte de dépression à haut risque de mortalité et de morbidité cardiovasculaire. Entre 20 et 35% des patients dépressifs ne répondent pas aux traitements AD et ce phénomène de résistance est associé à une augmentation du risque de morbidité et de mortalité cardiovasculaire. Un grand nombre de marqueurs biologiques identifiés comme des marqueurs de risques cardiovasculaires et associés à un faible taux de réponse aux AD ont été proposés pour expliquer l'augmentation de la mortalité et de la morbidité cardiovasculaires chez les patients dépressifs qui ne répondent pas aux traitements. Parmi ces marqueurs, on peut citer l'augmentation de marqueurs inflammatoires consistante avec une réponse immunologique de la phase aigüe, des dérégulations de l'axe HPA et du système nerveux autonome mais également la présence de facteurs de risques cardiovasculaires. En effet, le score de risque cardiovasculaire, représenté par la somme du nombre de facteurs de risques cardiovasculaires, est significativement associé à une diminution du taux de réponse à la fluoxétine et du manque de rémission. Plus spécifiquement, une hypercholestérolémie semble représenter un des facteurs de risque cardiovasculaire le plus prédicteur de résistance aux AD. De nombreuses études ont montré qu'une hypercholestérolémie chez les patients dépressifs était associée à une diminution du taux de réponse aux AD et ceci avec plusieurs classes d'AD incluant les inhibiteurs sélectifs de la sérotonine et la nortriptyline. Ainsi, bien que la biologie de la dépression résistante aux traitements soit actuellement peu connue, la recherche dans ce domaine semble particulièrement importante puisque si des marqueurs de risque cardiovasculaire spécifiques peuvent prédire la résistance aux AD, le traitement agressif de ces facteurs ou le choix de traitement de la dépression capable de modifier ces risques pourraient permettre d'améliorer la dépression et la survie de ces patients. Cependant, la recherche sur cette question qui permettrait de développer de nouvelles stratégies de traitement pour ces patients est limitée par le manque de modèles animaux de résistance aux AD.

Nous avons alors tenté de développer un modèle animal de résistance aux AD lié à une entité sub-nosographique de la dépression en modélisant la résistance aux AD induite par la présence de risques cardiovasculaires. Nous avons étudié les capacités d'un facteur de risque cardiovasculaire, un régime alimentaire riche en lipide capable d'induire une

hypercholestérolémie, à abolir les effets de la fluoxétine sur les conséquences comportementales de l'UCMS. A travers plusieurs dimensions comportementales (état du pelage, comportement motivationnel et autocentré, comportement anhédonique), les résultats ont montré que la présence d'un facteur de risque cardiovasculaire, un régime alimentaire riche en lipide est capable d'abolir les effets de la fluoxétine sur les conséquences comportementales de l'UCMS. En effet, alors que la fluoxétine est capable de reverser l'état « dépressif-like » induit par l'UCMS chez des animaux soumis à un régime alimentaire standard, la fluoxétine n'a pas d'effet chez des animaux soumis à un régime alimentaire saturé en graisse (**Article 4**). Cette étude nous a donc permis de modéliser la résistance aux AD observées chez les patients dépressifs présentant des facteurs de risque cardiovasculaire. Ce modèle de résistance aux AD pourrait représenter un outil intéressant dans l'étude des mécanismes biologiques sous-jacents au phénomène de résistance aux AD et dans la recherche de nouvelles pistes thérapeutiques capables de réduire la morbidité et la mortalité cardiovasculaire chez ce type de patients.

**ARTICLE 4 : ASSOCIATION BETWEEN REPEATED
UNPREDICTABLE CHRONIC MILD STRESS (UCMS) WITH
HIGH FAT DIET : A MODEL OF FLUOXETINE RESISTANCE IN
MICE**

Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: a model of fluoxetine resistance in mice

E Isingrini ¹, V Camus ^{1,2}, AM Le Guisquet ¹, M Paingaud ¹, S Devers ¹ and C Belzung ¹.

¹ UMRS INSERM U930, CNRS ERL 3106, Université François Rabelais, 37000 Tours, France.

² Clinique Psychiatrique Universitaire, CHRU de Tours, 37044 Tours, France.

ABSTRACT

Major depressive disorder is a debilitating disease. Unfortunately, treatment with antidepressants (ADs) has limited therapeutic efficacy since resistance to AD is common. Research in this field is hampered by the lack of a reliable natural animal model of AD resistance. Depression resistance is related to various factors, including the attendance of cardiovascular risk factors and past depressive episodes. We aimed to design a rodent model of depression resistance to ADs, associating cardiovascular risk factors with repeated unpredicted chronic mild stress (UCMS).

Male BALB/c mice were given either a regular (4% fat) or a high fat diet (45% fat) and subjected to two 7-week periods of UCMS separated by 6 weeks. From the second week of each UCMS procedure, vehicle or fluoxetine (10 mg/kg, i.p.) was administrated daily. The effects of the UCMS and fluoxetine in both diet conditions were assessed using physical (coat state and body weight) and behavioural tests (the reward maze test and the splash test).

The results demonstrate that during the second procedure, UCMS induced behavioural changes, including coat state degradation, disturbances in self-care behaviour (splash test) and anhedonia (reward maze test) and these were reversed by fluoxetine in the regular diet condition. In contrast, the high-fat diet regimen prevented the AD fluoxetine from abolishing the UCMS-induced changes.

In conclusion, by associating UCMS -an already validated animal model of depression- with high-fat diet regimen, we designed a naturalistic animal model of AD resistance related to a sub-nosographic clinical entity of depression.

KEY WORDS: Rodent model; Chronic stress; Vascular risk factor; High-fat diet; Antidepressant; Depression; drug-resistance.

INTRODUCTION

Major depressive disorder is a debilitating disease with a prevalence estimated to be as high as 16.2% according to the National Comorbidity Survey [1]. Unfortunately, the therapeutic efficacy of antidepressants (ADs) is unsatisfactory, since most patients fail to achieve a full remission when treated, mostly being non- or partial responders. Remission (i.e., full resolution of symptoms) occurs in only one third of the patients after treatment with a single drug [2,3]. AD resistance is related to various factors, including specific diagnostic entities. AD resistance is more frequent in some sub-nosographic disorders such as vascular depression. In this subtype of depression, it is suggested that the presence of brain cortical lesion of vascular origin predisposes, precipitates, or perpetuates a depressive state and has a negative impact on treatment outcome [4,5,6].

Furthermore, treatment-resistant major depression is also frequently described in patients with acute coronary heart disease, and seems to increase risk of mortality after acute coronary syndrome [7]. Moreover, cardiovascular risk factors like aging, smoking, hypertension, diabetes, hypercholesterolemia and advanced heart disease predict a poor response to fluoxetine/citalopram treatment and lack of remission [8,9]. Although low cholesterol levels have been reported in depressed subjects [10,11], in several studies, hypercholesterolemia, a risk factor for cardiovascular disease, was associated with a poor outcome following AD in major depression [12,13]. Finally, it seems that an increased number of past depressive episodes can also be associated with resistance to AD [14,15]. According to these results it seems that both the occurrence of vascular risk factors and the number of repeated depressive episodes can increase the risk of resistance to AD in major depression. However, research in this field is hampered by the lack of animal models of AD-resistance.

Several animal models of treatment-resistant depression have been proposed. Some are based on the invalidation of genes encoding for proteins involved either in the brain ADs penetration [16] or in the ADs molecular target [17,18,19,20]. In some instances, mutant mice only show a blunted response to AD and not a total suppression of the AD effect [21,22,23,24]. The main limit of this approach, based on the invalidation of single gene, is that it only partially mimics the human condition. Other approaches looked at the alteration of particular behavioural markers (for example high responders to novelty decreased response to desipramine in rats: [25] or bio-markers (mice with a disrupted neurogenesis do not respond to monoaminergic AD: [17,26]. However, all of these models are mostly concerned with

providing a mechanism explaining the AD resistance and not in proposing a naturalistic animal model of AD resistance related to sub-nosographic clinical entities.

For studying depressive disorders, the unpredictable chronic mild stress (UCMS) animal model has been shown to be valid, reliable and sensitive [27]. UCMS involves subjecting mice to a period of mild socio-environmental stressors. This procedure replicates several depression-related behavioural and physiological impairments which are reversed by chronic (but not acute) AD treatment [28,29,30,31]. Furthermore, since cardiovascular risk factors are related to AD resistance, the association of the UCMS procedure with a cardiovascular risk factor known to induce hypercholesterolemia in mice such as a high fat diet regimen provides a powerful tool to describe a model of “treatment-resistant depression”. The development of a naturalistic animal model of AD resistance related to sub-nosographic clinical entities will contribute to the development of new drugs which may be useful in the treatment of vascular depression.

The main objective of the present study was to evaluate the ability of chronic AD treatment with fluoxetine to reverse UCMS-induced depression-like behaviour in BALB/c mice when associating both repeated episodes of UCMS and a high fat diet regimen. As a 6-month period of a high fat diet regimen is necessary to induce cardiovascular alterations in BALB/c mice [32], we planned to repeat the UCMS procedure twice in this time period, with a UCMS-free period between the two. We evaluated the response to both UCMS and high fat diet via several validated measures, including physical measures (coat state degradation and body weight) and behavioural tests such as the splash test (decrease in total grooming time) and the reward maze test (decreased latency to chew a chocolate cookie).

METHODS

Animals

The subjects were 71 experimentally naive male BALB/c mice (7-9 weeks old) (Centre d'élevage Janvier, Le Genest Saint Isle, France) housed in groups of 4 and maintained under standard laboratory conditions (12 hrs. light-dark cycle, light on at 20:00; Temperature = 22 +/- 2°C) for 1 week prior to the beginning of the experiment. Food and water were freely available. All behavioural testing occurred during the dark phase of the light–dark cycle. All of the experiments are in agreement with the veterinary service (agreement number: B37-261-2) and were carried out in strict compliance with the European Community Council directive 86/609/EEC and with French legislation from the Ministère de l'Agriculture.

Drug

The selective serotonin reuptake inhibitor Fluoxetine hydrochloride (Sequoia) was freshly prepared every day in saline (NaCl 0.9%) and administered intraperitoneally (IP, 10 mg/kg) in a volume of 10 ml/kg. Vehicle animals received an IP injection of 0.9 % saline in a volume of 10 ml/kg.

General procedure (Figure 1)

The mice were randomized into regular diet (RD, 4% fat, DIETEX France) and high fat diet (HFD, 45% fat and 0.15% cholesterol, DIETEX France) conditions. In each condition, the mice were divided in four groups: Control/NaCl (RD: n=9 and HFD: n=10), Control/Fluoxetine (RD: n=10, HFD: n=8), UCMS/NaCl (RD: n=8, HFD: n=10), and UCMS/Fluoxetine (RD: n=6, HFD: n=10). The control group was maintained in standard laboratory conditions while the mice in the UCMS group were placed in small, individual cages (8 X 13.5 X 8.1 cm). We performed two 7-week UCMS procedures separated by a 6 week stress- and drug-free period in the UCMS groups. The first two weeks of the UCMS regimen were drug-free. Treatment was initiated on the third week of UCMS and continued up to the end of the 7 weeks. The same procedure was repeated during the second UCMS regimen. Coat state and body weight was assessed weekly until the end of the second UCMS regimen. During the two UCMS procedures, behavioural tests were carried out as follows: the splash test and the reward maze test.

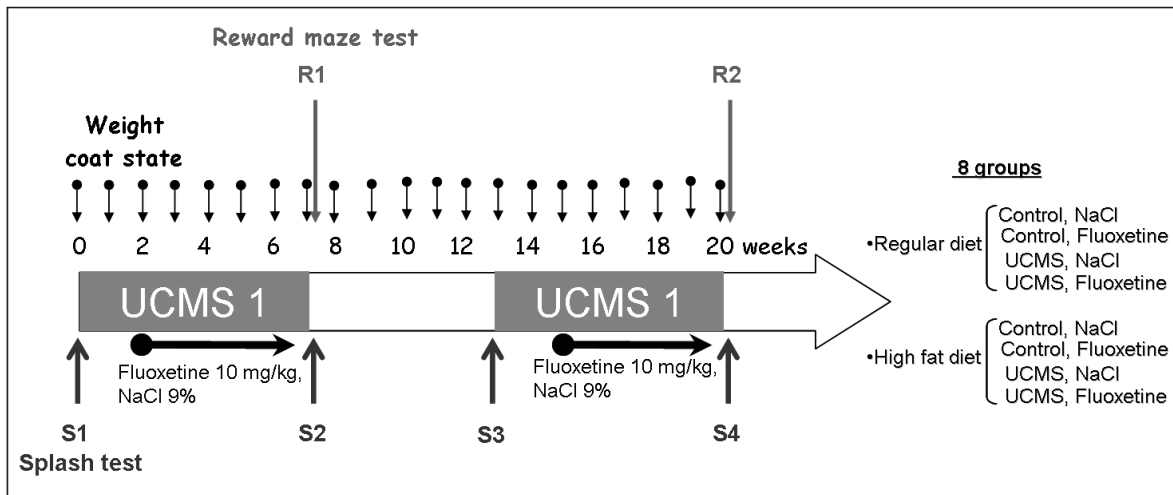


Figure 1: General procedure and experimental groups. In each regular diet and high fat diet condition, half of the mice were submitted to two 7-week periods of unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures separated by 6 weeks. Control mice were kept in standard laboratory conditions. After two weeks of UCMS, mice received either fluoxetine treatment (10 mg/kg, i.p.) or vehicle treatment (NaCl, 0.9%, i.p.). Treatments were administered daily during the last 5 weeks of the UCMS protocol and the same treatment procedure was performed during the second UCMS phase. Coat state and body weight were evaluated weekly and behaviour was assessed using the reward maze test and the splash test. One session of the reward maze test was performed at the end of the first UCMS procedure (Session R1) and one session at the end of the second UCMS procedure (Session R2). The splash test was performed at the beginning (session S1 for the first UCMS procedure and session S3 for the second UCMS procedure) and the end (session S2 for the first UCMS procedure and session S4 for the second UCMS procedure) of each UCMS procedure.

Unpredictable chronic mild stress

The mice were subjected to various and repeated unpredictable stressors several times a day during the two 7-week UCMS procedures. The stressors were: altered bedding (change or removal of sawdust, damp sawdust, substitution of sawdust with 21 °C water), cage tilting (45°), cage exchange (mice were placed in the empty cage of another male), altered length and time of light/dark cycle [26,31,33].

Coat state and body weight

The coat state and the body weight of each animal were evaluated weekly until the end of the second UCMS procedure. The coat-state evaluation involved the assessment of eight different body parts: head, neck, dorsal coat, ventral coat, tail, forepaws, hind paws and genital region. For each body area, a score of 0 was attributed for a coat in good condition or a score of 1 for a dirty coat. The total score was defined as the sum of the scores for each body

part. This index has been pharmacologically validated in previous studies using BALB/c mice [26,33,34].

Splash Test

The splash test, performed under a red light (230V, 15W), consists of squirting a 10% sucrose solution on the dorsal coat of a mouse in its home cage. Because of its viscosity, the sucrose solution dirties the mouse fur and animals initiate grooming behaviour. After applying sucrose solution, the time spent grooming was recorded for a period of 5 minutes as an index of self-care and motivational behaviour. The splash test was carried out at the beginning (S1 for UCMS 1 and S3 for UCMS 2) and at the end (S2 for UCMS1 and S4 for UCMS 2) of each UCMS procedure. The splash test, pharmacologically validated, demonstrates that UCMS decreases grooming behaviour [17,26,31,35], a form of motivational behaviour considered to parallel with some symptoms of depression such as apathetic behaviour [36]. Moreover, UCMS-induced grooming perturbation is associated with hedonic reactivity in the sucrose preference test and increased immobility in the force swim test [37,38].

Reward maze test

The reward maze test is used to assess UCMS-induced effects on the motivation to obtain a reward. This test consists in assessing the motivation for a palatable stimulus (a chocolate cookie) by measuring the latency before chewing the cookie. The reward maze test requires a device containing three aligned chambers with the same dimensions (19x19x20 cm). The only difference in the chambers is the colour of the walls and the floor: white for the first chamber, grey for the second and black for the third. The three chambers are linked by two openings via a door which is controlled by the experimenters. The device is illuminated by a 200-lux white light. To familiarize the mice with the palatable stimulus, small portion of cookie is placed in the homecage every 2 day for a period of 2.5 weeks starting 4.5 weeks before the first session. At the time of testing, a small piece of chocolate cookie is positioned at the centre of the black room. The white room is the departure compartment and the mouse is placed with its head facing away from the opening. The test lasts five minutes maximum; the door separating the departure chamber and the intermediate chamber was closed after the transition of the mouse (if a mouse did not enter after 2 minutes, it was gently guided toward the intermediate room).

The validation of this test was demonstrated by the stronger drive to chew a chocolate cookie than to chew a regular food pellet as a robust reduction of the chewing latency with the chocolate cookie when compared with the regular food. In the UCMS paradigm, the reward maze test can assess multiple behavioural dimensions: 1) anxiety-like state (latency to pass the first door), 2) locomotion and exploratory behaviour (number of passage through the second door) and 3) anhedonia (latency to chew the chocolate cookie in the UCMS mice *vs* Control mice). This test was validated in previous study in our laboratory demonstrating that a 7-week UCMS has no effect on the anxiety-like and exploratory behaviour but significantly increases the latency to chew the cookie. These results indicate that UCMS induces anhedonia [31].

In our experiment, we performed one session at the end of each UCMS procedure (R1 at the end of the first UCMS procedure and R2 at the end of the second UCMS procedure). During the two sessions, we recorded: 1) the latency to pass the first door as an index of anxiety behaviour, 2) the number of passage through the second door as an index of locomotion and exploratory behaviour and 3) the latency to chew the cookie as an index of anhedonia.

Statistical analysis

The results are expressed as the mean \pm SEM (standard error of the mean). Since the sample-size was small ($6 < n < 10$) and did not follow a normal distribution, we used a non-parametric analysis. Behaviour among all groups was compared using the Kruskal-Wallis test and compared among the different sessions in each group using the Friedman test (multiple samples). The Kruskal-Wallis was followed by the U of Mann-Witney test and the Friedman test was followed by the Wilcoxon test for two per two comparisons when required. Differences were considered as statistically significant at $p < .05$.

RESULTS

Coat state and body weight

The statistical analysis of changes in coat state (Figure 2) between the regular diet and the high fat diet groups were performed separately because of the texture difference between the two diets. The high fat diet was friable and thus readily dirtied the fur of the mice. This explains why, in the high fat diet groups, the coat state score was generally higher than in the regular diet groups.

In the regular diet group, the Kruskal-Wallis test indicates a significant difference between groups at the end of the first and the second UCMS procedure (week 7: $H_{3, 33}=25.1, p < 0.001$; week 20: $H_{3, 33}=20.2, p < 0.001$). The UCMS regimen induced a deterioration of the coat state (week 7: $U=0.0, p < .001$; week 20: $U=1.5, p < .001$). Importantly, fluoxetine treatment significantly reversed the deterioration of the coat state induced by UCMS (week 7: $U= 8, p < .05$; week 20: $U=6.5, p < .01$).

Similarly, in the high fat diet group, the Kruskal-Wallis test indicates a significant difference between groups at the end of both the first and the second UCMS regimen (week 7: $H_{3, 38}= 8.5, p < .05$; week 20: $H_{3, 38}=15.9, p < 0.01$). However, the UCMS-induced coat state degradation (week 7: $U= 16, p < .01$; week 20: $U= 10.5, p < .01$) was not significantly reversed by chronic fluoxetine (week 7: $U= 32, ns$; week 20: $U= 46.5; ns$).

An overall gain in body weight with time was observed in each group (Friedman test: Control/NaCl: RD: $X^2_{9, 20}= 114.9, p < .001$; HFD: $X^2_{10, 20}= 38.8, p < .01$; Control/fluoxetine: RD: $X^2_{9, 20}= 159.6, p < .001$; HFD: $X^2_{7, 20}= 59.7, p < .001$; UCMS/NaCl: RD: $X^2_{8, 20}= 127.1, p < .001$; HFD: $X^2_{10, 20}= 70.1, p < .001$; UCMS/fluoxetine: RD: $X^2_{10, 20}= 89.2, p < .01$; HFD: $X^2_{10, 20}= 117.3, p < .001$). The Kruskal-Wallis test failed to establish any difference between groups at the end of the first UCMS procedure (week 7: $H_{7, 71}= 11.8, ns$), and at the end of the second UCMS procedure (week 20: $H_{7, 71}= 12.6, ns$) (data not shown).

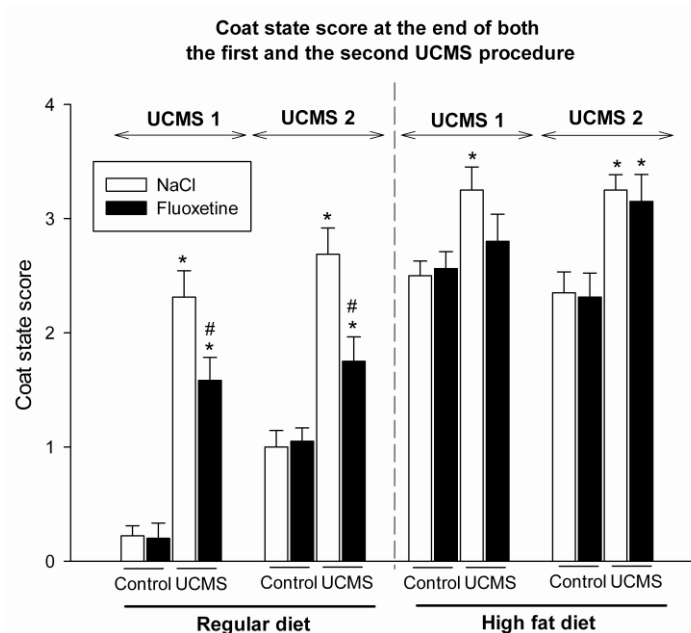


Figure 2: Coat state changes (Mean \pm SEM) at the end of the two unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures in both the regular diet (left) and the high fat diet (right) conditions for Control and UCMS groups treated or not with fluoxetine (10 mg/kg, administrated daily during the last 5 weeks of each UCMS procedure). * $p < .05$: comparison between the control and UCMS groups, from the same diet and treatment conditions. # $p < .05$: comparison between NaCl and fluoxetine-treated groups, from the same UCMS condition.

Splash test

The Friedman test indicates a significant difference over the four sessions of the splash test for each group (Control/NaCl: RD: $X^2_{9,3} = 16.9, p < .001$; HFD: $X^2_{10,3} = 20.5, p < .001$; Control/fluoxetine: RD: $X^2_{10,3} = 17.5, p < .001$; HFD: $X^2_{8,3} = 15.9, p < .01$; UCMS/NaCl: RD: $X^2_{8,3} = 7.5, p = .05$; HFD: $X^2_{10,3} = 9.5, p < .05$; UCMS/fluoxetine: RD: $X^2_{6,3} = 12.6, p < .01$; HFD: $X^2_{10,3} = 16.7, p < .001$).

During the first UCMS procedure, the total grooming time increased between the beginning (Session S1) and the end (Session S2) of the regimen in each group suggesting an increase in the motivation for grooming and the fact that the mice became used to the sucrose solution (Figure 3A, Control/NaCl: RD: $T = 2, p < .01$; HFD: $T = 2, p < .01$; Control/fluoxetine: RD: $T = 7, p < .05$; HFD: $T = 1, p < .01$; UCMS/NaCl: RD: $T = 0.0, p < .05$; HFD: $T = 0.0, p < .01$; UCMS/fluoxetine: RD: $T = 0.0, p < .05$; HFD: $T = 0.0, p < .01$).

During the second UCMS procedure, we also found an increase in the total time of grooming behaviour in control mice who received a regular or a high fat diet (Figure 3B, Control/NaCl: RD: $T = 5, p < .05$; HFD: $T = 0.0, p < .01$; Control/fluoxetine: RD: $T = 0.0, p < .01$; HFD: $T = 1, p < .01$) while UCMS abolished this increase in grooming motivation (RD:

T= 5, *ns*; HFD: T= 12, *ns*). Fluoxetine restored the total grooming time to the unstressed level in UCMS mice who received a regular diet, but this was not observed in the mice with the high fat diet (RD: T= 0.0, $p < .05$; HFD: T= 24, *ns*) suggesting that a high fat diet prevents the reversal effect of fluoxetine on repeated UCMS-induced grooming disturbance.

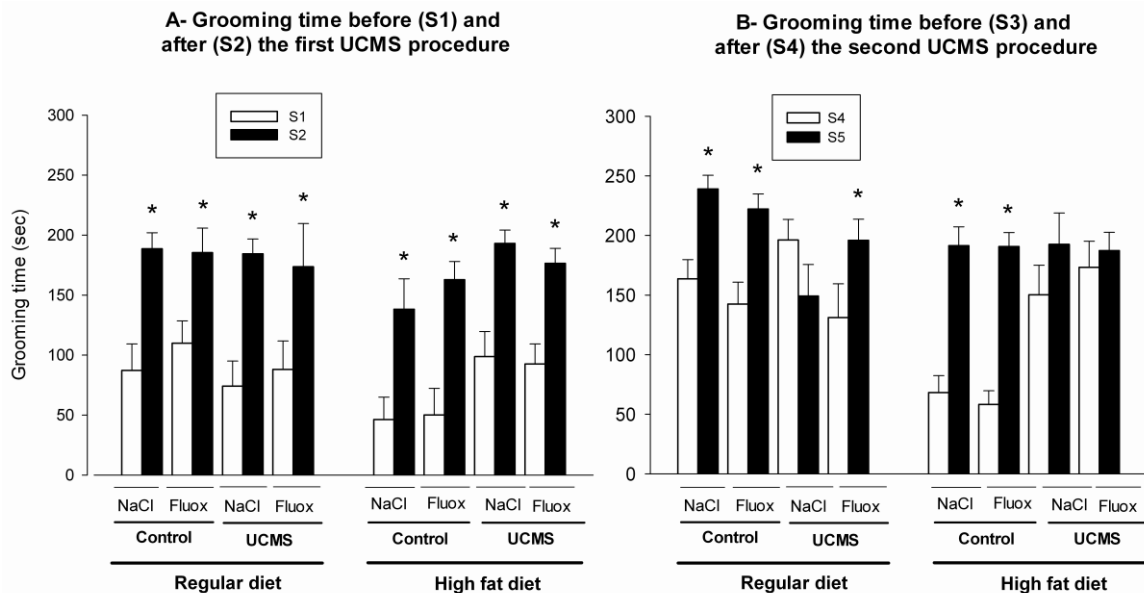


Figure 3: Grooming time (Mean +/- SEM) in the splash test in the control and the unpredictable chronic mild stress (UCMS) groups treated or not with fluoxetine (10 mg/kg, administrated daily during the last 5 weeks of each UCMS procedure) in the regular and high fat diet conditions. **A)** Before (S1) and after (S2) the first UCMS procedure. $*p < .05$: comparison between S1 and S2 for each group. **B)** Before (S3) and after (S4) the second UCMS procedure. $*p < .05$: comparison between S3 and S4 for each group.

Reward maze test

Regarding the latency to pass the first door and the number of passage through the second door, the Kruskal-Wallis tests failed to establish any differences between groups both at the end of the first and at the end of the second UCMS procedure (Latency to pass the first door: S1: $H_{7, 71}=8.4$, *ns*; S2: $H_{7, 71}=5.6$, *ns*. Number of passage: S1: $H_{7, 71}=8.7$, *ns*; S2: $H_{7, 71}=13.3$, *ns*). These results demonstrate that both high fat diet, UCMS and fluoxetine does not induce an anxiety-like state and perturbation of the locomotor and exploratory behaviour (Data not shown).

Regarding the latency for chewing the chocolate cookie at the end of the first UCMS regimen, the Kruskal-Wallis test indicates no significant difference between the groups (S1: $H_{7, 71}=9.3$, *ns*). However, during the second UCMS procedure, the latency in chewing the

chocolate cookie was significantly different between groups at the end of the regimen (Figure 4, S2: $H_{7, 71} = 19.4, p < .01$). In the control groups, nor high fat diet and fluoxetine treatment induced a modification of the latency to chew the cookie (HFD vs RD: Control, NaCl: $U=26, ns$ Control, fluoxetine: $U=29, ns$. NaCl vs fluoxetine: Control, RD: $U=41, ns$; Control HFD: $U=31.5, ns$) indicating that no anhedonic effect was induced by the high fat diet. The UCMS significantly increased the latency to chew the reward in both the regular and the high fat diet conditions (RD: $U= 12, p < .05$; HFD: $U= 19, p < .05$). Fluoxetine only counteracted this effect in mice who received a regular diet (RD: $U= 5, p < .05$; HFD: $U= 45, ns$). These results indicate that high fat diet prevents the reversal effect of fluoxetine on UCMS-induced anhedonia.

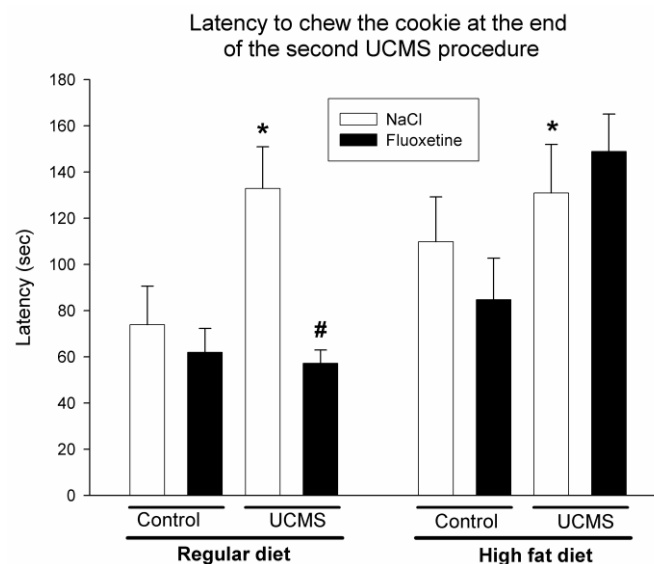


Figure 4: Latency to chew the chocolate cookie (Mean +/- SEM) in the reward maze test during the session performed at the end of the second unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedure (R2). The results are presented for the Control and UCMS mice under a regular or a high fat diet regimen who receive during the last 5 weeks of each UCMS procedure daily injection of either NaCl (9%) or Fluoxetine (10 mg/kg). * $p < .05$: Comparison to the control/NaCl group in the regular diet condition. # $p < .05$: Comparison between UCMS/NaCl and UCMS/fluoxetine groups in the same diet condition.

DISCUSSION

Based on the hypothesis that cardiovascular risk factors induce poor response to AD treatment in depressed subjects, the main objective of the present study was to develop a naturalistic animal model of AD resistance associating UCMS, a valid animal model of depression, with cardiovascular risk factors, especially through a high fat diet regimen. A high fat diet regimen inducing hypercholesterolemia is considered as a risk factor for the development of atherosclerosis. However in mice, the susceptibility to high fat diet is strain dependant. The BALB/c mice that are the most sensitive to the UCMS procedure need a longer period of high fat diet to react of the cardiovascular effects of this diet [32]. To ensure the effectiveness of the high fat diet and since resistance to AD is increased with recurrent depressive episodes, we designed a two UCMS procedure in BALB/c mice to mimic recurrent depression in humans. Our results clearly demonstrate that UCMS-induced behavioural changes including coat state degradation, disturbances in grooming motivation (splash test) and decrease in the motivation to obtain a palatable stimulus (reward maze test), were all reversed by fluoxetine treatment in mice subjected to a regular diet. However, in all these behavioural tests, a high fat diet regimen abolished the ability of the AD fluoxetine to reverse UCMS-induced depressive-like state at the end of the second period of the UCMS procedure.

Does fluoxetine reverse UCMS-induced depression-like behaviour?

In the regular diet condition, in spite of difference in the time of occurrence, the behavioural alterations induced by UCMS observed in this study replicate the behavioural changes reported in previous studies using the UCMS protocol in mice [26,31,33,34,35]. Ordinarily, a single UCMS regimen is sufficient to induce behavioural alterations, which was replicated here on the coat state. However, the UCMS-effects in the splash test and in the reward maze test were observed only after the second challenge. The late-onset apparition of the UCMS effect can be explained by the number, the intensity and the frequency of the different stressors application: indeed, as mice were exposed to a second UCMS, we reduced the severity of the stressors, mainly for ethical reasons.

UCMS and fluoxetine produced their usual effect on the coat state test, since the UCMS-induced coat state degradation was prevented by fluoxetine during both the first and the second UCMS procedure. On the body weight, the absence of UCMS and fluoxetine effect is in accordance to other studies using fluoxetine treatment in the UCMS model of

depression [34,39]. The results obtained in the splash test suit those of the coat state since UCMS-induced disturbance in grooming behaviour was reversed by fluoxetine treatment. Indicating a loss of motivational and self care behaviour in mice subjected to two UCMS procedure, the disturbance in grooming behaviour is considered to parallel the motivational and apathetic behaviour observed in depression [36]. The reward maze test takes advantage of multiple measures to give a more accurate analysis of the UCMS-induced effect on the behaviour, and particularly on anhedonia, which represents a core symptom of human depression. Our results show that UCMS procedure does not induce an anxiety-like state and perturbations of locomotor and exploratory behaviour. However, UCMS induced anhedonia, an effect that was counteracted by fluoxetine treatment. Taken together, these results suggest through multiple behavioral readouts that chronic AD treatment is effective in reversing a depression-like phenotype induced by UCMS.

In our study, the behavioural alterations induced by two UCMS procedures results in symptoms paralleling human depression and the pharmacological reversal with chronic fluoxetine models the successful treatment of recurrent depression. Furthermore, this model provides a powerful tool to describe a model of “treatment-resistant depression” based on the hypothesis that cardiovascular risk factors-induced AD resistance.

Does the high fat diet regimen induce depression resistance to fluoxetine treatment?

In the high fat diet conditions, UCMS induced behavioural alterations similar to those observed in the regular diet condition. However, the high fat diet regimen prevented chronic fluoxetine treatment from reversing UCMS-induced depression-like behaviour. This result cannot be explained by the cumulative period of UCMS and the previous treatment and withdrawal to fluoxetine since the fluoxetine resistance was not observed in the regular diet condition.

In the coat state test, fluoxetine was unable to improve UCMS-induced coat state degradation during the first and the second UCMS procedure in mice fed a high fat diet. However, the deterioration of the coat state induced by the crisp food texture itself makes this variable difficult to interpret as the observed-effect might be unspecific and unrelated to depressive-like state. In the splash test, which also represents an index of grooming behaviour, results clearly indicate that the UCMS-induced grooming disturbance was not reversed by fluoxetine treatment at the end of the second procedure. In this test, where the effect of the food texture was excluded as an explanation to the observed effects, only the

high fat diet regimen can explain the fluoxetine resistance in reversing motivational and self-care behaviour. Finally, in the reward maze test, we found that high fat diet *per se* has no anhedonic effect in spite of an increase chewing latency in the control mice. This effect can be explained by the difference in palatability between the regular and the high fat diet which could interfere with the behavioural changes observed. Nevertheless, the UCMS-induced increase of the chewing latency for the cookie in both conditions can be interpreted as UCMS-induced anhedonic behaviour. Similar to the regular diet conditions, UCMS-induced anhedonia in the high fat diet condition, however, in contrast, fluoxetine was unable to reverse these effects of UCMS in mice who received a high fat diet regimen.

In the high fat diet conditions, through multiple behavioural paradigms, we demonstrated that a high fat diet prevented chronic fluoxetine treatment from reversing UCMS-induced depression-like phenotype. These results are important because they mimic AD resistance induced by vascular risk factors. The hypothesis of AD resistance induced by vascular risk factors is based on a number of clinical studies which demonstrate the same effect on patients with vascular risk factors or suffering from cardiovascular disease. Several studies suggest that depressed patients with cerebrovascular lesions show increased resistance to both AD treatment and electroconvulsive therapy [5,6,40,41,42]. AD resistance is also associated with the presence of vascular risks factors. A high incidence of depression has been reported when associated with the total burden of vascular risk factors [43] and this so-called cardiovascular risk score (sum of vascular risk factors including aging, smoking cigarette, history family of premature vascular disease, hypertension, diabetes and hypercholesterolemia) is associated with low rates of remission [9]. Indeed, poor long-term outcomes of depressive symptoms and low rates of remission with selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) treatment are associated with cumulated cardiovascular risk factors and can be predicted by the burden of cardiac disease [8,44].

By mimicking clinical data our results consequently allow us to suggest that the combination of UCMS with a high fat diet can be used as an animal model of resistance to AD drugs. However, in order to definitely confirm that we modelled AD resistance induced by vascular risk factors, future studies should use different tests that are not based on food reward such as the resident/intruder test, the tail suspension test or the forced swim test which have already been used to assess UCMS effects [22,35,45]. It is also very important to generalise our results both with other AD drugs including other SSRIs but also other classes

of AD and with other cardiovascular risk factors and finally, to check whether these results are not related to a shift in the dose-response to fluoxetine using higher dose of AD.

CONCLUSION

Clinical data demonstrate the need for animal models in order to study AD resistance. We suggest that a naturalistic animal model of AD resistance related to sub-nosographic clinical entities, associating UCMS with cardiovascular risk factors, especially a high fat diet regimen, could prove to be extremely useful. This original model could serve as useful tool for future research and eventually lead to improvements in the treatment of depression and possibly to increased survival in patients with cardiovascular disease by aggressively treating the cardiovascular risk factors, or by selectively treating depression with drugs that also modify these risk factors. Future research in this field could open up new avenues for the development of novel AD or other treatment strategies for these patients.

REFERENCES

1. Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Koretz D, et al. (2003) The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *Jama* 289: 3095-3105.
2. Trivedi MH, Rush AJ, Wisniewski SR, Nierenberg AA, Warden D, et al. (2006) Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR*D: implications for clinical practice. *Am J Psychiatry* 163: 28-40.
3. Rush AJ, Trivedi MH, Wisniewski SR, Nierenberg AA, Stewart JW, et al. (2006) Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR*D report. *Am J Psychiatry* 163: 1905-1917.
4. Krishnan KR, Hays JC, Blazer DG (1997) MRI-defined vascular depression. *Am J Psychiatry* 154: 497-501.
5. Alexopoulos GS, Meyers BS, Young RC, Kakuma T, Silbersweig D, et al. (1997) Clinically defined vascular depression. *Am J Psychiatry* 154: 562-565.
6. Camus V, Kraehenbuhl H, Preisig M, Bula CJ, Waeber G (2004) Geriatric depression and vascular diseases: what are the links? *J Affect Disord* 81: 1-16.
7. Carney RM, Freedland KE (2009) Treatment-resistant depression and mortality after acute coronary syndrome. *Am J Psychiatry* 166: 410-417.
8. Alexopoulos GS, Kiosses DN, Murphy C, Heo M (2004) Executive dysfunction, heart disease burden, and remission of geriatric depression. *Neuropsychopharmacology* 29: 2278-2284.
9. Iosifescu DV, Clementi-Craven N, Fraguas R, Papakostas GI, Petersen T, et al. (2005) Cardiovascular risk factors may moderate pharmacological treatment effects in major depressive disorder. *Psychosom Med* 67: 703-706.
10. Partonen T, Haukka J, Virtamo J, Taylor PR, Lonnqvist J (1999) Association of low serum total cholesterol with major depression and suicide. *Br J Psychiatry* 175: 259-262.
11. Steegmans PH, Hoes AW, Bak AA, van der Does E, Grobbee DE (2000) Higher prevalence of depressive symptoms in middle-aged men with low serum cholesterol levels. *Psychosom Med* 62: 205-211.
12. Sonawalla SB, Papakostas GI, Petersen TJ, Yeung AS, Smith MM, et al. (2002) Elevated cholesterol levels associated with nonresponse to fluoxetine treatment in major depressive disorder. *Psychosomatics* 43: 310-316.

13. Papakostas GI, Petersen T, Sonawalla SB, Merens W, Iosifescu DV, et al. (2003) Serum cholesterol in treatment-resistant depression. *Neuropsychobiology* 47: 146-151.
14. Kaymaz N, van Os J, Loonen AJ, Nolen WA (2008) Evidence that patients with single versus recurrent depressive episodes are differentially sensitive to treatment discontinuation: a meta-analysis of placebo-controlled randomized trials. *J Clin Psychiatry* 69: 1423-1436.
15. Souery D, Oswald P, Massat I, Bailer U, Bollen J, et al. (2007) Clinical factors associated with treatment resistance in major depressive disorder: results from a European multicenter study. *J Clin Psychiatry* 68: 1062-1070.
16. Uhr M, Tontsch A, Namendorf C, Ripke S, Lucae S, et al. (2008) Polymorphisms in the drug transporter gene ABCB1 predict antidepressant treatment response in depression. *Neuron* 57: 203-209.
17. Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, et al. (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301: 805-809.
18. Cryan JF, Dalvi A, Jin SH, Hirsch BR, Lucki I, et al. (2001) Use of dopamine-beta-hydroxylase-deficient mice to determine the role of norepinephrine in the mechanism of action of antidepressant drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 298: 651-657.
19. Liu GX, Cai GQ, Cai YQ, Sheng ZJ, Jiang J, et al. (2007) Reduced anxiety and depression-like behaviors in mice lacking GABA transporter subtype 1. *Neuropsychopharmacology* 32: 1531-1539.
20. Kong H, Sha LL, Fan Y, Xiao M, Ding JH, et al. (2009) Requirement of AQP4 for antidepressive efficiency of fluoxetine: implication in adult hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacology* 34: 1263-1276.
21. Adachi M, Barrot M, Autry AE, Theobald D, Monteggia LM (2008) Selective loss of brain-derived neurotrophic factor in the dentate gyrus attenuates antidepressant efficacy. *Biol Psychiatry* 63: 642-649.
22. Ibarguen-Vargas Y, Surget A, Vourc'h P, Leman S, Andres CR, et al. (2009) Deficit in BDNF does not increase vulnerability to stress but dampens antidepressant-like effects in the unpredictable chronic mild stress. *Behav Brain Res* 202: 245-251.
23. Steiner MA, Wanisch K, Monory K, Marsicano G, Borroni E, et al. (2008) Impaired cannabinoid receptor type 1 signaling interferes with stress-coping behavior in mice. *Pharmacogenomics J* 8: 196-208.

24. Stewart LQ, Roper JA, Scott Young W, 3rd, O'Carroll AM, Lolait SJ (2008) The role of the arginine vasopressin Avp1b receptor in the acute neuroendocrine action of antidepressants. *Psychoneuroendocrinology* 33: 405-415.
25. Jama A, Cecchi M, Calvo N, Watson SJ, Akil H (2008) Inter-individual differences in novelty-seeking behavior in rats predict differential responses to desipramine in the forced swim test. *Psychopharmacology (Berl)* 198: 333-340.
26. Surget A, Saxe M, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, Chalon S, et al. (2008) Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. *Biol Psychiatry* 64: 293-301.
27. Willner P (1997) Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl)* 134: 319-329.
28. Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R (1987) Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology (Berl)* 93: 358-364.
29. Ducottet C, Griebel G, Belzung C (2003) Effects of the selective nonpeptide corticotropin-releasing factor receptor 1 antagonist antalarmin in the chronic mild stress model of depression in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27: 625-631.
30. Yalcin I, Aksu F, Bodard S, Chalon S, Belzung C (2007) Antidepressant-like effect of tramadol in the unpredictable chronic mild stress procedure: possible involvement of the noradrenergic system. *Behav Pharmacol* 18: 623-631.
31. Surget A, Belzung C (2008) Unpredictable chronic mild stress in mice. In: AV Kalueff and JL LaPorte, Editors, *Experimental Models in Neurobehavioral Research*, Nova Science, New York 79-112.
32. Paigen B, Ishida BY, Verstuyft J, Winters RB, Albee D (1990) Atherosclerosis susceptibility differences among progenitors of recombinant inbred strains of mice. *Arteriosclerosis* 10: 316-323.
33. Yalcin I, Aksu F, Belzung C (2005) Effects of desipramine and tramadol in a chronic mild stress model in mice are altered by yohimbine but not by pindolol. *Eur J Pharmacol* 514: 165-174.
34. Yalcin I, Belzung C, Surget A (2008) Mouse strain differences in the unpredictable chronic mild stress: a four-antidepressant survey. *Behav Brain Res* 193: 140-143.

35. Ducottet C, Aubert A, Belzung C (2004) Susceptibility to subchronic unpredictable stress is related to individual reactivity to threat stimuli in mice. *Behav Brain Res* 155: 291-299.
36. Willner P (2005) Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology* 52: 90-110.
37. Pothion S, Bizot JC, Trovero F, Belzung C (2004) Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress. *Behav Brain Res* 155: 135-146.
38. Griebel G, Stemmelin J, Scatton B (2005) Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant in models of emotional reactivity in rodents. *Biol Psychiatry* 57: 261-267.
39. Ibarguen-Vargas Y, Surget A, Touma C, Palme R, Belzung C (2008) Multifaceted strain-specific effects in a mouse model of depression and of antidepressant reversal. *Psychoneuroendocrinology* 33: 1357-1368.
40. Hickie I, Scott E, Mitchell P, Wilhelm K, Austin MP, et al. (1995) Subcortical hyperintensities on magnetic resonance imaging: clinical correlates and prognostic significance in patients with severe depression. *Biol Psychiatry* 37: 151-160.
41. Hickie I, Scott E, Wilhelm K, Brodaty H (1997) Subcortical hyperintensities on magnetic resonance imaging in patients with severe depression--a longitudinal evaluation. *Biol Psychiatry* 42: 367-374.
42. Jans V, Bouckaert F, Wils V, Peuskens J (2006) [Recent findings regarding the treatment of late-onset depression with vascular brain lesions. A literature review]. *Tijdschr Psychiatr* 48: 223-227.
43. Mast BT, Neufeld S, MacNeill SE, Lichtenberg PA (2004) Longitudinal support for the relationship between vascular risk factors and late-life depressive symptoms. *Am J Geriatr Psychiatry* 12: 93-101.
44. Lyness JM, King DA, Conwell Y, Cox C, Caine ED (2000) Cerebrovascular risk factors and 1-year depression outcome in older primary care patients. *Am J Psychiatry* 157: 1499-1501.
45. Mineur YS, Belzung C, Crusio WE (2006) Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. *Behav Brain Res* 175: 43-50.

DISCUSSION

L'objectif de ce travail était d'étudier le lien entre la dépression et les pathologies cardiovasculaires à travers l'utilisation d'un modèle animal, le modèle UCMS. Jusqu'à présent, bien que de nombreuses études cliniques et épidémiologiques aient clairement démontrées l'existence d'un lien complexe et multi facette entre la dépression et les pathologies cardiovasculaires, très peu d'étude ont tenté de modéliser ce lien. En considérant la dépression en tant que facteur de risque cardiovasculaire indépendant, nous avons cherché à modéliser dans l'UCMS les altérations vasculaires physiologiques et morphologiques observées chez les patients dépressifs ainsi que l'aptitude d'un AD à améliorer ces modifications. Dans un second temps, sur la base de l'hypothèse selon laquelle la présence de facteur de risque cardiovasculaire entraîne une perte de la réponse au traitement AD chez les patients dépressifs, nous avons tenté de développer un modèle animal de résistance aux AD en associant l'UCMS à un facteur de risque cardiovasculaire.

Notre première série de trois expériences, réalisée dans le but d'étudier les conséquences physiologiques et morphologiques de l'UCMS sur la paroi vasculaire, a fait émerger plusieurs résultats significatifs :

1) Nos résultats répliquent ceux préalablement réalisés dans notre laboratoire, indiquant que les altérations comportementales induites par l'UCMS sont reversées par l'administration chronique de fluoxétine permettant de renforcer la validation du modèle UCMS en tant que modèle de dépression. De plus, l'UCMS a été capable d'engendrer des profils d'altérations comportementales différents en fonction de la lignée de souris utilisée (DBA/2j vs BALB/c) suggérant que différentes formes de dépression peuvent être modélisées par l'UCMS en fonction du substrat génétique.

2) En considérant la dépression en tant que facteur de risque cardiovasculaire indépendant, nous avons démontré qu'un épisode d'UCMS n'est pas suffisant pour modifier l'expression précoce de marqueurs endothéliaux. Par contre, l'UCMS est capable d'altérer l'expression à long terme de ces marqueurs et cet effet est dépendant du marqueur étudié. En effet, sur les quatre marqueurs testés (MMP-9, PAI-1, ICAM-1 et VCAM-1), tous augmentent significativement avec l'âge mais seul le PAI-1 est modifié à long terme par l'UCMS. Parallèlement, un seul épisode d'UCMS est suffisant pour modifier à court terme la fonction vasomotrice de l'endothélium en altérant la vasodilatation probablement médiée par le NO. Cette altération persiste suite à deux épisodes d'UCMS mais de façon intéressante, un mécanisme de compensation se met en place pour pallier aux altérations de la relaxation

dépendante du NO. En effet, une réponse vasodilatatrice dépendante de l'EDHF, un facteur endothélial aux propriétés relaxantes mais dont l'expression est quasiment absente dans les vaisseaux tels que l'aorte, vient contribuer au maintien de l'homéostasie vasculaire au cours de l'exposition prolongée à l'UCMS. Finalement, alors que l'UCMS en tant que facteur de risque indépendant est capable de reproduire certaines altérations vasculaires observées chez les patients dépressifs (augmentation de l'expression de PAI-1 et diminution de la vasodilatation endothéliale dépendante du NO), dans ce cas l'UCMS n'est pas suffisant pour induire des altérations morphologiques de type athérosclérose.

3) L'aptitude d'un AD à améliorer les modifications induites par l'UCMS a été étudiée à la fois sur l'expression des marqueurs endothéliaux et sur la fonction vasomotrice de l'endothélium au cours de deux épisodes d'UCMS. Un prétraitement à la fluoxétine au cours de l'épisode d'UCMS ne modifie pas l'augmentation à long terme de l'expression de PAI-1 induite par l'UCMS. Par contre, bien qu'un traitement chronique à la fluoxétine ne semble pas modifier l'expression des marqueurs endothéliaux, il est capable de restaurer les altérations de la fonction vasomotrice de l'endothélium induit par l'UCMS. La fluoxétine augmente la relaxation endothéliale dépendante du NO de façon indépendante de la présence d'un phénotype dépressif.

