

Université de Montréal

***Lactobacillus helveticus* R0052 et *Bifidobacterium longum* R0175 en combinaison réduisent l'apoptose dans le système limbique après ischémie myocardique transitoire chez le rat**

par

Stéphanie-Anne Girard

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise des Sciences
en Pharmacologie

Avril, 2009

© Stéphanie-Anne Girard, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Lactobacillus helveticus R0052 et *Bifidobacterium longum* R0175 en combinaison réduisent l'apoptose dans le système limbique après ischémie myocardique transitoire chez le rat

présenté par :

Stéphanie-Anne Girard

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Hélène Girouard, président-rapporteur

Guy Rousseau, directeur de recherche

Pierre Haddad, membre du jury

Résumé

Nous avons démontré la présence d'apoptose dans le système limbique suivant un infarctus du myocarde. Cette mort cellulaire serait partiellement reliée à l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires. Des études démontrent que certains probiotiques ont des effets bénéfiques en diminuant le ratio de cytokines pro/anti-inflammatoires. La prise de probiotiques en prévention, avant l'occlusion d'une artère coronarienne, pourrait-elle diminuer l'apoptose dans le système limbique? **Méthodes :** La combinaison de probiotiques *Lactobacillus helveticus* R0052 et *Bifidobacterium longum* R0175 ou son véhicule fut additionné dans l'eau des rats pendant 28 jours consécutifs. Un infarctus du myocarde fut provoqué par l'occlusion de l'artère coronaire gauche. Après 40 minutes d'occlusion, les régions ischémiques ont été reperfusées pour 72 heures. Les animaux furent sacrifiés et la taille de l'infarctus mesurée. L'amygdale et l'hippocampe furent prélevés pour déterminer l'activité de la caspase-3 (pro-apoptotique), le ratio Bax/Bcl2 (pro-apoptotique/anti-apoptotique) et l'activité d'Akt (survie cellulaire). **Résultats :** La taille de l'infarctus n'est pas diminuée dans le groupe probiotique (45% de la région à risque) comparé au groupe placebo. Nos marqueurs d'apoptose démontrent une diminution dans les régions du gyrus denté, de l'amygdale latérale et médiane dans le groupe probiotique par rapport au placebo. L'activité de la caspase-3 et le ratio Bax:Bcl2 furent réduits dans le groupe probiotique de 50% et 40% respectivement ($p < 0.05$) et phosphorylation d'Akt fut augmentée de 35% ($p < 0.05$). Aucune différence fut observée pour les régions Ca1 et Ca3. **Conclusion :** La combinaison de probiotiques utilisée réduit l'apoptose dans différentes régions du système limbique 72 heures après un IM.

Mots-clés : probiotiques, infarctus du myocarde, reperfusion myocardique, apoptose, cytokines, système limbique.

Abstract

Apoptosis is observed in limbic system after a myocardial infarction (MI). This cell death is due to the release of pro-inflammatory cytokines. Since probiotics reduce the pro/anti-inflammatory cytokine ratio, we hypothesise that probiotics will lessen apoptosis in the limbic system following MI. **Methods:** Rats were given probiotics or placebo for 4 consecutive weeks. Rat in the probiotic group received a daily dose of over 1 billion live bacterial cells of *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 in combination. A MI was then induced in anaesthetised rats by a 40-minute occlusion of the left anterior coronary artery followed by a 72 hours of reperfusion. Infarct size was measured and apoptosis was determined in the amygdala and hippocampus in both groups. **Results:** Infarct size was not diminished in the probiotic group (45% of the risk area), apoptosis was lessened in the dentate gyrus (DG), the lateral (LA) and medial (MA) amygdala compared to the placebo group. Caspase-3 and Bax/Bcl2 ratio were reduced in the probiotic group by about 50% and 40% respectively. Akt activity was increased by 35% in these regions. No difference was observed in the hippocampus Ca1 and Ca3 regions. **Conclusion:** This probiotic combination can reduce the apoptosis found in specific regions of the limbic system following a MI, which may have significance for post-MI depression. **Keywords :** probiotics, myocardial infarction, myocardial reperfusion, apoptosis, cytokines, limbic system.

Table des matières

INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1. L'INFARCTUS DU MYOCARDE	2
1.1 Ischémie	2
1.2 Reperfusion	4
1.3 La dysfonction contractile des cellules endommagées de manière réversible (« stunning »).....	7
1.4 Les modifications microvasculaires (le phénomène de non reperfusion ou « no-reflow »).....	9
1.5 La dysfonction endothéliale (la vasoconstriction coronarienne).....	10
1.6 Les arythmies.....	11
1.7 Inflammation	12
1.7.1 Neutrophiles.....	12
1.8 Apoptose	18
1.8.1 La famille Bcl-2 comme régulateurs	21
1.8.2 L'apoptose et la cellule myocardique.....	23
CHAPITRE 2. LA DÉPRESSION POST-INFARCTUS DU MYOCARDE	26
2.1 Généralités (son occurrence et son importance)	26
2.2 La dépression et le système limbique	26
2.3 Hypothèses	27
2.3.1 L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA).....	27
2.3.2 Les cytokines	29
CHAPITRE 3. LES PROBIOTIQUES	34
3.1 Les probiotiques et le système gastro-intestinal	34
3.2 Les probiotiques et le stress	39

CHAPITRE 4. LES HYPOTHÈSES	42
CHAPITRE 5. <i>LACTOBACILLUS HELVETICUS</i> AND <i>BIFIDOBACTERIUM LONGUM</i> TAKEN IN COMBINATION REDUCE THE APOPTOSIS PROPENSITY IN THE LIMBIC SYSTEM AFTER MYOCARDIAL INFARCTION IN A RAT MODEL.....	43
CHAPITRE 6. LA DISCUSSION GÉNÉRALE DES RÉSULTATS.....	63
CONCLUSION	71
BIBLIOGRAPHIE.....	72