Finalement, dans le but de développer un modèle de résistance aux AD basé sur le fait que la présence de facteurs de risques cardiovasculaires pouvait atténuer la réponse aux AD chez les patients dépressifs, nous avons étudié la capacité de la fluoxétine à reverser les altérations comportementales induites par l'UCMS en présence d'un facteur de risque cardiovasculaire capable d'induire une hypercholestérolémie et de l'athérosclérose, un régime alimentaire riche en lipides. A travers plusieurs dimensions comportementales, un régime alimentaire riche en lipides est capable d'abolir la capacité de la fluoxétine à améliorer les modifications induites par l'UCMS. Ces résultats miment la résistance aux AD induite par des facteurs de risques cardiovasculaires.

L'UCMS en tant que modèle de dépression

Dans cette première partie, à travers les résultats comportementaux obtenus dans nos études et ceux déjà publiés, nous discuterons la validité de l'UCMS en tant que modèle de dépression en fonction des différents critères de validation d'un modèle animal. De plus, l'utilisation de deux lignées de souris différentes dans nos études ainsi que la répétition des épisodes d'UCMS nous a permis d'obtenir différents profils d'altérations que nous pourrions confronter aux données cliniques. Par la suite, étant donné que le modèle UCMS est basé sur l'exposition chronique au stress et que celui-ci représente un facteur de risque cardiovasculaire, nous discuterons les résultats vasculaires observés dans nos études comme les conséquences d'un état pathologique induit par le stress ou comme les conséquences d'un état de type dépressif.

1/ VALIDATION DU MODELE UCMS

La recherche en psychiatrie nécessite le développement de modèles animaux efficaces dans le but de comprendre l'étiopathogénèse et la physiopathologie de la pathologie ainsi que ses différentes stratégies de traitement. La validation d'un modèle animal de dépression se réfère à trois principaux critères [487, 506]: 1) la validité de prédiction : les altérations observées dans le modèle doivent pouvoir être améliorées par des traitements qui sont efficaces en clinique et selon des modalités identiques, 2) la validité de contenu : les réponses mesurées chez l'animal doivent être analogues aux symptômes et autres altérations physiopathologiques de la pathologie humaine et 3) la validité de construction : qui se base sur l'isomorphisme avec les facteurs étiologiques de la pathologie humaine.

1.1 Validation du modèle

L'étiologie complexe et multifactorielle de la dépression incluant des facteurs à la fois psychologiques, développementaux et génétiques entraîne des difficultés dans la validation de construction des modèles animaux de dépression. En s'appuyant sur le rôle des expériences de vie stressantes en tant que facteurs précipitants de la dépression, la plupart des modèles sont alors basés sur la réponse à différents stressseurs. Cependant, la pertinence du modèle augmente avec l'utilisation chronique de stressseurs écologiquement pertinents. L'utilisation chronique et imprédictible de stressseurs socio-environnementaux non traumatisants pour

l'animal confère à l'UCMS une forte validité de construction. Pour répondre au critère de validité de face, le modèle doit présenter des altérations (comportementales et neurobiologiques) équivalentes à celles observées dans la pathologie humaine. Dans notre modèle d'UCMS nous avons mis en évidence un syndrome (altérations physiques et comportementales) qui semble relativement analogue aux symptômes de la dépression chez l'Homme. En tant que symptôme cardinal de la dépression, l'anhédonie constitue un paramètre intéressant dans l'étude des altérations comportementales induites dans un modèle de dépression. Dans notre étude, l'UCMS a induit une réponse anhédonique en diminuant la réponse motivationnelle des animaux pour une récompense, un stimulus palatable (Reward maze test). En outre, d'autres symptômes induits par l'UCMS reflètent des symptômes subsidiaires à la dépression : une dégradation de l'état du pelage associée à une diminution de la motivation pour le toilettage (test du splash), indiquant dans le répertoire éthologique de la souris une perte d'intérêt pour des activités courantes et autocentrées, et des modifications de la réactivité émotionnelle (NSF). On trouve également dans le modèle UCMS d'autres types d'altérations pertinentes qui ont été mises en évidence dans des études réalisées préalablement au laboratoire telles que des anomalies neurobiologiques (diminution des niveaux de monoamines dans plusieurs régions du cerveau [559] et diminution de la prolifération cellulaire et de la neurogenèse hippocampique [358]) ainsi que des modifications neuroendocriniennes (changements des niveaux de glucocorticoïdes [560]). Ces altérations maintenues dans le temps semblent associées à un état pathologique plutôt qu'à un état physiologique. Finalement, un traitement AD est capable de contrecarrer ces modifications, ce qui confère à l'UCMS une importante valeur prédictive. La réversibilité par un traitement pharmacologique des altérations physiques, comportementales, neurobiologiques et neuroendocriniennes induites par l'UCMS a été démontrée avec différentes classes d'AD, incluant les TCA et les SSRI. Etant donné les conséquences cardiovasculaires néfastes d'un traitement aux TCA, nous nous sommes focalisés sur l'utilisation d'un AD SSRI, la fluoxétine. Dans chacun de nos paradigmes expérimentaux, nous avons démontré qu'un traitement à la fluoxétine peut contrecarrer les altérations physiques et comportementales induites par l'UCMS. De plus, les modifications induites par la fluoxétine sont observées suite à un traitement chronique et non aigu et leur délai d'apparition respecte celui observé en clinique avant l'apparition d'effets thérapeutiques associés au traitement AD.

1.2 Différents profils d'altérations

L'existence de profils différents peut représenter un atout dans la recherche de facteurs génétiques associés à la vulnérabilité face au stress et à certains types d'altérations particulières. A travers l'utilisation de deux lignées de souris différentes, la DBA/2j et la BALB/c, l'UCMS a généré deux profils d'altérations différents. Chez les souris de la lignée BALB/c, l'UCMS a induit des altérations à la fois physiques (dégradation de l'état du pelage) et comportementales (altération de la réactivité émotionnelle et motivationnelle dans le test du splash, le NSF et le reward maze test). Chez les souris de la lignée DBA/2j, malgré des altérations physiques (dégradation de l'état du pelage), l'UCMS n'a pas été capable d'induire des modifications comportementales. Les résultats sur la lignée DBA/2j, présentés dans l'article 1, indiquent une dégradation de l'état du pelage qui n'est pas associée à des altérations du comportement de toilettage dans le test du splash et de la réactivité émotionnelle dans le NSF (résultats présentés Figure 19). Etant donné le fort niveau d'anxiété chez les DBA/2j, cette dissociation pourrait s'expliquer par le fort potentiel anxiogène du test du splash (changement d'environnement, manipulation de la souris et vaporisation d'une solution) en comparaison au suivi hebdomadaire de l'état du pelage évalué dans l'environnement quotidien de l'animal. Par le biais de cette absence de réponse chez les DBA/2j aux tests comportementaux, il semble que cette lignée de souris présente une certaine résistance à l'UCMS. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus dans une étude de comparaison de lignées dans laquelle l'UCMS induit une dégradation de l'état du pelage à la fois chez les BALB/c et les DBA/2j et des modifications de la réactivité émotionnelle uniquement chez les BALB/c [560]. Par ailleurs, dans cette étude, l'UCMS a entraîné des modifications neuroendocriniennes telles qu'une élévation du taux de glucocorticoïdes chez les BALB/c et une diminution chez les DBA/2j. Les auteurs soulignent alors que l'UCMS peut générer plusieurs profils qui semblent reproduire chez quelques lignées certains sous-types de syndromes associés à la dépression majeure. En effet, les troubles dépressifs majeurs regroupent deux formes principales – la forme mélancolique et la forme atypique – qui présentent des symptômes psychologiques et neurovégétatifs divergents. En particulier, les perturbations de la réponse au stress s'orientent vers des directions opposées : une hyperactivité de l'axe du stress dans la forme mélancolique et une hypoactivité dans la forme atypique [561].

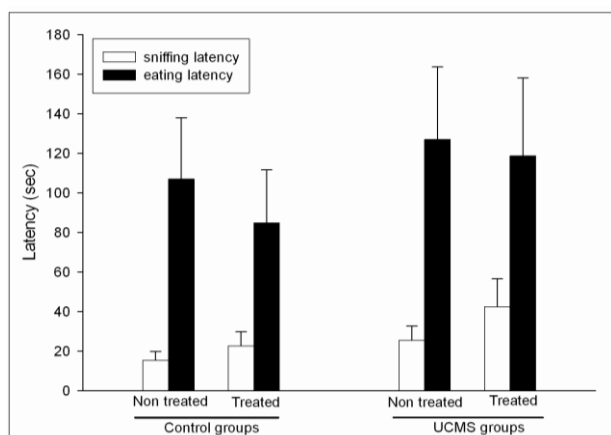


Figure 19: Résultats (moyenne +/- SEM) de la latence à renifler et à croquer la boulette de nourriture dans le test du NSF (novelty suppressed feeding test) chez des souris de la souche BDA/2j soumises ou non à 7 semaines de stress chronique imprédictible (unpredictable chronic mild stress, UCMS) et recevant soit un traitement à la fluoxétine (10 mg/kg, i.p.) soit des injections de NaCl (9%, i.p.) au cours des 5 dernières semaines du protocole.

1.3 Aspect récurrent de la dépression

La dépression majeure est une pathologie qui revêt un aspect récurrent sur toute la vie pour plus de 75% des patients, en général caractérisée par une succession de phases de rémission et de rechute [11]. Les patients rétablis à la suite d'un premier épisode dépressif présentent un risque de récurrence dans les 6 mois évalué à 50% en cas d'arrêt du traitement [12]. Dans le but de modéliser l'aspect récurrent de la dépression, nous avons exposé les souris à deux épisodes consécutifs d'UCMS sur une période de 5 mois (2 épisodes d'UCMS de 7 semaines chacun séparés par une période de 6 semaines au cours de laquelle aucune manipulation (stress et traitement) n'a été réalisée). Dans cette étude, les altérations physiques (état du pelage) sont visibles dès le premier épisode d'UCMS et sont maintenues jusqu'à la fin du second protocole. Un traitement à la fluoxétine est capable d'améliorer l'état du pelage des animaux soumis à l'UCMS après 4 semaines de traitement au cours du premier épisode d'UCMS. De façon intéressante, cet effet de la fluoxétine est aboli à l'arrêt du traitement et le pelage des animaux retrouve un état de dégradation similaire à celui des animaux UCMS non traités. Ces résultats reproduisent le risque de récurrence observé suite à un premier épisode dépressif en cas d'arrêt du traitement. Au cours de cette étude, de façon à soumettre les animaux à deux épisodes d'UCMS, la sévérité du protocole d'UCMS a été diminuée, ce qui pourrait expliquer l'absence de modifications comportementales au cours du premier épisode d'UCMS. Au cours du second épisode, l'UCMS a induit un état anhédonique (reward maze test) ainsi qu'une altération du comportement motivationnel autocentré (test du splash). Ces résultats indiquent l'apparition de nouveaux symptômes au cours d'épisodes d'UCMS répétés pouvant indiquer une aggravation du syndrome induit par l'UCMS au cours de la récurrence des épisodes.

2/ ETAT DE STRESS OU DEPRESSIF-LIKE

2.1 Conséquences cardiovasculaires du stress

Une littérature considérable indique qu'un grand nombre de stressseurs psycho-sociaux représente des facteurs de risques pour le développement d'altérations cardiovasculaires [1, 138, 233, 562]. La répétition d'épisodes de stress psychologique aussi bien qu'un stress aigu, pourraient initier et promouvoir le processus d'athérosclérose ainsi que sa manifestation clinique (Figure 20). Le terme « psycho-social » implique à la fois des facteurs psychologiques et sociaux qui sont considérés comme des facteurs de risque pour la progression de la maladie athérosclérotique. Un faible statut socio-économique est associé à des risques adverses de maladie coronarienne [563, 564]. De plus, un faible statut socio-économique est souvent associé à des facteurs environnementaux qui sont eux mêmes associés à une augmentation de la pression artérielle, de facteurs de coagulation et de lipides sanguins [565]. Par ailleurs un stress aigu, qu'il soit émotionnel ou mental, peut également précipiter le développement de maladies coronariennes [566]. Par exemple, l'expérience d'une attaque au missile ou d'un tremblement de terre est associée à une augmentation des risques d'infarctus du myocarde [567]. Chez l'Homme en situation de laboratoire, les conditions de stress utilisées sont généralement des tâches de courte durée qui consistent à prendre la parole en public, au rappel d'un souvenir désagréable ou à une tâche arithmétique [568, 569]. La réponse aigüe à un stress psychologique est concomitante à une augmentation de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque qui conduit à des altérations endothéliales à la fois structurelles et fonctionnelles. Il en résulte la synthèse de molécules importantes dans l'initiation et la progression d'athérosclérose (molécule d'adhésion, facteur de croissance et protéase). Un stress mental influence également la fonction hémostatique en augmentant à la fois les processus de coagulation et de fibrinolyse [138, 562].

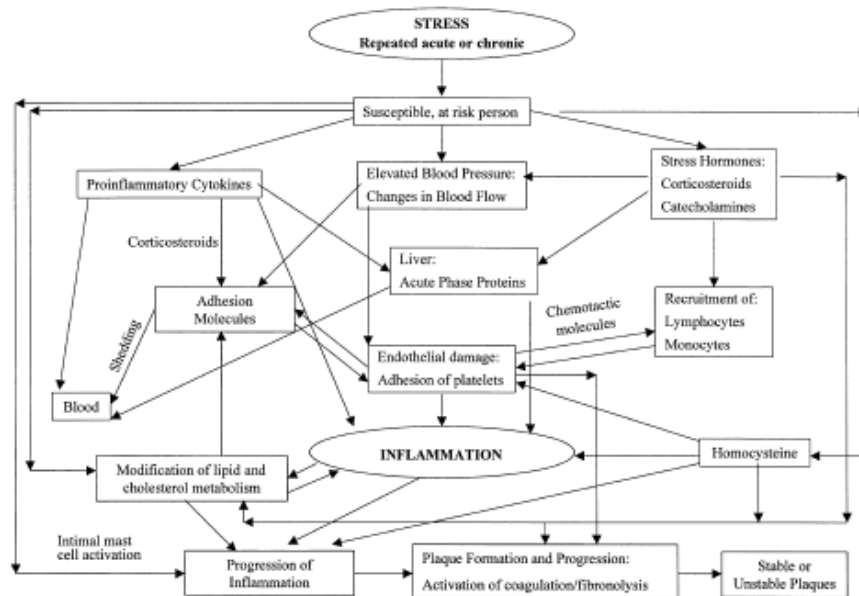


Figure 20: Stress, inflammation et athérosclérose. D'après Black et al, 2002 [138].

2.2 Profil psychosocial responsable des altérations cardiovasculaires de la dépression

En considérant les conséquences cardiovasculaires du stress, qu'il soit psychologique, social ou environnemental, ou qu'il soit chronique ou aigu, et son implication dans l'étiopathologie de la dépression, le stress représente un facteur de confusion important dans le lien entre la dépression et les pathologies cardiovasculaires. L'état de stress associé à la dépression plutôt que l'état dépressif en soi pourrait être en partie responsable des altérations cardiovasculaires observées chez les patients dépressifs. De plus, le modèle UCMS étant basé sur l'exposition chronique des animaux à des stressseurs socio-environnementaux, il est légitime de se demander si les effets sur le système cardiovasculaire observés sont représentatifs des effets du stress ou représentatifs d'un état "dépressif-like". Cette observation amène à se demander s'il existe un spectre de facteurs psychologiques dans la dépression associé à un risque plus élevé de maladies coronariennes. Ainsi une évaluation plus large des symptômes dépressifs, particulièrement l'évaluation de symptômes spécifiques pourrait améliorer notre compréhension sur l'association entre la dépression et les pathologies cardiovasculaires. Quel aspect de la dépression serait un bon prédicteur d'incidence et de récurrence de maladies coronariennes ? Le pessimisme et le désespoir qui représentent des symptômes précurseurs de la dépression et qui ne sont pas classifiés comme des facteurs de risque cardiovasculaire sont associés au développement de maladies coronariennes. L'anhédonie, qui constitue un des principaux symptômes de la dépression (un marqueur

d'état) est également prédictif de la morbidité et de la mortalité cardiovasculaires, et ceci de façon indépendante de la présence de dépression. Ainsi, certains symptômes marqueurs d'état de la dépression sont associés aux risques de mortalité et de morbidité cardiovasculaires observés dans la dépression. L'absence de profil "depressif-like" suite à l'UCMS chez les souris DBA/2j (ni perte de motivation, ni comportement anhédonique) pourrait donc expliquer l'absence de conséquences cardiovasculaires à court terme observées dans notre étude, avec cependant un effet sur le PAI-1 uniquement à long terme. Au contraire chez les BALB/c l'état "depressif-like" induit par l'UCMS (comportement anhédonique) est associé à un effet cardiovasculaire immédiat caractérisé par une altération de la fonction endothéliale. Dans le but de répondre à la question d'un effet cardiovasculaire induit par le stress ou par un état de type dépressif, il serait intéressant de tester l'effet de la souche de souris sur les différentes altérations vasculaires mais également d'utiliser d'autres modèles de dépression non basés sur le stress.

2.3 Mécanismes adaptatifs ou pathologiques

Nous avons vu en introduction que lorsque le cerveau perçoit une expérience comme stressante, des réponses physiologiques et comportementales sont initiées, conduisant aux processus d'allostase et d'adaptation. Cependant, au cours du temps, la charge allostatique peut s'accumuler et conduire au développement de pathologies. La surexpression de médiateurs neuronaux, endocriniens et immunologiques peut avoir des effets adverses sur de nombreux organes et notamment sur le système cardiovasculaire. En s'intéressant particulièrement à la fonction endothéliale, certaines études montrent que les effets du stress sur le système cardiovasculaire entraînent dans un premier temps un processus adaptatif qui peut devenir pathologique dans certaines conditions lorsque le stress devient chronique. L'application chez le rat d'un stress aigu, consistant à immobiliser l'animal pendant 60 minutes, entraîne une diminution de la contraction dépendante de l'endothélium en réponse à la NA associée à une augmentation de la relaxation induite par l'ACh [570]. En présence d'un inhibiteur de la NO synthase, ces modifications de la réactivité vasculaire induites par le stress sont abolies, indiquant une augmentation de la libération ou de la biodisponibilité en NO. Ces modifications de la réactivité vasculaire représentent alors un mécanisme adaptatif qui se met en place pour prévenir l'augmentation des besoins cardiaques (augmentation de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle). De la même façon, un stress chronique, qui consiste à diminuer la surface habitable des animaux pendant 8 semaines, entraîne une augmentation de la biodisponibilité en NO qui se traduit par une diminution de la contraction et une

augmentation de la relaxation dépendante de l'endothélium [571]. Ainsi, dans ces conditions, lors de l'application chronique de stressseurs, l'état adaptatif semble maintenu afin de prévenir des conséquences cardiovasculaires néfastes. Par opposition, dans notre modèle UCMS au cours duquel la chronicité de l'application des stressseurs est effectuée également sur une période de 8 semaines, les résultats indiquent que l'UCMS provoque une diminution de la relaxation dépendante de l'endothélium, probablement induite par une diminution de la relaxation dépendante du NO. De plus, une étude a récemment montré chez le rat que l'UCMS induisait une augmentation de la contraction en réponse à la NA et que cet effet est dépendant d'une altération des mécanismes dépendants du NO [572]. Ces résultats semblent indiquer que, dans l'UCMS, l'application chronique de stressseurs conduit à une altération des processus adaptatifs qui deviennent alors pathologiques. Ainsi, alors que la simple exposition chronique à un stress peut conduire à la mise en place de processus adaptatifs visant à enrayer les conséquences cardiovasculaires du stress, un état de type dépressif induit un état vasculaire pathologique. Le phénotype dépressif induit donc le passage d'un état adaptatif à un état pathologique. Les résultats de nos données sur la fonction endothéliale (article 2 et 3) représentent alors un argument en faveur d'altérations cardiovasculaires induites par un état de type dépressif et non par un état dit de stress.

L'UCMS en tant que facteur de risque cardiovasculaire

En démontrant la validité du modèle UCMS en tant que modèle de dépression, nous proposons un outil qui pourrait avoir un intérêt dans l'étude des conséquences cardiovasculaires de la dépression. Nous avons alors considéré l'UCMS en tant que facteur de risque vasculaire indépendant dans le but de modéliser les altérations vasculaires physiologiques et morphologiques de la paroi vasculaire observées chez les patients dépressifs. Dans cette partie de la discussion, nous expliquerons pourquoi nous avons choisi spécifiquement d'étudier la fonction endothéliale pour modéliser les altérations physiologiques dans le modèle UCMS. Ensuite nous discuterons les résultats obtenus sur la fonction endothéliale et la formation d'athérosclérose dans le modèle UCMS au regard des observations faites chez les patients dépressifs et nous proposerons des hypothèses physiopathologiques capables d'expliquer les altérations observées dans le modèle.

1/ ROLE CENTRAL DE LA FONCTION ENDOTHELIALE DANS L'HOMEOSTASIE VASCULAIRE

La dépression est associée une augmentation du risque de morbidité et de mortalité cardiovasculaire. Plus spécifiquement, en amont, la dépression contribue au développement et à la progression d'athérosclérose. Le processus d'athérosclérose met en jeu des mécanismes physiopathologiques multiples au niveau de la paroi vasculaire, incluant des altérations du métabolisme lipidique, un dysfonctionnement endothélial, des dérégulations hémostatiques ainsi qu'une activation des processus inflammatoires et immunitaires [397, 398]. Parallèlement, dans des études indépendantes, ces altérations physiologiques de la paroi vasculaire ont toutes été répertoriées chez les patients dépressifs. Parmi ces dérégulations physiologiques, une altération fonctionnelle de l'endothélium vasculaire joue un rôle central dans chacun des stades de l'athérosclérose, de l'initiation à la rupture de la plaque d'athérome (Figure 21). Ainsi, dans le but de modéliser les altérations vasculaires physiologiques observées chez les patients dépressifs, nous nous sommes particulièrement intéressés à la fonction endothéliale.

La localisation stratégique de l'endothélium vasculaire lui permet, en réponse à des signaux hémodynamiques, de libérer un grand nombre de substances vasoactives nécessaires au maintien de l'homéostasie vasculaire. Le NO représente le principal facteur relaxant de l'endothélium et permet en s'opposant à l'action de facteurs contractants de maintenir le tonus

et la réactivité vasculaire. Un dysfonctionnement endothélial est donc souvent défini par une diminution de la capacité vasodilatatrice de l'endothélium, mais le terme englobe une altération générale de tous les mécanismes homéostatiques. L'étude de la fonction vasomotrice de l'endothélium est donc considérée comme un outil d'évaluation de l'intégrité fonctionnelle de l'endothélium vasculaire. La fonction endothéliale est le plus communément mesurée par la réponse vasomotrice en réponse à des stimuli physiques ou pharmacologiques tels que l'ACh. La réponse vasodilatatrice dépendante de l'endothélium peut alors servir de marqueur de biodisponibilité du NO [573, 574].

Malgré le rôle majeur de l'endothélium dans le tonus et la réactivité vasculaire, l'altération de la balance entre les facteurs relaxants et contractants de l'endothélium prédispose la vasculature à l'activation et à l'agrégation plaquettaire, au recrutement des leucocytes, à la prolifération des cellules musculaires lisses, à l'inflammation et en conséquence à l'athérosclérose. Ainsi, l'endothélium vasculaire, en réponse à de nombreuses stimulations peut exprimer et libérer un grand nombre de marqueurs biologiques impliqués dans la coagulation et l'agrégation plaquettaire (vWf, PAI-1,...), dans le recrutement et la migration des leucocytes à travers l'endothélium endommagé (molécules d'adhésion, cytokines, chemokines), dans le remodelage vasculaire (matrice métalloprotéinase) et dans la prolifération des cellules musculaires lisses (facteurs de croissance). L'augmentation du taux circulant de ces différents marqueurs est alors représentative d'un dysfonctionnement endothélial.

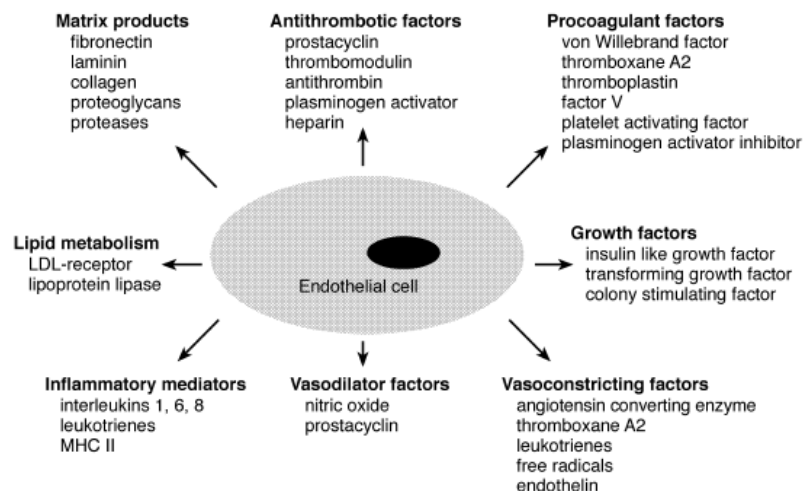


Figure 21: A travers un grand nombre de médiateurs, les cellules endothéliales exercent des fonctions autocrine, paracrine et endocrine et influencent les fonctions cellulaires des plaquettes, des cellules musculaires lisses et des leucocytes. LDL, low-density lipoprotein. D'après Galley et al, 2004 [575].

2/ LES ALTERATIONS DE LA FONCTION ENDOTHELIALE DANS L'UCMS

Dans le but de modéliser les altérations vasculaires physiologiques observées chez les patients dépressifs, nous nous sommes focalisés dans le modèle UCMS sur l'étude de la fonction endothéliale à travers ses différentes propriétés athérogéniques en évaluant 1) l'expression de marqueurs endothéliaux dont l'augmentation est physiopathologique et 2) la réponse vasomotrice de l'endothélium, plus spécifiquement la réponse vasodilatatrice dépendante de l'endothélium et médiée par le NO.

2.1 L'expression des marqueurs endothéliaux

Dans notre première étude, nous avons sélectionné 4 marqueurs endothéliaux (PAI-1, ICAM-1, VCAM-1 et MMP-9) impliqués dans les différentes étapes du processus d'athérosclérose : l'adhésion et la coagulation plaquettaire (PAI-1), le recrutement et la migration des leucocytes (ICAM-1, VCAM-1) et dans la destruction et le remodelage de la paroi vasculaire (MMP-9). En effet, à travers l'expression de certains des marqueurs impliqués dans le processus d'athérosclérose, de nombreuses études ont mis en évidence un dysfonctionnement endothélial et une altération des fonctions plaquettaires chez les patients souffrant de dépression :

1) Des études épidémiologiques ont permis d'identifier certains paramètres hémostatiques dont l'anomalie peut prédire le risque d'événements cardiaques. Parmi ces facteurs, le PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1), un marqueur prothrombotique surexprimé au cours d'une lésion vasculaire est également impliqué dans la dépression. En effet, les patients dépressifs présentent un taux élevé de l'activité du PAI-1 en comparaison aux patients non dépressifs, indiquant une altération de la fibrinolyse capable de favoriser la formation d'un caillot sanguin [423].

2) Une augmentation de l'expression de molécules d'adhésion tel que ICAM-1 et VCAM-1 a également été mise en évidence chez les patients dépressifs. ICAM-1 et VCAM-1 sont impliquées dans l'adhésion et la migration des leucocytes à travers l'endothélium vasculaire et favorisent la croissance et l'instabilité de la plaque d'athérome [406, 576, 577].

3) Une relation significative a été démontrée entre l'incidence de maladies coronariennes et de nombreux marqueurs inflammatoires tels que la CRP, IL-6, IL-1 et le TNF- α [455, 456, 578]. La dépression est également associée à une augmentation de l'expression de ces mêmes marqueurs inflammatoires. [422, 459, 579]. Le MMP-9, une métalloprotéinase de la matrice impliquée dans tous les stades d'athérosclérose, est sécrétée

par les cellules endothéliales et musculaires lisses en réponse au TNF- α et à IL-1 [580]. Cette enzyme qui contribue à la destruction et au remodelage du tissu inflammé a été identifiée en tant que prédicteur de mortalité cardiaque. Parallèlement, MMP-9 est surexprimée chez les patients dépressifs [581].

L'expression à court terme

A travers l'expression de quatre marqueurs endothéliaux impliqués dans l'agrégation plaquettaire (PAI-1), le recrutement des leucocytes (ICAM-1, VCAM-1) et le remodelage vasculaire (MMP-9) chez la lignée de souris DBA/2j, les résultats de notre étude indiquent qu'un épisode d'UCMS n'est pas suffisant pour altérer la fonction endothéliale. Par contre, un épisode d'UCMS est suffisant pour induire une augmentation à long terme de l'expression de PAI-1. Comme nous l'avons discuté précédemment, si l'on considère que certains symptômes spécifiques de la dépression tels que l'anhédonie ou les comportements de désespoir sont prédicteurs des altérations vasculaires observées chez les patients dépressifs, l'absence d'effets comportementaux dans cette lignée de souris peut expliquer l'absence d'effets sur l'expression des marqueurs endothéliaux. Cependant, en considérant que l'UCMS induit un profil d'altération assimilable à la dépression atypique, d'autres hypothèses peuvent être proposées.

Les marqueurs mesurés dans cette étude sont surexprimés lors d'un dysfonctionnement endothélial associé à des lésions (Figure 22) alors que les cytokines proinflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF- α représentent des marqueurs inflammatoires précoces qui sont sécrétés avant l'apparition de lésions artérielles et d'athérosclérose [582, 583]. De nombreuses études cliniques ont mis en évidence une forte association entre l'expression de ces marqueurs et la dépression [422, 459]. Jusqu'à présent, une étude a démontré une augmentation du niveau circulant de cytokines pro-inflammatoires chez le rat exposé à 4 semaines d'UCMS [584]. Cependant, cette étude n'a pas évalué l'expression de molécules d'adhésion, de facteurs de coagulation et de matrice métalloprotéinase. Notre étude est la première à évaluer ce type de marqueurs dans le modèle UCMS et peut être que les dosages n'ont pas été effectués dans la fenêtre temporelle optimum d'expression de ces marqueurs. En fonction des marqueurs, l'expression peut être précoce ou tardive et le temps d'expression peut varier.

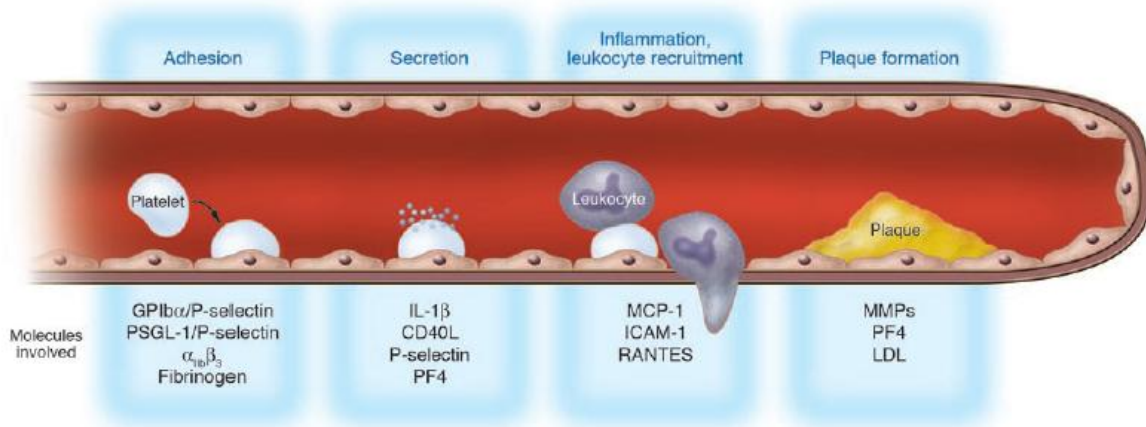


Figure 22: Modèle hypothétique d'athérogenèse. La libération de substances pro-inflammatoires (IL-1 β ,...) induit l'activation et l'aggrégation des plaquettes au niveau de l'endothélium, générant un phénotype proathérogène des cellules endothéliales (chemtaxis : MCP-1, adhésion : ICAM-1). En conséquence, les leucocytes circulants sont recrutés initiant la transmigration des leucocytes à travers l'endothélium et la formation de cellules spumeuses. D'après Gawaz et al, 2005 [411].

Par ailleurs, de nombreuses études cliniques ont suggéré un effet différé, à retardement d'un épisode de dépression sur le système cardiovasculaire. Pratt et al [16] ont trouvé que l'augmentation du risque d'événements cardiaques suite à un premier épisode de dépression survenait dans les 14 ans qui suivent le premier épisode de dépression. De plus, le risque d'infarctus du myocarde reste augmenté jusque dans les 10 ans après l'apparition du premier épisode de dépression [24]. De nombreuses études ont également montré que les patients dépressifs présentant des symptômes de modérés à sévères ont plus de risque de développer des désordres reconnus comme des facteurs de risque cardiovasculaire tel que le diabète de type 2, durant une période qui suit de 5 à 10 ans [166, 585].

L'expression à long terme

Ainsi étant donné l'absence d'altérations à court terme de l'épisode de l'UCMS, nous avons évalué les effets à retardement d'un épisode UCMS sur l'expression des marqueurs endothéliaux. Les résultats indiquent que l'effet de l'UCMS sur l'expression tardive des marqueurs est dépendant du marqueur étudié. En effet, l'UCMS induit une augmentation tardive de l'expression de PAI-1 uniquement et n'a pas d'effet sur l'expression d'ICAM-1, VCAM-1 et MMP-9.

Au cours du processus d'athérosclérose, la principale cause du développement de pathologies cardiovasculaires, la libération par les plaquettes actives de marqueurs inflammatoires au niveau du microenvironnement vient altérer les propriétés des cellules

endothéliales [411, 586, 587]. En effet, les plaquettes sécrètent des protéines d'adhésion (fibrinogène, P-selectine, vWf), des facteurs de croissance (PDGF, TGF- β , EGF), des chemokines (RANTES, platelet factor 4), des cytokines (IL-1 β , CD40 ligand) et des facteurs de coagulation (facteur V and XI, PAI-1, plasminogène, protéine S). Ces protéines vont agir en synergie d'une part pour promouvoir l'adhésion et la coagulation plaquettaire et d'autre part pour induire au niveau des cellules endothéliales un phénotype proathérogénique. En réponse, les cellules endothéliales vont à leur tour libérer des facteurs de coagulation (PAI-1), des chemokines (MCP-1) et des molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1) capables d'amplifier l'agrégation plaquettaire et le recrutement des leucocytes au niveau du site de lésion [588]. Finalement, la libération de cytokines pro-inflammatoires initie l'expression et la libération d'enzymes de dégradation de la matrice, les MMP. Ces enzymes, capable de dégrader les protéines de la matrice extracellulaire contribuent à la destruction et au remodelage du tissu inflammé [589]. Ainsi, le PAI-1 qui représente un inhibiteur majeur de la fibrinolyse est libéré immédiatement suite à l'activation plaquettaire et contribue à l'agrégation plaquettaire et à la stabilisation d'un caillot sanguin. Ces observations suggèrent qu'au cours d'une lésion vasculaire, les facteurs de coagulation sont parmi les premiers composés libérés, avant la décharge de molécules (ICAM-1 and VCAM-1) par les cellules endothéliales et de MMP par les cellules endothéliales et musculaires lisses. Ce pattern temporel d'expression des différents marqueurs vasculaires peut expliquer l'effet préférentiel de l'UCMS sur l'expression du PAI-1.

L'hypothèse neurotrophique de la dépression peut également être utilisée pour expliquer l'implication préférentielle du PAI-1 dans le modèle UCMS. Cette hypothèse est basée sur l'existence d'une association causale entre le taux de BDNF (brain-derived neurotrophic factor) et un état dépressif-like ou la réponse aux AD : une diminution de la synthèse et de la signalisation du BDNF est capable de générer des modifications cérébrales fonctionnelles et morphologiques précipitant la dépression, alors que son augmentation peut être sous-jacente à l'action des AD [368, 590, 591]. Bien que le BDNF soit hautement concentré dans le SNC, il est également présent en périphérie. Le BDNF sanguin est stocké dans les plaquettes desquelles il est libéré dans le plasma par des processus d'activation et de coagulation plaquettaire [592] mais il a également été identifié dans les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les lymphocytes [593-595]. Cependant, le BDNF passe la barrière hémato-encéphalique ce qui laisse supposer que la fraction sanguine pourrait également provenir du SNC [596]. Chez les patients dépressifs, une diminution du niveau de

BDNF a été mis en évidence dans certaines régions du SNC ainsi que dans le sérum et le plasma mais ne varie pas dans le sang total [377, 597]. Ces résultats indiquent que la diminution au niveau périphérique du niveau de BDNF proviendrait de la fraction plaquettaire [598, 599]. Le BDNF est produit à partir d'un précurseur, le proBDNF qui est clivé par une protéase parmi lesquelles la plasmine est une des plus importantes [600-602]. Le processus de protéolyse du proBDNF par le système tPA-plasminogène représente un outil puissant dans le contrôle de la direction de l'action du BDNF puisque le proBDNF a des effets biologiquement opposés de ceux du BDNF à travers une action sur des systèmes de récepteurs différents [603, 604]. Le système tPA- plasminogène est exprimé à la fois au niveau central et périphérique. Au niveau central, il est exprimé dans l'hippocampe, l'amygdale, le cervelet et l'hypothalamus par les neurones et les cellules de la microglie. Le PAI-1, principal inhibiteur du tPA est également présent au niveau central indiquant que toute la cascade est présente à la fois au niveau central et au niveau périphérique. Ainsi, le tPA par clivage du pro-BDNF en BDNF mature contribue à de nombreuses fonctions notamment la plasticité synaptique (LTP et LTD). *Etant donné le rôle central du BDNF dans la pathogenèse de la dépression et dans l'action thérapeutique des AD, il est concevable que le système tPA-plasminogène puisse également être impliqué dans la dépression [605-607]. Par ailleurs, puisque le PAI-1 est le principal inhibiteur du tPA, le PAI-1 pourrait également être impliqué dans la dépression à travers son action inhibitrice du système tPA-plasminogène et donc du clivage du proBDNF (Figure 23). Ainsi, l'augmentation du PAI-1 induit par l'UCMS dans notre étude pourrait être impliquée dans la diminution du niveau de BDNF observés dans de nombreuses études chez l'homme et l'animal.*

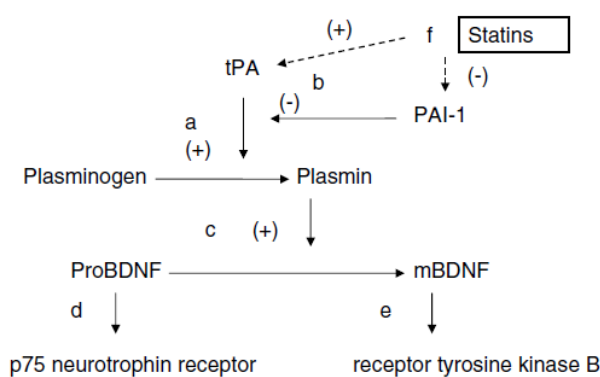


Figure 23: Interaction entre le système du tPA-plasminogène et le BDNF. a) Le plasminogène est activé en plasmine par l'activateur du plasminogène de type tissulaire (tPA). b) L'inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1 (PAI-1) est l'inhibiteur majeur du tPA. c) la plasmine peut cliver la pro-région du pro-BDNF (précurseur du BDNF, brain derived neurotrophic factor). d) Le pro-BDNF non clivé se fixe aux récepteurs p75 des neurotrophines. e) Le BDNF mature (mBDNF) se fixe aux récepteurs tyrosine kinase de type B. f) Les statines sont capables d'activer le tPA et d'inhiber l'expression de PAI-1. D'après Tsai SJ, 2007 [608].

2.2 La réactivité vasculaire

La principale fonction de l'endothélium vasculaire, avant d'être impliqué dans les mécanismes d'agrégation plaquettaire, de recrutement des leucocytes et de remodelage vasculaire, est la régulation du tonus et de la réactivité vasculaire. Dans notre modèle, les résultats indiquent qu'un épisode d'UCMS, bien qu'il n'ait pas d'effet sur l'expression des marqueurs sélectionnés, est suffisant pour altérer la réactivité vasculaire aortique. Plus spécifiquement, l'UCMS induit une altération de la relaxation dépendante de l'endothélium (article 2) et cet effet est dépendant du NO (article 3). Par ailleurs, lors de la répétition des épisodes d'UCMS, un mécanisme de compensation par l'EDHF, un facteur relaxant également dépendant de l'endothélium, se met en place. Il n'est cependant pas suffisant pour masquer complètement les altérations de la relaxation dépendante du NO (article 3).

La relaxation dépendante du NO

Nos résultats indiquant que la vasodilatation dépendante du NO est altérée dans l'UCMS sont en accord avec ceux obtenus dans une étude réalisée chez le rat. Cette étude a démontré que le dysfonctionnement endothélial induit par l'UCMS est principalement lié à une diminution de la production de NO endothéliale [572]. Par l'utilisation de différentes techniques invasives et non invasives, de nombreuses études cliniques ont également démontré une altération de la réponse vasodilatatrice chez les patients dépressifs, indiquant un dysfonctionnement endothélial médié par une perte de relaxation induite par le NO [407] [402-404]. Ces différentes observations indiquent clairement qu'une diminution de la biodisponibilité en NO représenterait le principal mécanisme responsable du dysfonctionnement endothélial observé dans la dépression.

Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer la diminution de la biodisponibilité en NO dans la dépression [398] : 1) une augmentation de sa dégradation et/ou 2) une diminution de sa production. Une accélération de la dégradation du NO par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) induit une forte réduction de la biodisponibilité en NO. Un excès de production de ROS tels que l'anion superoxyde (O_2^-) ou du cholestérol LDL oxydé ainsi qu'une diminution des agents antioxydants contribuent à augmenter la dégradation du NO. L'anion superoxyde O_2^- peut directement inactiver le NO en réagissant très rapidement pour former du peroxynitrite ($ONOO^-$) qui est vaso-inactif et capable d'oxyder un grand nombre de protéines, de lipides et d'acides nucléiques induisant des lésions cellulaires et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Figure 24). Une diminution de la production de NO contribue

également au dysfonctionnement endothélial. Etant donné que le NO est produit par la NO synthase endothéliale (eNOS), une altération de l'expression ou de la fonction de l'eNOS affecte la synthèse du NO. Différents mécanismes peuvent alors intervenir car les voies de synthèse du NO sont complexes (Figure 25). Par exemple, l'eNOS est inhibée lorsqu'elle interagit avec la cavéoline-1, une protéine membranaire des vésicules de la membrane plasmique appelée caveola. La protéine kinase Akt dépendante de la phosphorylation / déphosphorylation de l'eNOS joue également un rôle critique dans l'activation de l'eNOS, la libération du NO et la fonction endothéliale. Une abondance en inhibiteurs de l'eNOS tels que la diméthylarginine asymétrique (ADMA) aussi bien qu'un déficit en cofacteurs nécessaires à l'activation de l'eNOS peut également altérer la fonction de l'eNOS. Par exemple l'eNOS requiert un cofacteur, le tetrahydrobioptérine (BH4) pour former le NO à partir de la L-arginine. Ainsi, lors d'un déficit en L-arginine ou en BH4, l'eNOS devient « non couplé » et peut produire des ROS. L'eNOS, en cas de déficit en BH4, peut donc par elle-même activer les processus de stress oxydatif et promouvoir le dysfonctionnement endothélial.

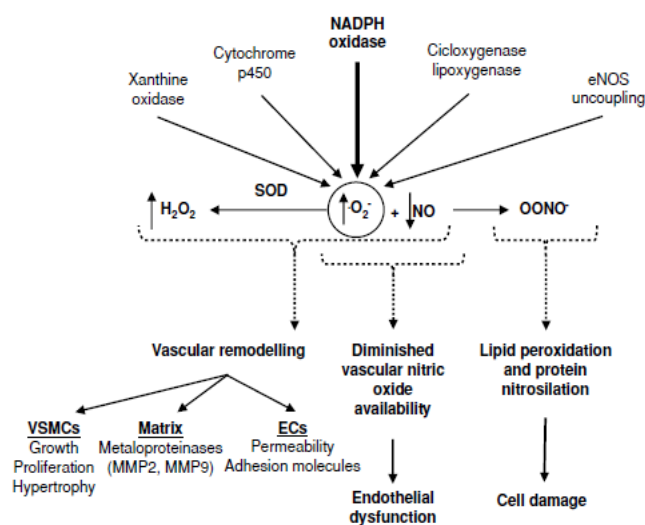


Figure 24: Génération des espèces réactives de l'oxygène (ROS). De nombreuses enzymes ont le potentiel de générer des ROS. Ce diagramme illustre les conséquences fonctionnelles et structurales des ROS au niveau artériel. Une augmentation de la production d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), principalement induite par l'activation de la NADPH oxydase, est impliquée dans le dysfonctionnement endothélial et dans le remodelage vasculaire en diminuant la biodisponibilité en oxyde nitrique (NO) et en augmentant la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et de peroxydinitrite ($OONO^{\cdot}$). eNOS, Endothelial Nitric Oxide Synthase ; SOD, Superoxyde Dismutase ; VSMCs, Vascular Smooth Muscle Cells ; EC, Endothelail cells. D'après Fortuno et al, 2005 [609].

Les résultats des études réalisées chez les patients dépressifs donnent des arguments en faveur des deux hypothèses. En effet, les patients dépressifs présentent une surproduction plasmatique de ROS et notamment d'anions superoxydes et de LDL oxydés ainsi qu'une augmentation des enzymes impliquées dans la formation des ROS telles que la superoxyde dismutase, la catalase et la peroxydase [610]. D'autre part, une augmentation d'ADMA [611] et un déficit en BH₄ [612] a également été mis en évidence dans le plasma de patients dépressifs. Ces résultats indiquent qu'une altération de l'activation de l'eNOS pourrait contribuer à la fois à la diminution de la biodisponibilité en NO mais également à l'activation du stress oxydatif dans la dépression.

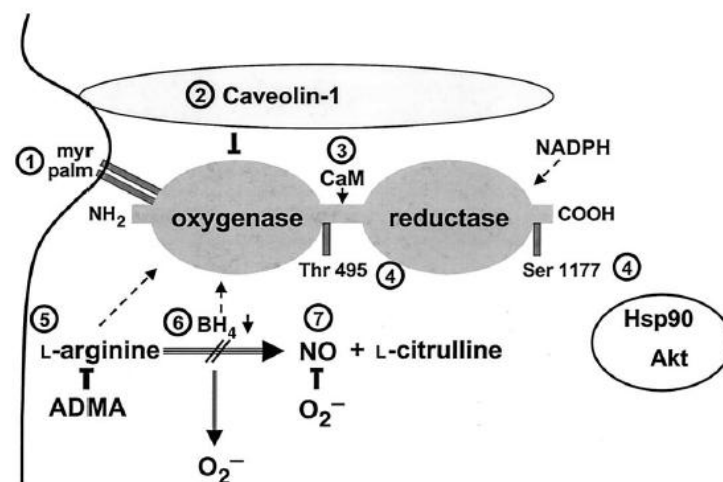


Figure 25: Signalisation de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS). L'eNOS est composé de deux domaines protéiques (réductase et oxygénase) connectés par une protéine flexible. Le domaine réductase génère des électrons nécessaires à la synthèse d'oxyde nitrique (NO) en se fixant au NADPH réduit (nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate) et en catalysant sa déshydrogénation. Les électrons sont transférés à travers la protéine de connexion au domaine oxygénase. Ce transfert d'électrons est activé par une calmoduline dépendante du Ca²⁺ (CaM) en se fixant à la protéine de connexion. Le domaine oxygénase est un centre catalytique responsable de la production de NO et de la fixation de l'hème, de la L-arginine et de la tetrahydrobioptérine (BH₄). Les étapes suivantes sont requises pour une production optimale de NO: (1) Localisation d'eNOS au niveau des cavéoles est nécessaire pour une synthèse efficace de NO et requiert la cotranslation myristoylation (myr) aussi bien que la posttranslocation palmitoylation (palm) d'eNOS. (2) Caveolin-1, la protéine membranaire majeure des cavéoles, peut interagir avec eNOS, résultant l'inhibition de eNOS. L'interruption de l'interaction est nécessaire pour activer l'eNOS. (3) CaM est un activateur allostérique essentiel de l'eNOS. La fixation de CaM à ses sites de fixations spécifiques augmente le taux de transfères d'électrons à partir du domaine réductase vers le domaine catalytique de l'eNOS. (4) L'activité d'eNOS est régulée par la phosphorylation du résidu sérine 1177 (Ser 1177). Cette phosphorylation activatrice requiert la protéine Kinase Akt et la heat shock protein 90 (Hsp90). La phosphorylation au niveau du site thréonine 495 (Thr 495) inactive l'eNOS. (5) La fixation de la L-arginine au domaine catalytique de l'eNOS peut être inhibée par un antagoniste compétitif endogène, l'arginine diméthyle asymétrique (ADMA). (6) BH₄ est un cofacteur nécessaire à la synthèse du NO. Une déplétion en BH₄ peut induire le non couplage de l'eNOS et la production d'anion superoxyde (O₂⁻). (7) Même lorsque le NO est produit proprement, il peut être rapidement inactivé par l'O₂⁻, particulièrement dans les conditions de stress oxydatif important. D'après behrendt et al, 2002 [393].

Mécanisme de compensation par l'EDHF

Bien que le NO représente le principal facteur impliqué dans la relaxation dépendante de l'endothélium, les prostacyclines (PGI_2) ainsi que des facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium (Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors, EDHF) représentent également des médiateurs importants dans la régulation du tonus et de la réactivité vasculaire, spécifiquement lorsque la vasodilatation médiée par le NO est compromise. Dans notre étude (article 3), *en situation d'inhibition du NO et de la PGI_2 , la vasodilatation dépendante de l'endothélium est quasiment absente chez les animaux non stressés alors que 33.5% de la relaxation est maintenue chez les animaux soumis à deux épisodes d'UCMS. Ces résultats indiquent que la totalité de la relaxation est dépendante du NO en situation contrôle (absence de stress). Par contre, en plus d'altérer la relaxation dépendante du NO, l'UCMS induit une augmentation significative de la contribution de la relaxation dépendante de l'EDHF.* Ces résultats ont été obtenus au cours de deux épisodes d'UCMS mais il semble qu'un seul épisode d'UCMS soit suffisant pour activer le mécanisme dépendant de l'EDHF (ANNEXE 2).

Une hypothèse originale et attractive a été proposée pour définir l'EDHF comme un mécanisme vasodilatateur compensateur en situation pathologique et notamment au niveau des gros vaisseaux où sa contribution est quasiment nulle en situation physiologique normale. Dans de nombreuses situations au cours desquelles la synthèse ou l'action du NO sont réduites, au cours de l'athérosclérose, d'une hypercholestérolémie, d'une ischémie, d'une hypertension ou du diabète, la libération d'EDHF deviendrait un mécanisme de réserve ou compensatoire crucial au maintien du flux sanguin [613-617]. Par exemple, une hypercholestérolémie chez le rat altère la relaxation aortique dépendante de l'endothélium qui est partiellement compensée par la contribution de novo de l'EDHF. De plus, la combinaison d'une hypercholestérolémie et du diabète qui représentent deux des principaux facteurs de risque d'athérosclérose, induit une altération additive de la relaxation dépendante de l'endothélium mais également une augmentation de la contribution compensatoire de l'EDHF au niveau de l'aorte [618]. Nos résultats sont donc cohérents avec ce concept selon lequel la fonction EDHF représenterait, en situation pathologique, une réponse compensatoire à la réduction de la biodisponibilité en NO pour supporter la fonction endothéliale et la perfusion tissulaire.

L'EDHF induit la relaxation des cellules musculaires lisses par un mécanisme d'hyperpolarisation [619-622]. Cependant, l'EDHF ne représente pas un facteur unique car de

nombreux facteurs sont capables d'hyperpolariser les cellules musculaires lisses. Plusieurs facteurs ont été proposés en tant que facteurs EDHF (Figure 26) [623] : 1) les produits du cytochrome P450, 2) les ions K^+ et 3) le peroxyde hydrogène (H_2O_2). Les agonistes dépendants de l'endothélium (ACh, substance P, bradikynine) en se fixant à leurs récepteurs spécifiques entraînent une augmentation du calcium (Ca^{2+}) intracellulaire au niveau de la cellule endothéliale et la synthèse de facteurs EDHF. L'augmentation de Ca^{2+} active la phospholypase A_2 connue pour libérer l'acide arachidonique (AA) à partir des phospholipides (PL). L'AA représente alors un substrat du cytochrome P450. L'acide époxyeicosatriénoïque (EET), produit de l'AA, active les canaux potassiques dépendant du Ca^{2+} intracellulaire (KCa^{2+}) au niveau des cellules musculaires lisses et induit une hyperpolarisation suivie d'une relaxation. L'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire au niveau des cellules endothéliales active également les canaux KCa^{2+} causant une hyperpolarisation des cellules endothéliales et une augmentation du potassium (K^+) extracellulaire qui hyperpolarise les cellules musculaires lisses via l'activation de la pompe $Na^+-K^+-ATPase$ ou des canaux K^+ rectifiants entrants (K_{IR}). Finalement, l'augmentation de Ca^{2+} active les enzymes (NADPH oxydase, cyclooxygénase, lipooxygénase et la eNOS non couplée) responsables de la production d'anions superoxydes (O_2^-). La superoxyde dismutase (SOD) accélère alors la dismutation de O_2^- en H_2O_2 capable d'induire une hyperpolarisation des cellules musculaires lisses par activation des canaux KCa^{2+} et donc la relaxation. L'implication de ce dernier mécanisme EDHF dépendant de la production de H_2O_2 est particulièrement intéressante compte tenu de l'implication du stress oxydatif dans la réduction de la biodisponibilité en NO dans la dépression. Une diminution de la disponibilité en NO est observée lorsque sa dégradation est accélérée par la production d' O_2^- . L' O_2^- séquestre le NO pour produire du peroxyde nitrite et de l' H_2O_2 . Alors que la relaxation dépendante du NO est sensible au stress oxydatif, la relaxation dépendante de l'EDHF est résistante au stress oxydatif. ***Nous pouvons donc faire l'hypothèse que l'altération de la relaxation dépendante du NO dans le modèle UCMS pourrait s'accompagner d'une augmentation du stress oxydatif et donc d'une augmentation de la production d' H_2O_2 . Bien que l' H_2O_2 induise des conséquences néfastes sur le remodelage vasculaire en favorisant la prolifération des cellules musculaires lisses, la dégradation de la matrice et la perméabilité des cellules endothéliales, il pourrait également agir en tant que vasodilatateur dépendant de l'endothélium pour compenser l'altération des mécanismes dépendants du NO.*** Cette hypothèse a été vérifiée dans l'étude présentée en ANNEXE 2, démontrant chez les animaux soumis à un épisode d'UCMS une altération de la relaxation

dépendante du NO partiellement compensée par un mécanisme dépendant de l'EDHF. *La relaxation dépendante de l'EDHF est abolie en présence de la catalase, une enzyme capable de dégrader l'H₂O₂ en H₂O et O₂, indiquant que la relaxation compensatoire observée dans l'UCMS est dépendante de l'H₂O₂.* Parallèlement, cette étude a mis en évidence une diminution au niveau de l'aorte de la production vasculaire de NO accompagnée par une augmentation de la production d'H₂O₂ chez les animaux soumis à l'UCMS.

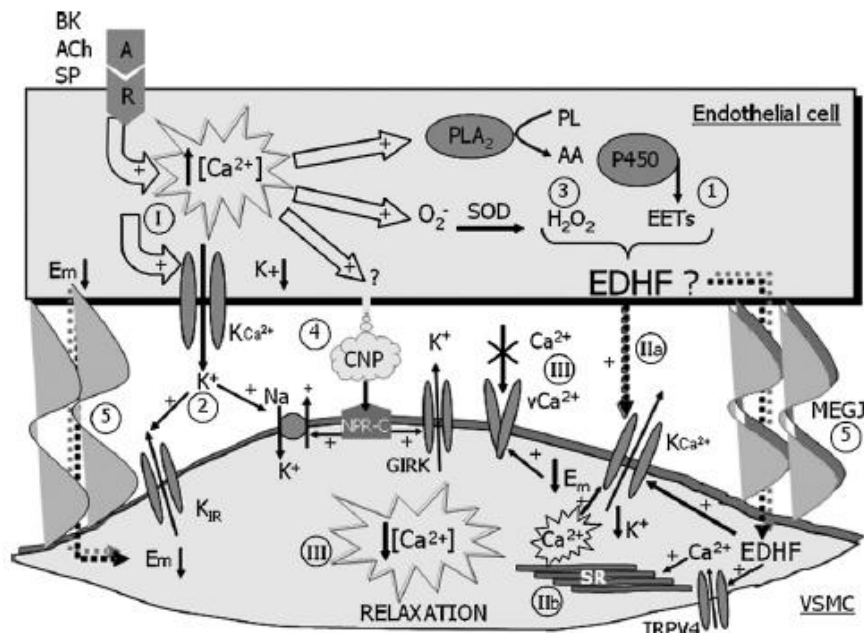


Figure 26: Les principaux candidats en tant que mécanisme EDHF. Les agonistes dépendants de l'endothélium (A) activent les récepteurs (R) des cellules endothéliales (EC) induisant l'entrée de Ca²⁺ extracellulaire et la libération de Ca²⁺ intracellulaire et la synthèse d'EDHF. Quatre principaux candidats capables d'induire une vasodilatation l'EDHF-dépendante ont été proposés : (1) Les produits de la Cytochrome P450 (CYP450), (2) des ions potassium (K⁺), (3) le peroxyde d'oxygène (H₂O₂) et (4) le peptide natriurétique de type C (CNP). PLA₂, phospholipase A₂; AA, arachidonic; PL, acid phospholipids EET, epoxyeicosatrienoic acids; K_{IR}, inward rectify K⁺-channels; O₂⁻, superoxyde anions; SOD, Superoxide dismutase; VSMC, Vascular smooth muscle cells; GIRK, G_T-dependent activation of G protein-gated K_{IR}-channels; MEGJ, Myoendothelial gap junctions. D'après Luksha et al, 2009 [623].

3/ LES ALTERATIONS MORPHOLOGIQUES DANS L'UCMS

L'altération de l'intégrité fonctionnelle de l'endothélium joue un rôle crucial dans tous les stades du développement d'athérosclérose, de l'initiation de la lésion à la rupture de la plaque. Cependant, dans notre étude (article 3), *bien que l'UCMS induise une altération de la relaxation dépendante de l'endothélium et plus spécifiquement du NO, ce dysfonctionnement endothélial n'est pas suffisant pour initier la formation d'athérosclérose.*

Etant donné les effets vasculaires protecteurs de l'endothélium, l'altération de la fonction vasomotrice de l'endothélium a une profonde implication dans le pronostic cardiovasculaire. Dans une étude prospective [624], la fonction endothéliale en réponse à différents stimuli (ACh, FMD) a été évaluée chez 147 patients qui ont ensuite été suivis sur une période moyenne de 6.7 ans. Les patients avec un dysfonctionnement endothélial ont montré un taux significativement plus élevé d'événements cardiovasculaires. Après ajustement des facteurs de risques cardiovasculaires et de la présence d'athérosclérose à l'angiographie, le dysfonctionnement endothélial reste un facteur de risque indépendant pour la progression d'athérosclérose et le taux d'événements cardiovasculaires. Dans une autre étude réalisée, 157 patients avec une obstruction légère des artères coronaires à l'angiographie ont été suivis sur une période de 28 mois [625]. Dans cette étude tous les événements cardiaques, incluant l'infarctus du myocarde et la mort cardiaque, sont observés chez tous les patients avec un dysfonctionnement vasomoteur endothélial sévère en réponse à l'ACh. La pertinence du pronostic d'une altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium médiée par le NO peut être liée au fait qu'un grand nombre de fonctions protectrices exercées par l'endothélium sain sont médiées par le NO. Une fonction vasomotrice anormale de l'endothélium, un indicateur de la diminution de la biodisponibilité en NO, peut donc refléter la présence d'un dysfonctionnement cellulaire important qui est activement impliqué dans la progression de l'athérosclérose et par conséquent affecte de façon néfaste les conséquences cardiovasculaires. Cependant, plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'absence de lésions morphologiques associées au dysfonctionnement endothélial dans notre modèle.

Tout d'abord, un dysfonctionnement endothélial, bien qu'il soit prédictif de lésions vasculaires, précède le développement d'athérosclérose [626]. L'évaluation de l'aorte de lapin par ultrasons a montré qu'une altération de la réponse vasodilatatrice de l'endothélium précède l'apparition à l'échocardiographie de lésions d'athérosclérose [627]. Au niveau des vaisseaux sanguins périphériques chez l'homme, une hypercholestérolémie ou d'autres facteurs de risque sont capables d'altérer la fonction vasodilatatrice de l'endothélium ; cependant, ceci est détecté avant le développement de lésions vasculaires [400, 628]. Ainsi, le déroulement temporel entre un dysfonctionnement endothélial et l'apparition de lésions vasculaires suggère que le dysfonctionnement endothélial observé dans notre modèle serait trop précoce pour initier la formation de lésions d'athérosclérose.

Par ailleurs, nous avons démontré que la diminution de la relaxation dépendante du NO était partiellement compensée par un mécanisme de relaxation dépendant de l'EDHF. La présence de ce mécanisme de compensation pourrait être responsable de l'absence de lésion vasculaire morphologique de type athérosclérose. Il serait intéressant d'étudier le délai d'apparition et l'évolution de la relaxation dépendante de l'EDHF au cours de procédures d'UCMS additionnelles. En effet le délai nécessaire à l'apparition de lésions d'athérosclérose pourrait être corrélé à l'épuisement de la relaxation compensatrice dépendante de l'EDHF. En effet, la présence d'un dysfonctionnement endothélial est un marqueur important mais le degré d'altération est également prédictif d'événements cardiovasculaires [625]. Dans des modèles animaux de diabète, la compensation de la diminution de la relaxation dépendante de l'endothélium est observée pendant la phase précoce de la maladie et a tendance à diminuer au cours du développement de la pathologie.

Finalement, la notion d'espèce et de lignée utilisée peut être discutée compte tenu des susceptibilités vasculaires qui varient de façon importante entre lignées. Dans une étude réalisée chez le rat, un protocole d'UCMS de quatre semaines est suffisant pour induire un dysfonctionnement endothélial associé à la formation d'athérosclérose [572]. Par ailleurs, la BALB/c utilisée dans notre étude est une lignée qui semble être résistante aux conséquences cardiovasculaires en comparaison à des lignées telles que la DBA/2j ou la C57. Chez la BALB/c, une période d'exposition d'au moins 6 mois à un régime alimentaire saturé en graisse, un facteur de risque cardiovasculaire connu pour induire une hypercholestérolémie et de l'athérosclérose, est nécessaire avant d'observer l'apparition de lésions précoces [629]. Ces résultats suggèrent que malgré la répétition des procédures d'UCMS sur une période de 5 mois, cette période d'exposition à l'UCMS n'était peut être pas suffisante pour induire l'apparition de lésions morphologiques précoces.

Les altérations cardiovasculaires dans l'UCMS

Nous avons illustré précédemment en quoi l'UCMS, en tant que facteur indépendant, était capable de reproduire les altérations physiologiques de la paroi vasculaire observées chez les patients dépressifs. Nous allons maintenant discuter de l'aptitude d'un traitement AD à reverser les altérations vasculaires produites par l'UCMS mais également à reverser les altérations comportementales en présence de facteurs de risque cardiovasculaire. En outre, nous discuterons du fait que les altérations vasculaires observées dans l'UCMS représentent un marqueur de trait ou d'état de la pathologie. Est ce que la réversion du phénotype dépressif par un traitement chronique à la fluoxétine abolit ses conséquences cardiovasculaires ? Par ailleurs, nous discuterons des mécanismes pouvant être impliqués dans la perte de réponse à la fluoxétine en présence d'un facteur de risque cardiovasculaire.

1/ MARQUEURS DE TRAIT OU D'ETAT

1.1 Pourquoi la fluoxétine ?

Parmi les AD pharmacologiques, l'ancienne génération d'AD tricycliques sont actuellement reconnus pour induire des conséquences cardiovasculaires néfastes et sont contre indiquées chez les patients souffrant de troubles cardiovasculaires. Plus spécifiquement, les TCA augmentent la fréquence cardiaque, entraînent de l'hypotension orthostatique, ralentissent la conductance cardiaque intraventriculaire et ont une activité anti-arythmique de type Ia (allongement du potentiel de repos et de l'intervalle QT à l'ECG). Au contraire, les SSRI qui sont également efficaces dans le traitement des symptômes dépressifs, ne présentent pas ou très peu d'effets cardiotoxiques. En effet, les SSRI ne présentent pas d'effet anti-cholinergique et les perturbations des rythmes cardiaques sont très rares. Bien que la capacité d'un traitement SSRI à réduire la morbidité et la mortalité cardiovasculaires des patients dépressifs n'ait pas clairement été démontrée, ils sont actuellement recommandés dans le traitement de la dépression des patients cardiaques. Par ailleurs, il semble que les SSRI possèdent des effets cardiovasculaires bénéfiques en modifiant certains facteurs de risques cardiovasculaires comportementaux associés à la dépression tels que la qualité de vie, la compliance médicale, l'alimentation et l'activité physique. Les SSRI semblent également avoir des effets protecteurs au niveau de la paroi vasculaire en inhibant l'activation

plaquettaire et en améliorant la fonction endothéliale. L'action des SSRI sur la recapture de la sérotonine ne se limite pas aux cellules nerveuses mais les SSRI inhibent également la recapture de la sérotonine au niveau des plaquettes et des cellules endothéliales. Cependant, malgré des effets bénéfiques sur la paroi vasculaire, il reste à déterminer si la normalisation de la fonction plaquettaire et endothéliale après un traitement SSRI résulte d'une amélioration des symptômes dépressifs ou d'un effet direct sur la paroi vasculaire.

Ainsi, étant donné les conséquences cardiovasculaires d'un traitement avec un TCA, nous avons choisi d'étudier les capacités d'un traitement chronique SSRI à améliorer les altérations endothéliales induites par l'UCMS. De plus, en vue des effets des SSRI sur les fonctions plaquettaires et endothéliales, il semblait particulièrement intéressant d'évaluer dans quelle mesure ces effets sur la fonction endothéliale sont dépendants de l'amélioration de l'état de type dépressif induit par l'UCMS. En d'autres termes, d'examiner si les altérations vasculaires dans l'UCMS représentent un marqueur de trait ou un marqueur d'état de la pathologie. La présence d'un marqueur d'état dépend de l'existence d'un épisode pathologique alors qu'un marqueur de trait est présent chez le patient avant, pendant et après l'épisode de dépression et n'est pas influencé par les fluctuations de l'état clinique ou les thérapeutiques. Parmi les différents composés SSRI, nous avons sélectionné la fluoxétine dont l'efficacité thérapeutique a déjà été démontrée dans le modèle UCMS.

1.2 Amélioration du pronostic vasculaire par la fluoxétine dans l'UCMS

Les résultats de nos expériences mettent en évidence différents effets de la fluoxétine sur les altérations de la fonction endothéliale induites par l'UCMS. Alors que la fluoxétine n'a pas d'effet sur l'expression des marqueurs endothéliaux à court terme et à long terme, elle améliore la réactivité vasculaire de l'endothélium. En effet, dans la lignée de souris DBA/2j, un prétraitement à la fluoxétine n'induit aucun effet sur l'augmentation de l'expression tardive du PAI-1 induit par l'UCMS (Article 1). Par contre, *les altérations de la relaxation dépendante de l'endothélium induites par l'UCMS sont améliorées par un traitement chronique à la fluoxétine* (Article 3). *Plus spécifiquement, la fluoxétine est capable de restaurer le taux de relaxation dépendant du NO au niveau contrôle (animaux non stressés). Ce constat qui semble paradoxal fait faire l'hypothèse d'un effet sélectif de la fluoxétine plutôt qu'un effet vasculaire général.*

Bien que des études aient mis en évidence une augmentation du taux de PAI-1 chez les patients dépressifs, les effets d'un traitement AD sur l'expression du PAI-1 n'ont jamais été explorés. Cependant, d'autres études ont été conduites sur les effets d'un traitement SSRI sur

l'expression de différents bio marqueurs endothéliaux et plaquettaires. Les résultats obtenus semblent alors dépendants du marqueur étudié, de l'AD utilisé et de la durée du traitement. Un traitement à la sertraline induit une diminution significative du taux de β -TG à partir de 6 semaines, un effet qui est accompagné d'une diminution du taux de E-sélectine et de P-sélectine après 12 semaines de traitement [630]. Par contre, la sertraline n'a pas d'effet sur l'expression de ICAM-1. Une autre étude a démontré une diminution significative du taux de CRP, d'IL-6 et de fibrinogène après 20 semaines de traitement à la sertraline [631]. Avec un traitement au citalopram de 12 semaines, aucun effet sur l'expression de la P-sélectine, de β -TG et de ICAM-1 n'est observé alors que le traitement induit une augmentation significative du taux de NO total [632]. L'implication clinique de ces différents résultats n'est pas claire compte tenu des conclusions contradictoires de ces études. L'absence d'effet dans notre étude sur l'expression du PAI-1 est un argument en faveur d'une action des AD indépendante de l'expression des marqueurs endothéliaux et plaquettaires. Cependant, l'absence d'effets pourrait également s'expliquer par l'évaluation de l'expression à long terme du traitement à la fluoxétine. Si l'effet d'un AD sur l'expression des marqueurs s'observe de façon concomitante au traitement et que cet effet est aboli à l'arrêt du traitement ce qui pourrait expliquer pourquoi aucun effet n'a été observé dans notre étude.

Au cours d'un dysfonctionnement endothélial, un traitement à la fluoxétine améliore la fonction vasomotrice de l'endothélium. Plus spécifiquement, un traitement à la fluoxétine est capable de reverser les effets de l'UCMS sur la relaxation dépendante de l'endothélium médiée par le NO. Nos résultats sont en cohérence avec ceux d'études réalisées chez les patients dépressifs : un traitement SSRI entraîne une augmentation significative du taux de NO endothélial [633] et normalise le dysfonctionnement endothélial en améliorant la vasodilatation dépendante de l'endothélium [631].

1.3 Effets vasculaires de la fluoxétine indépendant de l'état dépressif dans l'UCMS

Les résultats de notre étude sur les effets de la fluoxétine sur la fonction endothéliale laissent penser que les altérations de la fonction vasodilatatrice de l'endothélium dans le modèle UCMS représentent un marqueur d'état plutôt qu'un marqueur de trait de la pathologie. Lorsque l'état "dépressif-like" induit par l'UCMS est aboli, les altérations de la fonction endothéliale disparaissent (article 3). Cependant, il semble que l'effet de la fluoxétine soit indépendant de la présence d'un état dépressif puisque la fluoxétine *per se* induit une augmentation de la vasodilatation dépendante de l'endothélium médiée par le NO chez des animaux contrôles. Par ailleurs, il a été démontré que les SSRI pouvaient augmenter

la production de NO chez des sujets sains non dépressifs [634]. Les SSRI ont également des effets vasoactifs sur des anneaux d'artères de rats ou d'artère mammaires humaines [635]. Ainsi, in vitro, les SSRI augmentent la relaxation dépendante de l'endothélium et cet effet serait dépendant d'une stimulation de la mobilisation ou de la libération de Ca^{2+} [636]. Ces résultats indiquent que les effets comportementaux de la fluoxétine et son action sur la fonction vasodilatatrice de l'endothélium sont sous tendus par des mécanismes indépendants.

2/ FACTEUR D'INDUCTION DE RESISTANCE AUX AD

2.1 Hypercholestérolémie et résistance aux AD

L'efficacité thérapeutique des AD est insatisfaisante puisqu'entre 20 et 35% des patients ne présentent pas une rémission totale suite au traitement mais sont considérés comme non répondeurs, c'est-à-dire qu'ils ne présentent pas de diminution d'au moins 50% de leur score aux échelles d'intensité de la dépression. En outre, la résistance aux AD, fréquemment décrite chez les patients présentant un syndrome coronarien, est associée à une augmentation des risques de morbidité et de mortalité cardiovasculaires. La résistance aux AD chez les patients avec une pathologie vasculaire pourrait alors représenter une forme de dépression qualitativement différente de celle observée chez les patients qui répondent au traitement. Les mécanismes responsables de la résistance aux AD chez ce type de patients ne sont pas clairs mais il semble que la présence de marqueurs biologiques identifiés en tant que facteurs de risques cardiovasculaires pourrait être sous jacente à l'absence de réponse aux AD. Parmi ces facteurs, on peut citer les facteurs de risque cardiovasculaire traditionnels dont la présence est associée à une augmentation du taux de résistance aux AD [474-476]. Plus spécifiquement l'hypercholestérolémie est considérée comme un facteur prédictif de résistance aux AD et de façon indépendant à la présence d'autres facteurs de risques [477, 478].

La question du traitement des patients dépressifs souffrant de troubles cardiovasculaires est rendu complexe par ce phénomène de résistance aux AD induit par la présence de facteurs de risque cardiovasculaire. Le dernier objectif du présent travail était de modéliser la résistance aux AD en présence de facteurs de risques cardiovasculaires. Etant donné qu'une hypercholestérolémie semble le facteur de risque le plus prédictif, nous avons choisi d'exposer les animaux à un régime alimentaire riche en lipide, un facteur de risque cardiovasculaire capable d'induire une hypercholestérolémie et de l'athérosclérose. Par ailleurs, chez les souris BALB/c, une exposition à ce régime sur une période de 6 mois est

nécessaire pour induire l'apparition de lésions d'athérosclérose précoces. Ainsi, deux procédures d'UCMS sur une période de 6 mois associées ou non à un régime alimentaire riche en lipide ont été réalisées de façon à identifier les capacités de la fluoxétine à reverser les altérations comportementales induites par l'UCMS.

2.2 Association de l'UCMS avec un régime lipidique : modèle de résistance à la fluoxétine

Nos résultats indiquent qu'à travers plusieurs dimensions comportementales, la fluoxétine ne produit pas ces effets habituels, c'est-à-dire qu'elle ne reverse pas les altérations comportementales induites par deux protocoles successifs d'UCMS chez des animaux soumis à un régime alimentaire saturé en graisse. Un régime alimentaire saturé en graisse empêche la fluoxétine de reverser les altérations comportementales induites par l'UCMS. Ces effets sont observés sur la détérioration de l'état du pelage, sur la motivation pour le comportement de toilettage et des comportements autocentrés (splash test) et sur la présence d'un phénotype anhédonique (reward maze test). Ces résultats indiquent que l'administration d'un régime saturé en graisse, un facteur de risque cardiovasculaire capable d'induire une hypercholestérolémie et de l'athérosclérose, induit une résistance à la fluoxétine. Ainsi, cette étude a permis de développer un modèle animal de résistance aux AD lié à une entité sub-nosographique de la dépression, en associant l'UCMS à un facteur de risque cardiovasculaire, plus spécifiquement un régime alimentaire riche en lipide.

Cependant, cette étude présente certaines limites : 1) Les effets de la nourriture riche en lipide sur l'état du pelage des animaux rend les résultats difficile d'interprétation ; 2) le test d'anhédonie utilisé dans cette étude implique le comportement alimentaire et donc la palatabilité des différentes nourritures peut entrer en jeu. Il serait donc intéressant de généraliser les résultats avec d'autres tests d'anhédonie qui n'impliquent pas le comportement alimentaire (comportement sexuel également considéré comme comportement hédonique) ; 3) Nous n'avons pas vérifié si une hypercholestérolémie est sous-jacente à la résistance à la fluoxétine induit par le régime alimentaire riche en lipide ; 4) L'absence d'effet de la fluoxétine en présence du régime alimentaire riche en lipide pourrait uniquement représenter un shift dans la courbe dose-réponse. Il serait donc intéressant de généraliser les résultats obtenus à d'autres AD et à d'autres facteurs de risques cardiovasculaires.

2.3 Les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la résistance aux AD

Les mécanismes par lesquels une hypercholestérolémie induit une dépression résistante aux AD n'est pas connu. Cependant, plusieurs hypothèses peuvent être avancées. En effet, une augmentation de marqueurs inflammatoires ainsi que des dérégulations de l'axe HPA et du SNA ont été associées avec une diminution de la réponse à un grand nombre d'AD. D'autre part, l'exposition chronique à un régime alimentaire riche en lipide ou bien une hypercholestérolémie, induisant une perte de la réponse aux AD, sont également associés à une augmentation de marqueurs inflammatoires et des dérégulations de l'axe HPA [480-482].

De nombreuses études ont démontré une réponse exagérée de l'axe HPA au stress chez des rats exposés à un régime alimentaire riche en lipide [637] [638]. Tannenbaum et al. [637] ont reporté que l'activité de l'axe HPA basal ou en réponse au stress est altéré par l'exposition chronique à un régime riche en lipide. Les animaux présentent une augmentation du niveau basal de corticostérone, une augmentation de la libération d'ACTH en réponse au stress. Par ailleurs, d'autres études ont montré qu'un traitement répété à l'ACTH chez le rat pouvait bloquer l'effet AD de l'imipramine dans le test de la nage forcée [639]. Ces observations suggèrent que le régime alimentaire riche en lipide associé à l'UCMS pourrait amplifier les altérations de l'axe HPA observées dans l'UCMS et par ce biais induire une diminution de la réponse à la fluoxétine. L'exposition chronique à un régime riche en lipide ou une hypercholestérolémie sont également associés à une augmentation de cytokines / chemokines inflammatoires [640, 641], elles-mêmes associées à une perte de réponse aux AD. Les conséquences d'une inflammation systémique sur la réponse aux AD peuvent être médiées soit directement par l'augmentation du niveau de marqueurs inflammatoire soit indirectement par l'action des cytokines proinflammatoires sur l'activation de l'axe HPA. Finalement, une hypercholestérolémie peut également réduire la fluidité des cellules membranaires et la perméabilité membranaire induisant des modifications des systèmes de second messager essentiel aux neurotransmetteurs au niveau du SNC [642]. La modification de l'action des neurotransmetteurs induit par une hypercholestérolémie pourrait expliquer la résistance à la fluoxétine dans notre étude puisque les modifications adaptatives responsables de l'effet thérapeutique des AD dépendent essentiellement de la disponibilité des monoamines au niveau synaptique.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier la relation entre la dépression et les maladies cardiovasculaires via l'utilisation du modèle UCMS dans le but de valider des modèles animaux capables de reproduire 1) les altérations cardiovasculaires observées chez les patients dépressifs et 2) la résistance aux AD observée chez les patients dépressifs présentant des facteurs de risques cardiovasculaires. Bien que les résultats obtenus au cours de nos études nécessitent de futures investigations afin d'améliorer nos modèles, ils représentent une base de travail intéressante dans la découverte des mécanismes physiopathologiques sous jacents à ces altérations.

Dans le but de répondre à notre premier objectif, nous avons étudié les conséquences de l'UCMS en tant que facteurs de risque cardiovasculaire indépendants sur la fonction endothéliale et la formation d'athérosclérose. Deux principaux résultats ressortent de ces études. Dans un premier temps, chez la souche DBA/2j, alors que l'UCMS n'a pas de conséquence à court terme, il a induit une altération retardée de l'expression du PAI-1 indiquant des anomalies tardives de la fibrinolyse induite par l'UCMS. Par ailleurs, dans la souche BALB/c, l'UCMS a induit des altérations à court terme de la fonction endothéliale (altération de la vasodilatation endothélium- et NO-dépendante) qui persistent au cours de la répétition des épisodes d'UCMS. Cependant, ces altérations de la fonction endothéliale ne sont pas suffisantes pour induire la formation d'athérosclérose. Alors que la dépression est considérée comme un facteur de risque cardiovasculaire indépendant, dans notre modèle l'UCMS peut être considéré comme un facteur indépendant pour la formation de lésions physiologiques mais pas pour la formation de lésions morphologiques. Ces résultats, discutés précédemment, posent de nombreuses interrogations.

Dans un premier temps, afin de vérifier que le profil de type dépressif plutôt que l'effet du stress lui-même dans le modèle UCMS est responsable des altérations vasculaires physiologiques observées, il serait intéressant d'étudier l'effet de la souche sur ces altérations en fonction du profil comportemental induit par l'UCMS. La fonction vasodilatatrice dépendante de l'endothélium pourra être testée chez la souche BDA/2j tandis que parallèlement l'expression à court et long terme des marqueurs MMP-9, ICAM-1, VCAM-1 et PAI-1 pourra être analysée chez les BALB/c. Il serait également intéressant dans le but de répondre à cette question, d'étudier les altérations de la paroi vasculaire dans un modèle animal de dépression non basé sur l'exposition des animaux au stress tel que le modèle de bulbectomie olfactive ou certains modèles génétiques.

Dans un second temps, caractériser plus précisément le dysfonctionnement endothélial observé dans l'UCMS permettrait de mieux comprendre les mécanismes vasculaires impliqués dans l'UCMS. La caractérisation de l'effet préférentiel de l'UCMS sur l'expression de PAI-1 permettrait de définir les voies d'activation spécifiques induites par l'UCMS. Il serait déterminant de définir le lien avec le métabolisme du BDNF, en corrélant l'augmentation de l'expression du PAI-1 à une diminution de l'expression du BDNF à la fois au niveau périphérique et au niveau central (dans les régions d'intérêt de la dépression). Par ailleurs, les statines (inhibiteur de la HMG-CoA réductase), utilisées pour diminuer le taux de cholestérol sanguin afin de prévenir les risques cardiovasculaires, ont la capacité d'inhiber le PAI-1 et de stimuler le système tPA-plasminogène [643, 644]. Étant donné le rôle du système tPA-plasminogène dans le clivage du pro-BDNF en BDNF, ces observations impliquent que les statines pourraient en conséquence également agir sur l'expression du BDNF. L'utilisation d'un traitement aux statines dans le modèle UCMS permettrait d'inhiber l'expression du PAI-1 afin d'évaluer les conséquences sur le BDNF et probablement des effets AD. Ces hypothèses présentent des implications importantes pour le traitement de la dépression puisque si les statines agissent à la fois au niveau du système de fibrinolyse et au niveau des facteurs neurotrophiques, elles auraient l'avantage de posséder à la fois un effet protecteur sur le système cardiovasculaire et un effet antidépresseur [608].

En ce qui concerne les mécanismes de relaxation de l'endothélium dépendant du NO, il serait pertinent de déterminer dans quelle mesure ces altérations induites par l'UCMS sont dépendantes de l'eNOS et de la formation de ROS. Pour déterminer si les altérations de l'eNOS sont responsables d'une diminution de la biodisponibilité en NO, l'expression de l'eNOS total pourra être analysée au niveau de l'aorte par western blot mais également l'expression d'eNOS phosphorylée, modifications post-transcriptionnelles majeures. Le niveau de cofacteur de l'eNOS, le BH4 pourra également être analysé au niveau de l'aorte afin de déterminer le couplage de l'eNOS. En ce qui concerne le stress oxydatif, pourront être analysés le niveau de superoxyde au niveau de l'aorte par une technique de spectroscopie par ESC (electron spin resonance) ou l'expression des enzymes responsables de la formation de superoxydes tels que la NADPH oxydase par western blot au niveau de l'aorte. Finalement pourront être testés les systèmes antioxydants via leur expression (western blot) et leur activité (fluorométrie) incluant la Cu/Zn SOD (isoforme cytosolique) et la Mn/Zn SOD (isoforme mitochondrial). Par ailleurs, nous avons démontré que les altérations de la relaxation dépendante du NO étaient partiellement compensées par un mécanisme dépendant

de l'EDHF au cours de l'UCMS. Bien qu'il semble que ce mécanisme EDHF soit représenté par une production d' H_2O_2 , également impliquée dans l'activation des voies du stress oxydatif, il serait nécessaire de déterminer plus spécifiquement les mécanismes d'activation cellulaire responsables de la production d' H_2O_2 mais également de tester la présence d'autres mécanismes EDHF-dépendants tels que les canaux potassiques en utilisant une combinaison spécifique d'inhibiteur de IKCa (CTX) et de SKCa (Apa) ou les produits du cytochrome P450 en utilisant un inhibiteur de la synthèse d'EETs, le 14,15-EEZE. Finalement, il serait déterminant d'évaluer l'évolution des mécanismes dépendants de l'EDHF au cours du temps en multipliant les épisodes d'UCMS car une hypothèse serait que la présence de ce mécanisme en contribuant au maintien de la fonction endothéliale empêche la formation de lésions vasculaires. En effet, les modifications observées dans notre modèle suite à deux épisodes d'UCMS ne sont pas suffisantes pour induire la formation d'athérosclérose ce qui pose la question de l'UCMS en tant que facteur indépendant pour la formation de lésion morphologique ou en tant que facteur de confusion. Pour identifier l'UCMS en tant que facteur indépendant, il sera possible de tester 1) l'effet de la souche étant donné les variations de sensibilité vasculaire des différentes souches de souris, 2) la multiplication des épisodes d'UCMS en évaluant parallèlement à la formation d'athérosclérose, l'évolution du dysfonctionnement endothélial et 3) les effets retardés de l'UCMS puisque nous avons démontré que l'UCMS, malgré l'absence sur une longue période d'événements stressants pouvait induire des altérations vasculaires. Enfin, pour tester l'UCMS en tant que facteur de confusion, l'UCMS pourra être couplé à d'autres facteurs de risque cardiovasculaires, par exemple en utilisant des souches de souris génétiquement obèses ou diabétiques (ob/ob, db/db ou Apo E^{-/-}).

Cette première série d'investigations permettra de mieux caractériser et d'améliorer notre modèle afin de valider la procédure expérimentale (souche, nombre d'épisodes d'UCMS,..) la mieux adaptée pour étudier les mécanismes physiopathologiques activés en amont du dysfonctionnement endothélial et de la formation d'athérosclérose. Parmi ces mécanismes physiopathologiques, on peut citer le système sérotoninergique central, l'axe HPA et le SNA. Les résultats obtenus avec la fluoxétine laissent penser que l'action de la fluoxétine pour restaurer la relaxation dépendante de l'endothélium est indépendante des effets de l'UCMS indiquant que les altérations du système sérotoninergique, préalablement mis en évidence dans le modèle UCMS [645] ne seraient pas responsables des altérations de la fonction endothéliale. Afin de vérifier l'implication d'un dysfonctionnement de l'axe HPA

dans les altérations vasculaires observées dans l'UCMS, un traitement à la métyrapone, un inhibiteur de la synthèse des glucocorticoïdes, pourra être administré à des animaux soumis à l'UCMS. Si l'augmentation du niveau de glucocorticoïdes observée dans le modèle UCMS est responsable des altérations de la vasodilatation dépendante de l'endothélium et du NO, alors un traitement à la métyrapone devrait normaliser les altérations observées dans l'UCMS. Par ailleurs, étant donné que la métyrapone en soi n'a pas d'effet vasodilatateur, l'effet de la métyrapone pourra être interprété comme dépendant des effets de l'UCMS sur la fonction endothéliale. Cette hypothèse est soutenue par une étude clinique qui a démontré que la métyrapone était capable de rétablir les perturbations de la fonction endothéliale mesurées par la technique FMD chez les patients dépressifs [403]. Par ailleurs, une augmentation de la régulation sympathique responsable d'une augmentation de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle a été mise en évidence dans le modèle UCMS chez le rat. Etant donné que de telles altérations peuvent endommager l'endothélium et altérer la vasomotion dépendante de l'endothélium, l'utilisation de β -bloquant tel que le propranolol (inhibiteur des récepteurs β -adrénergique) permettrait d'évaluer dans quelle mesure la stimulation sympathique serait responsable des altérations de la fonction endothéliale observées dans notre modèle UCMS.

Dans le but de répondre à notre second objectif, nous avons étudié la capacité d'un traitement à la fluoxétine à contrecarrer l'état dépressif induit par l'UCMS en présence d'un facteur de risque cardiovasculaire, un régime alimentaire riche en lipide. Cette étude a permis de développer un modèle de résistance aux AD induit par la présence d'un facteur de risque cardiovasculaire. Cependant, afin de valider ce modèle en tant que modèle de dépression résistante aux AD, il semble nécessaire de généraliser ces résultats à d'autres AD incluant d'autres SSRI ainsi que d'autres classes d'AD mais également à d'autres facteurs de risques cardiovasculaires. Par la suite ce modèle permettra d'étudier les mécanismes physiopathologiques à la base de la résistance aux AD tels que les anomalies de l'axe HPA ou les systèmes de neurotransmissions centraux. La réponse au traitement pourrait dans un premier temps être corrélée au niveau de corticostérone sanguin ainsi qu'au niveau de sérotonine central, dans le modèle UCMS couplé à un facteur de risque cardiovasculaire. Par la suite pourront être utilisés des inhibiteurs des glucocorticoïdes tels que la métyrapone ou des agonistes sérotoninergiques dans le but d'examiner l'implication exacte de chacune de ces dérégulations.

BIBLIOGRAPHIE

1. Vale S. Psychosocial stress and cardiovascular diseases. *Postgrad Med J*, 2005; **81**(957): p. 429-35.
2. Carney RM and Freedland KE. Treatment-resistant depression and mortality after acute coronary syndrome. *Am J Psychiatry*, 2009; **166**(4): p. 410-7.
3. Nestler EJ, Gould E, Manji H, Buncan M, Duman RS, Greshenfeld HK, Hen R, Koester S, Lederhendler I, Meaney M, Robbins T, Winsky L and Zalcman S. Preclinical models: status of basic research in depression. *Biol Psychiatry*, 2002; **52**(6): p. 503-28.
4. Hansson GK, Robertson AK and Soderberg-Naucler C. Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol*, 2006; **1**: p. 297-329.
5. Murray CJ and Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet*, 1997; **349**(9063): p. 1436-42.
6. Murray CJ and Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet*, 1997; **349**(9064): p. 1498-504.
7. Mathers CD and Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*, 2006; **3**(11): p. e442.
8. Demyttenaere K and De Fruyt J. Getting what you ask for: on the selectivity of depression rating scales. *Psychother Psychosom*, 2003; **72**(2): p. 61-70.
9. Kessler RC. The effects of stressful life events on depression. *Annu Rev Psychol*, 1997; **48**: p. 191-214.
10. Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Koretz D, Merikangas KR, Rush AJ, Walters EE and Wang PS. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *Jama*, 2003; **289**(23): p. 3095-105.
11. Frank E and Thase ME. Natural history and preventative treatment of recurrent mood disorders. *Annu Rev Med*, 1999; **50**: p. 453-68.
12. Frank E, Kupfer DJ, Perel JM, Cornes C, Jarrett DB, Mallinger AG, Thase ME, McEachran AB and Grochocinski VJ. Three-year outcomes for maintenance therapies in recurrent depression. *Arch Gen Psychiatry*, 1990; **47**(12): p. 1093-9.
13. Mann JJ. Neurobiology of suicidal behaviour. *Nat Rev Neurosci*, 2003; **4**(10): p. 819-28.
14. Gold PW, Goodwin FK and Chrousos GP. Clinical and biochemical manifestations of depression. Relation to the neurobiology of stress (2). *N Engl J Med*, 1988; **319**(7): p. 413-20.
15. Gold PW, Goodwin FK and Chrousos GP. Clinical and biochemical manifestations of depression. Relation to the neurobiology of stress (1). *N Engl J Med*, 1988; **319**(6): p. 348-53.
16. Pratt LA, Ford DE, Crum RM, Armenian HK, Gallo JJ and Eaton WW. Depression, psychotropic medication, and risk of myocardial infarction. Prospective data from the Baltimore ECA follow-up. *Circulation*, 1996; **94**(12): p. 3123-9.
17. Barefoot JC, Helms MJ, 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.
18. Penninx BW, Leveille S, Ferrucci L, van Eijk JT and Guralnik JM. Exploring the effect of depression on physical disability: longitudinal evidence from the established populations for epidemiologic studies of the elderly. *Am J Public Health*, 1999; **89**(9): p. 1346-52.
19. Barefoot JC and Schroll M. Symptoms of depression, acute myocardial infarction, and total mortality in a community sample. *Circulation*, 1996; **93**(11): p. 1976-80.

20. Penninx BW, Beekman AT, 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.
21. Penninx BW, Guralnik JM, 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.
22. Anda R, Williamson D, Jones D, Macera C, Eaker E, Glassman A and Marks J. Depressed affect, hopelessness, and the risk of ischemic heart disease in a cohort of U.S. adults. *Epidemiology*, 1993; **4**(4): p. 285-94.
23. Ariyo AA, Haan M, Tangen CM, Rutledge JC, Cushman M, Dobs A and Furberg CD. Depressive symptoms and risks of coronary heart disease and mortality in elderly Americans. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *Circulation*, 2000; **102**(15): p. 1773-9.
24. Ford DE, Mead LA, 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.
25. Frasure-Smith N, Lesperance F and Talajic M. Depression and 18-month prognosis after myocardial infarction. *Circulation*, 1995; **91**(4): p. 999-1005.
26. Frasure-Smith N, Lesperance F and Talajic M. Depression following myocardial infarction. Impact on 6-month survival. *Jama*, 1993; **270**(15): p. 1819-25.
27. Kaufman MW FJ, Sussman EJ, Reed JF, Einfalt JM, Rodgers JK, et al. Relation between myocardial infarction, depression, hostility, and death. *Am Heart J*, 1999; **138**: p. 549-554.
28. Jiang W, Alexander J, Christopher E, Kuchibhatla M, Gauden LH, Cuffe MS, Blazing MA, Davenport C, Califf RM, Krishnan RR and O'Connor CM. Relationship of depression to increased risk of mortality and rehospitalization in patients with congestive heart failure. *Arch Intern Med*, 2001; **161**(15): p. 1849-56.
29. Lesperance F, Frasure-Smith N, Talajic M and Bourassa MG. Five-year risk of cardiac mortality in relation to initial severity and one-year changes in depression symptoms after myocardial infarction. *Circulation*, 2002; **105**(9): p. 1049-53.
30. Musselman DL, Evans DL and Nemeroff CB. The relationship of depression to cardiovascular disease: epidemiology, biology, and treatment. *Arch Gen Psychiatry*, 1998; **55**(7): p. 580-92.
31. Rozanski A, Blumenthal JA and Kaplan J. Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. *Circulation*, 1999; **99**(16): p. 2192-217.
32. O'Connor C M, Gurbel PA and Serebruany VL. Depression and ischemic heart disease. *Am Heart J*, 2000; **140**(4 Suppl): p. 63-9.
33. Smith TW and Ruiz JM. Psychosocial influences on the development and course of coronary heart disease: current status and implications for research and practice. *J Consult Clin Psychol*, 2002; **70**(3): p. 548-68.
34. Joynt KE, Whellan DJ and O'Connor CM. Depression and cardiovascular disease: mechanisms of interaction. *Biol Psychiatry*, 2003; **54**(3): p. 248-61.
35. Grippo AJ and Johnson AK. Stress, depression and cardiovascular dysregulation: a review of neurobiological mechanisms and the integration of research from preclinical disease models. *Stress*, 2009; **12**(1): p. 1-21.
36. Johnson AK and Grippo AJ. Sadness and broken hearts: neurohumoral mechanisms and co-morbidity of ischemic heart disease and psychological depression. *J Physiol Pharmacol*, 2006; **57 Suppl 11**: p. 5-29.

37. Carney RM and Freedland KE. Depression, mortality, and medical morbidity in patients with coronary heart disease. *Biol Psychiatry*, 2003; **54**(3): p. 241-7.
38. Carney RM and Freedland KE. Treatment-resistant depression and sudden cardiac death. *J Am Coll Cardiol*, 2009; **54**(10): p. 958; author reply 958-9.
39. Roose SP and Miyazaki M. Pharmacologic treatment of depression in patients with heart disease. *Psychosom Med*, 2005; **67 Suppl 1**: p. S54-7.
40. Von Ruden AE, Adson DE and Kotlyar M. Effect of selective serotonin reuptake inhibitors on cardiovascular morbidity and mortality. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2008; **13**(1): p. 32-40.
41. Hackett TP, Cassem NH and Wishnie HA. The coronary-care unit. An appraisal of its psychologic hazards. *N Engl J Med*, 1968; **279**(25): p. 1365-70.
42. Cassem NH and Hackett TP. Psychiatric consultation in a coronary care unit. *Ann Intern Med*, 1971; **75**(1): p. 9-14.
43. Cay EL, Vetter N, Philip AE and Dugard P. Psychological reactions to a coronary care unit. *J Psychosom Res*, 1972; **16**(6): p. 437-47.
44. Schleifer SJ, Macari-Hinson MM, 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.
45. Forrester AW, Lipsey JR, Teitelbaum ML, DePaulo JR and Andrzejewski PL. Depression following myocardial infarction. *Int J Psychiatry Med*, 1992; **22**(1): p. 33-46.
46. Lesperance F, Frasere-Smith N and Talajic M. Major depression before and after myocardial infarction: its nature and consequences. *Psychosom Med*, 1996; **58**(2): p. 99-110.
47. Carney RM, Rich MW, Tevelde A, Saini J, Clark K and Jaffe AS. Major depressive disorder in coronary artery disease. *Am J Cardiol*, 1987; **60**(16): p. 1273-5.
48. Gonzalez MB, Snyderman TB, Colket JT, Arias RM, Jiang JW, O'Connor CM and Krishnan KR. Depression in patients with coronary artery disease. *Depression*, 1996; **4**(2): p. 57-62.
49. Hance M, Carney RM, 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.
50. Freedland KE, Rich MW, Skala JA, Carney RM, Davila-Roman VG and Jaffe AS. Prevalence of depression in hospitalized patients with congestive heart failure. *Psychosom Med*, 2003; **65**(1): p. 119-28.
51. Rudisch B and Nemeroff CB. Epidemiology of comorbid coronary artery disease and depression. *Biol Psychiatry*, 2003; **54**(3): p. 227-40.
52. Lloyd GG and Cawley RH. Psychiatric morbidity in men one week after first acute myocardial infarction. *Br Med J*, 1978; **2**(6150): p. 1453-4.
53. Travella JI, Forrester AW, Schultz SK and Robinson RG. Depression following myocardial infarction: a one year longitudinal study. *Int J Psychiatry Med*, 1994; **24**(4): p. 357-69.
54. Robinson RG, Starr LB, Kubos KL and Price TR. A two-year longitudinal study of post-stroke mood disorders: findings during the initial evaluation. *Stroke*, 1983; **14**(5): p. 736-41.
55. Robinson RG, Bolduc PL and Price TR. Two-year longitudinal study of poststroke mood disorders: diagnosis and outcome at one and two years. *Stroke*, 1987; **18**(5): p. 837-43.
56. Pohjasvaara T, Leppavuori A, Siira I, Vataja R, Kaste M and Erkinjuntti T. Frequency and clinical determinants of poststroke depression. *Stroke*, 1998; **29**(11): p. 2311-7.