LISTE DES FIGURES**CHAPITRE 1 L'INFARCTUS DU MYOCARDE****FIGURE 1.1 SCHÉMA ILLUSTRANT LES ÉTAPES INFLAMMATOIRES SUIVANT UN IM 17****FIGURE 1.2 REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES DEUX DIFFÉRENTES VOIES APOPTOTIQUES 20****CHAPITRE 6 ARTICLE****FIGURE 1 60****FIGURE 2 61****FIGURE 3 62**

Liste des abréviations

AIF : *Apoptosis Inducing Factor*

AR: Zone à risque (*Area at Risk*)

ATP : Adénosine Triphosphate

BHE: Barrière Hémato-Encéphalique

COX-2: Cyclooxygénase-2

CRH : corticolibérine (*Corticotropin-Releasing Hormone*)

DR4 : Récepteur de mort 4 (*Death Receptor 4*)

DR5 : Récepteur de mort 5 (*Death Receptor 5*)

DRO : Dérivés Réactifs de l'Oxygène

FAO : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (*Food and Agriculture Organisation*)

HPA : hypothalamo-hypophyso-surrénalien (*Hypothalamic-Pituitary-Adrenal*)

HSP : Protéine de Choc Thermique (*Heat Shock Protein*)

I : Zone nécrosée (*Infarct zone*)

IAP : Inhibiteur de l'apoptose (*Inhibitor of Apoptosis*)

Il : Interleukine

kDa : Kilodalton

LV : Ventricule Gauche (*Left Ventricle*)

IM : Infarctus du Myocarde

IAM : Infarctus du Myocarde Aigu

IFN : Interféron

LPS : Lipopolysaccharide

OH⁻ : Ion Hydroxyde

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAF : Facteur d'Activation Plaquettaire (*Platelet-Activating Factor*)

PGE₂ : Prostaglandine E₂

RG : Récepteur de glucocorticoïde

SNC : Système Nerveux Central

TEMP : Tomographie d'Émission Monophotonique

TGF : Facteur de développement cellulaire (*Transforming Growth Factor*)

TLR : Récepteur de Type Toll (*Toll-like Receptor*)

TNF- α : Facteur nécrosant des tumeurs alpha (*Tumor Necrosis Factor alpha*)

TNFR1 : Récepteur-1 du Facteur des tumeurs (*Tumor Necrosis Factor Receptor-1*)

TRAIL : Protéine Apoptotique (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*)

TxA₂ : Thromboxane A₂

VDAC : Canal dépendant du Voltage ionique (*Voltage-Dependent Anion Channel*)

*À ma mère et mon père qui m'ont toujours
soutenue et que j'admire énormément*

Remerciements

Je tiens à remercier le Docteur Guy Rousseau, mon directeur de recherche, pour m'avoir acceptée en tant qu'étudiante à la maîtrise. J'aimerais le remercier pour tout le temps qu'il a dû consacrer pour pouvoir répondre à toutes mes questions et Dieu sait qu'elles ont été nombreuses! De plus, je veux le remercier pour son aide dans mon cheminement tant scientifique que personnel. Je remercie également le Docteur René Cardinal pour son accueil dans ses laboratoires du Centre de Recherche de l'hôpital du Sacré-Cœur de Montréal.

Mes sincères remerciements vont à Thierno Madjou Bah et Sévan Kaloustian, pour m'avoir guidée tout le long de ma maîtrise. Ils ont été pour moi des mentors incomparables. La formation qu'ils m'ont offerte restera avec moi tout le long de ma carrière scientifique. De plus, ils m'ont aussi procurée de judicieux conseils m'ayant servis tant au laboratoire que dans ma vie de tous les jours.

Je souhaite également remercier Laura Lada-Moldovan, Marc-André Déry, Isabelle Rondeau et Jacynthe Létourneau pour leurs aides et leurs soutiens tout au long de mon cheminement. Les heures de transport en commun avec Laura ont été remplies de confidences et d'encouragements, de plus notre coopération mutuelle permettant le succès dans nos examens m'a été essentielle.

Merci encore au département de pharmacologie pour cette expérience formatrice, formidable et inoubliable.

Merci à mes parents, Yves et Danielle, qui ont toujours cru en moi et malgré quelques obstacles, m'ont toujours encouragée à poursuivre mes études et exceller dans mon domaine. Je tiens à remercier mon frère Jonathan qui n'hésite jamais à me remettre les pieds sur terre! Je dois mentionner mon copain Kaunteya ainsi que toute sa famille; Sanjiv, Shobhna et Nitya pour leurs soutiens. Kaunteya a su être présent lors des belles journées

mais surtout lors des plus grises. Sans son aide et sa continuelle stimulation intellectuelle je ne serais qui je suis maintenant.

Introduction

L'infarctus du myocarde (IM) est un problème majeur dans nos sociétés industrialisées. Bien qu'il existe des médicaments pour prévenir ou atténuer les effets de l'IM sur la qualité de vie, le tout débute par une bonne hygiène de vie impliquant l'exercice physique et une bonne nutrition. Lorsque l'IM ne tue pas, de nombreuses conséquences s'en suivent. En effet, l'IM réduit de moitié l'espérance de vie. De plus, l'infarctus du myocarde contient un important processus inflammatoire et, récemment, des études ont démontré que des changements biochimiques survenaient dans certaines régions du cerveau après un IM, changements qui seraient reliés à l'inflammation.