57. Gainotti G, Azzoni A and Marra C. Frequency, phenomenology and anatomical-clinical correlates of major post-stroke depression. *Br J Psychiatry*, 1999; **175**: p. 163-7.
58. House A, Dennis M, Mogridge L, Warlow C, Hawton K and Jones L. Mood disorders in the year after first stroke. *Br J Psychiatry*, 1991; **158**: p. 83-92.
59. Burvill PW, Johnson GA, Jamrozik KD, Anderson CS, Stewart-Wynne EG and Chakera TM. Prevalence of depression after stroke: the Perth Community Stroke Study. *Br J Psychiatry*, 1995; **166**(3): p. 320-7.
60. Andersen G, Vestergaard K, Riis J and Lauritzen L. Incidence of post-stroke depression during the first year in a large unselected stroke population determined using a valid standardized rating scale. *Acta Psychiatr Scand*, 1994; **90**(3): p. 190-5.
61. Robinson RG and Szetela B. Mood change following left hemispheric brain injury. *Ann Neurol*, 1981; **9**(5): p. 447-53.
62. Morris PL, Robinson RG, Raphael B and Hopwood MJ. Lesion location and poststroke depression. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 1996; **8**(4): p. 399-403.
63. Robinson RG, Starr LB, Lipsey JR, Rao K and Price TR. A two-year longitudinal study of poststroke mood disorders. In-hospital prognostic factors associated with six-month outcome. *J Nerv Ment Dis*, 1985; **173**(4): p. 221-6.
64. MacHale SM, O'Rourke SJ, Wardlaw JM and Dennis MS. Depression and its relation to lesion location after stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1998; **64**(3): p. 371-4.
65. Gonzalez-Torrecillas JL, Mendlewicz J and Lobo A. Effects of early treatment of poststroke depression on neuropsychological rehabilitation. *Int Psychogeriatr*, 1995; **7**(4): p. 547-60.
66. Carson AJ, MacHale S, Allen K, Lawrie SM, Dennis M, House A and Sharpe M. Depression after stroke and lesion location: a systematic review. *Lancet*, 2000; **356**(9224): p. 122-6.
67. Carney RM, Rich MW, Freedland KE, Saini J, teVelde A, Simeone C and Clark K. Major depressive disorder predicts cardiac events in patients with coronary artery disease. *Psychosom Med*, 1988; **50**(6): p. 627-33.
68. Ahern DK, Gorkin L, Anderson JL, Tierney C, Hallstrom A, Ewart C, Capone RJ, Schron E, Kornfeld D, Herd JA and et al. Biobehavioral variables and mortality or cardiac arrest in the Cardiac Arrhythmia Pilot Study (CAPS). *Am J Cardiol*, 1990; **66**(1): p. 59-62.
69. Ladwig KH, Kieser M, Konig J, Breithardt G and Borggrefe M. Affective disorders and survival after acute myocardial infarction. Results from the post-infarction late potential study. *Eur Heart J*, 1991; **12**(9): p. 959-64.
70. Frasure-Smith N. In-hospital symptoms of psychological stress as predictors of long-term outcome after acute myocardial infarction in men. *Am J Cardiol*, 1991; **67**(2): p. 121-7.
71. Kennedy GJ, Hofer MA, Cohen D, Shindlecker R and Fisher JD. Significance of depression and cognitive impairment in patients undergoing programmed stimulation of cardiac arrhythmias. *Psychosom Med*, 1987; **49**(4): p. 410-21.
72. Carney RM, Blumenthal JA, Catellier D, Freedland KE, Berkman LF, Watkins LL, Czajkowski SM, Hayano J and Jaffe AS. Depression as a risk factor for mortality after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*, 2003; **92**(11): p. 1277-81.
73. Carney RM, Freedland KE, Jaffe AS, Frasure-Smith N, Lesperance F, Sheps DS, Glassman AH, O'Connor CM, Blumenthal JA, Kaufmann PG and Czajkowski SM. Depression as a risk factor for post-MI mortality. *J Am Coll Cardiol*, 2004; **44**(2): p. 472; author reply 473-4.

74. Booth-Kewley S and Friedman HS. Psychological predictors of heart disease: a quantitative review. *Psychol Bull*, 1987; **101**(3): p. 343-62.
75. Matthews KA. Coronary heart disease and type A behaviors: update on and alternative to the Booth-Kewley and Friedman (1987) quantitative review. *Psychol Bull*, 1988; **104**(3): p. 373-80.
76. Weeke A, Kastrup M and Dupont A. Long-stay patients in Danish psychiatric hospitals. *Psychol Med*, 1979; **9**(3): p. 551-66.
77. Tsuang MT, Woolson RF and Fleming JA. Premature deaths in schizophrenia and affective disorders. An analysis of survival curves and variables affecting the shortened survival. *Arch Gen Psychiatry*, 1980; **37**(9): p. 979-83.
78. Norton B and Whalley LJ. Mortality of a lithium-treated population. *Br J Psychiatry*, 1984; **145**: p. 277-82.
79. Rabins PV, Harvis K and Koven S. High fatality rates of late-life depression associated with cardiovascular disease. *J Affect Disord*, 1985; **9**(2): p. 165-7.
80. Sharma R and Markar HR. Mortality in affective disorder. *J Affect Disord*, 1994; **31**(2): p. 91-6.
81. Aromaa A, Raitasalo R, Reunanen A, Impivaara O, Heliovaara M, Knekt P, Lehtinen V, Joukamaa M and Maatela J. Depression and cardiovascular diseases. *Acta Psychiatr Scand Suppl*, 1994; **377**: p. 77-82.
82. Ferketich AK, Schwartzbaum JA, 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.
83. Mendes de Leon CF, Krumholz HM, Seeman TS, Vaccarino V, Williams CS, Kasl SV and Berkman LF. Depression and risk of coronary heart disease in elderly men and women: New Haven EPESE, 1982-1991. Established Populations for the Epidemiologic Studies of the Elderly. *Arch Intern Med*, 1998; **158**(21): p. 2341-8.
84. Wassertheil-Smoller S, Applegate WB, Berge K, Chang CJ, Davis BR, Grimm R, Jr., Kostis J, Pressel S and Schron E. Change in depression as a precursor of cardiovascular events. SHEP Cooperative Research Group (Systoloc Hypertension in the elderly). *Arch Intern Med*, 1996; **156**(5): p. 553-61.
85. 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.
86. Van der Kooy K, van Hout H, Marwijk H, Marten H, Stehouwer C and Beekman A. Depression and the risk for cardiovascular diseases: systematic review and meta analysis. *Int J Geriatr Psychiatry*, 2007; **22**(7): p. 613-26.
87. Rozanski A, Blumenthal JA, Davidson KW, Saab PG and Kubzansky L. The epidemiology, pathophysiology, and management of psychosocial risk factors in cardiac practice: the emerging field of behavioral cardiology. *J Am Coll Cardiol*, 2005; **45**(5): p. 637-51.
88. Ohira T, Iso H, Satoh S, Sankai T, Tanigawa T, Ogawa Y, Imano H, Sato S, Kitamura A and Shimamoto T. Prospective study of depressive symptoms and risk of stroke among japanese. *Stroke*, 2001; **32**(4): p. 903-8.
89. Jonas BS and Mussolino ME. Symptoms of depression as a prospective risk factor for stroke. *Psychosom Med*, 2000; **62**(4): p. 463-71.
90. Blumenthal JA. Depression and coronary heart disease: association and implications for treatment. *Cleve Clin J Med*, 2008; **75 Suppl 2**: p. S48-53.
91. Thomas AJ, Kalaria RN and O'Brien JT. Depression and vascular disease: what is the relationship? *J Affect Disord*, 2004; **79**(1-3): p. 81-95.
92. Palsson SP, Ostling S and Skoog I. The incidence of first-onset depression in a population followed from the age of 70 to 85. *Psychol Med*, 2001; **31**(7): p. 1159-68.

93. Beekman AT, Copeland JR and Prince MJ. Review of community prevalence of depression in later life. *Br J Psychiatry*, 1999; **174**: p. 307-11.
94. Copeland JR, Beekman AT, Dewey ME, Hooijer C, Jordan A, Lawlor BA, Lobo A, Magnusson H, Mann AH, Meller I, Prince MJ, Reischies F, Turrina C, deVries MW and Wilson KC. Depression in Europe. Geographical distribution among older people. *Br J Psychiatry*, 1999; **174**: p. 312-21.
95. Roth M. The natural history of mental disorder in old age. *J Ment Sci*, 1955; **101**(423): p. 281-301.
96. Post F. The management and nature of depressive illnesses in late life: a follow-through study. *Br J Psychiatry*, 1972; **121**(563): p. 393-404.
97. Brown RP, Sweeney J, Loutsch E, Kocsis J and Frances A. Involutional melancholia revisited. *Am J Psychiatry*, 1984; **141**(1): p. 24-8.
98. Conwell Y, Nelson JC, Kim KM and Mazure CM. Depression in late life: age of onset as marker of a subtype. *J Affect Disord*, 1989; **17**(2): p. 189-95.
99. Grace J and O'Brien JT. Association of life events and psychosocial factors with early but not late onset depression in the elderly: implications for possible differences in aetiology. *Int J Geriatr Psychiatry*, 2003; **18**(6): p. 473-8.
100. Camus V, de Mendonca Lima CA, Gaillard M, Simeone I and Wertheimer J. Are personality disorders more frequent in early onset geriatric depression? *J Affect Disord*, 1997; **46**(3): p. 297-302.
101. Kramer-Ginsberg E, Greenwald BS, Krishnan KR, Christiansen B, Hu J, Ashtari M, Patel M and Pollack S. Neuropsychological functioning and MRI signal hyperintensities in geriatric depression. *Am J Psychiatry*, 1999; **156**(3): p. 438-44.
102. Holroyd S and Duryee JJ. Differences in geriatric psychiatry outpatients with early- vs late-onset depression. *Int J Geriatr Psychiatry*, 1997; **12**(11): p. 1100-6.
103. Alexopoulos GS, Young RC and Meyers BS. Geriatric depression: age of onset and dementia. *Biol Psychiatry*, 1993; **34**(3): p. 141-5.
104. Beekman AT, Penninx BW, Deeg DJ, Ormel J, Smit JH, Braam AW and van Tilburg W. Depression in survivor of stroke: a community-based study of prevalence, risk factors and consequences. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol*, 1998; **33**(10): p. 463-70.
105. Salomon A, Yeates AE, Burger PC and Heinz ER. Subcortical arteriosclerotic encephalopathy: brain stem findings with MR imaging. *Radiology*, 1987; **165**(3): p. 625-9.
106. Coffey CE, Figiel GS, Djang WT, Cress M, Saunders WB and Weiner RD. Leukoencephalopathy in elderly depressed patients referred for ECT. *Biol Psychiatry*, 1988; **24**(2): p. 143-61.
107. Hachinski VC, Potter P and Merskey H. Leuko-araiosis. *Arch Neurol*, 1987; **44**(1): p. 21-3.
108. Awad IA, Johnson PC, Spetzler RF and Hodak JA. Incidental subcortical lesions identified on magnetic resonance imaging in the elderly. II. Postmortem pathological correlations. *Stroke*, 1986; **17**(6): p. 1090-7.
109. Liao D, Cooper L, Cai J, Toole J, Bryan N, Burke G, Shahar E, Nieto J, Mosley T and Heiss G. The prevalence and severity of white matter lesions, their relationship with age, ethnicity, gender, and cardiovascular disease risk factors: the ARIC Study. *Neuroepidemiology*, 1997; **16**(3): p. 149-62.
110. Fazekas F, Kleinert R, Offenbacher H, Schmidt R, Kleinert G, Payer F, Radner H and Lechner H. Pathologic correlates of incidental MRI white matter signal hyperintensities. *Neurology*, 1993; **43**(9): p. 1683-9.

111. Steffens DC, Helms MJ, Krishnan KR and Burke GL. Cerebrovascular disease and depression symptoms in the cardiovascular health study. *Stroke*, 1999; **30**(10): p. 2159-66.
112. Taylor WD, MacFall JR, Steffens DC, Payne ME, Provenzale JM and Krishnan KR. Localization of age-associated white matter hyperintensities in late-life depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2003; **27**(3): p. 539-44.
113. Hickie I, Scott E, Wilhelm K and Brodaty H. Subcortical hyperintensities on magnetic resonance imaging in patients with severe depression--a longitudinal evaluation. *Biol Psychiatry*, 1997; **42**(5): p. 367-74.
114. de Groot JC, de Leeuw FE, Oudkerk M, van Gijn J, Hofman A, Jolles J and Breteler MM. Cerebral white matter lesions and cognitive function: the Rotterdam Scan Study. *Ann Neurol*, 2000; **47**(2): p. 145-51.
115. Lesser IM, Boone KB, Mehninger CM, Wohl MA, Miller BL and Berman NG. Cognition and white matter hyperintensities in older depressed patients. *Am J Psychiatry*, 1996; **153**(10): p. 1280-7.
116. Dahabra S, Ashton CH, Bahrainian M, Britton PG, Ferrier IN, McAllister VA, Marsh VR and Moore PB. Structural and functional abnormalities in elderly patients clinically recovered from early- and late-onset depression. *Biol Psychiatry*, 1998; **44**(1): p. 34-46.
117. Krishnan KR, McDonald WM, Doraiswamy PM, Tupler LA, Husain M, Boyko OB, Figiel GS and Ellinwood EH, Jr. Neuroanatomical substrates of depression in the elderly. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 1993; **243**(1): p. 41-6.
118. Figiel GS, Krishnan KR, Rao VP, Doraiswamy M, Ellinwood EH, Jr., Nemeroff CB, Evans D and Boyko O. Subcortical hyperintensities on brain magnetic resonance imaging: a comparison of normal and bipolar subjects. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 1991; **3**(1): p. 18-22.
119. Thomas AJ, O'Brien JT, Davis S, Ballard C, Barber R, Kalaria RN and Perry RH. Ischemic basis for deep white matter hyperintensities in major depression: a neuropathological study. *Arch Gen Psychiatry*, 2002; **59**(9): p. 785-92.
120. Alexopoulos GS, Meyers BS, Young RC, Kakuma T, Silbersweig D and Charlson M. Clinically defined vascular depression. *Am J Psychiatry*, 1997; **154**(4): p. 562-5.
121. Krishnan KR, Hays JC and Blazer DG. MRI-defined vascular depression. *Am J Psychiatry*, 1997; **154**(4): p. 497-501.
122. Camus V, Kraehenbuhl H, Preisig M, Bula CJ and Waeber G. Geriatric depression and vascular diseases: what are the links? *J Affect Disord*, 2004; **81**(1): p. 1-16.
123. Baldwin RC and O'Brien J. Vascular basis of late-onset depressive disorder. *Br J Psychiatry*, 2002; **180**: p. 157-60.
124. Selye H. What is stress? *Metabolism*, 1956; **5**(5): p. 525-30.
125. Pacak K, Palkovits M, Yadid G, Kvetnansky R, Kopin IJ and Goldstein DS. Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. *Am J Physiol*, 1998; **275**(4 Pt 2): p. R1247-55.
126. Pacak K and Palkovits M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev*, 2001; **22**(4): p. 502-48.
127. Van de Kar LD and Blair ML. Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Front Neuroendocrinol*, 1999; **20**(1): p. 1-48.
128. Selye H. The stress-concept as it presents itself in 1956. *Antibiot Chemother*, 1956; **3**: p. 1-17.
129. McEwen BS. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci*, 1998; **840**: p. 33-44.

130. McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators. *N Engl J Med*, 1998; **338**(3): p. 171-9.
131. Sterling P and Eyer J. Biological basis of stress-related mortality. *Soc Sci Med [E]*, 1981; **15**(1): p. 3-42.
132. Anisman H and Zacharko RM. Multiple neurochemical and behavioral consequences of stressors: implications for depression. *Pharmacol Ther*, 1990; **46**(1): p. 119-36.
133. Anisman H and Zacharko RM. Depression as a consequence of inadequate neurochemical adaptation in response to stressors. *Br J Psychiatry Suppl*, 1992(15): p. 36-43.
134. Stilli D, Berni R, Sgoifo A, Costoli T, Bocchi L, Cacciani F, Manghi M, Olivetti G and Musso E. Social stress, myocardial damage and arrhythmias in rats with cardiac hypertrophy. *Physiol Behav*, 2001; **73**(3): p. 351-8.
135. Sgoifo A and Meerlo P. Animal models of social stress: implications for the study of stress related pathologies in humans. *Stress*, 2002; **5**(1): p. 1-2.
136. Kendler KS, Kessler RC, Walters EE, MacLean C, Neale MC, Heath AC and Eaves LJ. Stressful life events, genetic liability, and onset of an episode of major depression in women. *Am J Psychiatry*, 1995; **152**(6): p. 833-42.
137. Kendler KS, Karkowski LM and Prescott CA. Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *Am J Psychiatry*, 1999; **156**(6): p. 837-41.
138. Black PH and Garbutt LD. Stress, inflammation and cardiovascular disease. *J Psychosom Res*, 2002; **52**(1): p. 1-23.
139. Iso H, Date C, Yamamoto A, Toyoshima H, Tanabe N, Kikuchi S, Kondo T, Watanabe Y, Wada Y, Ishibashi T, Suzuki H, Koizumi A, Inaba Y, Tamakoshi A and Ohno Y. Perceived mental stress and mortality from cardiovascular disease among Japanese men and women: the Japan Collaborative Cohort Study for Evaluation of Cancer Risk Sponsored by Monbusho (JACC Study). *Circulation*, 2002; **106**(10): p. 1229-36.
140. Tennant CC, Palmer KJ, Langeluddecke PM, Jones MP and Nelson G. Life event stress and myocardial reinfarction: a prospective study. *Eur Heart J*, 1994; **15**(4): p. 472-8.
141. Rosengren A, Tibblin G and Wilhelmsen L. Self-perceived psychological stress and incidence of coronary artery disease in middle-aged men. *Am J Cardiol*, 1991; **68**(11): p. 1171-5.
142. Blumenthal JA, Jiang W, Waugh RA, Frid DJ, Morris JJ, Coleman RE, Hanson M, Babyak M, Thyrum ET, Krantz DS and et al. Mental stress-induced ischemia in the laboratory and ambulatory ischemia during daily life. Association and hemodynamic features. *Circulation*, 1995; **92**(8): p. 2102-8.
143. Strike PC and Steptoe A. Psychosocial factors in the development of coronary artery disease. *Prog Cardiovasc Dis*, 2004; **46**(4): p. 337-47.
144. Dimsdale JE. Psychological stress and cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*, 2008; **51**(13): p. 1237-46.
145. Stern SL, Dhanda R and Hazuda HP. Hopelessness predicts mortality in older Mexican and European Americans. *Psychosom Med*, 2001; **63**(3): p. 344-51.
146. Williams RB and Littman AB. Psychosocial factors: role in cardiac risk and treatment strategies. *Cardiol Clin*, 1996; **14**(1): p. 97-104.
147. Chockalingam A, Campbell NR and Fodor JG. Worldwide epidemic of hypertension. *Can J Cardiol*, 2006; **22**(7): p. 553-5.

148. Whitworth JA. 2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *J Hypertens*, 2003; **21**(11): p. 1983-92.
149. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H and Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*, 1998; **97**(18): p. 1837-47.
150. Shinn EH, Poston WS, Kimball KT, St Jeor ST and Foreyt JP. Blood pressure and symptoms of depression and anxiety: a prospective study. *Am J Hypertens*, 2001; **14**(7 Pt 1): p. 660-4.
151. Wiehe M, Fuchs SC, Moreira LB, Moraes RS, Pereira GM, Gus M and Fuchs FD. Absence of association between depression and hypertension: results of a prospectively designed population-based study. *J Hum Hypertens*, 2006; **20**(6): p. 434-9.
152. Jones-Webb R, Jacobs DR, Jr., Flack JM and Liu K. Relationships between depressive symptoms, anxiety, alcohol consumption, and blood pressure: results from the CARDIA Study. *Coronary Artery Risk Development in Young Adults Study. Alcohol Clin Exp Res*, 1996; **20**(3): p. 420-7.
153. Levenstein S, Smith MW and Kaplan GA. Psychosocial predictors of hypertension in men and women. *Arch Intern Med*, 2001; **161**(10): p. 1341-6.
154. Davidson K, Jonas BS, Dixon KE and Markovitz JH. Do depression symptoms predict early hypertension incidence in young adults in the CARDIA study? *Coronary Artery Risk Development in Young Adults. Arch Intern Med*, 2000; **160**(10): p. 1495-500.
155. Jonas BS and Lando JF. Negative affect as a prospective risk factor for hypertension. *Psychosom Med*, 2000; **62**(2): p. 188-96.
156. Jonas BS, Franks P and Ingram DD. Are symptoms of anxiety and depression risk factors for hypertension? Longitudinal evidence from the National Health and Nutrition Examination Survey I Epidemiologic Follow-up Study. *Arch Fam Med*, 1997; **6**(1): p. 43-9.
157. Rabkin JG, Charles E and Kass F. Hypertension and DSM-III depression in psychiatric outpatients. *Am J Psychiatry*, 1983; **140**(8): p. 1072-4.
158. Coelho R, Hughes AM, da Fonseca AF and Bond MR. Essential hypertension: the relationship of psychological factors to the severity of hypertension. *J Psychosom Res*, 1989; **33**(2): p. 187-96.
159. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R and King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 2004; **27**(5): p. 1047-53.
160. Roglic G, Unwin N, Bennett PH, Mathers C, Tuomilehto J, Nag S, Connolly V and King H. The burden of mortality attributable to diabetes: realistic estimates for the year 2000. *Diabetes Care*, 2005; **28**(9): p. 2130-5.
161. Garcia MJ, McNamara PM, Gordon T and Kannel WB. Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population. Sixteen year follow-up study. *Diabetes*, 1974; **23**(2): p. 105-11.
162. Anderson RJ, Freedland KE, Clouse RE and Lustman PJ. The prevalence of comorbid depression in adults with diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care*, 2001; **24**(6): p. 1069-78.
163. Gavard JA, Lustman PJ and Clouse RE. Prevalence of depression in adults with diabetes. An epidemiological evaluation. *Diabetes Care*, 1993; **16**(8): p. 1167-78.
164. Talbot F and Nouwen A. A review of the relationship between depression and diabetes in adults: is there a link? *Diabetes Care*, 2000; **23**(10): p. 1556-62.

165. Lustman PJ, Griffith LS and Clouse RE. Depression in adults with diabetes. Results of 5-yr follow-up study. *Diabetes Care*, 1988; **11**(8): p. 605-12.
166. Eaton WW, Armenian H, Gallo J, Pratt L and Ford DE. Depression and risk for onset of type II diabetes. A prospective population-based study. *Diabetes Care*, 1996; **19**(10): p. 1097-102.
167. Lustman PJ, Anderson RJ, Freedland KE, de Groot M, Carney RM and Clouse RE. Depression and poor glycemic control: a meta-analytic review of the literature. *Diabetes Care*, 2000; **23**(7): p. 934-42.
168. de Groot M, Anderson R, Freedland KE, Clouse RE and Lustman PJ. Association of depression and diabetes complications: a meta-analysis. *Psychosom Med*, 2001; **63**(4): p. 619-30.
169. Wilson PW, D'Agostino RB, Sullivan L, Parise H and Kannel WB. Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk: the Framingham experience. *Arch Intern Med*, 2002; **162**(16): p. 1867-72.
170. Goodman E and Whitaker RC. A prospective study of the role of depression in the development and persistence of adolescent obesity. *Pediatrics*, 2002; **110**(3): p. 497-504.
171. Roberts RE, Kaplan GA, Shema SJ and Strawbridge WJ. Are the obese at greater risk for depression? *Am J Epidemiol*, 2000; **152**(2): p. 163-70.
172. Roberts RE, Deleger S, Strawbridge WJ and Kaplan GA. Prospective association between obesity and depression: evidence from the Alameda County Study. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2003; **27**(4): p. 514-21.
173. Roberts RE, Strawbridge WJ, Deleger S and Kaplan GA. Are the fat more jolly? *Ann Behav Med*, 2002; **24**(3): p. 169-80.
174. Patten SB, Williams JV, Lavorato DH, Brown L, McLaren L and Eliasziw M. Major depression, antidepressant medication and the risk of obesity. *Psychother Psychosom*, 2009; **78**(3): p. 182-6.
175. Herva A, Laitinen J, Miettunen J, Veijola J, Karvonen JT, Lakso K and Joukamaa M. Obesity and depression: results from the longitudinal Northern Finland 1966 Birth Cohort Study. *Int J Obes (Lond)*, 2006; **30**(3): p. 520-7.
176. Noppa H and Hallstrom T. Weight gain in adulthood in relation to socioeconomic factors, mental illness and personality traits: a prospective study of middle-aged women. *J Psychosom Res*, 1981; **25**(2): p. 83-9.
177. Ahlberg AC, Ljung T, Rosmond R, McEwen B, Holm G, Akesson HO and Bjorntorp P. Depression and anxiety symptoms in relation to anthropometry and metabolism in men. *Psychiatry Res*, 2002; **112**(2): p. 101-10.
178. Anderson KM, Castelli WP and Levy D. Cholesterol and mortality. 30 years of follow-up from the Framingham study. *Jama*, 1987; **257**(16): p. 2176-80.
179. Bajwa WK, Asnis GM, Sanderson WC, Irfan A and van Praag HM. High cholesterol levels in patients with panic disorder. *Am J Psychiatry*, 1992; **149**(3): p. 376-8.
180. Weidner G, Connor SL, Hollis JF and Connor WE. Improvements in hostility and depression in relation to dietary change and cholesterol lowering. The Family Heart Study. *Ann Intern Med*, 1992; **117**(10): p. 820-3.
181. Freedman DS, Byers T, Barrett DH, Stroup NE, Eaker E and Monroe-Blum H. Plasma lipid levels and psychologic characteristics in men. *Am J Epidemiol*, 1995; **141**(6): p. 507-17.
182. McCallum J, Simons L, Simons J and Friedlander Y. Low serum cholesterol is not associated with depression in the elderly: data from an Australian community study. *Aust N Z J Med*, 1994; **24**(5): p. 561-4.

183. Oxenkrug GF, Branconnier RJ, Harto-Truax N and Cole JO. Is serum cholesterol a biological marker for major depressive disorder? *Am J Psychiatry*, 1983; **140**(7): p. 920-1.
184. Maes M, Delanghe J, Meltzer HY, Scharpe S, D'Hondt P and Cosyns P. Lower degree of esterification of serum cholesterol in depression: relevance for depression and suicide research. *Acta Psychiatr Scand*, 1994; **90**(4): p. 252-8.
185. Maes M, Smith R, Christophe A, Vandoolaeghe E, Van Gastel A, Neels H, Demedts P, Wauters A and Meltzer HY. Lower serum high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in major depression and in depressed men with serious suicidal attempts: relationship with immune-inflammatory markers. *Acta Psychiatr Scand*, 1997; **95**(3): p. 212-21.
186. Olusi SO and Fido AA. Serum lipid concentrations in patients with major depressive disorder. *Biol Psychiatry*, 1996; **40**(11): p. 1128-31.
187. Cadeddu G, Fioravanti P, Antonicelli R, Gasparrini PM and Gaetti R. [Relationship between cholesterol levels and depression in the elderly]. *Minerva Med*, 1995; **86**(6): p. 251-6.
188. Lindberg G, Larsson G, Setterlind S and Rastam L. Serum lipids and mood in working men and women in Sweden. *J Epidemiol Community Health*, 1994; **48**(4): p. 360-3.
189. Horsten M, Wamala SP, Vingerhoets A and Orth-Gomer K. Depressive symptoms, social support, and lipid profile in healthy middle-aged women. *Psychosom Med*, 1997; **59**(5): p. 521-8.
190. Suarez EC. Relations of trait depression and anxiety to low lipid and lipoprotein concentrations in healthy young adult women. *Psychosom Med*, 1999; **61**(3): p. 273-9.
191. Rabe-Jablonska J and Poprawska I. Levels of serum total cholesterol and LDL-cholesterol in patients with major depression in acute period and remission. *Med Sci Monit*, 2000; **6**(3): p. 539-47.
192. Rafter D. Biochemical markers of anxiety and depression. *Psychiatry Res*, 2001; **103**(1): p. 93-6.
193. Steegmans PH, Hoes AW, Bak AA, van der Does E and Grobbee DE. Higher prevalence of depressive symptoms in middle-aged men with low serum cholesterol levels. *Psychosom Med*, 2000; **62**(2): p. 205-11.
194. Terao T, Iwata N, Kanazawa K, Takano T, Takahashi N, Hayashi T and Sugawara Y. Low serum cholesterol levels and depressive state in human dock visitors. *Acta Psychiatr Scand*, 2000; **101**(3): p. 231-4.
195. Morgan RE, Palinkas LA, Barrett-Connor EL and Wingard DL. Plasma cholesterol and depressive symptoms in older men. *Lancet*, 1993; **341**(8837): p. 75-9.
196. Partonen T, Haukka J, Virtamo J, Taylor PR and Lonnqvist J. Association of low serum total cholesterol with major depression and suicide. *Br J Psychiatry*, 1999; **175**: p. 259-62.
197. Hyypa MT, Kronholm E, Virtanen A, Leino A and Jula A. Does simvastatin affect mood and steroid hormone levels in hypercholesterolemic men? A randomized double-blind trial. *Psychoneuroendocrinology*, 2003; **28**(2): p. 181-94.
198. Sarchiapone M, Camardese G, Roy A, Della Casa S, Satta MA, Gonzalez B, Berman J and De Risio S. Cholesterol and serotonin indices in depressed and suicidal patients. *J Affect Disord*, 2001; **62**(3): p. 217-9.
199. Steegmans PH, Fekkes D, Hoes AW, Bak AA, van der Does E and Grobbee DE. Low serum cholesterol concentration and serotonin metabolism in men. *Bmj*, 1996; **312**(7025): p. 221.

200. Group MRFITR. Relationship between baseline risk factors and coronary heart disease and total mortality in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. . *Prev Med*, 1986; **15**(3): p. 254-73.
201. Breslau N, Peterson EL, Schultz LR, Chilcoat HD and Andreski P. Major depression and stages of smoking. A longitudinal investigation. *Arch Gen Psychiatry*, 1998; **55**(2): p. 161-6.
202. Anda RF, Williamson DF, Escobedo LG, Mast EE, Giovino GA and Remington PL. Depression and the dynamics of smoking. A national perspective. *Jama*, 1990; **264**(12): p. 1541-5.
203. Hall SM, Munoz RF, Reus VI and Sees KL. Nicotine, negative affect, and depression. *J Consult Clin Psychol*, 1993; **61**(5): p. 761-7.
204. Quattrocki E, Baird A and Yurgelun-Todd D. Biological aspects of the link between smoking and depression. *Harv Rev Psychiatry*, 2000; **8**(3): p. 99-110.
205. Puddey IB, Rakic V, Dimmitt SB and Beilin LJ. Influence of pattern of drinking on cardiovascular disease and cardiovascular risk factors--a review. *Addiction*, 1999; **94**(5): p. 649-63.
206. Klatsky AL. Alcohol, cardiovascular diseases and diabetes mellitus. *Pharmacol Res*, 2007; **55**(3): p. 237-47.
207. Klatsky AL. Alcohol and cardiovascular diseases. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2009; **7**(5): p. 499-506.
208. Schuckit MA. Alcohol and depression: a clinical perspective. *Acta Psychiatr Scand Suppl*, 1994; **377**: p. 28-32.
209. Paljarvi T, Koskenvuo M, Poikolainen K, Kauhanen J, Sillanmaki L and Makela P. Binge drinking and depressive symptoms: a 5-year population-based cohort study. *Addiction*, 2009.
210. Greenfield TK, Rehm J and Rogers JD. Effects of depression and social integration on the relationship between alcohol consumption and all-cause mortality. *Addiction*, 2002; **97**(1): p. 29-38.
211. Merikangas KR, Risch NJ and Weissman MM. Comorbidity and co-transmission of alcoholism, anxiety and depression. *Psychol Med*, 1994; **24**(1): p. 69-80.
212. Gilman SE and Abraham HD. A longitudinal study of the order of onset of alcohol dependence and major depression. *Drug Alcohol Depend*, 2001; **63**(3): p. 277-86.
213. Rodgers B, Korten AE, Jorm AF, Jacomb PA, Christensen H and Henderson AS. Non-linear relationships in associations of depression and anxiety with alcohol use. *Psychol Med*, 2000; **30**(2): p. 421-32.
214. Caldwell TM, Rodgers B, Jorm AF, Christensen H, Jacomb PA, Korten AE and Lynskey MT. Patterns of association between alcohol consumption and symptoms of depression and anxiety in young adults. *Addiction*, 2002; **97**(5): p. 583-94.
215. Manninen L, Poikolainen K, Vartiainen E and Laatikainen T. Heavy drinking occasions and depression. *Alcohol Alcohol*, 2006; **41**(3): p. 293-9.
216. Lesperance F and Frasura-Smith N. Depression and heart disease. *Cleve Clin J Med*, 2007; **74 Suppl 1**: p. S63-6.
217. Horrobin DF. Abnormal membrane concentrations of 20 and 22-carbon essential fatty acids: a common link between risk factors and coronary and peripheral vascular disease? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1995; **53**(6): p. 385-96.
218. von Schacky C. n-3 fatty acids and the prevention of coronary atherosclerosis. *Am J Clin Nutr*, 2000; **71**(1 Suppl): p. 224S-7S.
219. Horrobin DF and Bennett CN. Depression and bipolar disorder: relationships to impaired fatty acid and phospholipid metabolism and to diabetes, cardiovascular

- disease, immunological abnormalities, cancer, ageing and osteoporosis. Possible candidate genes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1999; **60**(4): p. 217-34.
220. Leaf A and Kang JX. Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease. *World Rev Nutr Diet*, 1998; **83**: p. 24-37.
 221. miocardio Giplsdsni. dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-prevenzionz trial. *Lancet*, 1999(354): p. 447-455.
 222. Hibbeln JR. Fish consumption and major depression. *Lancet*, 1998; **351**(9110): p. 1213.
 223. Hibbeln JR. Seafood consumption, the DHA content of mothers' milk and prevalence rates of postpartum depression: a cross-national, ecological analysis. *J Affect Disord*, 2002; **69**(1-3): p. 15-29.
 224. De Vriese SR, Christophe AB and Maes M. Lowered serum n-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) levels predict the occurrence of postpartum depression: further evidence that lowered n-PUFAs are related to major depression. *Life Sci*, 2003; **73**(25): p. 3181-7.
 225. Noaghiul S and Hibbeln JR. Cross-national comparisons of seafood consumption and rates of bipolar disorders. *Am J Psychiatry*, 2003; **160**(12): p. 2222-7.
 226. Edwards R, Peet M, Shay J and Horrobin D. Omega-3 polyunsaturated fatty acid levels in the diet and in red blood cell membranes of depressed patients. *J Affect Disord*, 1998; **48**(2-3): p. 149-55.
 227. Frasure-Smith N, Lesperance F and Julien P. Major depression is associated with lower omega-3 fatty acid levels in patients with recent acute coronary syndromes. *Biol Psychiatry*, 2004; **55**(9): p. 891-6.
 228. Straus SE, Tosato G, Armstrong G, Lawley T, Preble OT, Henle W, Davey R, Pearson G, Epstein J, Brus I and et al. Persisting illness and fatigue in adults with evidence of Epstein-Barr virus infection. *Ann Intern Med*, 1985; **102**(1): p. 7-16.
 229. Puffer JC and McShane JM. Depression and chronic fatigue in athletes. *Clin Sports Med*, 1992; **11**(2): p. 327-38.
 230. Hickie I, Lloyd A, Wakefield D and Parker G. The psychiatric status of patients with the chronic fatigue syndrome. *Br J Psychiatry*, 1990; **156**: p. 534-40.
 231. Rissanen V, Romo M and Siltanen P. Premonitory symptoms and stress factors preceding sudden death from ischaemic heart disease. *Acta Med Scand*, 1978; **204**(5): p. 389-96.
 232. Appels A and Mulder P. Excess fatigue as a precursor of myocardial infarction. *Eur Heart J*, 1988; **9**(7): p. 758-64.
 233. Kop WJ. Chronic and acute psychological risk factors for clinical manifestations of coronary artery disease. *Psychosom Med*, 1999; **61**(4): p. 476-87.
 234. Perski A, Osuchowski K, Andersson L, Sanden A, Feleke E and Anderson G. Intensive rehabilitation of emotionally distressed patients after coronary by-pass grafting. *J Intern Med*, 1999; **246**(3): p. 253-63.
 235. Paluska SA and Schwenk TL. Physical activity and mental health: current concepts. *Sports Med*, 2000; **29**(3): p. 167-80.
 236. McCartney N. Role of resistance training in heart disease. *Med Sci Sports Exerc*, 1998; **30**(10 Suppl): p. S396-402.
 237. Beniamini Y, Rubenstein JJ, Zaichkowsky LD and Crim MC. Effects of high-intensity strength training on quality-of-life parameters in cardiac rehabilitation patients. *Am J Cardiol*, 1997; **80**(7): p. 841-6.
 238. Kristal-Boneh E, Raifel M, Fromm P and Ribak J. Heart rate variability in health and disease. *Scand J Work Environ Health*, 1995; **21**(2): p. 85-95.

239. Collins HL and DiCarlo SE. Daily exercise attenuates the sympathetic component of the arterial baroreflex control of heart rate. *Am J Physiol*, 1997; **273**(6 Pt 2): p. H2613-9.
240. Bao AM, Meynen G and Swaab DF. The stress system in depression and neurodegeneration: focus on the human hypothalamus. *Brain Res Rev*, 2008; **57**(2): p. 531-53.
241. Quirarte GL, Roozendaal B and McGaugh JL. Glucocorticoid enhancement of memory storage involves noradrenergic activation in the basolateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997; **94**(25): p. 14048-53.
242. de Kloet ER, Reul JM and Sutanto W. Corticosteroids and the brain. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1990; **37**(3): p. 387-94.
243. Holsboer F. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology*, 2000; **23**(5): p. 477-501.
244. Nemeroff CB. The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. *Mol Psychiatry*, 1996; **1**(4): p. 336-42.
245. Buijs RM and Kalsbeek A. Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat Rev Neurosci*, 2001; **2**(7): p. 521-6.
246. Swaab DF, Chung WC, Kruijver FP, Hofman MA and Hestiantoro A. Sex differences in the hypothalamus in the different stages of human life. *Neurobiol Aging*, 2003; **24 Suppl 1**: p. S1-16; discussion S17-9.
247. Carroll BJ, Cassidy F, Naftolowitz D, Tatham NE, Wilson WH, Iranmanesh A, Liu PY and Veldhuis JD. Pathophysiology of hypercortisolism in depression. *Acta Psychiatr Scand Suppl*, 2007(433): p. 90-103.
248. Pariante CM. Depression, stress and the adrenal axis. *J Neuroendocrinol*, 2003; **15**(8): p. 811-2.
249. Modell S, Yassouridis A, Huber J and Holsboer F. Corticosteroid receptor function is decreased in depressed patients. *Neuroendocrinology*, 1997; **65**(3): p. 216-22.
250. Webster MJ, Knable MB, O'Grady J, Orthmann J and Weickert CS. Regional specificity of brain glucocorticoid receptor mRNA alterations in subjects with schizophrenia and mood disorders. *Mol Psychiatry*, 2002; **7**(9): p. 985-94, 924.
251. Scott LV and Dinan TG. Vasopressin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function: implications for the pathophysiology of depression. *Life Sci*, 1998; **62**(22): p. 1985-98.
252. Raadsheer FC, Hoogendijk WJ, Stam FC, Tilders FJ and Swaab DF. Increased numbers of corticotropin-releasing hormone expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients. *Neuroendocrinology*, 1994; **60**(4): p. 436-44.
253. Purba JS, Raadsheer FC, Hofman MA, Ravid R, Polman CH, Kamphorst W and Swaab DF. Increased number of corticotropin-releasing hormone expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of patients with multiple sclerosis. *Neuroendocrinology*, 1995; **62**(1): p. 62-70.
254. Heuser IJ, Schweiger U, Gotthardt U, Schmider J, Lammers CH, Dettling M, Yassouridis A and Holsboer F. Pituitary-adrenal-system regulation and psychopathology during amitriptyline treatment in elderly depressed patients and normal comparison subjects. *Am J Psychiatry*, 1996; **153**(1): p. 93-9.
255. Barden N. Modulation of glucocorticoid receptor gene expression by antidepressant drugs. *Pharmacopsychiatry*, 1996; **29**(1): p. 12-22.
256. Zobel AW, Nickel T, Kunzel HE, Ackl N, Sonntag A, Ising M and Holsboer F. Effects of the high-affinity corticotropin-releasing hormone receptor 1 antagonist

- R121919 in major depression: the first 20 patients treated. *J Psychiatr Res*, 2000; **34**(3): p. 171-81.
257. Merali Z, Kent P, Du L, Hrdina P, Palkovits M, Faludi G, Poulter MO, Bedard T and Anisman H. Corticotropin-releasing hormone, arginine vasopressin, gastrin-releasing peptide, and neuromedin B alterations in stress-relevant brain regions of suicides and control subjects. *Biol Psychiatry*, 2006; **59**(7): p. 594-602.
258. Purba JS, Hoogendijk WJ, Hofman MA and Swaab DF. Increased number of vasopressin- and oxytocin-expressing neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in depression. *Arch Gen Psychiatry*, 1996; **53**(2): p. 137-43.
259. Belmaker RH and Agam G. Major depressive disorder. *N Engl J Med*, 2008; **358**(1): p. 55-68.
260. Burke CW. Adrenocortical insufficiency. *Clin Endocrinol Metab*, 1985; **14**(4): p. 947-76.
261. Friedman TC, Mastorakos G, Newman TD, Mullen NM, Horton EG, Costello R, Papadopoulos NM and Chrousos GP. Carbohydrate and lipid metabolism in endogenous hypercortisolism: shared features with metabolic syndrome X and NIDDM. *Endocr J*, 1996; **43**(6): p. 645-55.
262. Yanovski JA and Cutler GB, Jr. Glucocorticoid action and the clinical features of Cushing's syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1994; **23**(3): p. 487-509.
263. Girod JP and Brotman DJ. Does altered glucocorticoid homeostasis increase cardiovascular risk? *Cardiovasc Res*, 2004; **64**(2): p. 217-26.
264. Walker BR. Glucocorticoids and cardiovascular disease. *Eur J Endocrinol*, 2007; **157**(5): p. 545-59.
265. Vlachoyiannopoulos PG, Kanellopoulos PG, Ioannidis JP, Tektonidou MG, Mastorakou I and Moutsopoulos HM. Atherosclerosis in premenopausal women with antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus: a controlled study. *Rheumatology (Oxford)*, 2003; **42**(5): p. 645-51.
266. Manger K, Kusus M, Forster C, Ropers D, Daniel WG, Kalden JR, Achenbach S and Manger B. Factors associated with coronary artery calcification in young female patients with SLE. *Ann Rheum Dis*, 2003; **62**(9): p. 846-50.
267. Stamler J, Pick R and Katz LN. Effects of cortisone, hydrocortisone and corticotropin on lipemia, glycemia and atherogenesis in cholesterol-fed chicks. *Circulation*, 1954; **10**(2): p. 237-46.
268. Colao A, Pivonello R, Spiezia S, Faggiano A, Ferone D, Filippella M, Marzullo P, Cerbone G, Siciliani M and Lombardi G. Persistence of increased cardiovascular risk in patients with Cushing's disease after five years of successful cure. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999; **84**(8): p. 2664-72.
269. Bjorntorp P. The regulation of adipose tissue distribution in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1996; **20**(4): p. 291-302.
270. Veldhuis JD, Liem AY, South S, Weltman A, Weltman J, Clemmons DA, Abbott R, Mulligan T, Johnson ML, Pincus S and et al. Differential impact of age, sex steroid hormones, and obesity on basal versus pulsatile growth hormone secretion in men as assessed in an ultrasensitive chemiluminescence assay. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995; **80**(11): p. 3209-22.
271. Chrousos GP. The role of stress and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathogenesis of the metabolic syndrome: neuro-endocrine and target tissue-related causes. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2000; **24 Suppl 2**: p. S50-5.
272. Rainey WE, Rodgers RJ and Mason JI. The role of bovine lipoproteins in the regulation of steroidogenesis and HMG-CoA reductase in bovine adrenocortical cells. *Steroids*, 1992; **57**(4): p. 167-73.

273. Brindley DN. Role of glucocorticoids and fatty acids in the impairment of lipid metabolism observed in the metabolic syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1995; **19 Suppl 1**: p. S69-75.
274. Luoma PV. Gene activation, apolipoprotein A-I/high density lipoprotein, atherosclerosis prevention and longevity. *Pharmacol Toxicol*, 1997; **81**(2): p. 57-64.
275. Sapolsky RM, Romero LM and Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev*, 2000; **21**(1): p. 55-89.
276. Sudhir K, Jennings GL, Esler MD, Korner PI, Blombery PA, Lambert GW, Scoggins B and Whitworth JA. Hydrocortisone-induced hypertension in humans: pressor responsiveness and sympathetic function. *Hypertension*, 1989; **13**(5): p. 416-21.
277. Longenecker JP, Kilty LA and Johnson LK. Glucocorticoid influence on growth of vascular wall cells in culture. *J Cell Physiol*, 1982; **113**(2): p. 197-202.
278. Longenecker JP, Kilty LA and Johnson LK. Glucocorticoid inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation: influence of homologous extracellular matrix and serum mitogens. *J Cell Biol*, 1984; **98**(2): p. 534-40.
279. Berk BC, Vallega G, Griendling KK, Gordon JB, Cragoe EJ, Jr., Canessa M and Alexander RW. Effects of glucocorticoids on Na⁺/H⁺ exchange and growth in cultured vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol*, 1988; **137**(3): p. 391-401.
280. Goncharova EA, Billington CK, Irani C, Vorotnikov AV, Tkachuk VA, Penn RB, Krymskaya VP and Panettieri RA, Jr. Cyclic AMP-mobilizing agents and glucocorticoids modulate human smooth muscle cell migration. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003; **29**(1): p. 19-27.
281. Mangos GJ, Walker BR, Kelly JJ, Lawson JA, Webb DJ and Whitworth JA. Cortisol inhibits cholinergic vasodilation in the human forearm. *Am J Hypertens*, 2000; **13**(11): p. 1155-60.
282. Matsumura M, Kakishita H, Suzuki M, Banba N and Hattori Y. Dexamethasone suppresses iNOS gene expression by inhibiting NF-kappaB in vascular smooth muscle cells. *Life Sci*, 2001; **69**(9): p. 1067-77.
283. Provencher PH, Villeneuve A and Morin C. Glucocorticoids increase preproendothelin-1 expression in rat aorta. *Endocr Res*, 1998; **24**(3-4): p. 737-41.
284. Whitworth JA, Schyvens CG, Zhang Y, Mangos GJ and Kelly JJ. Glucocorticoid-induced hypertension: from mouse to man. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2001; **28**(12): p. 993-6.
285. Ullian ME. The role of corticosteroids in the regulation of vascular tone. *Cardiovasc Res*, 1999; **41**(1): p. 55-64.
286. Walker BR and Williams BC. Corticosteroids and vascular tone: mapping the messenger maze. *Clin Sci (Lond)*, 1992; **82**(6): p. 597-605.
287. Pirpiris M, Sudhir K, Yeung S, Jennings G and Whitworth JA. Pressor responsiveness in corticosteroid-induced hypertension in humans. *Hypertension*, 1992; **19**(6 Pt 1): p. 567-74.
288. Huang LQ, Whitworth JA and Chesterman CN. Effects of cyclosporin A and dexamethasone on haemostatic and vasoactive functions of vascular endothelial cells. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1995; **6**(5): p. 438-45.
289. Halleux CM, Declerck PJ, Tran SL, Detry R and Brichard SM. Hormonal control of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression and production in human adipose tissue: stimulation by glucocorticoids and inhibition by catecholamines. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999; **84**(11): p. 4097-105.

290. Morange PE, Aubert J, Peiretti F, Lijnen HR, Vague P, Verdier M, Negrel R, Juhan-Vague I and Alessi MC. Glucocorticoids and insulin promote plasminogen activator inhibitor 1 production by human adipose tissue. *Diabetes*, 1999; **48**(4): p. 890-5.
291. Patrassi GM, Dal Bo Zanon R, Boscaro M, Martinelli S and Girolami A. Further studies on the hypercoagulable state of patients with Cushing's syndrome. *Thromb Haemost*, 1985; **54**(2): p. 518-20.
292. Fatti LM, Bottasso B, Invitti C, Coppola R, Cavagnini F and Mannucci PM. Markers of activation of coagulation and fibrinolysis in patients with Cushing's syndrome. *J Endocrinol Invest*, 2000; **23**(3): p. 145-50.
293. Dal Bo Zanon R, Fornasiero L, Boscaro M, Ruffato G, Luzzato G, Fabris F and Girolami A. Clotting changes in Cushing's syndrome: elevated factor VIII activity. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch*, 1983; **110**(2): p. 268-77.
294. Yeager MP, Guyre PM and Munck AU. Glucocorticoid regulation of the inflammatory response to injury. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2004; **48**(7): p. 799-813.
295. Schuld A, Kraus T, Haack M, Hinze-Selch D, Zobel AW, Holsboer F and Pollmacher T. Effects of dexamethasone on cytokine plasma levels and white blood cell counts in depressed patients. *Psychoneuroendocrinology*, 2001; **26**(1): p. 65-76.
296. Arvidson NG, Gudbjornsson B, Larsson A and Hallgren R. The timing of glucocorticoid administration in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 1997; **56**(1): p. 27-31.
297. Reil TD, Sarkar R, Kashyap VS, Sarkar M and Gelabert HA. Dexamethasone suppresses vascular smooth muscle cell proliferation. *J Surg Res*, 1999; **85**(1): p. 109-14.
298. Pross C, Farooq MM, Angle N, Lane JS, Cerveira JJ, Xavier AE, Freischlag JA, Law RE and Gelabert HA. Dexamethasone inhibits vascular smooth muscle cell migration via modulation of matrix metalloproteinase activity. *J Surg Res*, 2002; **102**(2): p. 57-62.
299. Aljada A, Ghanim H, Mohanty P, Hofmeyer D, Tripathy D and Dandona P. Hydrocortisone suppresses intranuclear activator-protein-1 (AP-1) binding activity in mononuclear cells and plasma matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9). *J Clin Endocrinol Metab*, 2001; **86**(12): p. 5988-91.
300. Sakai M, Biwa T, Matsumura T, Takemura T, Matsuda H, Anami Y, Sasahara T, Kobori S and Shichiri M. Glucocorticoid inhibits oxidized LDL-induced macrophage growth by suppressing the expression of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999; **19**(7): p. 1726-33.
301. Cronstein BN, Kimmel SC, Levin RI, Martiniuk F and Weissmann G. A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992; **89**(21): p. 9991-5.
302. Bray PJ, Du B, Mejia VM, Hao SC, Deutsch E, Fu C, Wilson RC, Hanauske-Abel H and McCaffrey TA. Glucocorticoid resistance caused by reduced expression of the glucocorticoid receptor in cells from human vascular lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999; **19**(5): p. 1180-9.
303. Mastorakos G, Chrousos GP and Weber JS. Recombinant interleukin-6 activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993; **77**(6): p. 1690-4.
304. Calandra T. Pathogenesis of septic shock: implications for prevention and treatment. *J Chemother*, 2001; **13 Spec No 1**(1): p. 173-80.

305. Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med*, 1995; **332**(20): p. 1351-62.
306. Schreiber W, Pollmacher T, Fassbender K, Gudewill S, Vedder H, Wiedemann K, Galanos C and Holsboer F. Endotoxin- and corticotropin-releasing hormone-induced release of ACTH and cortisol. A comparative study in men. *Neuroendocrinology*, 1993; **58**(1): p. 123-8.
307. Schulte HM, Bamberger CM, Elsen H, Herrmann G, Bamberger AM and Barth J. Systemic interleukin-1 alpha and interleukin-2 secretion in response to acute stress and to corticotropin-releasing hormone in humans. *Eur J Clin Invest*, 1994; **24**(11): p. 773-7.
308. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999; **340**(2): p. 115-26.
309. Path G, Scherbaum WA and Bornstein SR. The role of interleukin-6 in the human adrenal gland. *Eur J Clin Invest*, 2000; **30 Suppl 3**: p. 91-5.
310. McCorry LK. Physiology of the autonomic nervous system. *Am J Pharm Educ*, 2007; **71**(4): p. 78.
311. Carney RM, Freedland KE and Veith RC. Depression, the autonomic nervous system, and coronary heart disease. *Psychosom Med*, 2005; **67 Suppl 1**: p. S29-33.
312. Barnes RF, Veith RC, Borson S, Verhey J, Raskind MA and Halter JB. High levels of plasma catecholamines in dexamethasone-resistant depressed patients. *Am J Psychiatry*, 1983; **140**(12): p. 1623-5.
313. Veith RC, Lewis N, Linares OA, Barnes RF, Raskind MA, Villacres EC, Murburg MM, Ashleigh EA, Castillo S, Peskind ER and et al. Sympathetic nervous system activity in major depression. Basal and desipramine-induced alterations in plasma norepinephrine kinetics. *Arch Gen Psychiatry*, 1994; **51**(5): p. 411-22.
314. Esler M, Turbott J, Schwarz R, Leonard P, Bobik A, Skews H and Jackman G. The peripheral kinetics of norepinephrine in depressive illness. *Arch Gen Psychiatry*, 1982; **39**(3): p. 295-300.
315. Lake CR, Pickar D, Ziegler MG, Lipper S, Slater S and Murphy DL. High plasma norepinephrine levels in patients with major affective disorder. *Am J Psychiatry*, 1982; **139**(10): p. 1315-8.
316. Roy A, Pickar D, De Jong J, Karoum F and Linnoila M. Norepinephrine and its metabolites in cerebrospinal fluid, plasma, and urine. Relationship to hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in depression. *Arch Gen Psychiatry*, 1988; **45**(9): p. 849-57.
317. Veith RC, Best JD and Halter JB. Dose-dependent suppression of norepinephrine appearance rate in plasma by clonidine in man. *J Clin Endocrinol Metab*, 1984; **59**(1): p. 151-5.
318. Wyatt RJ, Portnoy B, Kupfer DJ, Snyder F and Engelman K. Resting plasma catecholamine concentrations in patients with depression and anxiety. *Arch Gen Psychiatry*, 1971; **24**(1): p. 65-70.
319. Siever LJ and Davis KL. Overview: toward a dysregulation hypothesis of depression. *Am J Psychiatry*, 1985; **142**(9): p. 1017-31.
320. Watkins LL and Grossman P. Association of depressive symptoms with reduced baroreflex cardiac control in coronary artery disease. *Am Heart J*, 1999; **137**(3): p. 453-7.
321. Pitzalis MV, Iacoviello M, Todarello O, Fioretti A, Guida P, Massari F, Mastropasqua F, Russo GD and Rizzon P. Depression but not anxiety influences the autonomic control of heart rate after myocardial infarction. *Am Heart J*, 2001; **141**(5): p. 765-71.

322. Carney RM, Freedland KE, Stein PK, Watkins LL, Catellier D, Jaffe AS and Yeragani VK. Effects of depression on QT interval variability after myocardial infarction. *Psychosom Med*, 2003; **65**(2): p. 177-80.
323. Sinski M, Lewandowski J, Abramczyk P, Narkiewicz K and Gaciong Z. Why study sympathetic nervous system? *J Physiol Pharmacol*, 2006; **57 Suppl 11**: p. 79-92.
324. Harris KF and Matthews KA. Interactions between autonomic nervous system activity and endothelial function: a model for the development of cardiovascular disease. *Psychosom Med*, 2004; **66**(2): p. 153-64.
325. Delay J, Laine B and Buisson JF. [The action of isonicotinyI-hydrazide used in the treatment of depressive states.]. *Ann Med Psychol (Paris)*, 1952; **110**(2:5): p. 689-92.
326. Kuhn R. The treatment of depressive states with G 22355 (imipramine hydrochloride). *Am J Psychiatry*, 1958; **115**(5): p. 459-64.
327. Fuller RW. Serotonin uptake inhibitors: uses in clinical therapy and in laboratory research. *Prog Drug Res*, 1995; **45**: p. 167-204.
328. Dencker SJ. The need for new and better antidepressants: reboxetine a new option. *Acta Psychiatr Scand Suppl*, 2000; **402**: p. 6-11.
329. Erfurth A, Michael N, Stadtland C and Arolt V. Bupropion as add-on strategy in difficult-to-treat bipolar depressive patients. *Neuropsychobiology*, 2002; **45 Suppl 1**: p. 33-6.
330. Hoes MJ. Monoamines in Psychiatry: the role of serotonin in depression, anxiety and stress. *Acta Psychiatr Belg*, 1982; **82**(3): p. 287-309.
331. Schildkraut JJ. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry*, 1965; **122**(5): p. 509-22.
332. Leonard BE. Changes in the immune system in depression and dementia: causal or coincidental effects? *Int J Dev Neurosci*, 2001; **19**(3): p. 305-12.
333. Baldessarini RJ. Current status of antidepressants: clinical pharmacology and therapy. *J Clin Psychiatry*, 1989; **50**(4): p. 117-26.
334. Pineyro G and Blier P. Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action. *Pharmacol Rev*, 1999; **51**(3): p. 533-91.
335. Elhwuegi AS. Central monoamines and their role in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2004; **28**(3): p. 435-51.
336. Lee HS, Han J, Bai HJ and Kim KW. Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: regulation, molecular and cellular communication at the neurovascular interface. *Febs J*, 2009; **276**(17): p. 4622-35.
337. Palma V, Lim DA, Dahmane N, Sanchez P, Brionne TC, Herzberg CD, Gitton Y, Carleton A, Alvarez-Buylla A and Ruiz i Altaba A. Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development*, 2005; **132**(2): p. 335-44.
338. Zhang R, Zhang Z, Tsang W, Wang L and Chopp M. Down-regulation of p27kip1 increases proliferation of progenitor cells in adult rats. *Neuroreport*, 2004; **15**(11): p. 1797-800.
339. Zhang RL, Zhang ZG, Lu M, Wang Y, Yang JJ and Chopp M. Reduction of the cell cycle length by decreasing G1 phase and cell cycle reentry expand neuronal progenitor cells in the subventricular zone of adult rat after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006; **26**(6): p. 857-63.
340. Feng Y and Walsh CA. Protein-protein interactions, cytoskeletal regulation and neuronal migration. *Nat Rev Neurosci*, 2001; **2**(6): p. 408-16.
341. Lee SR, Kim HY, Rogowska J, Zhao BQ, Bhide P, Parent JM and Lo EH. Involvement of matrix metalloproteinase in neuroblast cell migration from the subventricular zone after stroke. *J Neurosci*, 2006; **26**(13): p. 3491-5.

342. Koizumi H, Higginbotham H, Poon T, Tanaka T, Brinkman BC and Gleeson JG. Doublecortin maintains bipolar shape and nuclear translocation during migration in the adult forebrain. *Nat Neurosci*, 2006; **9**(6): p. 779-86.
343. Doetsch F, Garcia-Verdugo JM and Alvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci*, 1997; **17**(13): p. 5046-61.
344. Garcia-Verdugo JM, Doetsch F, Wichterle H, Lim DA and Alvarez-Buylla A. Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. *J Neurobiol*, 1998; **36**(2): p. 234-48.
345. Louissaint A, Jr., Rao S, Leventhal C and Goldman SA. Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain. *Neuron*, 2002; **34**(6): p. 945-60.
346. Beaulieu C. The basis of anisotropic water diffusion in the nervous system - a technical review. *NMR Biomed*, 2002; **15**(7-8): p. 435-55.
347. Mori S and van Zijl PC. Fiber tracking: principles and strategies - a technical review. *NMR Biomed*, 2002; **15**(7-8): p. 468-80.
348. Watanabe T, Honda Y, Fujii Y, Koyama M, Matsuzawa H and Tanaka R. Three-dimensional anisotropy contrast magnetic resonance axonography to predict the prognosis for motor function in patients suffering from stroke. *J Neurosurg*, 2001; **94**(6): p. 955-60.
349. Madsen TM, Treschow A, Bengzon J, Bolwig TG, Lindvall O and Tingstrom A. Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy. *Biol Psychiatry*, 2000; **47**(12): p. 1043-9.
350. Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ and Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci*, 2000; **20**(24): p. 9104-10.
351. Scott BW, Wojtowicz JM and Burnham WM. Neurogenesis in the dentate gyrus of the rat following electroconvulsive shock seizures. *Exp Neurol*, 2000; **165**(2): p. 231-6.
352. Nakagawa S, Kim JE, Lee R, Malberg JE, Chen J, Steffen C, Zhang YJ, Nestler EJ and Duman RS. Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein. *J Neurosci*, 2002; **22**(9): p. 3673-82.
353. Duman RS, Malberg J and Nakagawa S. Regulation of adult neurogenesis by psychotropic drugs and stress. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001; **299**(2): p. 401-7.
354. Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA and Fuchs E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci*, 1997; **17**(7): p. 2492-8.
355. Tanapat P, Galea LA and Gould E. Stress inhibits the proliferation of granule cell precursors in the developing dentate gyrus. *Int J Dev Neurosci*, 1998; **16**(3-4): p. 235-9.
356. Lephart ED and Watson MA. Maternal separation: hypothalamic-preoptic area and hippocampal calbindin-D28K and calretinin in male and female infantile rats. *Neurosci Lett*, 1999; **267**(1): p. 41-4.
357. Malberg JE and Duman RS. Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology*, 2003; **28**(9): p. 1562-71.
358. Surget A, Saxe M, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, Chalon S, Griebel G, Hen R and Belzung C. Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. *Biol Psychiatry*, 2008; **64**(4): p. 293-301.

359. Banasr M, Valentine GW, Li XY, Gourley SL, Taylor JR and Duman RS. Chronic unpredictable stress decreases cell proliferation in the cerebral cortex of the adult rat. *Biol Psychiatry*, 2007; **62**(5): p. 496-504.
360. Czeh B, Michaelis T, Watanabe T, Frahm J, de Biurrun G, van Kampen M, Bartolomucci A and Fuchs E. Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001; **98**(22): p. 12796-801.
361. Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C and Hen R. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*, 2003; **301**(5634): p. 805-9.
362. Smith MA, Makino S, Kvetnansky R and Post RM. Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *J Neurosci*, 1995; **15**(3 Pt 1): p. 1768-77.
363. McEwen BS. Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci*, 1999; **22**: p. 105-22.
364. Nibuya M, Morinobu S and Duman RS. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci*, 1995; **15**(11): p. 7539-47.
365. Aberg MA, Aberg ND, Hedbacker H, Oscarsson J and Eriksson PS. Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J Neurosci*, 2000; **20**(8): p. 2896-903.
366. Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L and Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002; **99**(18): p. 11946-50.
367. Yoshimura S, Takagi Y, Harada J, Teramoto T, Thomas SS, Waeber C, Bakowska JC, Breakefield XO and Moskowitz MA. FGF-2 regulation of neurogenesis in adult hippocampus after brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001; **98**(10): p. 5874-9.
368. Duman RS, Heninger GR and Nestler EJ. A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry*, 1997; **54**(7): p. 597-606.
369. Newton SS and Duman RS. Regulation of neurogenesis and angiogenesis in depression. *Curr Neurovasc Res*, 2004; **1**(3): p. 261-7.
370. Benes FM, Kwok EW, Vincent SL and Todtenkopf MS. A reduction of nonpyramidal cells in sector CA2 of schizophrenics and manic depressives. *Biol Psychiatry*, 1998; **44**(2): p. 88-97.
371. Drevets WC, Ongur D and Price JL. Neuroimaging abnormalities in the subgenual prefrontal cortex: implications for the pathophysiology of familial mood disorders. *Mol Psychiatry*, 1998; **3**(3): p. 220-6, 190-1.
372. Ongur D, Drevets WC and Price JL. Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998; **95**(22): p. 13290-5.
373. Rajkowska G, Halaris A and Selemon LD. Reductions in neuronal and glial density characterize the dorsolateral prefrontal cortex in bipolar disorder. *Biol Psychiatry*, 2001; **49**(9): p. 741-52.
374. Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ, Wei J, Dilley G, Pittman SD, Meltzer HY, Overholser JC, Roth BL and Stockmeier CA. Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression. *Biol Psychiatry*, 1999; **45**(9): p. 1085-98.
375. Sheline YI, Wang PW, Gado MH, Csernansky JG and Vannier MW. Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996; **93**(9): p. 3908-13.

376. Dwivedi Y, Rizavi HS, Conley RR, Roberts RC, Tamminga CA and Pandey GN. Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects. *Arch Gen Psychiatry*, 2003; **60**(8): p. 804-15.
377. Chen B, Dowlatsahi D, MacQueen GM, Wang JF and Young LT. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry*, 2001; **50**(4): p. 260-5.
378. Heine VM, Zareno J, Maslam S, Joels M and Lucassen PJ. Chronic stress in the adult dentate gyrus reduces cell proliferation near the vasculature and VEGF and Flk-1 protein expression. *Eur J Neurosci*, 2005; **21**(5): p. 1304-14.
379. Czeh B, Abumaria N, Rygula R and Fuchs E. Quantitative changes in hippocampal microvasculature of chronically stressed rats: no effect of fluoxetine treatment. *Hippocampus*; **20**(1): p. 174-85.
380. Alonso G. Prolonged corticosterone treatment of adult rats inhibits the proliferation of oligodendrocyte progenitors present throughout white and gray matter regions of the brain. *Glia*, 2000; **31**(3): p. 219-31.
381. Gould E, Woolley CS and McEwen BS. Short-term glucocorticoid manipulations affect neuronal morphology and survival in the adult dentate gyrus. *Neuroscience*, 1990; **37**(2): p. 367-75.
382. Woolley CS, Gould E and McEwen BS. Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. *Brain Res*, 1990; **531**(1-2): p. 225-31.
383. Ekstrand J, Hellsten J and Tingstrom A. Environmental enrichment, exercise and corticosterone affect endothelial cell proliferation in adult rat hippocampus and prefrontal cortex. *Neurosci Lett*, 2008; **442**(3): p. 203-7.
384. Ekstrand J, Hellsten J, Wennstrom M and Tingstrom A. Differential inhibition of neurogenesis and angiogenesis by corticosterone in rats stimulated with electroconvulsive seizures. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2008; **32**(6): p. 1466-72.
385. Newton SS, Girgenti MJ, Collier EF and Duman RS. Electroconvulsive seizure increases adult hippocampal angiogenesis in rats. *Eur J Neurosci*, 2006; **24**(3): p. 819-28.
386. Hellsten J, Wennstrom M, Bengzon J, Mohapel P and Tingstrom A. Electroconvulsive seizures induce endothelial cell proliferation in adult rat hippocampus. *Biol Psychiatry*, 2004; **55**(4): p. 420-7.
387. Hellsten J, West MJ, Arvidsson A, Ekstrand J, Jansson L, Wennstrom M and Tingstrom A. Electroconvulsive seizures induce angiogenesis in adult rat hippocampus. *Biol Psychiatry*, 2005; **58**(11): p. 871-8.
388. Dome P, Teleki Z, Rihmer Z, Peter L, Dobos J, Kenessey I, Tovari J, Timar J, Paku S, Kovacs G and Dome B. Circulating endothelial progenitor cells and depression: a possible novel link between heart and soul. *Mol Psychiatry*, 2009; **14**(5): p. 523-31.
389. Greenberg DA and Jin K. From angiogenesis to neuropathology. *Nature*, 2005; **438**(7070): p. 954-9.
390. Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, Kumar S and Wang JM. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke*, 1994; **25**(9): p. 1794-8.
391. Chen HH, Chien CH and Liu HM. Correlation between angiogenesis and basic fibroblast growth factor expression in experimental brain infarct. *Stroke*, 1994; **25**(8): p. 1651-7.
392. Beck H and Plate KH. Angiogenesis after cerebral ischemia. *Acta Neuropathol*, 2009; **117**(5): p. 481-96.

393. Liu J, Solway K, Messing RO and Sharp FR. Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci*, 1998; **18**(19): p. 7768-78.
394. Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Batteur S, Simon RP and Greenberg DA. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001; **98**(8): p. 4710-5.
395. Jin K, Sun Y, Xie L, Peel A, Mao XO, Batteur S and Greenberg DA. Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum. *Mol Cell Neurosci*, 2003; **24**(1): p. 171-89.
396. Parent JM, Valentin VV and Lowenstein DH. Prolonged seizures increase proliferating neuroblasts in the adult rat subventricular zone-olfactory bulb pathway. *J Neurosci*, 2002; **22**(8): p. 3174-88.
397. Verma S and Anderson TJ. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation*, 2002; **105**(5): p. 546-9.
398. Behrendt D and Ganz P. Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol*, 2002; **90**(10C): p. 40L-48L.
399. Landmesser U and Drexler H. The clinical significance of endothelial dysfunction. *Curr Opin Cardiol*, 2005; **20**(6): p. 547-51.
400. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK and Deanfield JE. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*, 1992; **340**(8828): p. 1111-5.
401. Sherwood A, Hinderliter AL, Watkins LL, Waugh RA and Blumenthal JA. Impaired endothelial function in coronary heart disease patients with depressive symptomatology. *J Am Coll Cardiol*, 2005; **46**(4): p. 656-9.
402. Rajagopalan S, Brook R, Rubenfire M, Pitt E, Young E and Pitt B. Abnormal brachial artery flow-mediated vasodilation in young adults with major depression. *Am J Cardiol*, 2001; **88**(2): p. 196-8, A7.
403. Broadley AJ, Korszun A, Abdelaal E, Moskvina V, Deanfield J, Jones CJ and Frenneaux MP. Metyrapone improves endothelial dysfunction in patients with treated depression. *J Am Coll Cardiol*, 2006; **48**(1): p. 170-5.
404. Broadley AJ, Korszun A, Jones CJ and Frenneaux MP. Arterial endothelial function is impaired in treated depression. *Heart*, 2002; **88**(5): p. 521-3.
405. Rybakowski JK, Wykretowicz A, Heymann-Szlachcinska A and Wysocki H. Impairment of endothelial function in unipolar and bipolar depression. *Biol Psychiatry*, 2006; **60**(8): p. 889-91.
406. Dimopoulos N, Piperi C, Salonicioti A, Mitsonis C, Liappas I, Lea RW and Kalofoutis A. Elevation of plasma concentration of adhesion molecules in late-life depression. *Int J Geriatr Psychiatry*, 2006; **21**(10): p. 965-71.
407. Chrapko WE, Jurasz P, Radomski MW, Lara N, Archer SL and Le Melledo JM. Decreased platelet nitric oxide synthase activity and plasma nitric oxide metabolites in major depressive disorder. *Biol Psychiatry*, 2004; **56**(2): p. 129-34.
408. Thomas AJ, Ferrier IN, Kalaria RN, Woodward SA, Ballard C, Oakley A, Perry RH and O'Brien JT. Elevation in late-life depression of intercellular adhesion molecule-1 expression in the dorsolateral prefrontal cortex. *Am J Psychiatry*, 2000; **157**(10): p. 1682-4.
409. Yang EH, Lerman S, Lennon RJ, Simari RD, Lerman LO and Lerman A. Relation of depression to coronary endothelial function. *Am J Cardiol*, 2007; **99**(8): p. 1134-6.
410. Mackman N. Tissue-specific hemostasis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005; **25**(11): p. 2273-81.
411. Gawaz M, Langer H and May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest*, 2005; **115**(12): p. 3378-84.

412. Esmon CT. The interactions between inflammation and coagulation. *Br J Haematol*, 2005; **131**(4): p. 417-30.
413. Schins A, Honig A, Crijns H, Baur L and Hamulyak K. Increased coronary events in depressed cardiovascular patients: 5-HT_{2A} receptor as missing link? *Psychosom Med*, 2003; **65**(5): p. 729-37.
414. Brydon L, Magid K and Steptoe A. Platelets, coronary heart disease, and stress. *Brain Behav Immun*, 2006; **20**(2): p. 113-9.
415. Jennings LK. Role of platelets in atherothrombosis. *Am J Cardiol*, 2009; **103**(3 Suppl): p. 4A-10A.
416. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ and Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med*, 1992; **326**(4): p. 242-50.
417. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ and Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N Engl J Med*, 1992; **326**(5): p. 310-8.
418. Davies MJ. The contribution of thrombosis to the clinical expression of coronary atherosclerosis. *Thromb Res*, 1996; **82**(1): p. 1-32.
419. Braunwald E, Antman EM, Beasley JW, Califf RM, Cheitlin MD, Hochman JS, Jones RH, Kereiakes D, Kupersmith J, Levin TN, Pepine CJ, Schaeffer JW, Smith EE, 3rd, Steward DE, Theroux P, Gibbons RJ, Alpert JS, Faxon DP, Fuster V, Gregoratos G, Hiratzka LF, Jacobs AK and Smith SC, Jr. ACC/AHA guideline update for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction--2002: summary article: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on the Management of Patients With Unstable Angina). *Circulation*, 2002; **106**(14): p. 1893-900.
420. Gibbons RJ, Abrams J, Chatterjee K, Daley J, Deedwania PC, Douglas JS, Ferguson TB, Jr., Fihn SD, Fraker TD, Jr., Gardin JM, O'Rourke RA, Pasternak RC, Williams SV, Gibbons RJ, Alpert JS, Antman EM, Hiratzka LF, Fuster V, Faxon DP, Gregoratos G, Jacobs AK and Smith SC, Jr. ACC/AHA 2002 guideline update for the management of patients with chronic stable angina--summary article: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on the Management of Patients With Chronic Stable Angina). *Circulation*, 2003; **107**(1): p. 149-58.
421. von Kanel R, Dimsdale JE, Adler KA, Patterson TL, Mills PJ and Grant I. Effects of depressive symptoms and anxiety on hemostatic responses to acute mental stress and recovery in the elderly. *Psychiatry Res*, 2004; **126**(3): p. 253-64.
422. Kop WJ, Gottdiener JS, Tangen CM, Fried LP, McBurnie MA, Walston J, Newman A, Hirsch C and Tracy RP. Inflammation and coagulation factors in persons > 65 years of age with symptoms of depression but without evidence of myocardial ischemia. *Am J Cardiol*, 2002; **89**(4): p. 419-24.
423. Lahlou-Laforet K, Alhenc-Gelas M, Pornin M, Bydlowski S, Seigneur E, Benetos A, Kierzin JM, Scarabin PY, Ducimetiere P, Aiach M, Guize L and Consoli SM. Relation of depressive mood to plasminogen activator inhibitor, tissue plasminogen activator, and fibrinogen levels in patients with versus without coronary heart disease. *Am J Cardiol*, 2006; **97**(9): p. 1287-91.
424. Morel-Kopp MC, McLean L, Chen Q, Tofler GH, Tennant C, Maddison V and Ward CM. The association of depression with platelet activation: evidence for a treatment effect. *J Thromb Haemost*, 2009; **7**(4): p. 573-81.

425. Walsh MT, Dinan TG, Condren RM, Ryan M and Kenny D. Depression is associated with an increase in the expression of the platelet adhesion receptor glycoprotein Ib. *Life Sci*, 2002; **70**(26): p. 3155-65.
426. Kuijpers PM, Hamulyak K, Strik JJ, Wellens HJ and Honig A. Beta-thromboglobulin and platelet factor 4 levels in post-myocardial infarction patients with major depression. *Psychiatry Res*, 2002; **109**(2): p. 207-10.
427. Laghrissi-Thode F, Wagner WR, Pollock BG, Johnson PC and Finkel MS. Elevated platelet factor 4 and beta-thromboglobulin plasma levels in depressed patients with ischemic heart disease. *Biol Psychiatry*, 1997; **42**(4): p. 290-5.
428. Musselman DL, Marzec UM, Manatunga A, Penna S, Reemsnyder A, Knight BT, Baron A, Hanson SR and Nemeroff CB. Platelet reactivity in depressed patients treated with paroxetine: preliminary findings. *Arch Gen Psychiatry*, 2000; **57**(9): p. 875-82.
429. Musselman DL, Marzec U, Davidoff M, Manatunga AK, Gao F, Reemsnyder A, Duggirala S, Larsen H, Taylor RW, Hanson S and Nemeroff CB. Platelet activation and secretion in patients with major depression, thoracic aortic atherosclerosis, or renal dialysis treatment. *Depress Anxiety*, 2002; **15**(3): p. 91-101.
430. Sheline YI, Bardgett ME, Jackson JL, Newcomer JW and Csernansky JG. Platelet serotonin markers and depressive symptomatology. *Biol Psychiatry*, 1995; **37**(7): p. 442-7.
431. Hrdina PD, Bakish D, Chudzik J, Ravindran A and Lapierre YD. Serotonergic markers in platelets of patients with major depression: upregulation of 5-HT₂ receptors. *J Psychiatry Neurosci*, 1995; **20**(1): p. 11-9.
432. Neuger J, El Houry A, Kjellman BF, Wahlund B, Aberg-Wistedt A and Stain-Malmgren R. Platelet serotonin functions in untreated major depression. *Psychiatry Res*, 1999; **85**(2): p. 189-98.
433. Shimbo D, Child J, Davidson K, Geer E, Osende JI, Reddy S, Dronge A, Fuster V and Badimon JJ. Exaggerated serotonin-mediated platelet reactivity as a possible link in depression and acute coronary syndromes. *Am J Cardiol*, 2002; **89**(3): p. 331-3.
434. Shah SU, White A, White S and Littler WA. Heart and mind: (1) relationship between cardiovascular and psychiatric conditions. *Postgrad Med J*, 2004; **80**(950): p. 683-9.
435. Tedgui A and Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev*, 2006; **86**(2): p. 515-81.
436. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature*, 2002; **420**(6917): p. 846-52.
437. Leitinger N. Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 2003; **14**(5): p. 421-30.
438. Skalen K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hulten LM, Wiklund O, Innerarity TL and Boren J. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature*, 2002; **417**(6890): p. 750-4.
439. Kume N, Cybulsky MI and Gimbrone MA, Jr. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest*, 1992; **90**(3): p. 1138-44.
440. Cybulsky MI and Gimbrone MA, Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*, 1991; **251**(4995): p. 788-91.
441. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*, 2005; **352**(16): p. 1685-95.
442. Hansson GK, Libby P, Schonbeck U and Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res*, 2002; **91**(4): p. 281-91.

443. Janeway CA, Jr. and Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 2002; **20**: p. 197-216.
444. Zeiher AM, Goebel H, Schachinger V and Ihling C. Tissue endothelin-1 immunoreactivity in the active coronary atherosclerotic plaque. A clue to the mechanism of increased vasoreactivity of the culprit lesion in unstable angina. *Circulation*, 1995; **91**(4): p. 941-7.
445. Buttery LD, Springall DR, Chester AH, Evans TJ, Standfield EN, Parums DV, Yacoub MH and Polak JM. Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Lab Invest*, 1996; **75**(1): p. 77-85.
446. Sugiyama S, Okada Y, Sukhova GK, Virmani R, Heinecke JW and Libby P. Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. *Am J Pathol*, 2001; **158**(3): p. 879-91.
447. Shah PK, Falk E, Badimon JJ, Fernandez-Ortiz A, Mailhac A, Villareal-Levy G, Fallon JT, Regnstrom J and Fuster V. Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation*, 1995; **92**(6): p. 1565-9.
448. Frostegard J, Ulfgren AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U and Hansson GK. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis*, 1999; **145**(1): p. 33-43.
449. Biasucci LM, Vitelli A, Liuzzo G, Altamura S, Caligiuri G, Monaco C, Rebuffi AG, Ciliberto G and Maseri A. Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation*, 1996; **94**(5): p. 874-7.
450. Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, Venge P and Wallentin L. Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease. *N Engl J Med*, 2000; **343**(16): p. 1139-47.
451. Damas JK, Waehre T, Yndestad A, Otterdal K, Hognestad A, Solum NO, Gullestad L, Froland SS and Aukrust P. Interleukin-7-mediated inflammation in unstable angina: possible role of chemokines and platelets. *Circulation*, 2003; **107**(21): p. 2670-6.
452. Aukrust P, Muller F, Ueland T, Berget T, Aaser E, Brunsvig A, Solum NO, Forfang K, Froland SS and Gullestad L. Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina. Possible reflection of T lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Circulation*, 1999; **100**(6): p. 614-20.
453. Liuzzo G, Goronzy JJ, Yang H, Kopecky SL, Holmes DR, Frye RL and Weyand CM. Monoclonal T-cell proliferation and plaque instability in acute coronary syndromes. *Circulation*, 2000; **101**(25): p. 2883-8.
454. Caligiuri G, Paulsson G, Nicoletti A, Maseri A and Hansson GK. Evidence for antigen-driven T-cell response in unstable angina. *Circulation*, 2000; **102**(10): p. 1114-9.
455. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ and Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation*, 2000; **101**(15): p. 1767-72.
456. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE and Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med*, 2000; **342**(12): p. 836-43.

457. Schiepers OJ, Wichers MC and Maes M. Cytokines and major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2005; **29**(2): p. 201-17.
458. Maes M. Evidence for an immune response in major depression: a review and hypothesis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 1995; **19**(1): p. 11-38.
459. Shimbo D, Chaplin W, Crossman D, Haas D and Davidson KW. Role of depression and inflammation in incident coronary heart disease events. *Am J Cardiol*, 2005; **96**(7): p. 1016-21.
460. Smith RS. The macrophage theory of depression. *Med Hypotheses*, 1991; **35**(4): p. 298-306.
461. Sherman ML, Spriggs DR, Arthur KA, Imamura K, Frei E, 3rd and Kufe DW. Recombinant human tumor necrosis factor administered as a five-day continuous infusion in cancer patients: phase I toxicity and effects on lipid metabolism. *J Clin Oncol*, 1988; **6**(2): p. 344-50.
462. Niiranen A, Laaksonen R, Iivanainen M, Mattson K, Farkkila M and Cantell K. Behavioral assessment of patients treated with alpha-interferon. *Acta Psychiatr Scand*, 1988; **78**(5): p. 622-6.
463. Reichenberg A, Yirmiya R, Schuld A, Kraus T, Haack M, Morag A and Pollmacher T. Cytokine-associated emotional and cognitive disturbances in humans. *Arch Gen Psychiatry*, 2001; **58**(5): p. 445-52.
464. Young-Xu Y, Chan KA, Liao JK, Ravid S and Blatt CM. Long-term statin use and psychological well-being. *J Am Coll Cardiol*, 2003; **42**(4): p. 690-7.
465. Schonbeck U and Libby P. Inflammation, immunity, and HMG-CoA reductase inhibitors: statins as antiinflammatory agents? *Circulation*, 2004; **109**(21 Suppl 1): p. II18-26.
466. Steptoe A, Willemsen G, Owen N, Flower L and Mohamed-Ali V. Acute mental stress elicits delayed increases in circulating inflammatory cytokine levels. *Clin Sci (Lond)*, 2001; **101**(2): p. 185-92.
467. Frommberger UH, Bauer J, Haselbauer P, Fraulin A, Riemann D and Berger M. Interleukin-6-(IL-6) plasma levels in depression and schizophrenia: comparison between the acute state and after remission. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 1997; **247**(4): p. 228-33.
468. Lane R and Baldwin D. Selective serotonin reuptake inhibitor-induced serotonin syndrome: review. *J Clin Psychopharmacol*, 1997; **17**(3): p. 208-21.
469. Kupfer DJ. Long-term treatment of depression. *J Clin Psychiatry*, 1991; **52 Suppl**: p. 28-34.
470. Keller MB. Issues in treatment-resistant depression. *J Clin Psychiatry*, 2005; **66 Suppl 8**: p. 5-12.
471. Thase ME and Rush AJ. When at first you don't succeed: sequential strategies for antidepressant nonresponders. *J Clin Psychiatry*, 1997; **58 Suppl 13**: p. 23-9.
472. Fava M and Davidson KG. Definition and epidemiology of treatment-resistant depression. *Psychiatr Clin North Am*, 1996; **19**(2): p. 179-200.
473. Mast BT, Neufeld S, MacNeill SE and Lichtenberg PA. Longitudinal support for the relationship between vascular risk factors and late-life depressive symptoms. *Am J Geriatr Psychiatry*, 2004; **12**(1): p. 93-101.
474. Iosifescu DV, Clementi-Craven N, Fraguas R, Papakostas GI, Petersen T, Alpert JE, Nierenberg AA and Fava M. Cardiovascular risk factors may moderate pharmacological treatment effects in major depressive disorder. *Psychosom Med*, 2005; **67**(5): p. 703-6.

475. Lyness JM, King DA, Conwell Y, Cox C and Caine ED. Cerebrovascular risk factors and 1-year depression outcome in older primary care patients. *Am J Psychiatry*, 2000; **157**(9): p. 1499-501.
476. Alexopoulos GS, Kiosses DN, Murphy C and Heo M. Executive dysfunction, heart disease burden, and remission of geriatric depression. *Neuropsychopharmacology*, 2004; **29**(12): p. 2278-84.
477. Sonawalla SB, Papakostas GI, Petersen TJ, Yeung AS, Smith MM, Sickinger AH, Gordon J, Israel JA, Tedlow JR, Lamon-Fava S and Fava M. Elevated cholesterol levels associated with nonresponse to fluoxetine treatment in major depressive disorder. *Psychosomatics*, 2002; **43**(4): p. 310-6.
478. Papakostas GI, Petersen T, Sonawalla SB, Merens W, Iosifescu DV, Alpert JE, Fava M and Nierenberg AA. Serum cholesterol in treatment-resistant depression. *Neuropsychobiology*, 2003; **47**(3): p. 146-51.
479. Lanquillon S, Krieg JC, Bening-Abu-Shach U and Vedder H. Cytokine production and treatment response in major depressive disorder. *Neuropsychopharmacology*, 2000; **22**(4): p. 370-9.
480. Maes M, Bosmans E, De Jongh R, Kenis G, Vandoolaeghe E and Neels H. Increased serum IL-6 and IL-1 receptor antagonist concentrations in major depression and treatment resistant depression. *Cytokine*, 1997; **9**(11): p. 853-8.
481. Shimbo D, Rieckmann N, Paulino R and Davidson KW. Relation between C reactive protein and depression remission status in patients presenting with acute coronary syndrome. *Heart*, 2006; **92**(9): p. 1316-8.
482. Christensen P, Lolk A, Gram LF, Kragh-Sorensen P, Pedersen OL and Nielsen S. Cortisol and treatment of depression: predictive value of spontaneous and suppressed cortisol levels and course of spontaneous plasma cortisol. *Psychopharmacology (Berl)*, 1989; **97**(4): p. 471-5.
483. de Guevara MS, Schaufele SI, Nicola-Siri LC, Fahrner RD, Ortiz-Fragola E, Martinez-Martinez JA, Cardinali DP and Guinjoan SM. Worsening of depressive symptoms 6 months after an acute coronary event in older adults is associated with impairment of cardiac autonomic function. *J Affect Disord*, 2004; **80**(2-3): p. 257-62.
484. Fraguas R, Jr., Marci C, Fava M, Iosifescu DV, Bankier B, Loh R and Dougherty DD. Autonomic reactivity to induced emotion as potential predictor of response to antidepressant treatment. *Psychiatry Res*, 2007; **151**(1-2): p. 169-72.
485. Peet M and Horrobin DF. A dose-ranging study of the effects of ethyl-eicosapentaenoate in patients with ongoing depression despite apparently adequate treatment with standard drugs. *Arch Gen Psychiatry*, 2002; **59**(10): p. 913-9.
486. Swenson JR, Doucette S and Fergusson D. Adverse cardiovascular events in antidepressant trials involving high-risk patients: a systematic review of randomized trials. *Can J Psychiatry*, 2006; **51**(14): p. 923-9.
487. McKinney WT. Animal models of depression: an overview. *Psychiatr Dev*, 1984; **2**(2): p. 77-96.
488. Willner P and Mitchell PJ. The validity of animal models of predisposition to depression. *Behav Pharmacol*, 2002; **13**(3): p. 169-88.
489. Willner P. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl)*, 1984; **83**(1): p. 1-16.
490. Willner P. Animal models of depression: an overview. *Pharmacol Ther*, 1990; **45**(3): p. 425-55.
491. Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl)*, 1997; **134**(4): p. 319-29.

492. Willner P. Animal models of depression: validity and applications. *Adv Biochem Psychopharmacol*, 1995; **49**: p. 19-41.
493. Cryan JF and Holmes A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov*, 2005; **4**(9): p. 775-90.
494. Rush AJ, Trivedi MH, Wisniewski SR, Nierenberg AA, Stewart JW, Warden D, Niederehe G, Thase ME, Lavori PW, Lebowitz BD, McGrath PJ, Rosenbaum JF, Sackeim HA, Kupfer DJ, Luther J and Fava M. Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR*D report. *Am J Psychiatry*, 2006; **163**(11): p. 1905-17.
495. Trivedi MH, Rush AJ, Wisniewski SR, Nierenberg AA, Warden D, Ritz L, Norquist G, Howland RH, Lebowitz B, McGrath PJ, Shores-Wilson K, Biggs MM, Balasubramani GK and Fava M. Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR*D: implications for clinical practice. *Am J Psychiatry*, 2006; **163**(1): p. 28-40.
496. Bodnoff SR, Suranyi-Cadotte B, Aitken DH, Quirion R and Meaney MJ. The effects of chronic antidepressant treatment in an animal model of anxiety. *Psychopharmacology (Berl)*, 1988; **95**(3): p. 298-302.
497. Fontana DJ, Carbary TJ and Commissaris RL. Effects of acute and chronic anti-panic drug administration on conflict behavior in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*, 1989; **98**(2): p. 157-62.
498. Willner P. Animal models as simulations of depression. *Trends Pharmacol Sci*, 1991; **12**(4): p. 131-6.
499. Holsboer F. Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy. *J Affect Disord*, 2001; **62**(1-2): p. 77-91.
500. Kupfer DJ and Thase ME. The use of the sleep laboratory in the diagnosis of affective disorders. *Psychiatr Clin North Am*, 1983; **6**(1): p. 3-25.
501. Leonard BE. The immune system, depression and the action of antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2001; **25**(4): p. 767-80.
502. Akiskal HS. Interaction of biologic and psychologic factors in the origin of depressive disorders. *Acta Psychiatr Scand Suppl*, 1985; **319**: p. 131-9.
503. Lloyd C. Life events and depressive disorder reviewed. II. Events as precipitating factors. *Arch Gen Psychiatry*, 1980; **37**(5): p. 541-8.
504. Lloyd C. Life events and depressive disorder reviewed. I. Events as predisposing factors. *Arch Gen Psychiatry*, 1980; **37**(5): p. 529-35.
505. Papp M, Willner P and Muscat R. An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress. *Psychopharmacology (Berl)*, 1991; **104**(2): p. 255-9.
506. Willner P, Muscat R and Papp M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev*, 1992; **16**(4): p. 525-34.
507. Weiss JM. Does decreased sucrose intake indicate loss of preference in CMS model? *Psychopharmacology (Berl)*, 1997; **134**(4): p. 368-70; discussion 371-7.
508. Pothion S, Bizot JC, Trovero F and Belzung C. Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress. *Behav Brain Res*, 2004; **155**(1): p. 135-46.
509. Surget A and Belzung C. Unpredictable chronic mild stress in mice. In: A.V. Kalueff and J.L. LaPorte, Editors, *Experimental Models in Neurobehavioral Research*, Nova Science, New York 2008: p. 79-112.
510. D'Aquila PS, Brain P and Willner P. Effects of chronic mild stress on performance in behavioural tests relevant to anxiety and depression. *Physiol Behav*, 1994; **56**(5): p. 861-7.

511. Gronli J, Murison R, Fiske E, Bjorvatn B, Sorensen E, Portas CM and Ursin R. Effects of chronic mild stress on sexual behavior, locomotor activity and consumption of sucrose and saccharine solutions. *Physiol Behav*, 2005; **84**(4): p. 571-7.
512. Brotto LA, Gorzalka BB and LaMarre AK. Melatonin protects against the effects of chronic stress on sexual behaviour in male rats. *Neuroreport*, 2001; **12**(16): p. 3465-9.
513. McArthur R and Borsini F. Animal models of depression in drug discovery: a historical perspective. *Pharmacol Biochem Behav*, 2006; **84**(3): p. 436-52.
514. Porsolt RD, Bertin A and Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 1977; **229**(2): p. 327-36.
515. Porsolt RD, Le Pichon M and Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 1977; **266**(5604): p. 730-2.
516. Cryan JF, Mombereau C and Vassout A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev*, 2005; **29**(4-5): p. 571-625.
517. Soubrie P, Kulkarni S, Simon P and Boissier JR. [Effects of antianxiety drugs on the food intake in trained and untrained rats and mice (author's transl)]. *Psychopharmacologia*, 1975; **45**(2): p. 203-10.
518. Yalcin I, Belzung C and Surget A. Mouse strain differences in the unpredictable chronic mild stress: a four-antidepressant survey. *Behav Brain Res*, 2008; **193**(1): p. 140-3.
519. Song C and Leonard BE. The olfactory bulbectomized rat as a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev*, 2005; **29**(4-5): p. 627-47.
520. Cryan JF, McGrath C, Leonard BE and Norman TR. Combining pindolol and paroxetine in an animal model of chronic antidepressant action--can early onset of action be detected? *Eur J Pharmacol*, 1998; **352**(1): p. 23-8.
521. Zueger M, Urani A, Chourbaji S, Zacher C, Roche M, Harkin A and Gass P. Olfactory bulbectomy in mice induces alterations in exploratory behavior. *Neurosci Lett*, 2005; **374**(2): p. 142-6.
522. Cryan JF and Slattery DA. Animal models of mood disorders: Recent developments. *Curr Opin Psychiatry*, 2007; **20**(1): p. 1-7.
523. Overstreet DH. The Flinders sensitive line rats: a genetic animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev*, 1993; **17**(1): p. 51-68.
524. Overstreet DH, Friedman E, Mathe AA and Yavid G. The Flinders Sensitive Line rat: a selectively bred putative animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev*, 2005; **29**(4-5): p. 739-59.
525. Solberg LC, Olson SL, Turek FW and Redei E. Altered hormone levels and circadian rhythm of activity in the WKY rat, a putative animal model of depression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2001; **281**(3): p. R786-94.
526. Heurteaux C, Lucas G, Guy N, El Yacoubi M, Thummler S, Peng XD, Noble F, Blondeau N, Widmann C, Borsotto M, Gobbi G, Vaugeois JM, Debonnel G and Lazdunski M. Deletion of the background potassium channel TREK-1 results in a depression-resistant phenotype. *Nat Neurosci*, 2006; **9**(9): p. 1134-41.
527. Svenningsson P, Chergui K, Rachleff I, Flajolet M, Zhang X, El Yacoubi M, Vaugeois JM, Nomikos GG and Greengard P. Alterations in 5-HT_{1B} receptor function by p11 in depression-like states. *Science*, 2006; **311**(5757): p. 77-80.
528. Holmes A, Yang RJ, Murphy DL and Crawley JN. Evaluation of antidepressant-related behavioral responses in mice lacking the serotonin transporter. *Neuropsychopharmacology*, 2002; **27**(6): p. 914-23.
529. McKinney WT, Jr. and Bunney WE, Jr. Animal model of depression. I. Review of evidence: implications for research. *Arch Gen Psychiatry*, 1969; **21**(2): p. 240-8.

530. Panksepp J, Vilberg T, Bean NJ, Coy DH and Kastin AJ. Reduction of distress vocalization in chicks by opiate-like peptides. *Brain Res Bull*, 1978; **3**(6): p. 663-7.
531. Francis DD, Champagne FA, Liu D and Meaney MJ. Maternal care, gene expression, and the development of individual differences in stress reactivity. *Ann N Y Acad Sci*, 1999; **896**: p. 66-84.
532. Meaney MJ. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci*, 2001; **24**: p. 1161-92.
533. Lehr E. Distress call reactivation in isolated chicks: a behavioral indicator with high selectivity for antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)*, 1989; **97**(2): p. 145-6.
534. Sofia RD. Effects of centrally active drugs on four models of experimentally-induced aggression in rodents. *Life Sci*, 1969; **8**(13): p. 705-16.
535. Sofia RD. Structural relationship and potency of agents which selectively block mouse killing (muricide) behavior in rats. *Life Sci*, 1969; **8**(21): p. 1201-10.
536. Willner P, Theodorou A and Montgomery A. Subchronic treatment with the tricyclic antidepressant DMI increases isolation-induced fighting in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 1981; **14**(4): p. 475-9.
537. Garzon J and Del Rio J. Hyperactivity induced in rats by long-term isolation: further studies on a new animal model for the detection of antidepressants. *Eur J Pharmacol*, 1981; **74**(4): p. 287-94.
538. Malatynska E and Kostowski W. The effect of antidepressant drugs on dominance behavior in rats competing for food. *Pol J Pharmacol Pharm*, 1984; **36**(5): p. 531-40.
539. Fuchs E. Social stress in tree shrews as an animal model of depression: an example of a behavioral model of a CNS disorder. *CNS Spectr*, 2005; **10**(3): p. 182-90.
540. Fuchs E, Kramer M, Hermes B, Netter P and Hiemke C. Psychosocial stress in tree shrews: clomipramine counteracts behavioral and endocrine changes. *Pharmacol Biochem Behav*, 1996; **54**(1): p. 219-28.
541. Strekalova T, Spanagel R, Bartsch D, Henn FA and Gass P. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. *Neuropsychopharmacology*, 2004; **29**(11): p. 2007-17.
542. Meerlo P, Overkamp GJ, Benning MA, Koolhaas JM and Van den Hoofdakker RH. Long-term changes in open field behaviour following a single social defeat in rats can be reversed by sleep deprivation. *Physiol Behav*, 1996; **60**(1): p. 115-9.
543. Meerlo P, Overkamp GJ, Daan S, Van Den Hoofdakker RH and Koolhaas JM. Changes in Behaviour and Body Weight Following a Single or Double Social Defeat in Rats. *Stress*, 1996; **1**(1): p. 21-32.
544. Buwalda B, de Boer SF, Schmidt ED, Felszeghy K, Nyakas C, Sgoifo A, Van der Vegt BJ, Tilders FJ, Bohus B and Koolhaas JM. Long-lasting deficient dexamethasone suppression of hypothalamic-pituitary-adrenocortical activation following peripheral CRF challenge in socially defeated rats. *J Neuroendocrinol*, 1999; **11**(7): p. 513-20.
545. Buwalda B, Blom WA, Koolhaas JM and van Dijk G. Behavioral and physiological responses to stress are affected by high-fat feeding in male rats. *Physiol Behav*, 2001; **73**(3): p. 371-7.
546. Bohus B, Koolhaas JM, Heijnen CJ and de Boer O. Immunological responses to social stress: dependence on social environment and coping abilities. *Neuropsychobiology*, 1993; **28**(1-2): p. 95-9.
547. Von Frijtag JC, Reijmers LG, Van der Harst JE, Leus IE, Van den Bos R and Spruijt BM. Defeat followed by individual housing results in long-term impaired reward- and cognition-related behaviours in rats. *Behav Brain Res*, 2000; **117**(1-2): p. 137-46.