Maintes recherches ont été exécutées sur l'effet qu'ont les probiotiques sur le système gastro-intestinal. En effet, ces derniers sont des micro-organismes qui, lorsque pris en quantité suffisante, exercent un rôle bénéfique sur l'hôte. Les probiotiques permettraient de moduler la flore intestinale en empêchant l'attachement de bactéries pathogéniques ainsi qu'en modulant le système immunitaire de l'intestin. Par contre, les mécanismes par lesquels les probiotiques et le système immunitaire intestinal interagissent sont encore très méconnus. Si les probiotiques ont un tel effet sur l'intestin, il est intéressant de s'interroger sur leurs effets systémiques. Par quels mécanismes les probiotiques modulent-ils une réponse immunitaire et quels organes affectent-ils?

Au cours des dernières années, des recherches ont démontré que l'utilisation de probiotiques diminuait l'inflammation. Or, comme l'IM reperfusé est un phénomène inflammatoire nous avons émis l'hypothèse que la prise de probiotiques avant l'occlusion d'une artère coronarienne peut diminuer la taille de l'infarctus. De plus, une administration de probiotiques en prophylaxie pourrait-elle diminuer l'apoptose dans le cerveau suite à un IM? Une connaissance plus approfondie des probiotiques et de leurs effets sur le cœur et le cerveau permettrait de trouver une combinaison de bactéries bénéfiques qui protégerait l'hôte contre plusieurs maladies.

Chapitre 1. L'infarctus du myocarde

Au Canada l'infarctus aigu du myocarde (IAM) représente chaque année, toutes causes confondues, 3,8% des hospitalisations et 8,6% des décès (Lê and L'Allier, 2008). L'infarctus du myocarde survient lorsque l'apport sanguin est interrompu dans une région du myocarde, créant une ischémie. Ceci survient généralement à cause de la présence d'un thrombus au niveau d'une plaque athérosclérotique, du développement d'un spasme coronarien ou d'une embolie qui va occlure le vaisseau. Au cours de ce chapitre nous verrons les conséquences sur le myocarde d'une privation sanguine.

1.1 Ischémie

L'ischémie est un phénomène se produisant lorsqu'il y a une réduction ou élimination de l'apport de sang oxygéné à un certain organe ou tissu. Dans le cas de l'IM, l'ischémie apparaît lorsque le cœur est privé d'oxygène par l'occlusion d'une artère coronaire. L'énergie fournie devient donc moindre que la demande métabolique, ce qui crée un déficit. Quinze à 30 secondes d'ischémie sévère est suffisant pour inhiber le métabolisme aérobie (Jennings et al., 1986). Les réserves de phosphates hautement énergétiques sont très petites dans le myocarde et, suivant le début de l'ischémie, il n'y a assez d'adénosine triphosphate et de créatine phosphate que pour trois ou quatre battements de cœur (Gordon and Morgan, 1986).

Toujours dans les secondes suivant le début de l'ischémie, la respiration aérobie change et devient anaérobie. Cette dernière devient la principale source de phosphates hautement énergétiques (Jennings et al., 1990). Par contre, la respiration anaérobie ne peut que partiellement soutenir la survie cellulaire. En effet, puisque l'ischémie cause une diminution de l'apport de substrats exogènes (Jennings, 1970), tel que le glucose, le myocarde chez le rat ne peut supporter une glycolyse anaérobie que pour 5 à 10 minutes à 37°C (Jennings et al., 1986). Puisque 80% des phosphates hautement énergétiques utilisés par les cellules myocardiques ischémiques proviennent de la glycolyse anaérobie (Jennings and Reimer,

1991) on voit l'importance de remédier à la situation le plus rapidement possible. Suite à une glycolyse anaérobie importante et une diminution du flot artériel, les métabolites de la glycolyse s'accumulent. En effet, le lactate qui est le produit final ne peut pas être métabolisé en l'absence d'oxygène. Dans cette pensée, les effets délétères de l'ischémie vis-à-vis les cardiomyocytes pourraient provenir, du moins en partie, de l'accumulation de déchets potentiellement toxiques comme le lactate et les ions H^+ (Jennings et al., 1990).

Le cœur nécessite de l'énergie pour se contracter. Durant l'ischémie, le cœur va donc arrêter de se contracter et ceci est causé non seulement par une diminution de l'adénosine triphosphate (ATP) mais aussi par un changement dans la disponibilité du calcium (Katz and Hecht, 1969). La région qui est privée de sang se protège et arrête de se contracter pour diminuer au maximum sa demande énergétique.

Malgré une atteinte importante des cellules myocardiques, ces cellules ischémiques sont encore viables après quelques minutes d'ischémie et si le flot sanguin est rétabli (suite à une reperfusion par exemple), elles redeviennent contractiles. Donc l'ouverture rapide de l'occlusion et la restauration du flot sanguin peut sauver les cardiomyocytes ischémiques (Jennings et al., 1990).

En revanche, ces cellules blessées de façon réversible présentent des dommages caractéristiques. Ces changements peuvent être observés dans le potentiel membranaire des cellules. Leurs myofibrilles commencent à se relaxer et s'étirer un peu et il y a une légère margination de leurs chromatines qui commencent à se diriger vers les côtés du noyau (Jennings et al., 1990).

Si l'ischémie est maintenue, les lésions qui étaient réversibles deviennent irréversibles. Chez le chien cette situation survient après seulement 20 minutes d'ischémie (Reimer et al., 1983). Les cellules présentant des lésions irréversibles exhibent un gonflement (un œdème) cellulaire et mitochondrial, une agrégation de la chromatine ainsi que l'apparition d'entités amorphes dans la cavité mitochondriale (Jennings and Reimer, 1991). La mort cellulaire sera

précédée par une destruction du sarcolemme (Jennings et al., 1990) ainsi que de la mitochondrie.

La transition des cellules affectées de manière réversible à des cellules affectées de manière irréversible est caractérisée par d'importants changements. Entre autre, l'apparition d'entités amorphes comme des lipides et des protéines dénaturées dans l'espace matriciel ou encore la désorganisation de l'espace inter-membranaire de la mitochondrie ainsi que des changements ultra-structuraux du sarcolemme sont observés (Jennings et al., 1990).

Il est important de mentionner que pour maintenir l'intégrité des cellules, un débit de 0.15ml à 0.20ml/minute/gramme au lieu de 1 ml/minute/gramme est suffisant. Seulement 20% du débit normal suffit à maintenir l'intégrité des cellules (Hearse and Yellon, 1984). Donc, les cellules myocardiques peuvent survivre pendant un certain temps malgré l'apport considérablement diminué de sang oxygéné. Si l'ischémie est prolongée, les cellules deviendront affectées de manière irréversible.

Chez le chien, après 20 à 40 minutes d'ischémie, il y a une zone nécrotique qui se situe au niveau subendocardique. Plus le temps de l'ischémie augmente, plus il y a une progression de mort cellulaire de la région endocardique vers la région épocardique, phénomène connu sous le nom du « phénomène en front de vague » (Reimer et al., 1977). Par contre, certains facteurs tels que la durée et la sévérité de l'ischémie, le volume de la région ischémique étant à risque, les interventions thérapeutiques avant et durant l'ischémie ainsi que les demandes énergétiques durant l'ischémie détermineront les dommages ultimes après la restauration du flot sanguin (Reffellmann and Kloner, 2007).

1.2 Reperfusion

La meilleure façon de limiter les dégâts induits par l'ischémie est de reperfuser les régions ischémiques. Il s'agit de l'unique solution pour que les myocytes étant encore viables dans la zone ischémique survivent. Faisant exception à cette règle sont les 25% d'individus qui ont

suffisamment d'apport de sang collatéral et qui peuvent donc maintenir un débit sanguin suffisant pour maintenir l'intégrité du tissu malgré une obstruction d'une artère coronaire (Pohl et al., 2001). Lorsqu'il y a une reperfusion, et donc lorsque le passage du sang est permis à nouveau, il y aura une réduction ou même une abolition complète de l'ischémie.

Chez les personnes atteintes d'une occlusion coronarienne, il existe trois principales méthodes pour entraîner la reperfusion. En premier lieu, la thérapie thrombolytique peut être adoptée. En effet, lors d'un infarctus causé par un thrombus coronaire occlusif, plusieurs agents thrombolytiques sont disponibles et ceux-ci peuvent être administrés par voie veineuse périphérique ou intra-artérielle sélective (Braunwald, 1985). Par contre, l'utilisation de ces agents lytiques peut entraîner des hémorragies sévères voir même mortelles. Une réocclusion peut malheureusement survenir puisque, malgré une thrombolyse réussie, il reste souvent une obstruction résiduelle sur le site de l'ancienne occlusion. Deuxièmement, il existe deux méthodes permettant la revascularisation de manière mécanique. L'angioplastie coronarienne transluminale permet le rétablissement du sang oxygéné par l'insertion d'une sonde dans l'artère. Cette sonde est munie d'un ballonnet gonflable et elle permet de dilater l'artère là où se trouvait l'occlusion. De plus, la pose d'une endoprothèse vasculaire s'ensuit généralement pour éviter la régénération du rétrécissement. Cette méthode prévient les complications hémorragiques comme c'est le cas pour les agents thrombolytiques (Braunwald, 1985). Par contre, lors du gonflement du ballon, des dommages peuvent survenir au niveau de l'endothélium et ceci peut mener à une prolifération incontrôlée des cellules et causer ultimement une resténose. Finalement, le pontage aorto-coronarien peut être une méthode pour mettre fin à l'ischémie. Cette technique consiste à contourner l'artère coronaire occluse en implantant un autre vaisseau artificiel en aval. Ce traitement est plus définitif que les deux autres puisque, chez presque la moitié des patients souffrant d'IMA, d'autres obstructions sévères du lit vasculaire coronarien sont présentes (Braunwald, 1985).

Lors de la restauration du flot sanguin, il sera possible d'observer, dans la zone à risque du myocarde ischémique, des cardiomyocytes nécrosés et viables. Ce qui va déterminer la

proportion des cellules dans chacun des groupes est le moment où sera pratiquée la reperfusion (Reffelmann and Kloner, 2007). En effet, la taille de l'infarctus ou le dommage myocardique est directement relié au temps d'ischémie, c'est-à-dire plus la durée de l'ischémie est petite, plus la taille de l'infarctus est petite (Buja, 2005, Braunwald and Kloner, 1985).

Durant les quinze premières minutes de reperfusion, une hyperhémie (un débit sanguin plusieurs fois supérieur au débit sanguin de base) peut être observée et ceci engendrera une restauration de la respiration aérobie chez les cardiomyocytes affectés de manière réversible. Il y aura une re-phosphorylation des nucléotides d'adénosine en adénosine triphosphate (ATP), une augmentation de créatine phosphate et une normalisation des concentrations de lactate et du pH (Reffelmann and Kloner, 2007). Par contre, malgré la reperfusion, les concentrations d'ATP dans le myocarde ischémique demeure réprimée pendant plusieurs heures voir quelques jours et ne reviennent à la normale qu'une semaine environ après le début de la reperfusion (Braunwald and Kloner, 1985). Lorsque les cellules myocardiques ont été sujettes à 40 ou 60 minutes d'ischémie sévère et qu'elles sont maintenant exposées à une reperfusion, un œdème des mitochondries ainsi qu'au niveau cellulaire peut être observé (Kloner et al., 1974b).