548. Seligman ME and Maier SF. Failure to escape traumatic shock. *J Exp Psychol*, 1967; **74**(1): p. 1-9.
549. Seligman ME, Rosellini RA and Kozak MJ. Learned helplessness in the rat: time course, immunization, and reversibility. *J Comp Physiol Psychol*, 1975; **88**(2): p. 542-7.
550. Kohen R, Kirov S, Navaja GP, Happe HK, Hamblin MW, Snoddy JR, Neumaier JF and Petty F. Gene expression profiling in the hippocampus of learned helpless and nonhelpless rats. *Pharmacogenomics J*, 2005; **5**(5): p. 278-91.
551. Katz RJ. Animal model of depression: effects of electroconvulsive shock therapy. *Neurosci Biobehav Rev*, 1981; **5**(2): p. 273-7.
552. Katz RJ. Animal model of depression: pharmacological sensitivity of a hedonic deficit. *Pharmacol Biochem Behav*, 1982; **16**(6): p. 965-8.
553. Katz RJ and Baldrighi G. A further parametric study of imipramine in an animal model of depression. *Pharmacol Biochem Behav*, 1982; **16**(6): p. 969-72.
554. Katz RJ and Sibel M. Animal model of depression: tests of three structurally and pharmacologically novel antidepressant compounds. *Pharmacol Biochem Behav*, 1982; **16**(6): p. 973-7.
555. Willner P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*, 2005; **52**(2): p. 90-110.
556. Grippo AJ and Johnson AK. Biological mechanisms in the relationship between depression and heart disease. *Neurosci Biobehav Rev*, 2002; **26**(8): p. 941-62.
557. Shively CA, Musselman DL and Willard SL. Stress, depression, and coronary artery disease: modeling comorbidity in female primates. *Neurosci Biobehav Rev*, 2009; **33**(2): p. 133-44.
558. Glassman AH, Bigger JT, Jr. and Gaffney M. Psychiatric characteristics associated with long-term mortality among 361 patients having an acute coronary syndrome and major depression: seven-year follow-up of SADHART participants. *Arch Gen Psychiatry*, 2009; **66**(9): p. 1022-9.
559. Yalcin I, Aksu F, Bodard S, Chalon S and Belzung C. Antidepressant-like effect of tramadol in the unpredictable chronic mild stress procedure: possible involvement of the noradrenergic system. *Behav Pharmacol*, 2007; **18**(7): p. 623-31.
560. Ibarguen-Vargas Y, Surget A, Touma C, Palme R and Belzung C. Multifaceted strain-specific effects in a mouse model of depression and of antidepressant reversal. *Psychoneuroendocrinology*, 2008; **33**(10): p. 1357-68.
561. Gold PW, Gabry KE, Yasuda MR and Chrousos GP. Divergent endocrine abnormalities in melancholic and atypical depression: clinical and pathophysiologic implications. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2002; **31**(1): p. 37-62, vi.
562. Kop WJ. Acute and chronic psychological risk factors for coronary syndromes: moderating effects of coronary artery disease severity. *J Psychosom Res*, 1997; **43**(2): p. 167-81.
563. Slater C and Carlton B. Behavior, lifestyle, and socioeconomic variables as determinants of health status: implications for health policy development. *Am J Prev Med*, 1985; **1**(5): p. 25-33.
564. Lynch J, Kaplan GA, Salonen R, Cohen RD and Salonen JT. Socioeconomic status and carotid atherosclerosis. *Circulation*, 1995; **92**(7): p. 1786-92.
565. Falger PR and Schouten EG. Exhaustion, psychological stressors in the work environment, and acute myocardial infarction in adult men. *J Psychosom Res*, 1992; **36**(8): p. 777-86.

566. Krantz DS, Kop WJ, Santiago HT and Gottdiener JS. Mental stress as a trigger of myocardial ischemia and infarction. *Cardiol Clin*, 1996; **14**(2): p. 271-87.
567. Meisel SR, Kutz I, Dayan KI, Pauzner H, Chetboun I, Arbel Y and David D. Effect of Iraqi missile war on incidence of acute myocardial infarction and sudden death in Israeli civilians. *Lancet*, 1991; **338**(8768): p. 660-1.
568. Rozanski A, Bairey CN, Krantz DS, Friedman J, Resser KJ, Morell M, Hilton-Chalfen S, Hestrin L, Bietendorf J and Berman DS. Mental stress and the induction of silent myocardial ischemia in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*, 1988; **318**(16): p. 1005-12.
569. Burg MM, Jain D, Soufer R, Kerns RD and Zaret BL. Role of behavioral and psychological factors in mental stress-induced silent left ventricular dysfunction in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*, 1993; **22**(2): p. 440-8.
570. Cordellini S and Vassilieff VS. Decreased endothelium-dependent vasoconstriction to noradrenaline in acute-stressed rats is potentiated by previous chronic stress: nitric oxide involvement. *Gen Pharmacol*, 1998; **30**(1): p. 79-83.
571. Bernatova I, Puzserova A, Navarova J, Csizmadiova Z and Zeman M. Crowding-induced alterations in vascular system of Wistar-Kyoto rats: role of nitric oxide. *Physiol Res*, 2007; **56**(5): p. 667-9.
572. Neves VJ, Moura MJ, Tamascia ML, Ferreira R, Silva NS, Costa R, Montemor PL, Narvaes EA, Bernardes CF, Novaes PD and Marcondes FK. Proatherosclerotic effects of chronic stress in male rats: Altered phenylephrine sensitivity and nitric oxide synthase activity of aorta and circulating lipids. *Stress*, 2008: p. 1.
573. Furchgott RF and Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *Faseb J*, 1989; **3**(9): p. 2007-18.
574. Furchgott RF and Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 1980; **288**(5789): p. 373-6.
575. Galley HF and Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth*, 2004; **93**(1): p. 105-13.
576. Thomas AJ, Morris C, Davis S, Jackson E, Harrison R and O'Brien JT. Soluble cell adhesion molecules in late-life depression. *Int Psychogeriatr*, 2007; **19**(5): p. 914-20.
577. Krieglstein CF and Granger DN. Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am J Hypertens*, 2001; **14**(6 Pt 2): p. 44S-54S.
578. Kim JS. Cytokines and adhesion molecules in stroke and related diseases. *J Neurol Sci*, 1996; **137**(2): p. 69-78.
579. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysohoou C, Tsetsekou E, Papageorgiou C, Christodoulou G and Stefanadis C. Inflammation, coagulation, and depressive symptomatology in cardiovascular disease-free people; the ATTICA study. *Eur Heart J*, 2004; **25**(6): p. 492-9.
580. Galis ZS, Johnson C, Godin D, Magid R, Shipley JM, Senior RM and Ivan E. Targeted disruption of the matrix metalloproteinase-9 gene impairs smooth muscle cell migration and geometrical arterial remodeling. *Circ Res*, 2002; **91**(9): p. 852-9.
581. Garvin P, Nilsson L, Carstensen J, Jonasson L and Kristenson M. Plasma levels of matrix metalloproteinase-9 are independently associated with psychosocial factors in a middle-aged normal population. *Psychosom Med*, 2009; **71**(3): p. 292-300.
582. Sima AV, Stancu CS and Simionescu M. Vascular endothelium in atherosclerosis. *Cell Tissue Res*, 2009; **335**(1): p. 191-203.
583. Nilupul Perera M, Ma HK, Arakawa S, Howells DW, Markus R, Rowe CC and Donnan GA. Inflammation following stroke. *J Clin Neurosci*, 2006; **13**(1): p. 1-8.

584. Grippo AJ, Francis J, Beltz TG, Felder RB and Johnson AK. Neuroendocrine and cytokine profile of chronic mild stress-induced anhedonia. *Physiol Behav*, 2005; **84**(5): p. 697-706.
585. Kawakami N, Takatsuka N, Shimizu H and Ishibashi H. Depressive symptoms and occurrence of type 2 diabetes among Japanese men. *Diabetes Care*, 1999; **22**(7): p. 1071-6.
586. Gawaz M, Brand K, Dickfeld T, Pogatsa-Murray G, Page S, Bogner C, Koch W, Schomig A and Neumann F. Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis*, 2000; **148**(1): p. 75-85.
587. Gawaz M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc Res*, 2004; **61**(3): p. 498-511.
588. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G and Kroczek RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*, 1998; **391**(6667): p. 591-4.
589. May AE, Kalsch T, Massberg S, Herouy Y, Schmidt R and Gawaz M. Engagement of glycoprotein IIb/IIIa (alpha(IIb)beta3) on platelets upregulates CD40L and triggers CD40L-dependent matrix degradation by endothelial cells. *Circulation*, 2002; **106**(16): p. 2111-7.
590. Castren E, Voikar V and Rantamaki T. Role of neurotrophic factors in depression. *Curr Opin Pharmacol*, 2007; **7**(1): p. 18-21.
591. Duman RS and Monteggia LM. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry*, 2006; **59**(12): p. 1116-27.
592. Fujimura H, Altar CA, Chen R, Nakamura T, Nakahashi T, Kambayashi J, Sun B and Tandon NN. Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. *Thromb Haemost*, 2002; **87**(4): p. 728-34.
593. Donovan MJ, Miranda RC, Kraemer R, McCaffrey TA, Tessarollo L, Mahadeo D, Sharif S, Kaplan DR, Tsoulfas P, Parada L and et al. Neurotrophin and neurotrophin receptors in vascular smooth muscle cells. Regulation of expression in response to injury. *Am J Pathol*, 1995; **147**(2): p. 309-24.
594. Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misgeld T, Klinkert WE, Kolbeck R, Hoppe E, Oropeza-Wekerle RL, Bartke I, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H and Hohlfeld R. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med*, 1999; **189**(5): p. 865-70.
595. Nakahashi T, Fujimura H, Altar CA, Li J, Kambayashi J, Tandon NN and Sun B. Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor. *FEBS Lett*, 2000; **470**(2): p. 113-7.
596. Pan W, Banks WA, Fasold MB, Bluth J and Kastin AJ. Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. *Neuropharmacology*, 1998; **37**(12): p. 1553-61.
597. Duman RS. Role of neurotrophic factors in the etiology and treatment of mood disorders. *Neuromolecular Med*, 2004; **5**(1): p. 11-25.
598. Karege F, Bondolfi G, Gervasoni N, Schwald M, Aubry JM and Bertschy G. Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity. *Biol Psychiatry*, 2005; **57**(9): p. 1068-72.
599. Lee BH and Kim YK. Reduced platelet BDNF level in patients with major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2009; **33**(5): p. 849-53.

600. Seidah NG, Benjannet S, Pareek S, Chretien M and Murphy RA. Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases. *FEBS Lett*, 1996; **379**(3): p. 247-50.
601. Lee R, Kermani P, Teng KK and Hempstead BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*, 2001; **294**(5548): p. 1945-8.
602. Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, Teng KK, Yung WH, Hempstead BL and Lu B. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science*, 2004; **306**(5695): p. 487-91.
603. Lu B, Pang PT and Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci*, 2005; **6**(8): p. 603-14.
604. Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, Kermani P, Torkin R, Chen ZY, Lee FS, Kraemer RT, Nykjaer A and Hempstead BL. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci*, 2005; **25**(22): p. 5455-63.
605. Tsai SJ. The possible role of tissue-type plasminogen activator and the plasminogen system in the pathogenesis of major depression. *Med Hypotheses*, 2006; **66**(2): p. 319-22.
606. Martinowich K, Manji H and Lu B. New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nat Neurosci*, 2007; **10**(9): p. 1089-93.
607. Hou SJ, Yen FC and Tsai SJ. Is dysfunction of the tissue plasminogen activator (tPA)-plasmin pathway a link between major depression and cardiovascular disease? *Med Hypotheses*, 2009; **72**(2): p. 166-8.
608. Tsai SJ. Statins may enhance the proteolytic cleavage of proBDNF: implications for the treatment of depression. *Med Hypotheses*, 2007; **68**(6): p. 1296-9.
609. Fortuno A, San Jose G, Moreno MU, Diez J and Zalba G. Oxidative stress and vascular remodelling. *Exp Physiol*, 2005; **90**(4): p. 457-62.
610. Szuster-Ciesielska A, Slotwinska M, Stachura A, Marmurowska-Michalowska H, Dubas-Slemp H, Bojarska-Junak A and Kandefers-Szerszen M. Accelerated apoptosis of blood leukocytes and oxidative stress in blood of patients with major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2008; **32**(3): p. 686-94.
611. Selley ML. Increased concentrations of homocysteine and asymmetric dimethylarginine and decreased concentrations of nitric oxide in the plasma of patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 2003; **24**(7): p. 903-7.
612. Richardson MA, Read LL, Reilly MA, Clelland JD and Clelland CL. Analysis of plasma biopterin levels in psychiatric disorders suggests a common BH4 deficit in schizophrenia and schizoaffective disorder. *Neurochem Res*, 2007; **32**(1): p. 107-13.
613. Fujii K, Tominaga M, Ohmori S, Kobayashi K, Koga T, Takata Y and Fujishima M. Decreased endothelium-dependent hyperpolarization to acetylcholine in smooth muscle of the mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*, 1992; **70**(4): p. 660-9.
614. Najibi S, Cowan CL, Palacino JJ and Cohen RA. Enhanced role of potassium channels in relaxations to acetylcholine in hypercholesterolemic rabbit carotid artery. *Am J Physiol*, 1994; **266**(5 Pt 2): p. H2061-7.
615. Park Y, Capobianco S, Gao X, Falck JR, Dellsperger KC and Zhang C. Role of EDHF in type 2 diabetes-induced endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008; **295**(5): p. H1982-8.
616. Kamata K, Miyata N, Abiru T and Kasuya Y. Functional changes in vascular smooth muscle and endothelium of arteries during diabetes mellitus. *Life Sci*, 1992; **50**(19): p. 1379-87.

617. Garland CJ, Plane F, Kemp BK and Cocks TM. Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. *Trends Pharmacol Sci*, 1995; **16**(1): p. 23-30.
618. Malakul W, Thirawarapan S, Suvitayavat W and Woodman OL. Type 1 diabetes and hypercholesterolaemia reveal the contribution of endothelium-derived hyperpolarizing factor to endothelium-dependent relaxation of the rat aorta. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2008; **35**(2): p. 192-200.
619. Feletou M and Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006; **26**(6): p. 1215-25.
620. Moncada S and Vane JR. The role of prostacyclin in vascular tissue. *Fed Proc*, 1979; **38**(1): p. 66-71.
621. Cohen RA and Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation*, 1995; **92**(11): p. 3337-49.
622. Hecker M. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor-Fact or Fiction? *News Physiol Sci*, 2000; **15**: p. 1-5.
623. Luksha L, Agewall S and Kublickiene K. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 2009; **202**(2): p. 330-44.
624. Schachinger V, Britten MB and Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation*, 2000; **101**(16): p. 1899-906.
625. Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR, Jr. and Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation*, 2000; **101**(9): p. 948-54.
626. Shimokawa H. Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol*, 1999; **31**(1): p. 23-37.
627. Mano T, Masuyama T, Yamamoto K, Naito J, Kondo H, Nagano R, Tanouchi J, Hori M, Inoue M and Kamada T. Endothelial dysfunction in the early stage of atherosclerosis precedes appearance of intimal lesions assessable with intravascular ultrasound. *Am Heart J*, 1996; **131**(2): p. 231-8.
628. Creager MA, Cooke JP, Mendelsohn ME, Gallagher SJ, Coleman SM, Loscalzo J and Dzau VJ. Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest*, 1990; **86**(1): p. 228-34.
629. Paigen B, Ishida BY, Verstuyft J, Winters RB and Albee D. Atherosclerosis susceptibility differences among progenitors of recombinant inbred strains of mice. *Arteriosclerosis*, 1990; **10**(2): p. 316-23.
630. Serebruany VL, Glassman AH, Malinin AI, Nemeroff CB, Musselman DL, van Zyl LT, Finkel MS, Krishnan KR, Gaffney M, Harrison W, Califf RM and O'Connor CM. Platelet/endothelial biomarkers in depressed patients treated with the selective serotonin reuptake inhibitor sertraline after acute coronary events: the Sertraline AntiDepressant Heart Attack Randomized Trial (SADHART) Platelet Substudy. *Circulation*, 2003; **108**(8): p. 939-44.
631. Pizzi C, Mancini S, Angeloni L, Fontana F, Manzoli L and Costa GM. Effects of selective serotonin reuptake inhibitor therapy on endothelial function and inflammatory markers in patients with coronary heart disease. *Clin Pharmacol Ther*, 2009; **86**(5): p. 527-32.
632. van Zyl LT, Lesperance F, Frasura-Smith N, Malinin AI, Atar D, Laliberte MA and Serebruany VL. Platelet and endothelial activity in comorbid major depression and coronary artery disease patients treated with citalopram: the Canadian Cardiac

- Randomized Evaluation of Antidepressant and Psychotherapy Efficacy Trial (CREATE) biomarker sub-study. *J Thromb Thrombolysis*, 2009; **27**(1): p. 48-56.
633. Chrapko W, Jurasz P, Radomski MW, Archer SL, Newman SC, Baker G, Lara N and Le Melleo JM. Alteration of decreased plasma NO metabolites and platelet NO synthase activity by paroxetine in depressed patients. *Neuropsychopharmacology*, 2006; **31**(6): p. 1286-93.
634. Lara N, Archer SL, Baker GB and Le Melleo JM. Paroxetine-induced increase in metabolic end products of nitric oxide. *J Clin Psychopharmacol*, 2003; **23**(6): p. 641-5.
635. van Melle JP, Buikema H, van den Berg MP, van Buiten A, van Veldhuisen DJ, Boonstra PW and van Gilst WH. Sertraline causes strong coronary vasodilation: possible relevance for cardioprotection by selective serotonin reuptake inhibitors. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2004; **18**(6): p. 441-7.
636. Ungvari Z, Pacher P and Koller A. Serotonin reuptake inhibitor fluoxetine decreases arteriolar myogenic tone by reducing smooth muscle [Ca²⁺]_i. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2000; **35**(6): p. 849-54.
637. Tannenbaum BM, Brindley DN, Tannenbaum GS, Dallman MF, McArthur MD and Meaney MJ. High-fat feeding alters both basal and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal activity in the rat. *Am J Physiol*, 1997; **273**(6 Pt 1): p. E1168-77.
638. Pascoe WS, Smythe GA and Storlien LH. Enhanced responses to stress induced by fat-feeding in rats: relationship between hypothalamic noradrenaline and blood glucose. *Brain Res*, 1991; **550**(2): p. 192-6.
639. Kitamura Y and Gomita Y. [Development of animal models of treatment-resistant depression in rats]. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*, 2008; **28**(2): p. 93-100.
640. Steinberg D. Hypercholesterolemia and inflammation in atherogenesis: two sides of the same coin. *Mol Nutr Food Res*, 2005; **49**(11): p. 995-8.
641. Grimble RF. Dietary lipids and the inflammatory response. *Proc Nutr Soc*, 1998; **57**(4): p. 535-42.
642. Boston PF, Dursun SM and Reveley MA. Cholesterol and mental disorder. *Br J Psychiatry*, 1996; **169**(6): p. 682-9.
643. Lopez S, Peiretti F, Bonardo B, Juhan-Vague I and Nalbone G. Effect of atorvastatin and fluvastatin on the expression of plasminogen activator inhibitor type-1 in cultured human endothelial cells. *Atherosclerosis*, 2000; **152**(2): p. 359-66.
644. Mussoni L, Banfi C, Sironi L, Arpaia M and Tremoli E. Fluvastatin inhibits basal and stimulated plasminogen activator inhibitor 1, but induces tissue type plasminogen activator in cultured human endothelial cells. *Thromb Haemost*, 2000; **84**(1): p. 59-64.
645. Yalcin I, Coubard S, Bodard S, Chalon S and Belzung C. Effects of 5,7-dihydroxytryptamine lesion of the dorsal raphe nucleus on the antidepressant-like action of tramadol in the unpredictable chronic mild stress in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 2008; **200**(4): p. 497-507.

ANNEXES

Annexe 1

Endothelial dysfunction: A potential therapeutic target
for geriatric depression and brain amyloid deposition in
Alzheimer's disease?

Endothelial dysfunction: A potential therapeutic target for geriatric depression and brain amyloid deposition in Alzheimer's disease?

Elsa Isingrini¹, Thomas Desmidt^{1,2}, Catherine Belzung^{1,3} & Vincent Camus^{1,2,3*}

Addresses

¹UMR INSERM U 930 & CNRS FRE 2448

²Centre Hospitalier Régional Universitaire de Tours

³Université François Rabelais de Tours, CHRU de Tours,

Boulevard Tonnelé, 37044 Tours Cedex 01, France

Email: camus@med.univ-tours.fr

*To whom correspondence should be addressed

Depression and Alzheimer's disease (AD) are among the most prevalent mental disorders in the elderly. Strong evidence suggests that vascular diseases and vascular risk factors are associated with both depression and AD, and could partially explain the coexistence or the concurrent onset of these two diseases. In particular, endothelial dysfunction appears to play a critical role in the neurobiology of depression and amyloid deposition in the brains of patients with AD. Antidepressants have a significant impact on endothelial function. In addition, several drugs used to treat vascular disease or vascular risk factors, such as calcium-channel blockers, angiotensin-converting enzyme inhibitors and statins, have, to variable extents, significant clinical effects on depressive symptomatology or amyloid deposition in AD. Furthermore, preclinical and clinical data suggest that the nitric oxide and VEGF signaling pathways may be of value for the treatment of depression and AD.

Keywords Aging, Alzheimer's disease, depression, endothelial dysfunction, vascular disease, vascular risk factor

Introduction

According to WHO estimates, cardiovascular disease is the most prevalent medical condition worldwide [1]. The global incidence of cardiovascular disease has increased over the past five decades because of the increasing rate of diabetes [2], especially in the aging population [3]. Estimates predict that by the year 2020, depression will become the second most costly disease to treat after cardiovascular disease, irrespective of age and sex [4]. Depression is particularly common in the elderly and annual incidence increases with age from 17 per 1000 individuals between the ages of 70 to 79 years to 44 per 1000 individuals between the ages of 79 to 85 years [5]. The prevalence in the general community varies from 1.8% for major depression to 9.8% for minor depression and 13.5% for clinically significant depressive syndromes [6,7]. Dementia is also a highly disabling condition in the elderly; its prevalence increases from 1% between the ages of 60 to 65 years to 50 to 60% by the age of 90 years. Alzheimer's disease (AD) accounts for two-thirds of the cases of dementia, followed by vascular dementia and other types of neurodegenerative diseases, such as Parkinson's disease or fronto-temporal dementia [8,9].

Several epidemiological studies have demonstrated that depression and AD are often associated. In particular, depressed mood is one of the most common symptoms among the behavioral and psychological symptoms of dementia [10,11]. Depressive symptoms can also precede AD. This suggests that depression may constitute a

prodromal state or risk factor for AD. Moreover, mild depressive symptoms, as well as major depression, can be associated with an increased risk for AD. A 3-year prospective study specifically designed to assess psychiatric prodromal symptoms of AD demonstrated that patients who developed this disease had significantly more frequent episodes and scored more highly on depression, agitation and apathy scales than at the initial psychiatric assessment (ie, at baseline) [12]. Data from the Personnes Agées QUID (PAQUID) study suggested that the prevalence of depressive symptoms at baseline increased the risk of dementia at 8-year follow-up assessments [13]. In addition, the increase in risk primarily in men was additive with the level of the cognitive deficit at baseline [13]. The Cardiovascular Health Study suggested that depressive symptoms may also increase the risk of developing mild cognitive impairment (MCI), independently of any underlying cardiovascular disease [14]. Moreover, patients with MCI who were depressed had more than twice the risk of developing Alzheimer-type dementia than those without depression [15,16]. A meta-analysis confirmed that a past history of major depression increased the risk of developing AD (odds ratio = 1.90; 95% confidence interval: 1.55 to 2.33) [17]. These results have neuropathological correlates, as suggested by evidence of increased hippocampal amyloid plaques and neurofibrillary tangles (NFTs) in patients with AD with comorbid depression [18] or a lifetime history of major depression [19]. However, the mechanism by which depression initiates or precipitates AD remains undetermined. Nevertheless, the implication of vascular disorders,

particularly endothelial dysfunction, cannot be entirely excluded. After a brief review of the pathophysiology of endothelial dysfunction, evidence is presented that suggests endothelial dysfunction is associated with both depression and AD. This association is discussed to gain an improved understanding of the pharmacological basis of current therapeutic strategies, and for the development of new potential drugs for the treatment of depression and AD.

Endothelial dysfunction: Definition, pathophysiology and assessment

Definition

The vascular endothelium is a single layer of cells covering the internal surface of blood vessels, cardiac cavities and valves. It plays a key role in maintaining vascular homeostasis by releasing several vasoactive substances that act on vascular tone to regulate blood flow and vessel caliber. These endothelium-released substances have various effects including: vasodilatation (eg, nitric oxide [NO], bradykinin and C-natriuretic peptide), vasoconstriction (eg, endothelin, angiotensin-II, thromboxane A₂, reactive oxygen species [ROS] and PGH₂), antiproliferation (eg, NO and prostacyclin), proliferation (eg, endothelin, angiotensin-II, ROS, PDGF, basic FGF, insulin-like growth factor and ILs), antithrombotic effects (eg, NO, prostacyclin, plasminogen activator, C-protein and von Willebrand factor), prothrombotic effects (eg, endothelin, ROS, plasminogen-activator inhibitor-1, thromboxane A₂ and fibrinogen), proinflammatory effects (eg, cellular adhesion molecules [CAMs], such as P- and E-selectin, intercellular adhesion molecules [ICAMs], vascular-CAMs [VCAMs] and chemokines), and pro-angiogenesis effects [eg, VEGF]. Consequently, the vascular endothelium not only regulates vascular tone, but also several other physiological functions, including smooth muscle proliferation, inflammation, platelet aggregation, thrombosis, fibrinolysis, oxidation and angiogenesis, in response to various types of stress (eg, humoral, neural, ischemic or mechanical stimuli). Endothelial dysfunction is defined as the loss of NO-induced vasodilatation capacity, but the term also encompasses any modification to the balance and therefore relative effects of endothelium-derived relaxing and contracting factors [20]. Alterations in the mobilization and homing of endothelial progenitor cells (EPCs) that could cause re-endothelialization and neovascularization are associated with other markers of endothelial dysfunction [21]. In addition, these vascular remodeling and cell migration processes are facilitated by the expression of extracellular proteases, such as matrix metalloproteases [22]. Endothelial dysfunction has been observed in most conditions that are associated with atherosclerosis and an increased risk of vascular events [23].

Pathophysiology

NO is one of the most important endothelium-released compounds for maintaining vascular homeostasis. This compound is the strongest determinant of relaxation of vascular smooth muscle tone, and counteracts the

vasoconstrictive action of the endothelium-released agents endothelin and angiotensin. NO is synthesized from L-arginine by NO synthase (NOS). NOS is a calcium-dependent enzyme present in the endothelium (eNOS), as well as in neurons (nNOS), where it regulates synaptic activity. The third isoform of NOS, which is inducible by cytokines, for example, is calcium independent and is mainly expressed by macrophages. ACh, serotonin, thrombin, bradykinin and shear stress all trigger eNOS activity and increase NO production. eNOS activity requires the cofactors tetrahydrobiopterin (TH4), caveolin-1 and an increased level of intracellular calcium. eNOS exerts its relaxing effect on smooth muscle by activating guanylyl cyclase, which converts guanosine triphosphate into cyclic GMP (cGMP); cGMP is then inactivated by the PDE enzyme. eNOS also inhibits platelet and leukocyte activation, and maintains smooth muscle in a non-proliferative state [20]. Because of the multitude of steps required for maintaining NO bioavailability, the NO pathway can be altered at several levels, mainly through a reduction in cellular NO production or accelerated NO degradation. The excessive generation of reactive oxidant species or superoxide anions and oxidized LDL-cholesterol, as well as a decrease in antioxidant mechanisms, can contribute to an increase in NO degradation. eNOS activity is inhibited by atherogenic lipoproteins, cytokines, glucocorticoids or the overexpression of eNOS inhibitors, such as asymmetric dimethylarginine (ADMA) [24]. Several non-pharmacological and pharmacological substances routinely used in cardiovascular disease prevention have a beneficial effect on endothelial dysfunction [25]. Forced inactivity has a negative impact on eNOS expression [26]. Conversely, dietary restriction and long-term physical exercise reduce oxidative stress and consequently prevent endothelial dysfunction. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) [27], calcium-channel blockers (CCBs) [28] and angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors [29] improve endothelial dysfunction by increasing eNOS activity and circulating EPCs, which is in addition to their cholesterol-lowering and antihypertensive effects.

Assessment

Established and emerging techniques for the assessment of endothelial dysfunction include: structural markers that assess endothelium-dependent vasodilatation, microvascular abnormalities, arterial rigidity and pulse-wave propagation; and surrogate biomarkers of endothelial cell function, for example, the detection and dosage of circulating endothelial cells and microparticles, which are markers of oxidative stress, inflammation and coagulation [30]. The assessment of these markers in addition to other factors of cardiovascular risk assessment and various genetic markers allows a comprehensive evaluation of the risk of cardiovascular events [31].

The functional and structural assessment of endothelial dysfunction is based on studies that demonstrated that normal endothelium mediates the vasodilatation effect of ACh and that when the endothelium is removed or altered, ACh exerts a vasoconstrictive effect by a

direct action on smooth muscle [32]. Consequently, the vasomotor response to various pharmacological or physical stimuli, such as ACh, methacholine, bradykinin, serotonin, substance P and shear stress, can be considered as surrogate markers of NO bioavailability. Using high resolution ultrasound equipment, flow-mediated vasodilatation (FMD) measures the change in diameter of an artery (most often the brachial or radial artery) in response to an increase in post-ischemic flow (typically induced by the inflation of a blood-pressure cuff at supra-systolic pressure for 5 min) [33]. FMD is predominantly NO-mediated and, consequently, closely related to other cardiovascular risk factors and outcomes [34]. Carotid intima-media thickness, as determined by high-resolution ultrasound, is another index of structural remodeling of blood vessels; this parameter is an independent cardiovascular risk factor and a strong predictor of the occurrence of carotid atherosclerosis, coronary artery disease and cerebrovascular events [35-37]. Other methods utilized to assess the thickness, elasticity and density of vessel walls, such as pulse wave velocity (PWV), are also used to document vascular remodeling that can predict atherosclerosis and cardiovascular events [38,39].

Additional surrogate biomarkers of endothelial function (eg, increased plasma concentrations of ADMA) [40], various markers of inflammation (eg, increased levels of C-protein [41], fibrinogen and von Willebrand factor [42]), lipoprotein-associated phospholipase A₂ [41,43], E-selectin and soluble ICAMs [44], circulating EPCs [45] and endothelial microparticles [46,47]) are correlated, to varying extents, with other functional or structural markers of endothelial dysfunction and with the occurrence of subsequent cardiovascular events.

Depression, dementia and endothelial dysfunction

Depression and vascular disease: Potential role of endothelial dysfunction

Psychosocial risk factors (eg, widowhood) and biological risk factors (eg, the presence of cardiovascular disease and cardiovascular risk factors) are associated with an increased risk of depression in the elderly [48]. Early in the 1990s, it was first suggested that the high prevalence of neurological symptoms and white matter hyperintensities (WMH) in MRI scans of elderly patients with late-onset depressive disorder (first episode of depression at 50 years or later) [49] could be related to the presence of vascular damage in the striato-pallido-thalamo-cortical neural pathways [50]. This observation led to the emergence of the 'vascular depression' concept [51,52]. Additional evidence that depression can be facilitated by vascular disease or vascular risk factors was provided by data on post-stroke depression [53], coronary artery disease [54] and diabetes [55]. There is also increasing evidence that suggests depression is not only a potential consequence of vascular disease, but that it also constitutes a risk factor for stroke [56], myocardial infarction [57,58] and poor cardiac outcome in patients

with coronary artery disease [59,60] or diabetes [61,62]. Endothelial dysfunction was suggested as one of the numerous potential mechanisms that may explain the bidirectional relationship between depression and vascular disease [63].

Several structural and functional methods to assess endothelial dysfunction have been used to investigate changes in elderly patients with depression. FMD was decreased in adult and elderly depressed patients compared with healthy control individuals [64-66]. PWV was altered during depressive episodes in patients with both unipolar and bipolar mood disorders [67]. Additional data demonstrated an increase in intima-media thickness (IMT) in relation to the level of depressive symptoms [68] and altered executive functions (ie, neuropsychological functions of the frontal cortex), as measured by neuropsychological testing [69]. Moreover, the dosage of biological surrogate markers of endothelial dysfunction in patients with depression demonstrated increased concentrations of the soluble chemokine monocyte chemoattractant protein-1, E-selectin and ICAM-1s [64,70], as well as decreased plasma levels of NO metabolites and eNOS activity [71], decreased levels of EPCs and VEGF, an inverse correlation between EPC levels and the severity of depressive symptoms, and increased levels of TNF α [72]. An increase in VCAMs and ICAMs was also observed in post-mortem brain tissue from the dorsolateral prefrontal cortex of patients with late-onset geriatric depression [73,74]. Only a small number of studies have failed to duplicate these data, in particular those generated using FMD [75] or serum levels of adhesion molecules [76]. Furthermore, endothelial dysfunction assessed by IMT was correlated to WMH in MRI scans [77]. Therefore, the assessment of endothelial dysfunction could be considered as reliable as the MRI scan for documenting the potential vascular basis of geriatric depression.

The role of vascular pathology in the pathogenesis of AD

Brain lesions of AD are formed by cortical accumulation of β -amyloid proteins within senile plaques (APs), NFTs of hyperphosphorylated tau protein, and neuronal death associated with glial activation and oxidative stress. The progression of brain lesions follows a sequential and hierarchical pathway from the initial localization of the lesion in the entorhinal cortex, eventually reaching the hippocampus, followed by the temporal, prefrontal and other neocortical areas [78]. Amyloid deposition through the amyloid cascade is considered the primary driving factor in the pathophysiology of this disease. However, an increasing amount of evidence has emerged that suggests vascular pathology could contribute to this pathophysiological process. Several epidemiological studies, such as the Rotterdam [79], European Community Concerted Action Epidemiology of Dementia (EURODEM) [80], FINMONICA [81], Cardiovascular Health [82] and the Kungsholmen Project [83], have all demonstrated that most vascular risk factors and vascular diseases are also risk factors for AD. In addition, data from

neuropathological studies have suggested that the neuropathology of AD encompasses macro- and micro-infarction, hemorrhages, lacuna and ischemic white matter changes [84], and cerebral amyloid angiopathy [85]. Most of these vascular lesions are more severe in carriers of the apolipoprotein E4 variant [86]. Evidence of decreased regional cerebral blood flow (rCBF) measured by functional neuroimaging (eg, ^{18}F -fluorodeoxyglucose PET), mainly in areas of the brain known to have a high load of amyloid plaques, provides another indirect clue to the involvement of vascular damage in the pathophysiology of AD [87]. Based on these data, some researchers have suggested that AD may be a vascular disorder rather than a neurodegenerative disorder [88,89]; however, neuropathological [90] and preclinical data [91] suggest that vascular damage appears after the deposition of amyloid plaques. Data from both preclinical studies and clinical trials also suggest that endothelial dysfunction could be one of the main mechanisms behind these vascular changes.

Preclinical data suggest that cerebral amyloid deposition into the extracellular neuropil and the vascular wall initiates a vicious cycle by inducing endothelial dysfunction, oxidative damage and a decrease in cerebral blood flow that ultimately exacerbates amyloidogenesis [92,93]. In particular, amyloid deposition increased the vasoconstriction of cerebral vessels [94] and induced oxidative stress through the production of ROS and, consequently, impaired both endothelial function and spatial memory performances [95]. These behavioral changes were eNOS activity-dependent [96] and could be reversed by free radical scavengers or a NADPH inhibitor [95]. Neuropathological studies on postmortem brain tissue of patients with AD provided additional evidence of endothelial dysfunction in the pathophysiology of AD. In particular, several components of the renin-angiotensin system (particularly ACE and angiotensin II) were overexpressed in the perivascular space of several cortical areas in patients with AD [97]. In addition, VEGF accumulated along with β -amyloid within the senile plaques of patients with AD [98], and appeared to limit β -amyloid-induced neurotoxicity [99]. Both ischemia [100] and hyperglycemia [101] increased β -amyloid toxicity. Furthermore, several clinical trials have demonstrated an association between surrogate markers of endothelial dysfunction and AD. Decreased vascular responses in the skin to both ACh [102] and FMD [103] were observed in patients with AD. CSF adhesion molecule (ICAM) levels were increased in patients with AD and correlated with reductions in rCBF when assessed by ^{133}Xe -SPECT [104] and blood-brain-barrier permeability measurements [105].

Potential impact for improved knowledge of pharmacological mechanisms: Current drugs and future development

Potential implications for treating patients with depression

Several studies have suggested that patients with depression and evidence of brain lesions using MRI have

lower response rates to both antidepressants [106-108] and electroconvulsive therapy [109]. Both the number and localization (ie, frontal lobe, basal ganglia and reticular formation) of WMH predict a poor response to antidepressants [108]. A large longitudinal study has demonstrated that tricyclic antidepressants have a significant negative impact on lesions in the white matter, which may be caused by the hypotension they induce [110]. Interestingly, SSRIs appeared to have no significant impact on cerebral vascular lesions, probably because of their known effect on the reduction of platelet aggregation [111]. SSRIs may provide protection against the progression of vascular brain lesions [112] and appear to be safe despite their association with an increased risk of upper gastrointestinal tract bleeding [111,113]. The effect of antidepressants on endothelial dysfunction has yet to be determined. Data from some clinical trials demonstrated significant parallel improvements in both endothelial dysfunction and depression [65,67,114], while other clinical trials have not demonstrated this dual effect [66]. This could explain the limited effect of sertraline on the reduction of cardiovascular mortality and morbidity in the Sertraline Antidepressant Heart Attack Randomized Trial (SADHART), which was designed to assess the safety and efficacy of SSRIs in the treatment of post-acute myocardial infarction and depression [115].

Among the most commonly prescribed antihypertensive drugs, CCBs are the most effective in reducing carotid IMT, compared with diuretics, β -blockers or ACE inhibitors [116]. CCBs reduced the active tone of vessels and contributed to vasodilatation by blocking calcium entry into smooth muscle cells. These agents also enhanced eNOS activity [117], inhibited apoptotic cell death in endothelial cells [118] and reduced vascular inflammation and oxidative stress [119]. Attempts at increasing antidepressant treatment with the CCB nimodipine were associated with a significant decrease in the risk of relapse in elderly patients with depression and WMH in MRI scans [120]. However, these preliminary data have not been fully corroborated in other clinical trials in patients with depression, although consistent improvements in cognition, ADL and global functioning in dementia have been demonstrated [121].

In contrast, the role of the glucocorticoid cascade in depression and vascular disease has received considerable experimental and clinical confirmation. Hyperactivity in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in untreated patients with depression is one of the most consistent observations in biological psychiatry, and has been confirmed in numerous studies. Patients with depression have increased plasma, urine and CSF cortisol concentrations [122]. In addition, concentrations of corticotrophin-releasing factor (CRF) in CSF are increased [123] and hypothalamic CRH neurons are overexpressed [124], as demonstrated by the non-suppression of cortisol production following the administration of the synthetic glucocorticoid dexamethasone [125,126]. However, glucocorticoids increase the risk of cardiovascular disease by inducing hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia and hypertension [127]. These agents also have a

significant direct impact on vascular endothelial cells [128], as demonstrated by glucocorticoid-induced inhibition of cholinergic vasodilation in the human forearm [129]. This impairment in endothelial function is mediated by the inhibition of eNOS activity and by a reduction in the essential eNOS cofactor TH4 [130-134]. Several anti-glucocorticoid agents, such as ketoconazole [135], RU-486 [136] and metyrapone [137], have also demonstrated antidepressant properties. In addition, metyrapone improved endothelial dysfunction in patients with depression [138].

Preclinical evidence suggests that the behavioral effects of antidepressants are mediated by their impact on the NOS pathway, although this appears to be mainly due to a reversible inhibitory effect on nNOS activity in the hippocampus [139-142]. NOS inhibitors and soluble guanylate cyclase inhibitors demonstrated antidepressant effects [143,144], and sustained the behavioral effects of antidepressants [145]. The PDE5 inhibitor sildenafil, which is used for treating erectile dysfunction, also demonstrated antidepressant effects [141,142,146]. When considered with clinical data demonstrating the presence of markers of endothelial dysfunction in patients with depression, preclinical data suggest that eNOS and nNOS activity might have opposing effects on depression. Consequently, because of the association of the NOS pathway with vascular disease, it is unclear how this pathway can contribute to the improved therapeutic management of depression.

VEGF, a compound released by endothelial cells, has received much attention because of its potential role in tumor growth [147]; however, VEGF is also involved in one of the main signaling pathways that regulate neurogenesis [148-150]. This pathway may therefore prove to be a potential therapeutic target for antidepressant therapy [151], particularly because preserved hippocampal neurogenesis is required for monoaminergic compounds to exhibit their behavioral effects [152]. This is in contrast to anti-CRF antidepressant compounds that do not have the same requirement [153]. Moreover, monoaminergic antidepressants increase the expression of VEGF in the hippocampus, and VEGF activation is required for antidepressant-induced cell proliferation [154]. Interestingly, human lactoferrin, which enhances Flk-1 receptor tyrosine kinase signaling and consequently stimulates VEGF-mediated endothelial cell proliferation [155], could also have therapeutic effects in depression.

Potential implications for treating patients with AD

Alkaloid derivatives, such as nicergoline, induce vasodilatation and increase cerebral blood flow because of their α_1 -adrenoreceptor antagonistic effects, and have been used for decades in the treatment of AD and other age-related cognitive disorders [156]. However, these therapeutic strategies have progressively been supplanted by new paradigms for the treatment of AD. Acetylcholinesterase inhibitors, such as donepezil, galantamine, and rivastigmine, were initially utilized to enhance cholinergic transmission, while NMDA

antagonists, such as memantine, were utilized to limit glutamate-excitation toxicity mediated through excessive activation of the NMDA receptor [157]. However, an improved knowledge of the potential role of vascular pathology has provided new insights into the mechanism of action of drugs currently used in AD, and has introduced new therapeutic perspectives. Both acetylcholinesterase inhibitors and memantine have a significant effect on vascular regulation, which is independent of their enhancing effect on neurotransmission [158,159]. Randomized, controlled trials have demonstrated the potential clinical benefit of these agents in vascular dementia [160]. There is also evidence that control of vascular risk factors, in particular hypertension, can help prevent AD [161]. The same is true of the beneficial preventive effect of physical exercise, which has demonstrated a multiple level impact on the vascular generation of ROS, cerebral blood flow, vascular NO generation, vascular remodeling and regeneration [162]. Limiting oxidative stress reduced the A β -induced cerebrovascular dysfunction in AD [93] and also directly reduced A β deposition [163,164], which might explain the preventive effects of chronic NSAID consumption [165]. Furthermore, VEGF limited both A β aggregation and ROS production at early stages of the disease and also accelerated amyloid deposition through its angiogenic effect [99]. This suggests that anti-angiogenic compounds may prove to be of therapeutic benefit in depression and AD [166].

Conclusions

Depression and AD, two of the most devastating mental disorders in the increasing aged population, share some common and close relationships with vascular diseases and vascular risk factors. Preclinical and clinical evidence suggests that endothelial dysfunction plays a critical role in the pathophysiology of both diseases. This may partially explain the coexistence or the concurrent onset of these two disorders. NOS signaling pathways and angiogenesis also appear to be involved in neurogenesis and may constitute two potential therapeutic targets in depression and in AD in the near future.

References

- of outstanding interest
 - of special interest
1. Yach D, Hawkes C, Gould CL, Hofman KJ: **The global burden of chronic diseases: Overcoming impediments to prevention and control.** *J Am Med Assoc* (2004) 291(21):2616-2622.
 2. Fox CS, Coady S, Sorlie PD, D'Agostino RB Sr, Pencina MJ, Vasan RS, Meigs JB, Levy D, Savage PJ: **Increasing cardiovascular disease burden due to diabetes mellitus: The Framingham Heart Study.** *Circulation* (2007) 115(12):1544-1550.
 3. Fagot-Campagna A, Bourdel-Marchasson I, Simon D: **Burden of diabetes in an aging population: Prevalence, incidence, mortality, characteristics and quality of care.** *Diabetes Metab* (2005) 31(Spec No 2):S535-S552.
 4. Prince M, Patel V, Saxena S, Maj M, Maselko J, Phillips MR, Rahman A: **No health without mental health.** *The Lancet* (2007) 370(9590):859-877.
 5. Palsson SP, Östling S, Skoog I: **The incidence of first-onset depression in a population followed from the age of 70 to 85.** *Psychol Med* (2001) 31(7):1159-1168.

6. Beekman AT, Copeland JR, Prince MJ: **Review of community prevalence of depression in later life.** *Br J Psychiatry* (1999) 174:307-311.
7. Copeland JR, Beekman AT, Dewey ME, Hooijer C, Jordan A, Lawlor BA, Lobo A, Magnusson H, Mann AH, Meller I, Prince MJ et al: **Depression in Europe. Geographical distribution among older people.** *Br J Psychiatry* (1999) 174:312-321.
8. Copeland JR, Davidson IA, Dewey ME, Gilmore C, Larkin BA, McWilliam C, Saunders PA, Scott A, Sharma V, Sullivan C: **Alzheimer's disease, other dementias, depression and pseudodementia: Prevalence, incidence and three-year outcome in Liverpool.** *Br J Psychiatry* (1992) 161:230-239.
9. Berr C, Wancata J, Ritchie K: **Prevalence of dementia in the elderly in Europe.** *Eur Neuropsychopharmacol* (2005) 15(4):463-471.
10. Aalten P, Verhey FR, Boziki M, Bullock R, Byrne EJ, Camus V, Caputo M, Collins D, De Deyn PP, Elina K, Frisoni G et al: **Neuropsychiatric syndromes in dementia. Results from the European Alzheimer Disease Consortium: Part I.** *Dement. Geriatr Cogn Disord* (2007) 24(6):457-463.
11. Aalten P, Verhey FR, Boziki M, Brugnolo A, Bullock R, Byrne EJ, Camus V, Caputo M, Collins D, De Deyn PP, Elina K et al: **Consistency of neuropsychiatric syndromes across dementias: Results from the European Alzheimer Disease Consortium. Part II.** *Dement Geriatr Cogn Disord* (2008) 25(1):1-8.
12. Copeland MP, Daly E, Hines V, Mastromauro C, Zaitchik D, Gunther J, Albert M: **Psychiatric symptomatology and prodromal Alzheimer's disease.** *Alzheimer Dis Assoc Disord* (2003) 17(1):1-8.
13. Fuhrer R, Dufouil C, Dartigues JF, PAQUID Study: **Exploring sex differences in the relationship between depressive symptoms and dementia incidence: Prospective results from the PAQUID study.** *J Am Geriatr Soc* (2003) 51(8):1055-1063.
14. Barnes DE, Alexopoulos GS, Lopez OL, Williamson JD, Yaffe K: **Depressive symptoms, vascular disease, and mild cognitive impairment: Findings from the Cardiovascular Health Study.** *Arch Gen Psychiatry* (2006) 63(3):273-279.
15. Modrego PJ, Ferrandez J: **Depression in patients with mild cognitive impairment increases the risk of developing dementia of Alzheimer type: A prospective cohort study.** *Arch Neurol* (2004) 61(8):1290-1293.
16. Gabryelewicz T, Styczynska M, Luczywek E, Barczak A, Pfeffer A, Androsiuk W, Chodakowska-Zebrowska M, Wasiak B, Peplonska B, Barcikowska M: **The rate of conversion of mild cognitive impairment to dementia: Predictive role of depression.** *Int J Geriatr Psychiatry* (2007) 22(6):563-567.
17. Ownby RL, Crocco E, Acevedo A, John V, Loewenstein D: **Depression and risk for Alzheimer disease: Systematic review, meta-analysis, and meta-regression analysis.** *Arch Gen Psychiatry* (2006) 63(5):530-538.
- **A comprehensive review of the relationships between depression and AD.**
18. Rapp MA, Schnaider-Beeri M, Purohit DP, Perl DP, Haroutunian V, Sano M: **Increased neurofibrillary tangles in patients with Alzheimer disease with comorbid depression.** *Am J Geriatr Psychiatry* (2008) 16(2):168-174.
- **This study analyzed postmortem material from patients with AD and demonstrated that specific neuropathological changes were associated with a past history of comorbid depression.**
19. Rapp MA, Schnaider-Beeri M, Grossman HT, Sano M, Perl DP, Purohit DP, Gorman JM, Haroutunian V: **Increased hippocampal plaques and tangles in patients with Alzheimer disease with a lifetime history of major depression.** *Arch Gen Psychiatry* (2006) 63(2):161-167.
20. Verma S, Anderson TJ: **Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist.** *Circulation* (2002) 105(5):546-549.
21. Heiss C, Keymel S, Niesler U, Ziemann J, Kelm M, Kalka C: **Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction.** *J Am Coll Cardiol* (2005) 45(9):1441-1448.
22. Newby AC: **Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates.** *Cardiovasc Res* (2006) 69(3):614-624.
23. Brunner H, Cockcroft JR, Deanfield J, Donald A, Ferrannini E, Halcox J, Kiowski W, Luscher TF, Mancia G, Natali A, Oliver JJ et al: **Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension.** *J Hypertens* (2005) 23(2):233-246.
24. Behrendt D, Ganz P: **Endothelial function. From vascular biology to clinical applications.** *Am J Cardiol* (2002) 90(10C):40L-48L.
25. Landmesser U, Drexler H: **The clinical significance of endothelial dysfunction.** *Curr Opin Cardiol* (2005) 20(6):547-551.
26. Suvorava T, Lauer N, Kojda G: **Physical inactivity causes endothelial dysfunction in healthy young mice.** *J Am Coll Cardiol* (2004) 44(6):1320-1327.
27. Landmesser U, Bahlmann F, Mueller M, Spiekermann S, Kirchhoff N, Schulz S, Manes C, Fischer D, de Groot K, Fliser D, Fauler G et al: **Simvastatin versus ezetimibe: Pleiotropic and lipid-lowering effects on endothelial function in humans.** *Circulation* (2005) 111(18):2356-2363.
28. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Magagna A, Favilla S, Pompella A, Salvetti A: **Restoration of nitric oxide availability after calcium antagonist treatment in essential hypertension.** *Hypertension* (2001) 37(3):943-948.
29. Bahlmann FH, de Groot K, Mueller O, Hertel B, Haller H, Fliser D: **Stimulation of endothelial progenitor cells: A new putative therapeutic effect of angiotensin II receptor antagonists.** *Hypertension* (2005) 45(4):526-529.
30. Goligorsky MS: **Clinical assessment of endothelial dysfunction: Combine and rule.** *Curr Opin Nephrol Hypertens* (2006) 15(6):617-624.
31. Deanfield J, Donald A, Ferri C, Giannattasio C, Halcox J, Halligan S, Lerman A, Mancia G, Oliver JJ, Pessina AC, Rizzoni D et al: **Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: A statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension.** *J Hypertens* (2005) 23(1):7-17.
32. Furchgott RF, Zawadzki JV: **The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.** *Nature* (1980) 288(5789):373-376.
33. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE: **Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis.** *Lancet* (1992) 340(8828):1111-1115.
34. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thürlitz C, Lüscher TF: **Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo.** *Circulation* (1995) 91(5):1314-1319.
35. O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Manolio TA, Burke GL, Wolfson SK Jr: **Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults.** *Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. N Engl J Med* (1999) 340(1):14-22.
36. Zureik M, Ducimetière P, Touboul PJ, Courbon D, Bonithon-Kopp C, Berr C, Magne C: **Common carotid intima-media thickness predicts occurrence of carotid atherosclerotic plaques: Longitudinal results from the Aging Vascular Study (EVA) study.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2000) 20(6):1622-1629.
37. Bots ML, Hoes AW, Koudstaal PJ, Hofman A, Grobbee DE: **Common carotid intima-media thickness and risk of stroke and myocardial infarction: The Rotterdam Study.** *Circulation* (1997) 96(5):1432-1437.
38. Naka KK, Tweddel AC, Doshi SN, Goodfellow J, Henderson AH: **Flow-mediated changes in pulse wave velocity: A new clinical measure of endothelial function.** *Eur Heart J* (2006) 27(3):302-309.
39. Park SM, Seo HS, Lim HE, Shin SH, Park CG, Oh DJ, Ro YM: **Assessment of arterial stiffness index as a clinical parameter for atherosclerotic coronary artery disease.** *Circ J* (2005) 69(10):1218-1222.