En revanche, la reperfusion, bien que nécessaire, peut engendrer des phénomènes pouvant être délétères (Braunwald and Kloner, 1985). En effet, il y a des évidences que la reperfusion pourrait entraîner la transformation de cellules affectées de manière réversible en des lésions irréversibles. (Buja, 2005, Braunwald and Kloner, 1985). Ces cellules qui étaient atteintes de façon réversible lors de l'ischémie et qui avaient moins de réserve énergétique pour se défendre ne vont pas supporter cette reperfusion et elles vont mourir. La restauration rapide du flot sanguin, en particulier le rétablissement de l'oxygène, cause des dommages transitoires au tissu précédemment ischémique et c'est ce phénomène que l'on appelle les lésions de reperfusion (Mehta and Jayaram, 1997, Maxwell and Lip, 1997). Les lésions de reperfusion sont un sujet encore très controversé dans la littérature à savoir si les lésions

apparaissant lors de la reperfusion, sont causées par la reperfusion elle-même ou par l'ischémie. Plusieurs groupes ont tenté de démontrer qu'en effet, la reperfusion engendre des dommages et que l'administration d'un composé pharmacologique pouvait diminuer les effets néfastes telle la nécrose myocardique ou encore diminuer la taille de l'infarctus du myocarde. Rousseau et coll. (Rousseau et al., 1991) ont démontré qu'en administrant un médicament (un bloqueur des canaux calciques) 5 à 10 minutes avant le début de la reperfusion (pour atteindre des seuils intéressants de niveaux plasmatiques et pour être sûr que le médicament ait son effet), la taille de l'infarctus peut être diminuée de 40%. Aussi, il a été démontré chez deux groupes de patients que le groupe qui avait été reperfusé graduellement versus rapidement présentait moins de dommages irréversibles. Ceci suggère donc que la façon dont la reperfusion est rétablie peut jouer un rôle critique dans l'évolution des lésions de reperfusion (Mehta and Jayaram, 1997).

Il existe plusieurs acteurs qui provoquent les lésions de reperfusion dont les radicaux libres, la surcharge calcique et les neutrophiles (Buja, 2005). Ces derniers vont entraîner la génération, la dégranulation et la relâche de protéases ainsi que le relâchement de métabolites arachidoniques et autres médiateurs inflammatoires (Jordan et al., 1999). Les plus importantes conséquences de la reperfusion, hormis la mort cellulaire, sont la dysfonction contractile des cellules endommagées de manière réversible (« stunning »), les modifications microvasculaires (le phénomène de non reperfusion ou « no-reflow »), la dysfonction endothéliale (la vasoconstriction coronarienne) et les arythmies.

1.3 La dysfonction contractile des cellules endommagées de manière réversible (« stunning »)

Dépendamment de la durée et de la sévérité de l'ischémie, il peut survenir une dysfonction contractile chez les cardiomyocytes suivant la restauration du flot sanguin et ceci peut perdurer pour quelques heures ou même quelques jours (Reffelmann and Kloner, 2007). Depuis plus d'un demi-siècle, il a été largement accepté que, malgré une durée d'ischémie

brève, il y ait une diminution de la fonction myocardique. Cette dysfonction est remédiable si le flot est rétabli avant que les cellules ne soient endommagées de manière irréversible (Braunwald and Kloner, 1982). La dysfonction contractile est un phénomène qui est totalement réversible si un support inotropique ou circulatoire est maintenu (Maxwell and Lip, 1997). Le mécanisme précis qui cause cette dysfonction est malheureusement encore méconnu mais pourrait inclure plusieurs processus. En effet, durant les premières minutes de reperfusion, suite à l'apport d'oxygène, il y a une production intense de radicaux libres (particulièrement le radical hydroxyle OH⁻) qui désensibilisent l'appareil contractile du sarcolemme (Bolli et al., 1989). Suite à des dommages aux canaux calciques, le réticulum sarcoplasmique aurait de la difficulté à utiliser le calcium (Maxwell and Lip, 1997). Il a été démontré que les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) ont un effet direct d'inhibition de la fonction myocardique et donc ces derniers joueraient un rôle critique dans la dysfonction contractile (« stunning » du myocarde) (Bolli, 1988, Piper et al., 1998).

Toutefois, malgré que les dommages associés à ce phénomène soient résiliables, il ne faut pas négliger sa sévérité. Lors d'une durée d'ischémie brève, les cellules peuvent être affectées de manière réversible. Par contre, si plusieurs durées d'ischémie brève surviennent rapprochées ces cellules ne le sont plus pour autant. En effet, il a été rapporté que des épisodes répétés de brèves ischémies (5 à 15 minutes) ne causent pas de mort cellulaire en elles mêmes mais qu'elles ont un effet cumulatif et produisent ainsi la mort cellulaire (Ninomiya et al., 1981). De plus, lors de l'examen post-mortem de cœurs de patients ayant eu des cardiomyopathies ischémiques, il est important de mentionner que seulement une quantité modérée de myocarde est nécrosée et que la défaillance cardiaque doit plutôt être attribuée à une sévère atteinte de la fonction contractile du myocarde (Braunwald and Kloner, 1982).

1.4 Les modifications microvasculaires (le phénomène de non reperfusion ou « no-reflow »)

Paradoxalement, la réinitiation du flot sanguin, nécessaire pour la viabilité des cellules myocardiques, peut aussi entraîner des dommages microvasculaires. Après le relâchement de l'occlusion de l'artère coronaire, le sang ne peut perfuser uniformément toutes les sections du tissu antérieurement ischémique. Cette condition a été surnommée le « no-reflow phenomenon » ou le phénomène de non-reperfusion (Braunwald and Kloner, 1985). Le phénomène de non-reperfusion a été démontré non seulement dans le cœur mais aussi dans les reins, le cerveau, la peau et le muscle squelettique (Kloner et al., 1974a, Engler et al., 1983). Un facteur qui détermine la présence de ce phénomène est la durée de l'ischémie. La région de non-reperfusion augmente avec la durée de l'ischémie (Darsee and Kloner, 1980). En effet, Kloner et coll. (Kloner et al., 1974a) ont démontré que pour observer le phénomène de non-reperfusion chez le chien, une occlusion de l'artère coronaire de 90 minutes était nécessaire et que 40 minutes d'ischémie s'avèrent trop court pour voir un effet.

Les dommages des capillaires semblent jouer un rôle important dans ce type de lésions de reperfusion. En effet, l'œdème des cellules endothéliales serait une cause des dégâts. Les cellules endothéliales ayant un cytoplasme gonflé créent des bombements dans la lumière des capillaires et ceci engendre des occlusions. Les capillaires dans les régions de non-reperfusion exhibent une augmentation des vésicules pinocytiques, de l'agrégation de la chromatine et de l'œdème des cellules endothéliales (Kloner et al., 1974a).

De plus, la formation de rouleaux d'érythrocytes pourrait occlure les capillaires myocardiques. En effet, Engler et coll. (Engler et al., 1983) ont avancé que la grande proportion de globules rouges dans les capillaires de non-reperfusion suggère qu'elles puissent en être la cause. Par contre, leurs études semblent démontrer que les érythrocytes ne sont pas la cause principale de l'occlusion des capillaires.

De nombreuses évidences semblent pointer du doigt les leucocytes comme étant les principaux acteurs dans le phénomène de non reperfusion. Durant l'hypotension, dans les muscles squelettiques, presque tous les capillaires obstrués contiennent au moins un leucocyte (Engler et al., 1983). De plus, le phénomène de non-reperfusion peut être atténué expérimentalement par une déplétion considérable de neutrophiles (Mehta et al., 1988). Toutefois des résultats contradictoires affirment qu'une diminution du nombre de neutrophiles circulants n'a aucun effet sur la perfusion myocardique ((de Lorgeril et al., 1989)). Le rôle précis des neutrophiles dans ce phénomène reste à être confirmé.

1.5 La dysfonction endothéliale (la vasoconstriction coronarienne)

Puisque la reperfusion est associée à une augmentation des dommages infligés aux myocytes ischémiques (Braunwald and Kloner, 1985), l'effet de la reperfusion sur les cellules endothéliales et le rôle que ces dernières jouent dans les lésions de reperfusion ont été le sujet de plusieurs études. En effet, suite à la reperfusion, il y a une production importante de radicaux libres par l'endothélium et ceci coïncide avec une dysfonction endothéliale; soit la perte de vasorelaxation ou l'insensibilité de l'endothélium à plusieurs vasodilatateurs. La dysfonction endothéliale se produit très rapidement après le rétablissement du flot sanguin soit 2,5 minutes après le début de la reperfusion (Tsao et al., 1990).

Les cellules endothéliales sont responsables de la régulation du tonus vasculaire et donc du flot sanguin. Une dysfonction de ces cellules peut mener à des vasospasmes. Les vasospasmes peuvent à leur tour causer des phénomènes de non-reperfusion. De plus, une dysfonction endothéliale peut aussi conduire à une accumulation de neutrophiles. Une accumulation significative de neutrophiles peut être observée suivant 180 minutes de reperfusion (Lefter et al., 1991).

Ces neutrophiles vont à leur tour provoquer une vasoconstriction encore plus importante en relâchant certains vasoconstricteurs tels la thromboxane A₂ (TxA₂). En effet, les neutrophiles activés et les plaquettes vont sécréter la TxA₂ qui va non seulement stimuler le

chimiotactisme des neutrophiles mais aussi contribuer à la vasoconstriction (Vinten-Johansen, 2004a). De plus, les neutrophiles vont contribuer à la réduction de formation de monoxyde d'azote (vasodilatateur) par les cellules endothéliales favorisant la contraction (Dhalla and Duhamel, 2007). Le degré de vasoconstriction suit le nombre de neutrophiles (Jordan et al., 1999). Ceci va alors occasionner un bouchon leucocytaire et les cellules en aval du bouchon seront privées d'oxygène malgré le rétablissement de l'occlusion. Une fois que les neutrophiles interagissent avec les cellules endothéliales, ceux-ci vont produire encore plus de radicaux libres (Lefter et al., 1991). L'adhésion des neutrophiles sur l'endothélium vasculaire est accompagnée d'une diminution progressive de la fonction endothéliale (Vinten-Johansen, 2004a) et ce sont tous ces éléments qui vont mener ultimement à la nécrose myocardique.

1.6 Les arythmies

Lors de la reperfusion, des arythmies peuvent être observée. Plus précisément, ces arythmies sont ventriculaires et se développent après seulement quelques secondes du rétablissement du flot sanguin. En effet, les arythmies ventriculaires sont un trait caractéristique de la restauration du sang oxygéné (Mehta and Jayaram, 1997). Chez l'homme, les arythmies lors de la reperfusion sont souvent observées lorsque les patients sont soumis à des thérapies thrombolytiques ainsi qu'à des chirurgies cardiaques. Ces arythmies contribuent grandement à la mort subite qui peut survenir lors du rétablissement du sang oxygéné (Maxwell and Lip, 1997). Plusieurs facteurs peuvent expliquer la génération d'arythmies suite à l'interruption de l'ischémie. Entre autre, les radicaux libres et la surcharge calcique peuvent expliquer ce phénomène. Par contre, chez l'homme, le myocarde possède peu de xanthine oxydase qui est responsable de la production de radicaux libres (comme le peroxyde d'hydrogène) et donc cela suggère que les radicaux libres seuls ne puissent être la cause unique des arythmies et que c'est probablement un phénomène dépendant du calcium (Maxwell and Lip, 1997, Opie and Coetzee, 1988).