40. Nanayakkara PW, Teerlink T, Stehouwer CD, Allajar D, Spijkerman A, Schalkwijk C, ter Wee PM, van Guldener C: **Plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) concentration is independently associated with carotid intima-media thickness and plasma soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) concentration in patients with mild-to-moderate renal failure.** *Kidney Int* (2005) 68(5):2230-2236.
 41. Koenig W, Khuseynova N, Lowel H, Trischler G, Meisinger C: **Lipoprotein-associated phospholipase A₂ adds to risk prediction of incident coronary events by C-reactive protein in apparently healthy middle-aged men from the general population: Results from the 14-year follow-up of a large cohort from southern Germany.** *Circulation* (2004) 110(14):1903-1908.
 42. Kirmizis D, Tsiandoulas A, Pangalou M, Koutoupa E, Rozi P, Protopoulos M, Barboutis K: **Validity of plasma fibrinogen, D-dimer, and the von Willebrand factor as markers of cardiovascular morbidity in patients on chronic hemodialysis.** *Med Sci Monit* (2006) 12(2):CR55-CR62.
 43. Yang EH, McConnell JP, Lennon RJ, Barsness GW, Pumper G, Hartman SJ, Rihal CS, Lerman LO, Lerman A: **Lipoprotein-associated phospholipase A₂ is an independent marker for coronary endothelial dysfunction in humans.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2006) 26(1):106-111.
 44. Jenny NS, Arnold AM, Kuller LH, Sharrett AR, Fried LP, Psaty BM, Tracy RP: **Soluble intracellular adhesion molecule-1 is associated with cardiovascular disease risk and mortality in older adults.** *J Thromb Haemost* (2006) 4(1):107-113.
 45. Loomans CJ, de Koning EJ, Staal FJ, Rookmaaker MB, Verseyden C, de Boer HC, Verhaar MC, Braam B, Rabelink TJ, van Zonneveld AJ: **Endothelial progenitor cell dysfunction: A novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes.** *Diabetes* (2004) 53(1):195-199.
 46. Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, Ahn YS: **Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction.** *Front Biosci* (2004) 9:1118-1135.
 47. Amabile N, Guerin AP, Leroyer A, Mallat Z, Nguyen C, Boddaert J, London GM, Tedgui A, Boulanger CM: **Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure.** *J Am Soc Nephrol* (2005) 16(11):3381-3388.
 48. Holley CK, Mast BT: **The effects of widowhood and vascular risk factors on late-life depression.** *Am J Geriatr Psychiatry* (2007) 15(8):690-698.
 49. Alexopoulos GS, Young RC, Meyers BS, Abrams RC, Shamoian CA: **Late-onset depression.** *Psychiatr Clin North Am* (1988) 11(1):101-115.
 50. Alexopoulos GS, Meyers BS, Young RC, Kakuma T, Silbersweig D, Charlson M: **Clinically defined vascular depression.** *Am J Psychiatry* (1997) 154(4):562-565.
 51. Alexopoulos GS, Meyers BS, Young RC, Campbell S, Silbersweig D, Charlson M: **'Vascular depression' hypothesis.** *Arch Gen Psychiatry* (1997) 54(10):915-922.
 52. Krishnan KR, Hays JC, Blazer DG: **MRI-defined vascular depression.** *Am J Psychiatry* (1997) 154(4):497-501.
 53. Hackett ML, Yapa C, Parag V, Anderson CS: **Frequency of depression after stroke: A systematic review of observational studies.** *Stroke* (2005) 36(6):1330-1340.
 54. Ziegelstein RC: **Depression after myocardial infarction.** *Cardiol Rev* (2001) 9(1):45-51.
 55. Anderson RJ, Freedland KE, Clouse RE, Lustman PJ: **The prevalence of comorbid depression in adults with diabetes: A meta-analysis.** *Diabetes Care* (2001) 24(6):1069-1078.
 56. Salaycik KJ, Kelly-Hayes M, Beiser A, Nguyen AH, Brady SM, Kase CS, Wolf PA: **Depressive symptoms and risk of stroke: The Framingham Study.** *Stroke* (2007) 38(1):16-21.
 57. Pratt LA, Ford DE, Crum RM, Armenian HK, Gallo JJ, Eaton WW: **Depression, psychotropic medication, and risk of myocardial infarction. Prospective data from the Baltimore ECA follow-up.** *Circulation* (1996) 94(12):3123-3129.
 58. Ariyo AA, Haan M, Tangen CM, Rutledge JC, Cushman M, Dobs A, Furberg CD: **Depressive symptoms and risks of coronary heart disease and mortality in elderly Americans. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group.** *Circulation* (2000) 102(15):1773-1779.
 59. Frasure-Smith N, Lespérance F, Talajic M: **Depression and 18-month prognosis after myocardial infarction.** *Circulation* (1995) 91(4):999-1005.
 60. Lespérance F, Frasure-Smith N, Talajic M, Bourassa MG: **Five-year risk of cardiac mortality in relation to initial severity and one-year changes in depression symptoms after myocardial infarction.** *Circulation* (2002) 105(9):1049-1053.
 61. Eaton WW, Armenian H, Gallo J, Pratt L, Ford DE: **Depression and risk for onset of type II diabetes. A prospective population-based study.** *Diabetes Care* (1996) 19(10):1097-1102.
 62. Golden SH, Lazo M, Carnethon M, Bertoni AG, Schreiner PJ, Roux AV, Lee HB, Lyketsos C: **Examining a bidirectional association between depressive symptoms and diabetes.** *J Am Med Assoc* (2008) 299(23):2751-2759.
 63. Camus V, Kraehenbühl H, Preisig M, Bula CJ, Waeber G: **Geriatric depression and vascular diseases: What are the links?** *J Affect Disord* (2004) 81(1):1-16.
 64. Rajagopalan S, Brook R, Rubenfire M, Pitt E, Young E, Pitt B: **Abnormal brachial artery flow-mediated vasodilation in young adults with major depression.** *Am J Cardiol* (2001) 88(2):196-198.
 65. Broadley AJM, Korszun A, Jones CJH, Frenneaux MP: **Arterial endothelial function is impaired in treated depression.** *Heart* (2002) 88(5):521-523.
 66. Sherwood A, Hinderliter AL, Watkins LL, Waugh RA, Blumenthal JA: **Impaired endothelial function in coronary heart disease patients with depressive symptomatology.** *J Am Coll Cardiol* (2005) 46(4):656-659.
 67. Rybakowski JK, Wykretowicz A, Heymann-Szlachcinska A, Wysocki H: **Impairment of endothelial function in unipolar and bipolar depression.** *Biol Psychiatry* (2006) 60(8):889-891.
 68. Faramawi MF, Gustat J, Wildman RP, Rice J, Johnson E, Sherwin R, Cardiovascular Health Study Investigators: **Relation between depressive symptoms and common carotid artery atherosclerosis in American persons > or = 65 years of age.** *Am J Cardiol* (2007) 99(11):1610-1613.
 69. Smith PJ, Blumenthal JA, Babyak MA, Hoffman BM, Doraiswamy PM, Waugh R, Hinderliter A, Sherwood A: **Cerebrovascular risk factors, vascular disease, and neuropsychological outcomes in adults with major depression.** *Psychosom Med* (2007) 69(6):578-586.
 70. Dimopoulos N, Piperi C, Salonicioti A, Mitsonis C, Liappas I, Lea RW, Kalofoutis A: **Elevation of plasma concentration of adhesion molecules in late-life depression.** *Int J Geriatr Psychiatry* (2006) 21(10):965-971.
 71. Chrapko WE, Jurasz P, Radomski MW, Lara N, Archer SL, Le Mellédo JM: **Decreased platelet nitric oxide synthase activity and plasma nitric oxide metabolites in major depressive disorder.** *Biol Psychiatry* (2004) 56(2):129-134.
 72. Dome P, Teleki Z, Rihmer Z, Peter L, Dobos J, Kenessey I, Tovari J, Timar J, Paku S, Kovacs G, Dome B: **Circulating endothelial progenitor cells and depression: A possible novel link between heart and soul.** *Mol Psychiatry* (2008):doi:10.1038/sj.mp.4002138.
 73. Thomas AJ, Ferrier IN, Kalaria RN, Woodward SA, Ballard C, Oakley A, Perry RH, O'Brien JT: **Elevation in late-life depression of intercellular adhesion molecule-1 expression in the dorsolateral prefrontal cortex.** *Am J Psychiatry* (2000) 157(10):1682-1684.
 74. Thomas AJ, Ferrier IN, Kalaria RN, Davis S, O'Brien JT: **Cell adhesion molecule expression in the dorsolateral prefrontal cortex and anterior cingulate cortex in major depression in the elderly.** *Br J Psychiatry* (2002) 181:129-134.
- This study was the first to demonstrate a potential link between localized brain ischemic lesions and a past history of late onset geriatric depression.

75. Yang EH, Lerman S, Lennon RJ, Simari RD, Lerman LO, Lerman A: **Relation of depression to coronary endothelial function.** *Am J Cardiol* (2007) 99(8):1134-1136.
76. Thomas AJ, Morris C, Davis S, Jackson E, Harrison R, O'Brien JT: **Soluble cell adhesion molecules in late-life depression.** *Int Psychogeriatr* (2007) 19(5):914-920.
77. Chen CS, Chen CC, Kuo YT, Chiang IC, Ko C-H, Lin H-F: **Carotid intima-media thickness in late-onset major depressive disorder.** *Int J Geriatr Psychiatry* (2006) 21(1):36-42.
78. Delacourte A, David JP, Sergeant N, Buée L, Wattez A, Vermersch P, Ghazali F, Fallet-Bianco C, Pasquier F, Lebert F, Petit H, Di Menza C: **The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease.** *Neurology* (1999) 52(6):1158-1165.
79. Ott A, Breteler MM, van Harskamp F, Stijnen T, Hofman A: **Incidence and risk of dementia. The Rotterdam Study.** *Am J Epidemiol* (1998) 147(6):574-580.
80. Launer LJ, Andersen K, Dewey ME, Letenneur L, Ott A, Amaducci LA, Brayne C, Copeland JR, Dartigues JF, Kragh-Sorensen P, Lobo A et al: **Rates and risk factors for dementia and Alzheimer's disease: Results from EURODEM pooled analyses. EURODEM Incidence Research Group and Work Groups. European Studies of Dementia.** *Neurology* (1999) 52(1):78-84.
81. Kivipelto M, Ngandu T, Fratiglioni L, Viitonen M, Kareholt I, Winblad B, Helkala EL, Tuomilehto J, Soininen H, Nissinen A: **Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and Alzheimer disease.** *Arch Neurol* (2005) 62(10):1556-1560.
82. Irie F, Fitzpatrick AL, Lopez OL, Kuller LH, Peila R, Newman AB, Launer LJ: **Enhanced risk for Alzheimer disease in persons with type 2 diabetes and ApoE ε4: The Cardiovascular Health Study Cognition Study.** *Arch Neurol* (2008) 65(1):89-93.
83. Xu WL, Qiu CX, Wahlin A, Winblad B, Fratiglioni L: **Diabetes mellitus and risk of dementia in the Kungsholmen project: A 6-year follow-up study.** *Neurology* (2004) 63(7):1181-1186.
84. Kalaria RN: **Vascular factors in Alzheimer's disease.** *Int Psychogeriatr* (2003) 15(Suppl 1):47-52.
85. Haglund M, Englund E: **Cerebral amyloid angiopathy, white matter lesions and Alzheimer encephalopathy - a histopathological assessment.** *Dement Geriatr Cogn Disord* (2002) 14(3):161-166.
86. Yip AG, McKee AC, Green RC, Wells J, Young H, Cupples LA, Farrer LA: **ApoE, vascular pathology, and the AD brain.** *Neurology* (2005) 65(2):259-265.
87. Edison P, Archer HA, Hinz R, Hammers A, Pavese N, Tai YF, Hotton G, Cutler D, Fox N, Kennedy A, Rossor M, Brooks DJ: **Amyloid, hypometabolism, and cognition in Alzheimer disease: An [¹⁴C]PIB and [¹⁸F]FDG PET study.** *Neurology* (2007) 68(7):501-508.
88. Launer LJ: **Demonstrating the case that AD is a vascular disease: Epidemiologic evidence.** *Ageing Res Rev* (2002) 1(1):61-77.
89. de la Torre JC: **Is Alzheimer's disease a neurodegenerative or a vascular disorder? Data, dogma, and dialectics.** *Lancet Neurol* (2004) 3(3):184-190.
90. Kawai M, Cras P, Perry G: **Serial reconstruction of β-protein amyloid plaques: Relationship to microvessels and size distribution.** *Brain Res* (1992) 592(1-2):278-282.
91. Kouznetsova E, Klingner M, Sorger D, Sabri O, Grossmann U, Steinbach J, Scheunemann M, Schliebs R: **Developmental and amyloid plaque-related changes in cerebral cortical capillaries in transgenic Tg2576 Alzheimer mice.** *Int J Dev Neurosci* (2006) 24(2-3):187-193.
92. Iadecola C: **Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease.** *Nat Rev Neurosci* (2004) 5(5):347-360.
93. Hamel E, Nicolakakis N, Aboukassim T, Ongali B, Tong XK: **Oxidative stress and cerebrovascular dysfunction in mouse models of Alzheimer's disease.** *Exp Physiol* (2008) 93(1):116-120.
94. Niwa K, Porter VA, Kazama K, Cornfield D, Carlson GA, Iadecola C: **A β-peptides enhance vasoconstriction in cerebral circulation.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2001) 281(6):H2417-H2424.
95. Park L, Anrather J, Girouard H, Zhou P, Iadecola C: **Nox2-derived reactive oxygen species mediate neurovascular dysregulation in the aging mouse brain.** *J Cereb Blood Flow Metab* (2007) 27(12):1908-1918.
96. de la Torre JC, Aliev G: **Inhibition of vascular nitric oxide after rat chronic brain hypoperfusion: Spatial memory and immunocytochemical changes.** *J Cereb Blood Flow Metab* (2005) 25(6):663-672.
97. Savaskan E, Hock C, Olivieri G, Bruttel S, Rosenberg C, Hulette C, Muller-Spahn F: **Cortical alterations of angiotensin converting enzyme, angiotensin II and AT1 receptor in Alzheimer's dementia.** *Neurobiol Aging* (2001) 22(4):541-546.
98. Yang SP, Bae DG, Kang HJ, Gwag BJ, Gho YS, Chae CB: **Co-accumulation of vascular endothelial growth factor with β-amyloid in the brain of patients with Alzheimer's disease.** *Neurobiol Aging* (2004) 25(3):283-290.
99. Yang SP, Kwon BO, Gho YS, Chae CB: **Specific interaction of VEGF₁₆₅ with β-amyloid, and its protective effect on β-amyloid-induced neurotoxicity.** *J Neurochem* (2005) 93(1):118-127.
- *This preclinical study provided strong support to the hypothesis of a potential interaction between VEGF and amyloidogenesis.*
100. Qi JP, Wu H, Yang Y, Wang DD, Chen YX, Gu YH, Liu T: **Cerebral ischemia and Alzheimer's disease: The expression of amyloid-β and apolipoprotein E in human hippocampus.** *J Alzheimers Dis* (2007) 12(4):335-341.
101. Burdo JR, Chen Q, Calcutt NA, Schubert D: **The pathological interaction between diabetes and presymptomatic Alzheimer's disease.** *Neurobiol Aging* (2008):doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.02.010.
102. Algotsson A, Nordberg A, Almkvist O, Winblad B: **Skin vessel reactivity is impaired in Alzheimer's disease.** *Neurobiol Aging* (1995) 16(4):577-582.
103. Dede DS, Yavuz B, Yavuz BB, Cankurtaran M, Halil M, Ulger Z, Cankurtaran ES, Aytemir K, Kabakci G, Ariogul S: **Assessment of endothelial function in Alzheimer's disease: Is Alzheimer's disease a vascular disease? J Am Geriatr Soc** (2007) 55(10):1613-1617.
104. Janciauskiene SM, Erikson C, Warkentin S: **A link between sICAM-1, ACE and parietal blood flow in the aging brain.** *Neurobiol Aging* (2008):doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.08.025.
105. Nielsen HM, Londos E, Minthon L, Janciauskiene SM: **Soluble adhesion molecules and angiotensin-converting enzyme in dementia.** *Neurobiol Dis* (2007) 26(1):27-35.
106. Hickie I, Scott E, Mitchell P, Wilhelm K, Austin MP: **Subcortical hyperintensities on magnetic resonance imaging: Clinical correlates and prognostic significance in patients with severe depression.** *Biol Psychiatry* (1995) 37(3):151-160.
107. Hickie I, Scott E, Brodaty H: **Subcortical intensities on magnetic resonance imaging in patients with severe depression - A longitudinal evaluation.** *Biol Psychiatry* (1997) 42(5):367-374.
108. Simpson S, Baldwin RC, Jackson A, Burns AS: **Is subcortical disease associated with a poor response to antidepressants? Neurological, neuropsychological and neuroradiological findings in late-life depression.** *Psychol Med* (1998) 28(5):1015-1026.
109. Steffens DC, Conway CR, Dombeck CB, Wagner HR, Tupler LA: **Severity of subcortical gray matter hyperintensity predicts ECT response in geriatric depression.** *J ECT* (2001) 17(1):45-49.
110. Steffens DC, Chung H, Krishnan KR, Longstreth WT Jr, Carlson M, Burke GL: **Antidepressant treatment and worsening white matter on serial cranial magnetic resonance imaging in the elderly: The Cardiovascular Health Study.** *Stroke* (2008) 39(3):857-862.
- *Data from this prospective cardiovascular health study unexpectedly suggested that the use of any type of antidepressant increased the risk of worsening WMH in MRI scans.*

111. Halperin D, Reber G: **Influence of antidepressants on hemostasis.** *Dialogues Clin Neurosci* (2007) 9(1):47-59.
112. Maurer-Spurej E, Pittendreich C, Solomons K: **The influence of selective serotonin reuptake inhibitors on human platelet serotonin.** *Thromb Haemost* (2004) 91(1):119-128.
113. de Abajo FJ, Garcia-Rodriguez LA: **Risk of upper gastrointestinal tract bleeding associated with selective serotonin reuptake inhibitors and venlafaxine therapy: Interaction with nonsteroidal anti-inflammatory drugs and effect of acid-suppressing agents.** *Arch Gen Psychiatry* (2008) 65(7):795-803.
114. van Zyl LT, Lesperance F, Frasere-Smith N, Malinin AI, Atar D, Laliberte MA, Serebruany VL: **Platelet and endothelial activity in comorbid major depression and coronary artery disease patients treated with citalopram: The Canadian Cardiac Randomized Evaluation of Antidepressant and Psychotherapy Efficacy Trial (CREATE) biomarker sub-study.** *J Thromb Thrombolysis* (2008):doi:10.1007/s11239-007-0189-3.
 •• This study demonstrated that the treatment of patients with depression and coronary artery disease with citalopram for 12 weeks was associated with enhanced production of NO, despite the co-administration of commonly prescribed anti-platelet regimens, including aspirin and clopidogrel.
115. Glassman AH, O'Connor CM, Califf RM, Swedberg K, Schwartz P, Bigger JT Jr, Krishnan KR, van Zyl LT, Swenson JR, Finkel MS, Landau C et al: **Sertraline treatment of major depression in patients with acute MI or unstable angina.** *J Am Med Assoc* (2002) 288(6):701-709.
116. Wang JG, Staessen JA, Li Y, Bortel LMV, Nawrot T, Fagard R, Messerli FH, Safer M: **Carotid intima-media thickness and antihypertensive treatment: A meta-analysis of randomized controlled trials.** *Stroke* (2006) 37(7):1933-1940.
117. Li H, Wallerath T, Munzel T, Forstermann U: **Regulation of endothelial-type NO synthase expression in pathophysiology and in response to drugs.** *Nitric Oxide* (2002) 7(3):149-164.
118. Yamagishi S, Nakamura K, Matsui T: **Role of oxidative stress in the development of vascular injury and its therapeutic intervention by nifedipine.** *Curr Med Chem* (2008) 15(2):172-177.
119. Godfraind T: **Antioxidant effects and the therapeutic mode of action of calcium channel blockers in hypertension and atherosclerosis.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* (2005) 360(1464):2259-2272.
120. Taragano FE, Allegri R, Vicario A, Bagnatti P, Lyketsos CG: **A double blind, randomized clinical trial assessing the efficacy and safety of augmenting standard antidepressant therapy with nimodipine in the treatment of 'vascular depression'.** *Int J Geriatr Psychiatry* (2001) 16(3):254-260.
121. Lopez-Arrieta JM, Birks J: **Nimodipine for primary degenerative, mixed and vascular dementia.** *Cochrane Database Syst Rev* (2002):CD000147.
122. Gold PW, Goodwin FK, Chrousos GP: **Clinical and biochemical manifestations of depression. Relation to the neurobiology of stress (1).** *N Engl J Med* (1988) 319(6):348-353.
123. Nemeroff CB, Widerlov E, Bissette G, Walleus H, Karlsson I, Eklund K, Kilts CD, Loosen PT, Vale W: **Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients.** *Science* (1984) 226(4680):1342-1344.
124. Raadsheer FC, Hoogendijk WJ, Stam FC, Tilders FJ, Swaab DF: **Increased numbers of corticotropin-releasing hormone expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients.** *Neuroendocrinology* (1994) 60(4):436-444.
125. Holsboer F: **Prediction of clinical course by dexamethasone suppression test (DST) response in depressed patients - physiological and clinical construct validity of the DST.** *Pharmacopsychiatria* (1983) 16(6):186-191.
126. Nemeroff CB, Evans DL: **Correlation between the dexamethasone suppression test in depressed patients and clinical response.** *Am J Psychiatry* (1984) 141(2):247-249.
127. Troxler RG, Sprague EA, Albanese RA, Fuchs R, Thompson AJ: **The association of elevated plasma cortisol and early atherosclerosis as demonstrated by coronary angiography.** *Atherosclerosis* (1977) 26(2):151-162.
128. Whitworth JA, Mangos GJ, Kelly JJ: **Cushing, cortisol, and cardiovascular disease.** *Hypertension* (2000) 36(5):912-916.
129. Mangos GJ, Walker BR, Kelly JJ, Lawson JA, Webb DJ, Whitworth JA: **Cortisol inhibits cholinergic vasodilation in the human forearm.** *Am J Hypertens* (2000) 13(11):1155-1160.
130. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S: **Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells.** *Proc Natl Acad Sci USA* (1990) 87(24):10043-10047.
131. Wallerath T, Witte K, Schafer SC, Schwarz PM, Prellwitz W, Wohlfart P, Kleinert H, Lehr HA, Lemmer B, Forstermann U: **Down-regulation of the expression of endothelial NO synthase is likely to contribute to glucocorticoid-mediated hypertension.** *Proc Natl Acad Sci USA* (1999) 96(23):13357-13362.
132. Simmons WW, Ungureanu-Longrois D, Smith GK, Smith TW, Kelly RA: **Glucocorticoids regulate inducible nitric oxide synthase by inhibiting tetrahydrobiopterin synthesis and L-arginine transport.** *J Biol Chem* (1996) 271(39):23928-23937.
133. Rogers KM, Bonar CA, Estrella JL, Yang S: **Inhibitory effect of glucocorticoid on coronary artery endothelial function.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2002) 283(5):H1922-H1928.
134. Johns DG, Dorrance AM, Tramontini NL, Webb RC: **Glucocorticoids inhibit tetrahydrobiopterin-dependent endothelial function.** *Exp Biol Med (Maywood)* (2001) 226(1):27-31.
135. Wolkowitz OM, Reus VI, Chan T, Manfredi F, Raum W, Johnson R, Canick J: **Antiglucocorticoid treatment of depression: Double-blind ketoconazole.** *Biol Psychiatry* (1999) 45(8):1070-1074.
136. Murphy BE, Filipini D, Ghadirian AM: **Possible use of glucocorticoid receptor antagonists in the treatment of major depression: Preliminary results using RU486.** *J Psychiatry Neurosci* (1993) 18(5):209-213.
137. O'Dwyer AM, Lightman SL, Marks MN, Checkley SA: **Treatment of major depression with metyrapone and hydrocortisone.** *J Affect Disord* (1995) 33(2):123-128.
138. Broadley AJ, Korszun A, Abdelaal E, Moskvina V, Deanfield J, Jones CJ, Frenneaux MP: **Metyrapone improves endothelial dysfunction in patients with treated depression.** *J Am Coll Cardiol* (2006) 48(1):170-175.
139. Wegener G, Volke V, Harvey BH, Rosenberg R: **Local, but not systemic, administration of serotonergic antidepressants decreases hippocampal nitric oxide synthase activity.** *Brain Res* (2003) 959(1):128-134.
140. Harvey BH, Retief R, Korff A, Wegener G: **Increased hippocampal nitric oxide synthase activity and stress responsiveness after imipramine discontinuation: Role of 5HT_{2A/C}-receptors.** *Metab Brain Dis* (2006) 21(2-3):211-220.
141. Dhir A, Kulkarni SK: **Involvement of nitric oxide (NO) signaling pathway in the antidepressant action of bupropion, a dopamine reuptake inhibitor.** *Eur J Pharmacol* (2007) 568(1-3):177-185.
142. Dhir A, Kulkarni SK: **Involvement of L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of venlafaxine in mice.** *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* (2007) 31(4):921-925.
 • This preclinical study demonstrated that the antidepressant-like effect of venlafaxine involved the L-Arg-NO-cGMP pathway.
143. Heiberg IL, Wegener G, Rosenberg R: **Reduction of cGMP and nitric oxide has antidepressant-like effects in the forced swimming test in rats.** *Behav Brain Res* (2002) 134(1-2):479-484.
144. Kulkarni SK, Dhir A: **Possible involvement of L-arginine-nitric oxide (NO)-cyclic guanosine monophosphate (cGMP) signaling pathway in the antidepressant activity of berberine chloride.** *Eur J Pharmacol* (2007) 569(1-2):77-83.
145. Harkin A, Connor TJ, Burns MP, Kelly JP: **Nitric oxide synthase inhibitors augment the effects of serotonin re-uptake inhibitors in the forced swimming test.** *Eur Neuropsychopharmacol* (2004) 14(4):274-281.
146. Brink CB, Clapton JD, Eagar BE, Harvey BH: **Appearance of antidepressant-like effect by sildenafil in rats after central muscarinic receptor blockade: Evidence from behavioural and neuro-receptor studies.** *J Neural Transm* (2008) 115(1):117-125.

147. Carmeliet P: **VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer.** *Oncology* (2005) **69**(Suppl 3):4-10.
148. Fabel K, Fabel K, Tam B, Kaufer D, Baiker A, Simmons N, Kuo CJ, Palmer TD: **VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis.** *Eur J Neurosci* (2003) **18**(10):2803-2812.
- This preclinical study demonstrated that peripheral VEGF mediated the effects of running on adult hippocampal neurogenesis.
149. Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA: **Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo.** *Proc Natl Acad Sci USA* (2002) **99**(18):11946-11950.
150. Sun Y, Jin K, Childs JT, Xie L, Mao XO, Greenberg DA: **Vascular endothelial growth factor-B (VEGFB) stimulates neurogenesis: Evidence from knockout mice and growth factor administration.** *Dev Biol* (2006) **289**(2):329-335.
- This preclinical study suggested a role for VEGFB in the regulation of adult neurogenesis, as demonstrated by the impaired neurogenesis in VEGFB-KO mice; intraventricular administration of VEGFB restored neurogenesis to wild-type levels in VEGFB-KO mice.
151. Warner-Schmidt JL, Duman RS: **VEGF as a potential target for therapeutic intervention in depression.** *Curr Opin Pharmacol* (2008) **8**(1):14-19.
152. Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R: **Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants.** *Science* (2003) **301**(5634):805-809.
153. Surget A, Saxe M, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, Chalon S, Griebel G, Hen R, Belzung C: **Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal.** *Biol Psychiatry* (2008) **64**(4):293-301.
154. Warner-Schmidt JL, Duman RS: **VEGF is an essential mediator of the neurogenic and behavioral actions of antidepressants.** *Proc Natl Acad Sci USA* (2007) **104**(11):4647-4652.
155. Kim CW, Son KN, Choi SY, Kim J: **Human lactoferrin upregulates expression of KDR/Flk-1 and stimulates VEGF-A-mediated endothelial cell proliferation and migration.** *FEBS Lett* (2006) **580**(18):4332-4336.
156. Winblad B, Fioravanti M, Dolezal T, Logina I, Milanov IG, Popescu DC, Solomon A: **Therapeutic use of nicergoline.** *Clin Drug Investig* (2008) **28**(9):533-552.
157. Klafki HW, Staufenbiel M, Kornhuber J, Wiltfang J: **Therapeutic approaches to Alzheimer's disease.** *Brain* (2006) **129**(Pt 11):2840-2855.
158. Rosengarten B, Paulsen S, Burr O, Kaps M: **Neurovascular coupling in Alzheimer patients: Effect of acetylcholinesterase inhibitors.** *Neurobiol Aging* (2008): doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.02.017.
159. Bar KJ, Boettger MK, Seidler N, Mentzel HJ, Terborg C, Sauer H: **Influence of galantamine on vasomotor reactivity in Alzheimer's disease and vascular dementia due to cerebral microangiopathy.** *Stroke* (2007) **38**(12):3186-3192.
160. Kavirajan H, Schneider LS: **Efficacy and adverse effects of cholinesterase inhibitors and memantine in vascular dementia: A meta-analysis of randomised controlled trials.** *Lancet Neurol* (2007) **6**(9):782-792.
161. Patterson C, Feightner JW, Garcia A, Hsiung GV, MacKnight C, Sadovnick AD: **Diagnosis and treatment of dementia: 1. Risk assessment and primary prevention of Alzheimer disease.** *CMAJ* (2008) **178**(5):548-556.
162. Lange-Asschenfeldt C, Kojda G: **Alzheimer's disease, cerebrovascular dysfunction and the benefits of exercise: From vessels to neurons.** *Exp Gerontol* (2008) **43**(6):499-504.
163. Eriksen JL, Sagi SA, Smith TE, Weggen S, Das P, McLendon DC, Ozols VV, Jessing KW, Zavitz KH, Koo EH, Golde TE: **NSAIDs and enantiomers of flurbiprofen target γ -secretase and lower A β 42 in vivo.** *J Clin Invest* (2003) **112**(3):440-449.
164. Weggen S, Eriksen JL, Das P, Sagi SA, Wang R, Pietrzik CU, Findlay KA, Smith TE, Murphy MP, Bulter T, Kang DE et al: **A subset of NSAIDs lower amyloidogenic A β 42 independently of cyclooxygenase activity.** *Nature* (2001) **414**(6860):212-216.
165. Szekely CA, Breitner JC, Fitzpatrick AL, Rea TD, Psaty BM, Kuller LH, Zandi PP: **NSAID use and dementia risk in the Cardiovascular Health Study: Role of APOE and NSAID type.** *Neurology* (2008) **70**(1):17-24.
166. Schultheiss C, Blechert B, Gaertner FC, Drecolli E, Mueller J, Weber GF, Drzezga A, Essler M: **In vivo characterization of endothelial cell activation in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease.** *Angiogenesis* (2006) **9**(2):59-65.

Annexe 2

Depressive behavior and vascular dysfunction: a link between
clinical depression and vascular disease?

DEPRESSIVE BEHAVIOR AND VASCULAR DYSFUNCTION:
A LINK BETWEEN CLINICAL DEPRESSION AND VASCULAR DISEASE?

Alexandre C. d' Audiffret^{1,2}, Stephanie J. Frisbee^{1,3}, Phoebe A. Stapleton^{1,4},
Adam G. Goodwill^{1,5}, Elsa Isingrini⁶ and Jefferson C. Frisbee^{1,5}

Center for Cardiovascular and Respiratory Sciences¹, Divisions of Vascular and Endovascular Surgery²
and Exercise Physiology⁴, Departments of Community Medicine³ and Physiology and Pharmacology⁵,
West Virginia University School of Medicine, Morgantown, WV 26506 and Université François Rabelais
de Tours, 37200 Tours, France⁶

Running Head: Vascular dysfunction with depressive symptoms

Send Correspondence to:

Jefferson C. Frisbee, Ph.D.
Center for Cardiovascular and Respiratory Sciences
Department of Physiology and Pharmacology
Robert C. Byrd Health Sciences Center
PO Box 9105
West Virginia University School of Medicine
Morgantown, WV 26505
Phone: (304) 293-6527
Fax: (304) 293-5513
Email: jfrisbee@hsc.wvu.edu

ABSTRACT

As chronic stress and depression have become recognized as significant risk factors for peripheral vascular disease in patients with no prior history of vasculopathy, we interrogated this relationship utilizing an established mouse model of chronic stress/depressive symptoms from behavioral research. Male mice were exposed to eight weeks of unpredictable chronic mild stress (UCMS; e.g., wet bedding, predator sound/smell, random disruption of light/dark cycle), with indices of depressive behavior (coat status, grooming and mobility) becoming exacerbated vs. controls. In vascular rings, constrictor (phenylephrine) and endothelium-independent dilator (sodium nitroprusside) responses were not different between groups, although endothelium-dependent dilation (methacholine) was attenuated with UCMS. NOS inhibition was without effect in UCMS, but nearly abolished reactivity in controls, while cyclooxygenase inhibition blunted dilation in both. Combined blockade abolished reactivity in controls, although a significant dilation remained in UCMS that was abolished by catalase. Arterial NO production was attenuated by UCMS, although H₂O₂ production was increased. UCMS mice demonstrated an increased, although variable, insulin resistance and inflammation. However, while UCMS-induced vascular impairments were consistent, the predictive power of aggregate plasma levels of insulin, TNF- α , IL-1 β and CRP were limited. However, when separated into tertiles with regard to vascular outcomes, insulin resistance and hypertension were predictive of the most severe vascular impairments. Taken together, these data suggest that aggregate insulin resistance, inflammation and hypertension in UCMS mice are not robust predictors of vascular dysfunction, suggesting that unidentified mechanisms may be superior predictors of poor vascular outcomes in this model.

Key Words: vasodilation, endothelium-derived factors, peripheral vascular disease, nitric oxide, models of chronic stress, clinical depression

INTRODUCTION

Clinical diagnoses of depression and depressive symptoms are becoming increasingly common among patients with coronary artery and peripheral vascular disease, with ~20% of patients displaying angiographic evidence of vascular disease suffering from major depressive disorders (21). In addition, previous studies have provided evidence that clinical depression or depressive symptoms of sufficient severity can serve as independent risk factors for ischemic heart disease (20). However, in recent clinical trials, anti-depressant therapy failed to improve cardiac outcomes among patients with major depression (3, 4), suggesting that a distinct pathophysiological mechanism may be responsible for the compelling associations between clinical depression and the evolution of vascular disease. Patient-based studies have suggested that physiological differences are present between patients suffering from depression/depressive symptoms and control patients (4, 5), with one study suggesting that platelet nitric oxide synthase (NOS) activity and plasma NO levels were reduced in patients with depressive disorders (8). However, the validity of these reports has been criticized as suffering from a poor level of control and heterogeneity in data acquisition procedures. To further interrogate the characteristics linking clinical depression with vascular disease, the contributing mechanisms, functional outcomes and potential for interventional success, it is necessary to appropriately integrate an animal model for depression/depressive symptoms with data collected using human cohorts.

Previously, investigators developed the ‘unpredictable chronic mild stress’ (UCMS) model for developing depression/depression-like behaviors in rodents (16, 22, 26, 28), with the underlying assumption that a common source for developing depression is an environment of continual stressors resulting from uncontrollable exogenous factors, and the genetic component of depressive behavior being a function of heritable differences in susceptibility to imposed stressors (16, 19). The UCMS model is considered to be the most appropriate rodent model for human clinical depression, based on its ability to reproduce the development of many human depressive symptoms, including anhedonia and learned helplessness (16, 19, 25).

Although the UCMS model of depression in mice has been well established in the behavioral sciences, the application of this model to interrogate the association between depressive disorders and peripheral vascular disease has received little attention. The purpose of this study was to determine the relationships between chronic stress/depressive symptoms and vascular function in a mouse strain that is highly susceptible to the development of depression/depressive symptoms as a result of the UCMS protocol, the BALB/cJ (16, 27). This study evaluated the hypothesis that the UCMS protocol, leading to depressive behaviors in mice, would cause significant impairments to vascular reactivity that are consistent with the development of peripheral vascular disease, including increased constrictor reactivity and blunted dilator responses. Results from this study suggest that chronic depressive symptoms in mice strongly associated with poor vascular endothelial function, and that this may have significant implications for the regulation of vascular tone, thrombosis, atherogenesis, and tissue/organ perfusion.

MATERIALS AND METHODS

Animals: Male BALB/cJ mice (Jackson) were fed standard chow and drinking water *ad libitum* and were housed in the animal care facility at the WVU HSC. All protocols received prior IACUC approval. At nine weeks of age, mice were divided into two groups, control and UCMS (below). After eight weeks duration under either condition, mice were anesthetized with injections of sodium pentobarbital (50 mg·kg⁻¹ i.p.) and a carotid artery was cannulated for determination of arterial pressure. Venous blood aliquots were collected for biochemical evaluation of plasma markers of dysfunction (below).

Unpredictable Chronic Mild Stress Protocol: All mice were singly housed, with the control group in a separate, nearby quiet room. Alternatively, in the UCMS group, mice were randomly exposed to the following stressors on multiple occasions throughout each 24 hour period:

1. Damp bedding – 10 oz. of water was added to each standard cage for the next 3 hours
2. Water – all bedding was removed and ~0.5 inches of water was added to empty cage for the next 3 hours
3. Each cage was tilted to 45 degrees with or without bedding for 3 hours

4. Social stress – each mouse was switched into a cage of a neighboring mouse for 3 hours
5. No bedding lasting for 3 hours or, on two occasions each week, overnight.
6. Succession of light/dark cycles, lasting 30 minutes throughout a 24 hour period
7. Exposure to predator smells (e.g., cat fur) and/or sounds (e.g., cat growling)

After eight weeks, all mice were subjected to a series of behavioral tests that were aimed at evaluating the outcomes of the UCMS procedures.

Coat Status: This evaluation was done throughout the duration of the UCMS protocol. The total cumulative score was computed by giving an individual score of 0 (clean) or 1 (dirty) to eight body parts (head, neck, dorsal coat, ventral coat, tail, forelimb, hind-limb, and genital region).

Splash Test: This test was used to evaluate acute grooming behavior, defined as cleaning of the fur by licking or scratching. A 10% sucrose solution was sprayed on the dorsal coat of each mouse and grooming activity was recorded for five minutes. The viscosity of the sucrose solution will dirty the coat and induce grooming behavior, with depressive symptoms characterized by an increased latency (idle time between spray and initiation of grooming) and decreased frequency (number of times grooming a particular body part).

Tail Suspension Test: Mice subjected to the short term, inescapable stress of tail suspension, will develop an immobile posture, with longer periods of immobility in mice exhibiting a depressed behavior. Mice were suspended by the tail on a horizontal bar 35 cm from the base platform using adhesive tape. The latency to the first bout of immobility and the duration of total immobility were recorded for six minutes.

Measurements of Vascular Reactivity: In each mouse, the thoracic aorta was removed, rinsed in physiological salt solution, cleared of surrounding tissue, and cut in 2-3 mm segments. Each ring was mounted in a myobath chamber between a fixed point and a force transducer (World Precision Instruments), and set to 0.5 g tension for 45 minutes to equilibrate. The organ baths contained physiological salt solution at 37°C, and aerated with 95% O₂ and 5% CO₂. Rings were pre-conditioned by treatment with 10⁻⁷ M phenylephrine for 5 minutes, at which time 10⁻⁵ M methacholine was added to the bath to assess endothelial integrity. Any ring that failed to demonstrate both a brisk constrictor response to phenylephrine and viable

endothelial function was discarded. Subsequently, rings were treated with increasing concentrations of phenylephrine (10^{-10} M – 10^{-3} M) to assess constrictor reactivity. For the assessment of dilator reactivity, rings were pre-treated with 10^{-6} M phenylephrine and exposed to increasing concentrations of methacholine (10^{-10} M – 10^{-3} M) and sodium nitroprusside (10^{-10} M – 10^{-3} M). To assess the roles of nitric oxide, cyclooxygenase and hydrogen peroxide in modulating vascular responses to the agonist treatments, concentration-response curves were also conducted following treatment of the rings with L-NAME (10^{-4} M), indomethacin (10^{-5} M) and catalase (10^{-4} M), respectively.

Measurement of Vascular Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide Bioavailability: From a cohort of mice within each group, the aorta was used to assess vascular NO and H₂O₂ production using amperometric sensors (World Precision Instruments). Briefly, aortae were isolated, cleaned, and placed within a sealed chamber filled with physiological salt solution equilibrated with 95% O₂ and 5% CO₂. Within this chamber, a nitric oxide sensor (ISO-NOPF 100) and a hydrogen peroxide sensor (ISO-HPO-100) were inserted and a baseline current was obtained. Subsequently, methacholine (10^{-6} M) was added to the chamber and the changes in current were determined. To verify that responses represented NO and H₂O₂ release, these procedures were repeated following addition of L-NAME (10^{-4} M) or catalase (10^{-4} M) to the chamber.

Analyses of eNOS Expression: For determination of eNOS expression, aortae were homogenized and proteins were separated under denaturing conditions on 10% SDS-polyacrylamide gel, which were then transferred to a PVDF membrane and blocked. Subsequently, blots were incubated with mouse anti-eNOS/NOS Type III mAb (BD Transduction Laboratories), washed and incubated with appropriate horseradish peroxidase conjugated secondary antibody. GE Healthsciences ECL advance kits were used to visualize proteins, and all eNOS bands were normalized to expression of actin.

Biochemical Analyses: In all samples, blood glucose was determined using a commercially available glucometer (Freestyle). Lipid panels for cholesterol and triglycerides were performed using commercially available kits (Wako). Additionally, oxidant stress was assessed through determination of plasma

nitrotyrosine (Cayman). Finally, using a multiplexed procedure, plasma insulin and markers of inflammation were assessed using commercially available kits (Millipore).

Data and Statistical Analyses: Mechanical responses following challenge with methacholine or phenylephrine were fit with the three-parameter logistic equation:

$$y = \text{min} + \left[\frac{\text{max} - \text{min}}{1 + 10^{\log ED_{50} - x}} \right]$$

where y represents the isometric tension, “min” and “max” represent the lower and upper bounds, respectively, of the change in tone with agonist concentration, x is the logarithm of the agonist concentration and $\log ED_{50}$ represents the logarithm of the agonist concentration (x) where the response (y) is halfway between the bounds. The use of the three-parameter logistic equation is appropriate for the analysis of sigmoidal concentration-response relationships, as it simultaneously provides estimates of the curve maximum (upper bound), minimum (lower bound) and the dose at which the dependent variable reaches 50% of maximum (ED_{50}).

All data are presented as mean \pm SEM. Significant differences between groups were determined using analysis of variance (ANOVA). In all cases, Student-Newman-Keuls post hoc test was used when appropriate and $p < 0.05$ was taken to reflect statistical significance.

RESULTS

Table 1 presents data describing the characteristics of mouse groups in the present study. At the time of use, plasma insulin, triglyceride concentrations and plasma levels of nitrotyrosine were significantly greater in UCMS mice than in controls. No differences were determined between body mass, mean arterial pressure, plasma glucose and cholesterol levels.

The impact of the UCMS protocol on depressive behaviors in mice is summarized in Figure 1. Throughout the duration of the UCMS period, coat status in mice undergoing the stress protocol was consistently poorer as compared to that in controls (Panel A). In response to the sucrose spray, control mice

demonstrated both a more rapid (Panel B) and a more frequent (Panel C) grooming response as compared to that exhibited by mice following the UCMS protocol. In response to tail suspension, control mice demonstrated a significantly shorter period of immobility as compared to that in UCMS mice (Panel D).

Figure 2 summarizes the constrictor responses of aortic rings from the two mouse groups in response to increasing concentrations of phenylephrine. As shown in Panel A, there was no evidence of an altered constrictor reactivity of rings from UCMS mice in response to phenylephrine. However, when treated with the NOS inhibitor L-NAME (Panel B), the constrictor responses of rings from control mice increased significantly, a response not present in UCMS. Treatment of vascular rings from either group with indomethacin had no impact on the constrictor response to phenylephrine (Panel C), and combined treatment with both L-NAME and indomethacin was not different from that for L-NAME alone (Panel D).

The dilator responses of vascular rings from control and UCMS mice are summarized in Figure 3. Rings from UCMS mice demonstrated a significant reduction in methacholine-induced dilation as compared to responses in rings from control mice (Panel A). While pre-treatment of rings with L-NAME nearly abolished methacholine-induced reactivity in control mice, NOS blockade had only a minor impact on dilation in rings from UCMS mice (Panel B). Further, while methacholine-induced dilation was only mildly impacted by treatment with indomethacin in both groups (Panel C), treatment with L-NAME and indomethacin produced results that were comparable to that for L-NAME alone (Panel D). The dilation of aortic rings to increasing concentrations of the NO donor sodium nitroprusside did not differ between control and UCMS mice (Panel E).

The arterial expression of eNOS in control and UCMS mice was not altered by the UCMS protocol (Figure 4). These results suggest that any change in NO bioavailability and the impaired NO-dependent component of methacholine-induced dilation in UCMS mice does not reflect a change in vascular eNOS expression.

Figure 5 presents data describing the impact of treatment of aortic rings from both mouse groups with catalase on methacholine-induced dilation. Treatment of rings with catalase, while having minimal impact of

dilator reactivity in control mice, significantly reduced dilator responses in UCMS mice (Panels A and B). Further, combined treatment of rings with L-NAME and catalase nearly abolished responses of vascular rings to methacholine in both control and UCMS groups (Panel C).

The results of biochemical assays for methacholine-induced NO (Panel A) and H₂O₂ (Panel B) production are summarized in Figure 6. Aortae from control mice demonstrated a robust NO production in response to challenge with methacholine as compared to levels in unstimulated vessels, while that from UCMS mice was significantly attenuated (Panel A); paralleling the mechanical responses presented in Figure 3. In contrast, methacholine challenge resulted in a limited production of H₂O₂ in aortae from control animals, yet caused a strong increase in H₂O₂ release in vessels of UCMS (Panel B), providing further support for the data presented in Figure 5. The production of H₂O₂ in response to application of methacholine in either group was unaffected by pre-treatment with L-NAME.

Plasma levels of inflammatory cytokines in control and UCMS mice are summarized in Figure 7. Although mean values were elevated for TNF- α (Panel A), IL-1 β (Panel B) and C-reactive peptide (CRP; Panel C) in UCMS mice as compared to control, a high variability in these measurements between animals within the UCMS group prevented differences from reaching statistical significance. Plasma levels of IL-10 (Panel D) were not different between the two groups of mice.

Given the variability in markers of peripheral vascular disease risk in the UCMS mice, it is important to determine the extent to which these substances were predictive of poor vascular outcomes in this model of chronic stress/depressive symptoms. As presented in Figure 8, plasma levels of TNF- α (Panel A), insulin concentration (Panel D), and nitrotyrosine (Panel F) were well correlated with vascular reactivity in control mice (with $r^2 > 0.6$ for each), with other risk factors [IL-1 β (Panel B), CRP (Panel C) and arterial pressure (Panel E)] being less predictive. However, none of the measured risk factors were strongly predictive of the vascular outcomes in the UCMS mice where r^2 values ranged between 0.013 for insulin and ~ 0.3 for both arterial pressure and nitrotyrosine.

However, if relationships in Figure 8 are separated into tertiles with regard to vascular outcome, these data are more informative. In Figure 9, vascular dysfunction is separated as such, with the first tertile representing mild vascular dysfunction (lower bound of the methacholine-induced dilation <20% of initial tension), the second tertile representing moderate vascular dysfunction (lower bound between 20 and 40% of initial tension), and the third tertile representing severe vascular dysfunction (lower bound >40% of initial tension). When presented in this fashion where the correlation between specific risk factors and the graded severity of vascular dysfunction in UCMS mice is presented, it is apparent that mild levels of vascular dysfunction in response to UCMS are not well predicted by any of the risk factors determined. In mice where a moderate reduction in dilator reactivity was present (second tertile), this degree of vascular impairment was well predicted where a significant elevation in arterial pressure was the primary outcome of the UCMS protocol. The strongest levels of vascular dysfunction were observed in mice where the UCMS protocol was able to create a more insulin-resistant, hypertensive state.