1.7 Inflammation

1.7.1 Neutrophiles

Le myocarde ischémique va entraîner une réponse inflammatoire qui sera accrue lors de la reperfusion. Des facteurs chimio-attractants tels que le facteur nécrosant des tumeurs alpha (TNF- α), l'interleukine 8 (Il-8), Il-6, Il-1, facteur d'activation plaquettaire (platelet activating factor; PAF), leucotriènes et le complément sont sécrétés par le myocarde durant l'ischémie (Vinten-Johansen, 2004a). Durant l'ischémie, il y a un constant apport de neutrophiles par le flot collatéral et qui les emprisonne progressivement dans le myocarde (Engler et al., 1983). Sans la reperfusion, l'infiltration de neutrophiles est restreinte au pourtour de la zone à risque du myocarde avec seulement quelques neutrophiles dans le centre de la zone nécrosée (Vinten-Johansen, 2004a).

Ensuite, lors de la reperfusion, il y a migration et accumulation de leucocytes dans le myocarde subendocardique (Chatelain et al., 1987). De plus, les leucocytes ayant été précédemment recrutés dans la zone ischémique vont s'activer (Buja, 2005). Ils vont interagir avec le myocarde via différentes molécules d'adhésion et vont ultimement entraîner des lésions de reperfusion (Riou et al., 2002). L'adhésion des neutrophiles à l'endothélium vasculaire se produit dès les premières minutes de la reperfusion (Vinten-Johansen, 2004a). L'adhésion des neutrophiles aux myocytes provoque des dommages à ces derniers et ceci est causé par un transfert direct de radicaux libres des neutrophiles aux myocytes (Entman et al., 1992).

En effet, des radicaux libres dérivés de l'oxygène sont relâchés par les leucocytes (Braunwald and Kloner, 1985). Lors d'une infection bactérienne et d'une réponse inflammatoire, le recrutement de neutrophiles et la production de ces médiateurs s'avèrent primordiaux mais, lors de la reperfusion ceci va aggraver la sévérité des dommages myocardiques.

Une fois que les neutrophiles sont recrutés au myocarde reperfusé, ils relâchent des produits inflammatoires qui vont amplifier le recrutement et l'activation d'un plus grand nombre de neutrophiles (Jordan et al., 1999). Les lésions de reperfusion associées aux neutrophiles sont causées par la libération de radicaux libres, de facteurs chimioattractants, des enzymes protéolytiques, des produits de l'acide arachidonique et l'obstruction physique de petites artérioles et capillaires (phénomène de non-reperfusion) (Mehta and Jayaram, 1997).

De plus, il a été démontré que les neutrophiles agissent non seulement sur les lésions de reperfusion mais aussi sur la taille de l'IM. En effet, lors d'une occlusion de l'artère coronaire chez le chien, il a été démontré que l'administration d'un antisérum contre les neutrophiles était associée à une réduction de la taille de l'infarctus (Romson et al., 1983). De plus, de Lorgeril et coll. (de Lorgeril et al., 1989) ont démontré qu'une leucopénie, chez le chien, précédant un IM diminuait, significativement, la taille d'infarctus par rapport au groupe témoin. Par contre, une diminution du nombre de leucocytes suite à l'utilisation de corticostéroïdes, malgré une diminution de la taille de l'infarctus, retardera la cicatrisation et la déposition de collagène (Kloner et al., 1978).

L'infarctus du myocarde, induit par une ischémie, entraîne une réponse inflammatoire accélérée et augmentée lorsque le tissu ischémique est reperfusé (Frangogiannis et al., 2002). En effet, la reperfusion va permettre d'entamer le processus inflammatoire, la phagocytose et la réparation cellulaire (Reimer et al., 1977). La reperfusion améliore la réparation des cellules myocardiques et cet effet est accompli par l'amplification de la réponse inflammatoire. De plus, la réponse inflammatoire observée se manifeste de manière locale et systémique (Girn et al., 2007). C'est un point culminant pour la réparation suivant un IM (Bonvini et al., 2005). Par contre, cette inflammation peut aussi avoir de nombreux effets délétères et mener à la mort myocardique. Une réaction inflammatoire trop intense se produisant suite à la reperfusion augmente les dommages myocardiques (Frangogiannis et al., 1998). En effet, il a été observé que des cytokines telles que TNF- α et Il-6 jouent un rôle dans les lésions de reperfusion par l'infiltration de myocytes et l'apoptose qui s'ensuit (Yang et

al., 2008). Nous reviendrons aux cytokines et leurs rôles dommageables dans une prochaine section.

Suite à un IM, le processus de cicatrisation va dépendre d'une cascade inflammatoire qui va mener à la clairance des cellules mortes et des débris matriciels ainsi qu'à la formation de tissus cicatriciels (Frangogiannis, 2006b). Ce processus de cicatrisation peut être divisé en plusieurs phases et ces dernières sont retrouvées sur la figure 1.1.