DISCUSSION

With a growing body of clinical and epidemiological evidence suggesting a link between chronic stress/depression and the progression of vascular disease, it is vital to utilize an appropriate animal model such that experiments can be designed which will interrogate these processes at a high level of resolution; for mechanistic contributors, functional implications, and interventional strategies. The UCMS model for the establishment of depressive symptoms in rodents has been repeatedly validated within behavioral research, and has demonstrated a remarkably broad utility. Not only is this model used for general studies involving chronic stress and depression (19, 25), it has also been employed as an excellent means for evaluating interventional and potentially ameliorative therapies (12, 19, 25), as the depressive state in rodents manifests behaviors that mimic those in human subjects afflicted with clinical depression (25, 27). One of the main underlying assumptions of clinical depression and depressive symptoms is that the presence of chronic exogenous stressors will initiate depression/depressive symptoms in all afflicted subjects, but that underlying genetic, heritable traits are directly relevant to the severity of these symptoms rather than basic susceptibility

per se (25, 27). The veracity of this fundamental assumption has been evaluated previously in multiple mouse strains in response to the imposition of the UCMS protocol. Interestingly, across numerous mouse strains, the BALB/cJ was consistently demonstrated as being among the most susceptible to the UCMS protocol, with the most severe development of depressive symptoms as a result of the chronic stressors (10, 15). Given that previous studies have identified that the BALB/cJ strain to be somewhat less susceptible to vascular dysfunction (11, 17) underscores the potential importance of the relationships between chronic stress/depression and negative vascular outcomes under investigation in the current study.

Building on the results from previous studies of impaired vascular function in human subjects with increasing depressive symptom severity (3), the UCMS mouse model was used to further interrogate these relationships. With the success of the UCMS protocol in producing depressive behaviors in mice (Figure 1), the present results demonstrated that this was associated with significant impairments and alterations to vascular reactivity. Net reactivity of aortic rings to phenylephrine was not significantly different between control and UCMS mice, a response that is in contrast to the recent work from Neves *et al.* (18), although that study utilized rats and a much shorter duration of UCMS exposure. However, in the present study application of L-NAME resulted in an increased constrictor response in control mice only, suggesting a level of NO production which buffers phenylephrine-induced constriction; an observation that was completely absent in UCMS mice (Figure 2). This lack of an impact of L-NAME on adrenergic reactivity suggested that one of the effects of UCMS was a reduction in vascular NO bioavailability, although the responses of vascular smooth muscle to exogenous NO appear to be intact as responses to sodium nitroprusside were unaffected.

This concept of impaired endothelial function was further explored through interrogation of dilator responses to the endothelium-dependent agonist methacholine. While methacholine-induced vasodilation in rings from control animals was overwhelmingly a function of NO production, this pattern was altered substantially in UCMS mice (Figure 3). Following the UCMS protocol, methacholine-induced dilation, while blunted versus responses from control mice, demonstrated a reduced dependence on, and role for, NO

bioavailability. However, as combined treatment with L-NAME revealed a residual dilator response to methacholine, these results suggest that a compensatory dilator mechanism develops in UCMS mice where NO bioavailability is compromised. Based on the data presented in Figure 4, it seems unlikely that this reduction in vascular NO bioavailability reflects a reduction in NOS expression within the aortic endothelium, as expression was not altered between control and UCMS mice.

As summarized in Figure 5, treatment of aortic rings from UCMS mice with the hydrogen peroxide scavenger catalase reduced methacholine-induced dilation, while having minimal impact on responses in rings from control mice. Further, combined treatment of vascular rings with L-NAME and catalase nearly abolished vascular responses to methacholine in both control and UCMS mice. These results strongly suggest that the vascular production of H₂O₂ in response to challenge with methacholine may represent a compensatory mechanism which helps to maintain normal vascular mechanical responses to vasoactive stimuli. This conceptual paradigm received additional support through the measurements of NO and H₂O₂ production in aortae of control and UCMS mice following challenge with methacholine. Presented in Figure 6, the reduction in agonist-induced NO bioavailability in UCMS mice was associated with an increased H₂O₂ production versus responses in aortae from control mice.

One of the more intriguing elements to the present study was assessing major contributing mechanisms which could underlie the demonstrated changes in vascular reactivity with chronic UCMS in mice. As evidenced by the data summarized in Figure 8, vascular reactivity in control mice demonstrated a predictable correlation with markers of inflammation (Panels A-C), an index of insulin resistance (Panel D), and a plasma marker of oxidant stress (Panel F). However, in UCMS mice, these correlations were much less robust as neither these markers, nor arterial pressure (Panel E), were able to effectively predict the reduced dilator responses in UCMS-mice, with only arterial pressure and plasma nitrotyrosine demonstrating r^2 values in excess of 0.3. This is a particularly interesting outcome in that UCMS mice developed insulin resistance that, while not severe, could certainly contribute to alterations in endothelium-dependent vascular reactivity through multiple mechanism associated with nitric oxide bioavailability, oxidant stress

and chronic inflammation (7, 14, 24). Given this, we elected to analyze the data after dividing the vascular outcome into tertiles based on the severity of the impaired dilator reactivity (Figure 9). The results from these analyses were particularly intriguing, as mild vascular impairments as a result of the UCMS protocol occurred largely in the absence of alterations to insulin sensitivity, chronic oxidant stress, inflammation, or elevated arterial pressure. However, moderate impairments in vascular reactivity in UCMS mice were associated with the development of increased arterial pressure only, were weakly predicted by oxidant stress and inflammation and were independent of insulin sensitivity. It was only at the highest levels of vascular dysfunction as a result of UCMS where both hypertension and insulin resistance (with the associated elevation in oxidant stress) became robust predictors of the negative outcomes.

Taken together, these data provide for multiple compelling avenues for future investigation. First, a greater understanding of reduced NO bioavailability with UCMS warrants attention, via determination eNOS activity and its regulatory processes. Additionally, future studies should be organized to distinguish chronic stress/depression from a general lack of physical activity (and the possible role of insulin resistance in this process; ref. 23) as a result of the UCMS protocol, as the mice experiencing the stress procedures did manifest a greater degree of behavior (delayed/reduced motor responses to stimuli, reduced physical struggling against holding/restraint) which is comparable to the “learned helplessness” that afflicts human subjects with clinical depression/depressive symptoms. Further, the results presented in Figure 9 suggest that there is a level of vascular dysfunction inherent in UCMS and the development of depressive symptoms in mice that is not associated with the measured parameters in the present study, and which may reflect the impact of currently unidentified processes. What makes this particularly compelling is that it is apparent that even though all mice undergoing the UCMS protocol were genetically identical, and each manifest comparable behavioral outcomes, variability in the vascular outcome, and most certainly in the contributing elements to that vascular dysfunction, is present. As a point of speculation, this suggests that the individual responses to chronic exogenous stress may be

heterogeneous, even within an inbred strain, and that variability in terms of adaptation in response to imposed external stressors may result in distinct developmental routes through which an integrated pathophysiological outcome develops. We believe that this warrants future investigation.

One area that requires a brief clarification is that of ‘vascular depression’, a term that describes the development of depressive symptoms that stems from cerebrovascular dysfunction impacting cerebral perfusion distribution (1). In ‘vascular depression’, the depressive symptoms are the result of poor perfusion to the prefrontal regions or their modulating pathways owing to an accumulation of vascular lesions which negatively impact behavioral outcomes, leading to a state of clinical depression (2). Given the novelty of using the UCMS model in mice for the study of vascular dysfunction, one area that will require future investigation is the temporal association of the depressive symptom severity and the alterations to cerebrovascular reactivity, as the extent to which these are distinct pathological conditions is presently unclear.

In summary, these results suggest that depressive symptoms of sufficient severity can represent a powerful factor in the development of negative vascular outcomes in a mouse model of chronic stress/depression. The vascular dysfunction that develops with depressive symptoms is characterized by an abrogation of vascular NO bioavailability, although net vascular reactivity is still largely intact owing to the emergence of H₂O₂ as a compensatory dilator metabolite. We believe that future investigation into the role of depressive symptoms versus physical activity, the mechanistic bases of the vascular dysfunction, the functional implications for the change in endothelial function and the potential for ameliorative interventions, is well justified.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the expertise of Dr. Catherine Belzung of the Université François Rabelais de Tours, France for assisting us in the developing the UCMS model in our laboratory. Additionally, we acknowledge the expert technical assistance of Ms. Barbara Jackson, Ms. Milinda James and the support provided through Center for Cardiovascular and Respiratory Sciences at the West Virginia University Health Sciences Center.

SOURCES OF RESEARCH FUNDING

This study was supported by the American Heart Association (EIA 0740129N), the National Institutes of Health (R01 DK64668) and a West Virginia University Research Development Grant.

REFERENCES

1. Alexopoulos, G.S., B.S. Meyers, R.C. Young, S. Campbell, D. Silbersweig and M. Charlson. 'Vascular depression' hypothesis. *Arch Gen Psychiatry*. 1997; 54(10):915-22.
2. Alexopoulos, G.S., B.S. Meyers, R.C. Young, T. Kakuma, D. Silbersweig and M. Charlson. Clinically defined vascular depression. *Am J Psychiatry*. 1997; 154(4):562-5.
3. Brown, A.D., D.A. Barton and G.W. Lambert. Cardiovascular abnormalities in patients with major depressive disorder: autonomic mechanisms and implications for treatment. *CNS Drugs*. 2009; 23:583-602
4. Barefoot, J.C., B.H. Brummett, M.J. Helms, D.B. Mark, I.C. Siegler, R.B. Williams. Depressive symptoms and survival of patients with coronary artery disease. *Psychosom Med*. 2000; 62(6):790-5.
5. Barefoot, J.C. and R.B. Williams. Antidepressant use and the risk of myocardial infarction. *Am J Med*. 2000; 108(1):87-8.
6. Berkman, L.F., J. Blumenthal, M. Burg, R.M. Carney, D. Catellier, M.J. Cowan, S.M. Czajkowski, R. DeBusk, J. Hosking, A. Jaffe, P.G. Kaufmann, P. Mitchell, J. Norman, L.H. Powell, J.M. Raczynski and N. Schneiderman. Enhancing Recovery in Coronary Heart Disease Patients Investigators (ENRICHD). Effects of treating depression and low perceived social support on clinical events after myocardial infarction: the Enhancing Recovery in Coronary Heart Disease Patients (ENRICHD) Randomized Trial. *JAMA*. 2003; 289(23):3106-16.

7. Busija, D.W., A.W. Miller, P. Katakam and B. Erdős. Insulin resistance and associated dysfunction of resistance vessels and arterial hypertension. *Minerva Med.* 2005; 96(4):223-32.
8. Chrapko, W.E., P. Jurasz, M.W. Radomski, N. Lara, S.L. Archer and J.M. Le Mellédo. Decreased platelet nitric oxide synthase activity and plasma nitric oxide metabolites in major depressive disorder. *Biol Psychiatry.* 2004; 56(2):129-34.
9. Davidson, K.W., D.J. Kupfer, J.T. Bigger, R.M. Califf, R.M. Carney, J.C. Coyne, S.M. Czajkowski, E. Frank, N. Frasure-Smith, K.E. Freedland, E.S. Froelicher, A.H. Glassman, W.J. Katon, P.G. Kaufmann, R.C. Kessler, H.C. Kraemer, K.R. Krishnan, F. Lespérance, N. Rieckmann, D.S. Sheps and J.M. Suls. National Heart, Lung, and Blood Institute Working Group. Assessment and treatment of depression in patients with cardiovascular disease: National Heart, Lung, and Blood Institute Working Group Report. *Psychosom Med.* 2006; 68(5):645-50.
10. Ducottet, C. and C. Belzung, Correlations between behaviours in the elevated plus-maze and sensitivity to unpredictable subchronic mild stress: evidence from inbred strains of mice. *Behav Brain Res,* 2005. 156(1): 153-62.
11. Friedman, G., A. Ben-Yehuda, Y. Dabach, G. Hollander, S. Babaey, M. Ben-Naim, O. Stein and Y. Stein. Macrophage cholesterol metabolism, apolipoprotein E, and scavenger receptor AI/II mRNA in atherosclerosis-susceptible and -resistant mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20(11):2459-64.
12. Gass, P., H.M. Reichardt, T. Strekalova, F. Henn and F. Tronche. Mice with targeted mutations of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors: models for depression and anxiety? *Physiol Behav.* 2001; 73(5):811-25.

13. Glassman, A.H., C.M. O'Connor, R.M. Califf, K. Swedberg, P. Schwartz, J.T. Bigger, Jr., K.R. Krishnan, L.T. van Zyl, J.R. Swenson, M.S. Finkel, C. Landau, P.A. Shapiro, C.J. Pepine, J. Mardekian, W.M. Harrison, D. Barton and M. McIvor. Sertraline Antidepressant Heart Attack Randomized Trial (SADHEART) Group. Sertraline treatment of major depression in patients with acute MI or unstable angina. *JAMA*. 2002; 288(6):701-9. Erratum in: *JAMA* 2002; 288(14):1720.
14. Kim, F., M. Pham, E. Maloney, N.O. Rizzo, G.J. Morton, B.E. Wisse, E.A. Kirk, A. Chait and M.W. Schwartz. Vascular inflammation, insulin resistance, and reduced nitric oxide production precede the onset of peripheral insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28(11):1982-8.
15. Mineur, Y.S., C. Belzung and W.E. Crusio. Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. *Behav Brain Res*. 2006; 175(1):43-50.
16. Mineur, Y.S., D.J. Prasol, C. Belzung and W.E. Crusio. Agonistic behavior and unpredictable chronic mild stress in mice. *Behav Genet*. 2003; 33(5):513-9.
17. Miyoshi, T., A.H. Matsumoto and W. Shi. Paradoxical increase in LDL oxidation by endothelial cells from an atherosclerosis-resistant mouse strain. *Atherosclerosis*. 2007; 192(2):259-65.
18. Neves, V.J., M.J. Moura, M.L. Tamascia, R. Ferreira, N.S. Silva, R. Costa, P.L. Montemor, E.A. Narvaes, C.F. Bernardes, P.D. Novaes and F.K. Marcondes. Proatherosclerotic effects of chronic stress in male rats: altered phenylephrine sensitivity and nitric oxide synthase activity of aorta and circulating lipids. *Stress*. 2009;12:320-7

19. Porsolt, R.D. Animal models of depression: utility for transgenic research. *Rev Neurosci.* 2000; 11(1):53-8.
20. Penninx, B.W., A.T. Beekman, A. Honig, D.J. Deeg, R.A. Schoevers, J.T. van Eijk and W. van Tilburg. Depression and cardiac mortality: results from a community-based longitudinal study. *Arch Gen Psychiatry.* 2001; 58(3):221-7.
21. Rudisch, B. and C.B. Nemeroff. Epidemiology of comorbid coronary artery disease and depression. *Biol Psychiatry.* 2003; 54(3):227-40.
22. Santarelli, L., M. Saxe, C. Gross, A. Surget, F. Battaglia, S. Dulawa, N. Weisstaub, J. Lee, R. Duman, O. Arancio, C. Belzung and R. Hen. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science.* 2003; 301(5634): 805-9.
23. Venables, M.C. and A.E. Jeukendrup. Physical inactivity and obesity: links with insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev.* 2009;25 Suppl 1:S18-23.
24. Wiernsperger, N., P. Nivoit, L.G. De Aguiar and E. Bouskela. Microcirculation and the metabolic syndrome. *Microcirculation.* 2007; 14(4-5):403-38.
25. Willner, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl).* 1997; 134(4):319-29.
26. Willner, P. Animal models of depression: validity and applications. *Adv Biochem Psychopharmacol.* 1995; 49: 19-41.

27. Yalcin, I., C. Belzung and A. Surget. Mouse strain differences in the unpredictable chronic mild stress: a four-antidepressant survey. *Behav Brain Res.* 2008; 193(1):140-3.

28. Yalcin, I., F. Aksu and C. Belzung. Effects of desipramine and tramadol in a chronic mild stress model in mice are altered by yohimbine but not by pindolol. *Eur J Pharmacol.* 2005; 514(2-3): 165-74.

Table 1. Baseline characteristics between mouse groups in the present study. All mice are male, aged 17-18 weeks. * $p < 0.05$ versus control.

	Control	UCMS
Mass (g)	31±2	29±4
MAP (mmHg)	84±5	93±4
Insulin _{plasma} (ng/ml)	1.3±0.2	3.9±0.6*
Glucose _{blood} (mg/dl)	102±8	104±7
Cholesterol _{plasma} (mg/dl)	75±8	81±8
Triglycerides _{plasma} (mg/dl)	102±8	128±10*
Nitrotyrosine _{plasma} (ng/ml)	17±2	27±4*

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Depressive symptoms following eight weeks of the UCMS protocol in BALB/cJ mice. Data are presented for coat status (Panel A), the latency (Panel B) and frequency (Panel C) of facial grooming following a 10% sucrose solution spray, and the total period of immobility during the tail suspension test (Panel D) for control and UCMS mice. * $p < 0.05$ versus control; $n = 25$ for control; $n = 26$ for UCMS.

Figure 2. Constrictor responses of aortic rings to increasing concentrations of phenylephrine from mice under control conditions (open symbols, \circ/\square) and after eight weeks of UCMS (filled symbols, \bullet/\blacksquare). Data are presented under control conditions (Panel A; control upper bound = $3.2 \pm 0.2g$; UCMS upper bound = $3.3 \pm 0.3g$), in response to NOS inhibition with L-NAME (Panel B; control+L-NAME upper bound = $3.8 \pm 0.2g$; UCMS+L-NAME upper bound = $3.5 \pm 0.2g$), cyclooxygenase inhibition with indomethacin (INDO; Panel B; control+INDO upper bound = $3.3 \pm 0.3g$; UCMS+INDO upper bound = $3.4 \pm 0.3g$) or both (Panel D; control+both upper bound = $3.9 \pm 0.3g$; UCMS+both upper bound = $3.5 \pm 0.3g$). * $p < 0.05$ versus responses in untreated vascular rings from control mice; $n = 10-11$ for control; $n = 10-12$ for UCMS.

Figure 3. Dilator responses of aortic rings to increasing concentrations of methacholine from mice under control conditions (open symbols, \circ/\square) and following eight weeks of UCMS (filled symbols, \bullet/\blacksquare). Data are presented under control conditions (Panel A; control lower bound = $10.3 \pm 2.4\%$; UCMS lower bound = $33.6 \pm 4.4\%$), in response to NOS inhibition with L-NAME (Panel B; control+L-NAME lower bound = $84.5 \pm 3.2\%$; UCMS+L-NAME lower bound = $54.6 \pm 5.4\%$), cyclooxygenase inhibition with indomethacin (INDO; Panel C; control+INDO lower bound = $21.2 \pm 4.1\%$; UCMS+INDO lower bound = $43.4 \pm 5.2\%$) or both (Panel D; control+both lower bound = $93.4 \pm 2.4\%$; UCMS+both lower bound = $59.2 \pm 5.6\%$). Data are also presented for vascular responses to increasing concentrations of sodium nitroprusside (Panel E; control lower bound = $2.5 \pm 1.1\%$; UCMS lower bound = $2.9 \pm 1.3\%$). * $p < 0.05$ versus

responses in untreated vascular rings from control mice, † $p < 0.05$ versus responses in untreated vascular rings from UCMS mice; $n = 8-9$ for control; $n = 7-9$ for UCMS.

Figure 4. Representative blots describing expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) from aortae in control and UCMS mice (Panel A). Panel B presents densitometric analysis of band intensity between control and UCMS mice; $n = 5$ for control and for UCMS.

Figure 5. Dilator responses of aortic rings to increasing concentrations of methacholine from mice under control conditions (open symbols, \circ/\square) and following eight weeks of UCMS (filled symbols, \bullet/\blacksquare). Data are presented under control conditions (Panel A; control lower bound = $16.6 \pm 3.9\%$; UCMS lower bound = $37.4 \pm 4.6\%$), following pre-treatment of rings with the H_2O_2 scavenger catalase (Panel B; control+catalase lower bound = $23.8 \pm 4.4\%$; UCMS+catalase lower bound = $72.3 \pm 6.1\%$), or following combined treatment with catalase and L-NAME (Panel C; control+catalase/L-NAME lower bound = $91.4 \pm 2.8\%$; UCMS+catalase/L-NAME lower bound = $92.6 \pm 3.1\%$). * $p < 0.05$ versus responses in untreated vascular rings from control mice, † $p < 0.05$ versus responses in untreated vascular rings from UCMS mice; $n = 8$ for control; $n = 8-9$ for UCMS.

Figure 6. Aortic production of nitric oxide (Panel A) and H_2O_2 (Panel B) following methacholine challenge in mice under control conditions and following eight weeks of UCMS. Data are presented for arteries under control (unstimulated) conditions, following challenge with methacholine and following methacholine challenge in the presence of NOS inhibition with L-NAME. * $p < 0.05$ versus responses in unstimulated vessels in that group, † $p < 0.05$ versus responses in vessels from control animals following challenge with methacholine, ‡ $p < 0.05$ versus responses in vessels from that group following challenge with methacholine; $n = 5$ for control; $n = 6$ for UCMS.

Figure 7. Plasma levels of markers of inflammation in control mice and in mice following eight weeks of UCMS. Data are shown for TNF- α (Panel A), IL-1 β (Panel B), IL-10 (Panel C) and C-reactive peptide (Panel D). n=24 for control and for UCMS

Figure 8. Correlations between vascular reactivity and individual vascular disease risk factors in control (open symbols, solid line) and UCMS mice (filled symbols, dashed line). Data are presented as the lower bound in the methacholine concentration-response curve for an individual mouse versus plasma concentrations of TNF- α (Panel A), IL-1 β (Panel B), CRP (Panel C), insulin (Panel D), mean arterial pressure (Panel E) and plasma levels of nitrotyrosine (Panel F). Also presented are lines of best fit through the data for each group, with the resulting equations and r^2 values presented in the legend.

Figure 9. Correlations between vascular reactivity and individual cardiovascular disease risk factors in control and UCMS mice following separation of the lower bound of the methacholine concentration-response curves into tertiles based on the severity of impairment in dilator responses. Data are presented as the correlation between a given tertile of vascular impairment severity and a specific vascular disease risk factor. Please see text for details.

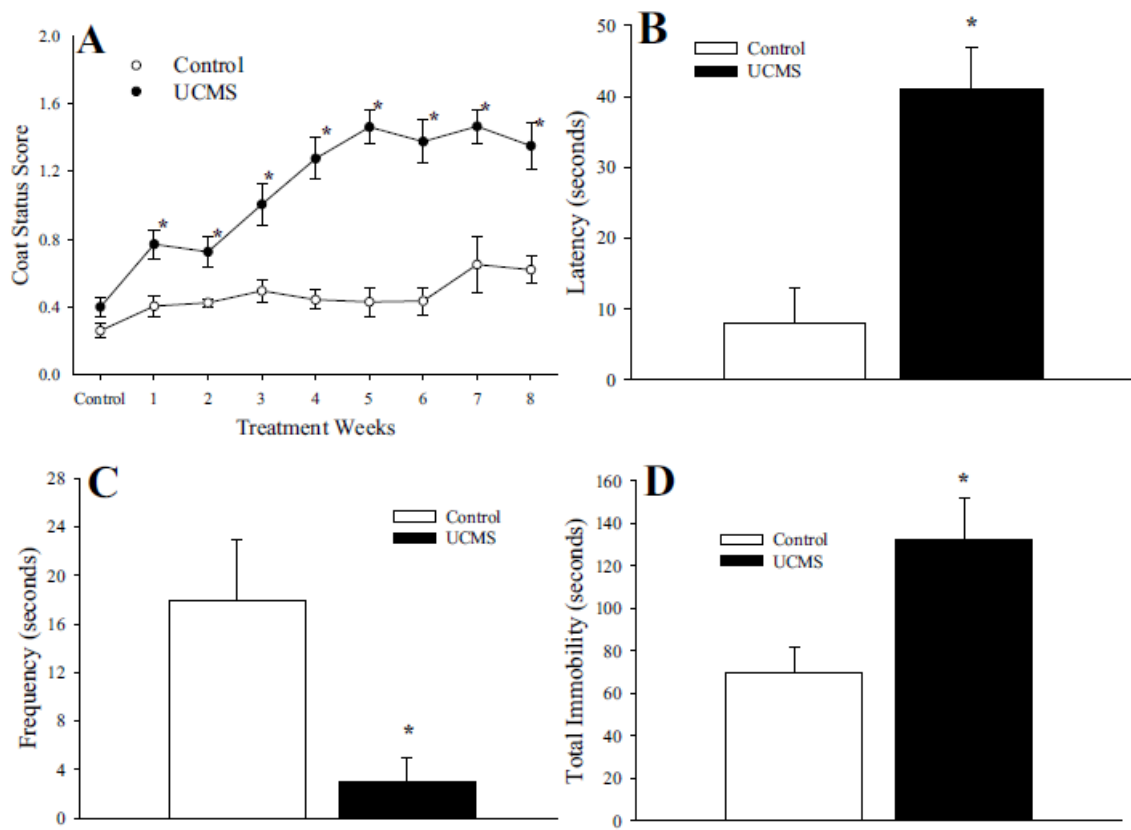


Figure 1.
d'Audiffret et al.

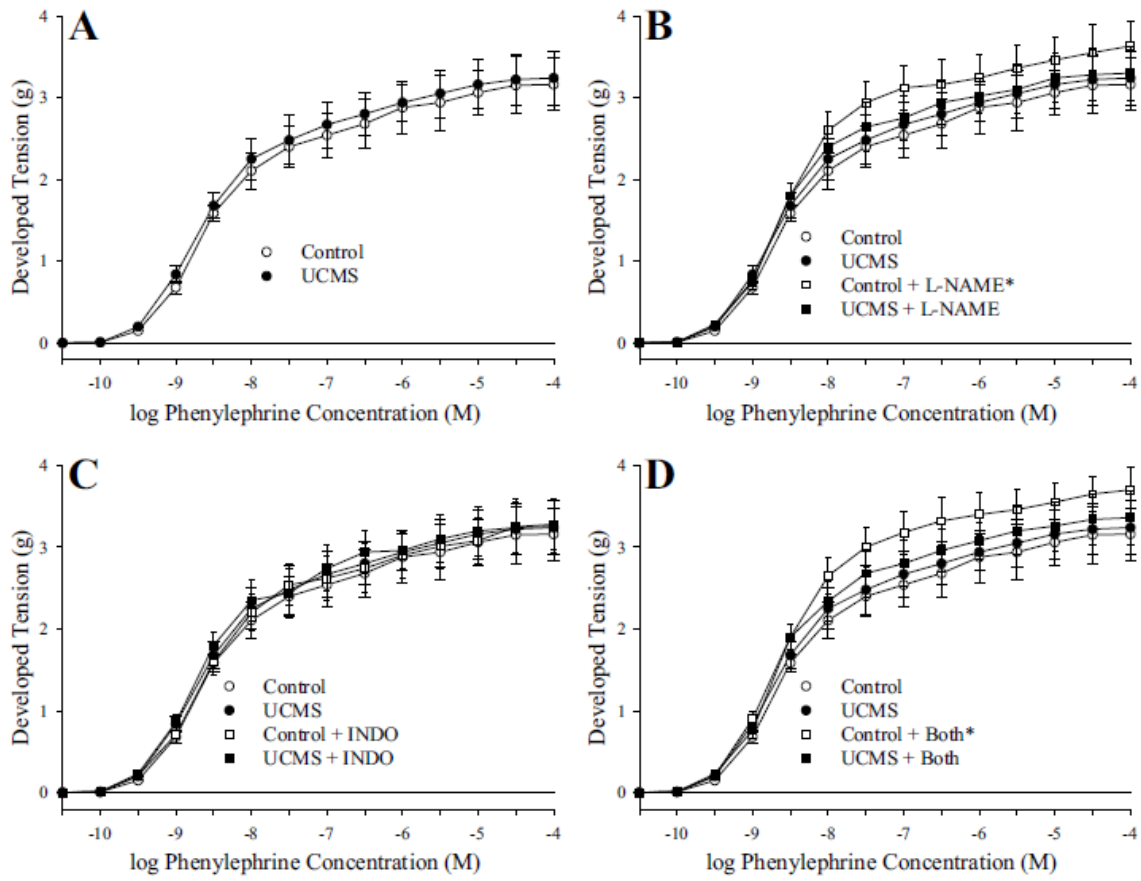


Figure 2.
d'Audiffret et al.

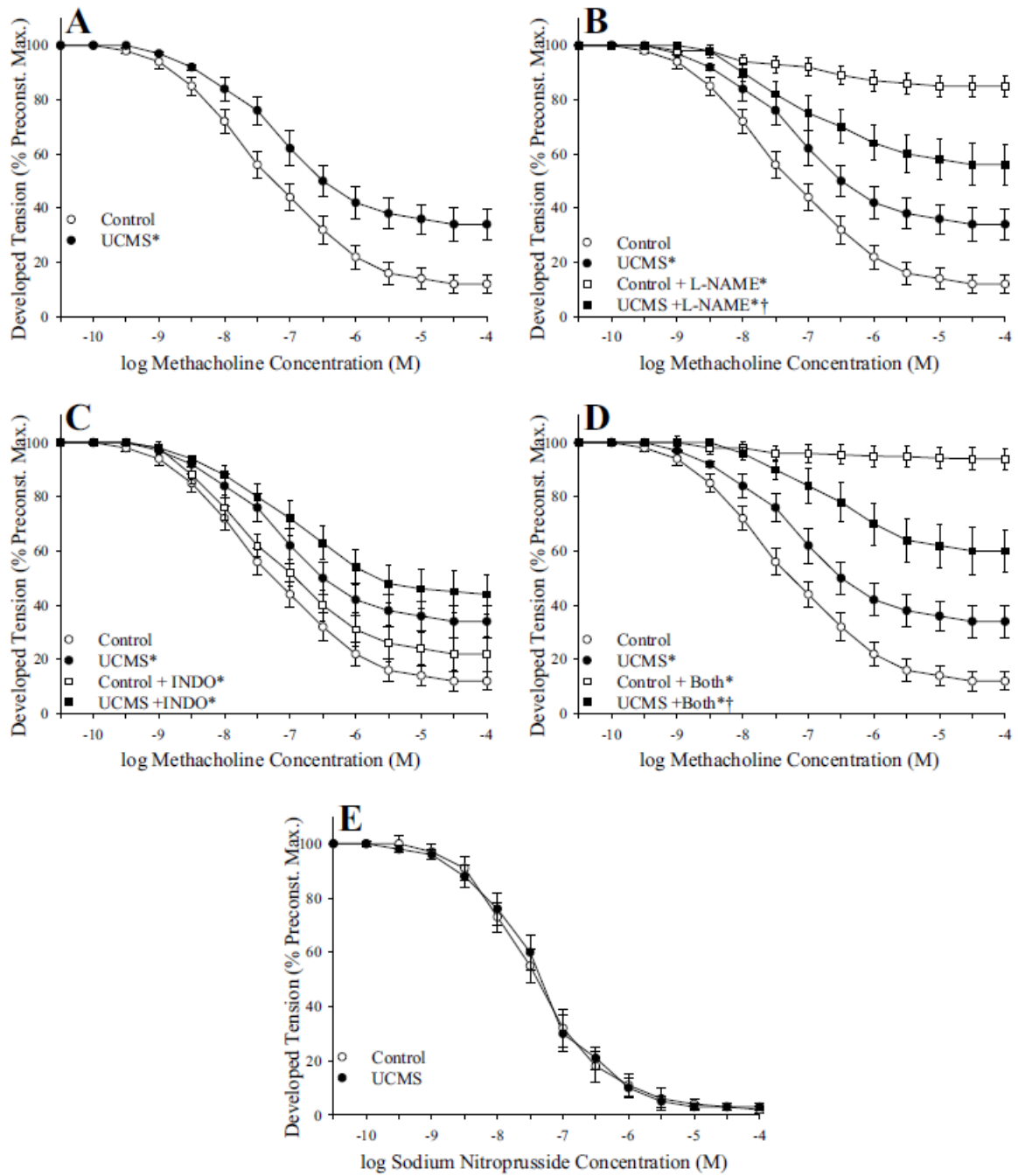


Figure 3.
d'Audiffret et al.

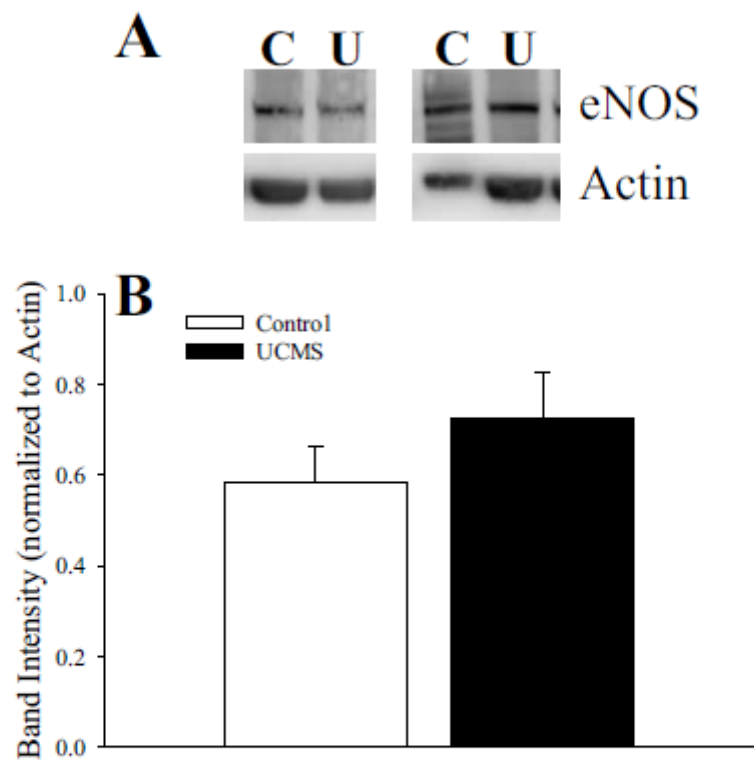


Figure 4.
d'Audiffret et al.

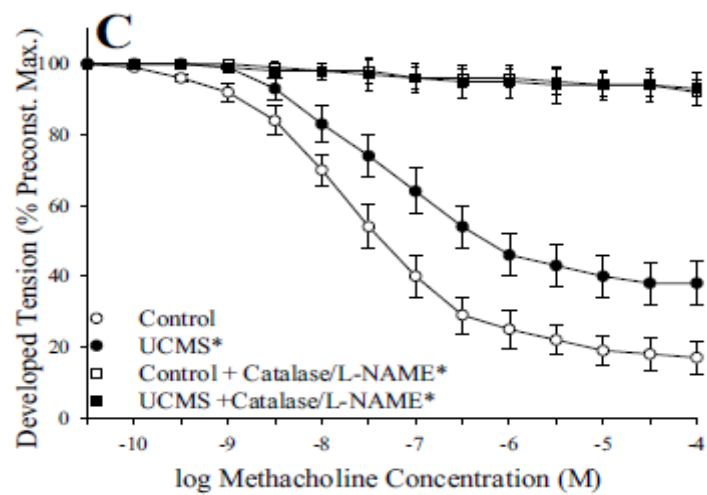
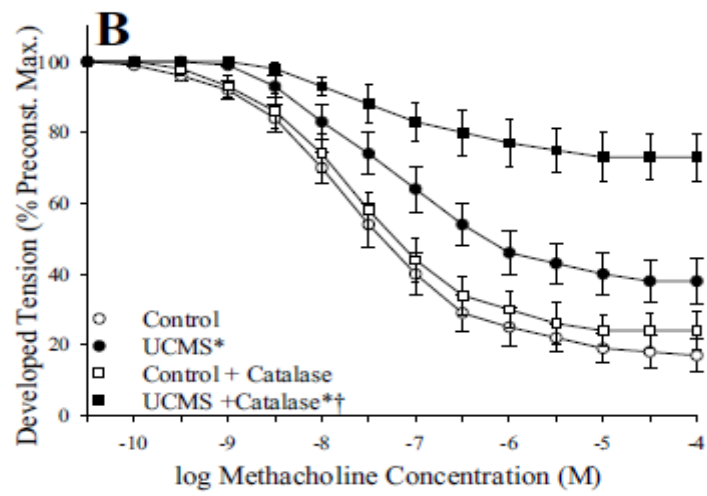
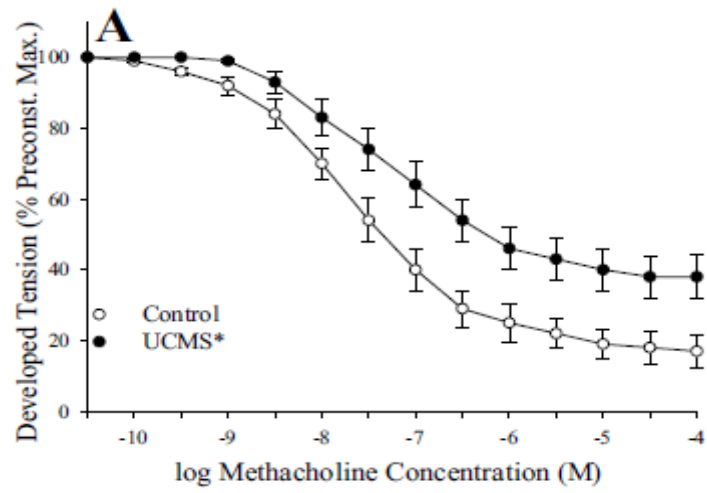


Figure 5.
d'Audiffret et al.

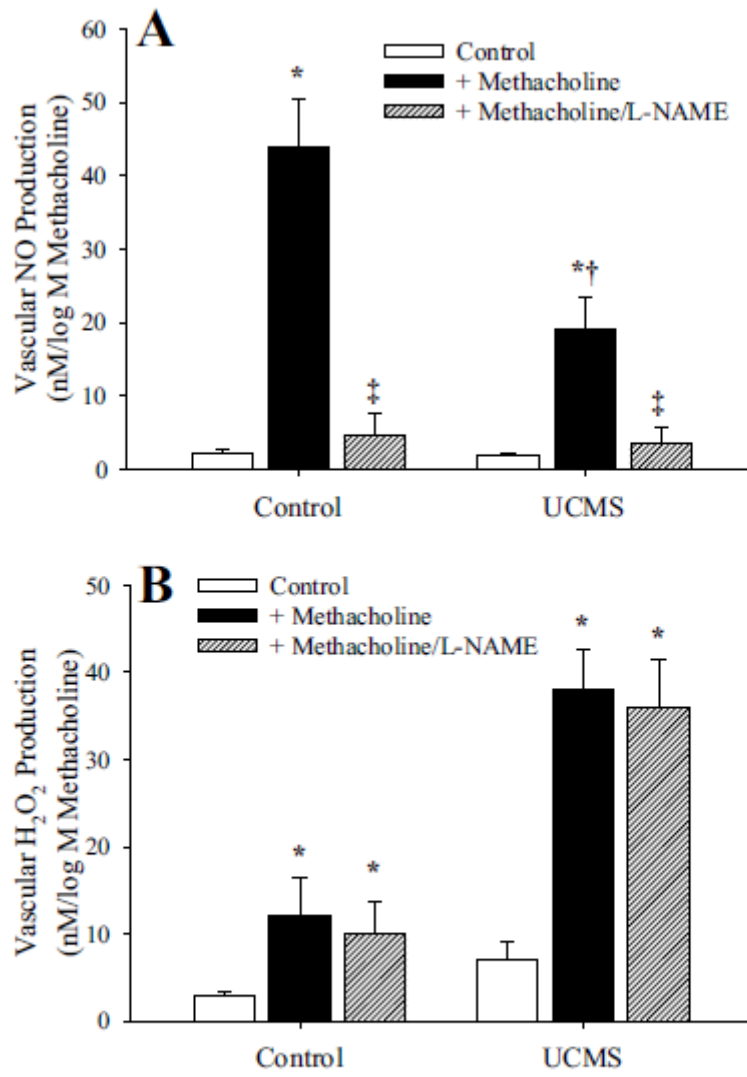


Figure 6.
d'Audiffret et al.

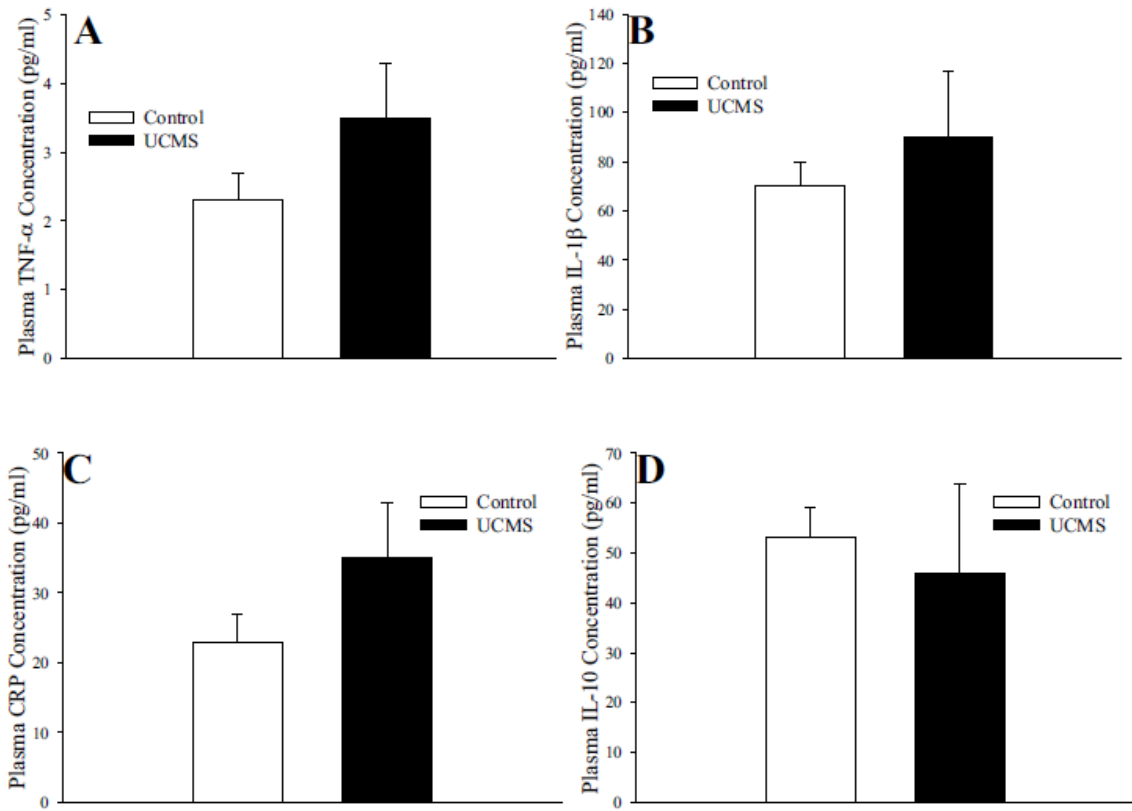


Figure 7.
d'Audiffret et al.

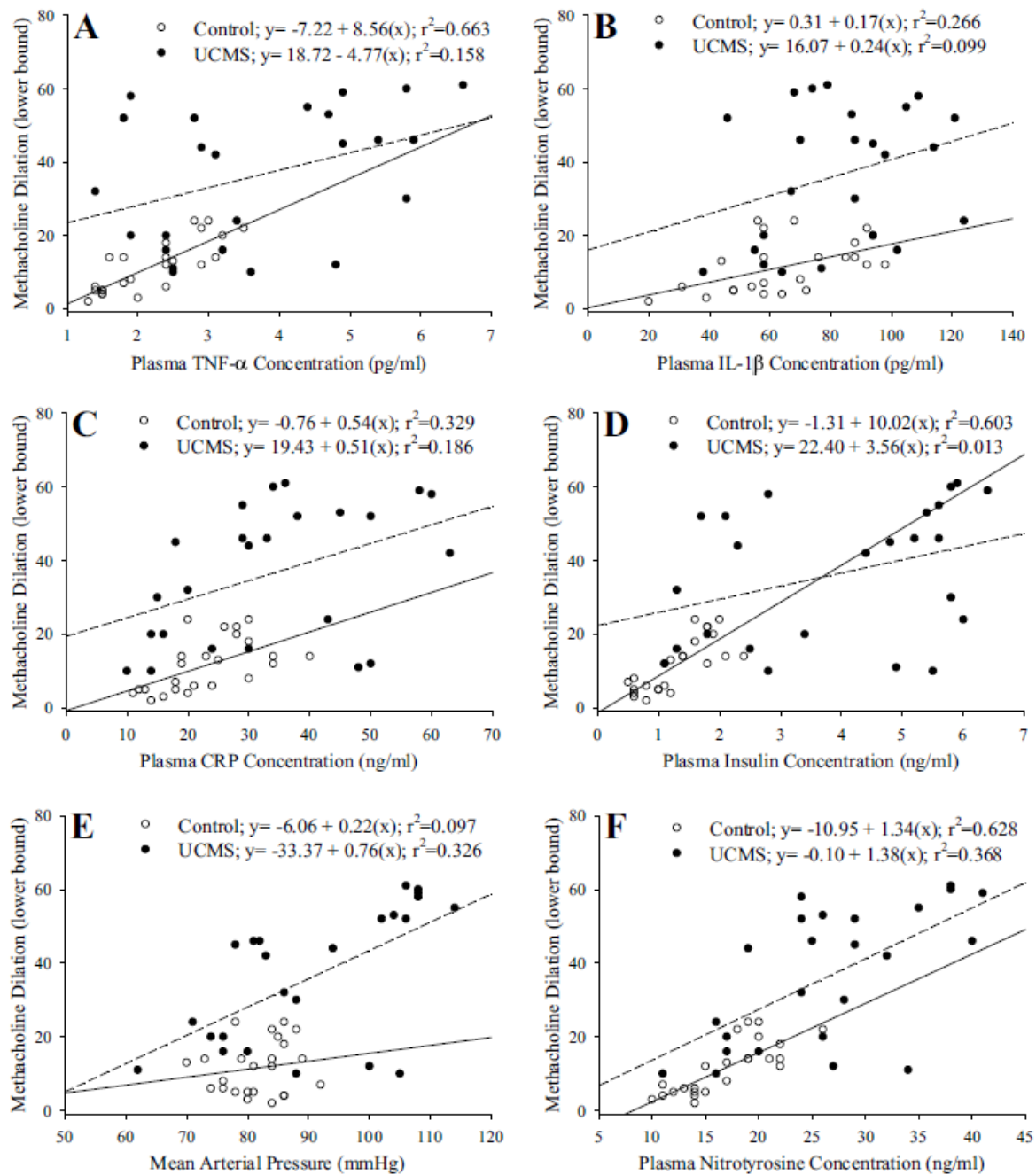


Figure 8.
d'Audiffret et al.

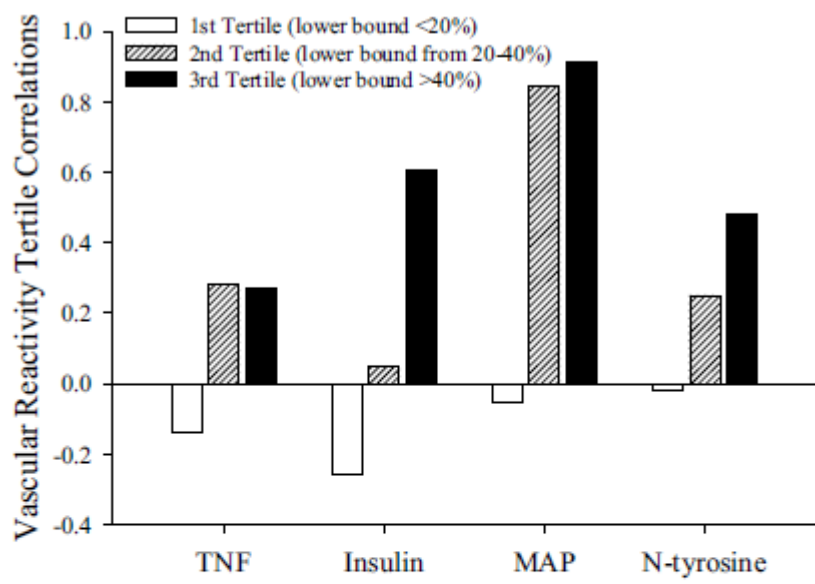


Figure 9.
d'Audiffret et al.

Modélisation de l'impact de la dépression sur le système cardiovasculaire : utilisation du modèle de stress chronique imprédictible chez la souris

Résumé

La dépression est considérée comme un facteur de risque capable de prédire l'apparition de maladies cardiovasculaires. L'objectif de ce travail est de développer un modèle animal capable de reproduire les altérations vasculaires et la résistance aux traitements observés chez les patients dépressifs qui présentent des risques cardiovasculaires. La formation d'athérosclérose et la fonction endothéliale sont évaluées chez des souris exposées au stress chronique imprédictible (UCMS) qui constitue un modèle valide de dépression et les effets comportementaux d'un traitement antidépresseur sont évalués chez des souris UCMS recevant un régime hyper lipidique. Nos résultats montrent que l'UCMS induit un état de type dépressif et un dysfonctionnement endothélial qui n'est pas suffisant pour induire de l'athérosclérose. Le régime hyper lipidique abolit les effets antidépresseurs de la fluoxétine. Ces résultats suggèrent que ce modèle reproduit les altérations physiologiques mais non morphologique aussi bien que la résistance aux traitements des patients dépressifs présentant des facteurs de risques cardiovasculaires. Mots clés : dépression, antidépresseurs, maladies cardiovasculaires, fonction endothélial, athérosclérose, modèle animal, stress chronique.

Résumé en anglais

Epidemiologic studies have demonstrated that depressive symptoms can predict cardiovascular disease in healthy patients. The purpose of this study was to develop an animal model able to reproduce the vascular alterations and the treatment resistance observed in depressed subjects who develop vascular disease. Atherosclerotic plaque formation and endothelial dysfunction were assessed in mice exposed to the Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS) that constitute a reliable animal model of depression and the reversal effect of antidepressant was assessed in UCMS mice fed a high fat diet. Our results show that high fat diet regimen prevented the reversal effect of chronic fluoxetine treatment on UCMS-induced depressive-like behaviour. Moreover, UCMS-induced endothelial dysfunction was not associated with atherosclerotic plaque formation. These findings suggest that this model can reproduce the physiological but not the morphological vascular alterations observed in depressed patients who develop vascular disease as well as the reported treatment resistance in depressed patients also suffering from cardiovascular risk factor. Key words: depression, antidepressant, cardiovascular disease, endothelial function, atherosclerosis, animal model, chronic stress.