La phase nécrotique se produit immédiatement après l'IM et elle consiste en la mort cellulaire myocardique par nécrose. Suite à cette nécrose, il y a la phase inflammatoire nécessaire pour se débarrasser du tissu nécrotique. Cette phase est caractérisée par une colonisation de la cicatrice par des neutrophiles. Une à trois semaines suivant l'infarctus du myocarde, un tissu de granulation se met en place et une prolifération des myofibroblastes ainsi qu'une angiogénèse se produisent. Puis finalement, après plus d'un mois, ces cellules disparaissent et laissent place à une matrice de collagène qui est dépourvue de propriétés contractiles (Bonvini et al., 2005, Barandon et al., 2004).

Par contre, la nécrose myocardique se produisant au tout début suite à l'IM va aussi enclencher le système du complément et donc la réaction inflammatoire systémique. L'inflammation humorale est la cause de l'initiation du phénomène inflammatoire. En effet, l'activation du système du complément est une des premières étapes inflammatoires suivant l'infarctus du myocarde. Suite à des dommages lors de l'ischémie, avant même la reperfusion, le myocarde peut activer le système du complément (Hill and Ward, 1971, Frangogiannis et al., 1998). Une activation du complément va avoir un rôle très important dans le recrutement des neutrophiles et des macrophages au myocarde infarci (Frangogiannis et al., 2002). En effet, le système du complément va promouvoir la production de certaines cytokines comme l'Il-8 qui, avec le PAF produit par les cellules endothéliales, va stimuler l'adhésion des neutrophiles et donc augmenter l'inflammation tissulaire (Bonvini et al., 2005). De plus, la composante C5a du complément semble être l'agent chimiotactique

dominant dans les deux premières heures de reperfusion en ce qui à trait aux neutrophiles et aux monocytes (Birdsall et al., 1997). Une fois dans la région infarctée, les neutrophiles et macrophages vont pouvoir débarrasser la région des cellules mortes et des débris.

Après l'IM, l'inflammation est associée de très près au rétablissement cardiaque (Frangogiannis, 2006a). Par contre, une réponse inflammatoire exubérante et une stimulation exagérée du système du complément, pouvant être observée lors de la reperfusion, peuvent avoir des effets délétères dans la zone affectée (Bonvini et al., 2005). Malgré que l'inflammation observée suite à la reperfusion contribue à la réparation des tissus ainsi qu'à la cicatrisation, cette réponse inflammatoire, dans le myocarde reperfusé, peut aussi aggraver la condition des cellules myocardiques affectées (Scarabelli and Gottlieb, 2004).

Suite à l'activation du système du complément ainsi qu'à la production d'Il-8, les neutrophiles vont migrer dans la région myocardique ischémique, adhérer à l'endothélium et participer ainsi à la réponse inflammatoire cellulaire. Une fois infiltrée, les neutrophiles peuvent participer aux lésions de reperfusion. De plus, tel que mentionné précédemment, les neutrophiles peuvent produire des substances toxiques qui seront néfastes pour les cellules myocardiques environnantes.

La réaction inflammatoire systémique contient deux types d'immunité soit l'immunité humorale et l'immunité cellulaire. Nous avons mentionné l'effet du système du complément qui stimule la production de cytokines pro-inflammatoires. En effet, la réaction inflammatoire suivant l'ischémie et la reperfusion est associée à la libération de cytokines (Frangogiannis et al., 2000) et ces dernières peuvent mener à des détériorations myocardiques. Les cytokines Il-1, Il-6 et TNF- α sont impliqués dans ces dommages en stimulant l'adhésion des neutrophiles aux myocytes cardiaques (Entman et al., 1992). Yang et coll. (Yang et al., 2008) ont étudié l'activation d'un récepteur et son rôle dans les lésions de reperfusion ainsi que la production subséquente de Il-6 et TNF- α . Le récepteur de type Toll 4 (TLR4), qui est normalement activé lors de la réponse inflammatoire humorale

innée, fut observé. Ils ont démontré que l'expression de TLR4 était augmentée suivant 30 minutes de reperfusion et qu'elle plafonnait après 1 heure. De plus, une corrélation positive existerait entre l'augmentation de TLR4, Il-6 et TNF- α suggérant un rôle important de ces cytokines dans les lésions de reperfusion. Effectivement, suite à l'ischémie-reperfusion, l'augmentation de la production de plusieurs cytokines par le tissu myocardique a été observée. L'expression des cytokines pro-inflammatoires Il-6, Il-8, IFN γ et TNF- α est augmentée suite à une ischémie et une reperfusion (Kamikubo, 1993). De plus la cytokine Il-1 α qui n'est pas exprimée dans un cœur normal est présente suite à la reperfusion du cœur ischémique.

Aussi, la cytokine anti-inflammatoire Il-10 semble être induite durant la reperfusion et son expression maximale se voit entre 96 et 120 heures de reperfusion (Frangogiannis et al., 1998). L'Il-10 semble avoir des effets bénéfiques en diminuant la production de l'Il-6 par les macrophages et myocytes dans la zone infarctée ainsi qu'en diminuant la production de métalloprotéinases favorisant ainsi la préservation de la matrice extracellulaire (Lacraz et al., 1995). Les réponses cellulaires lors de l'ischémie-reperfusion vont déterminer la réponse inflammatoire. Cette dernière est coordonnée par la relâche de cytokines qui vont finalement mener à une cascade bien orchestrée (Frangogiannis et al., 1998). Récemment Kaloustian et coll. ont toutefois démontré qu'en présence d'un inhibiteur de TNF α , aucun changement dans la taille de l'infarctus n'a été observé. De plus, dans le même modèle, la pentoxifylline, un inhibiteur de la synthèse de cytokines, n'avait aucun effet, ne suggérant qu'un effet mineur des cytokines dans l'infarctus du myocarde reperfusé (Wann et al., 2006).

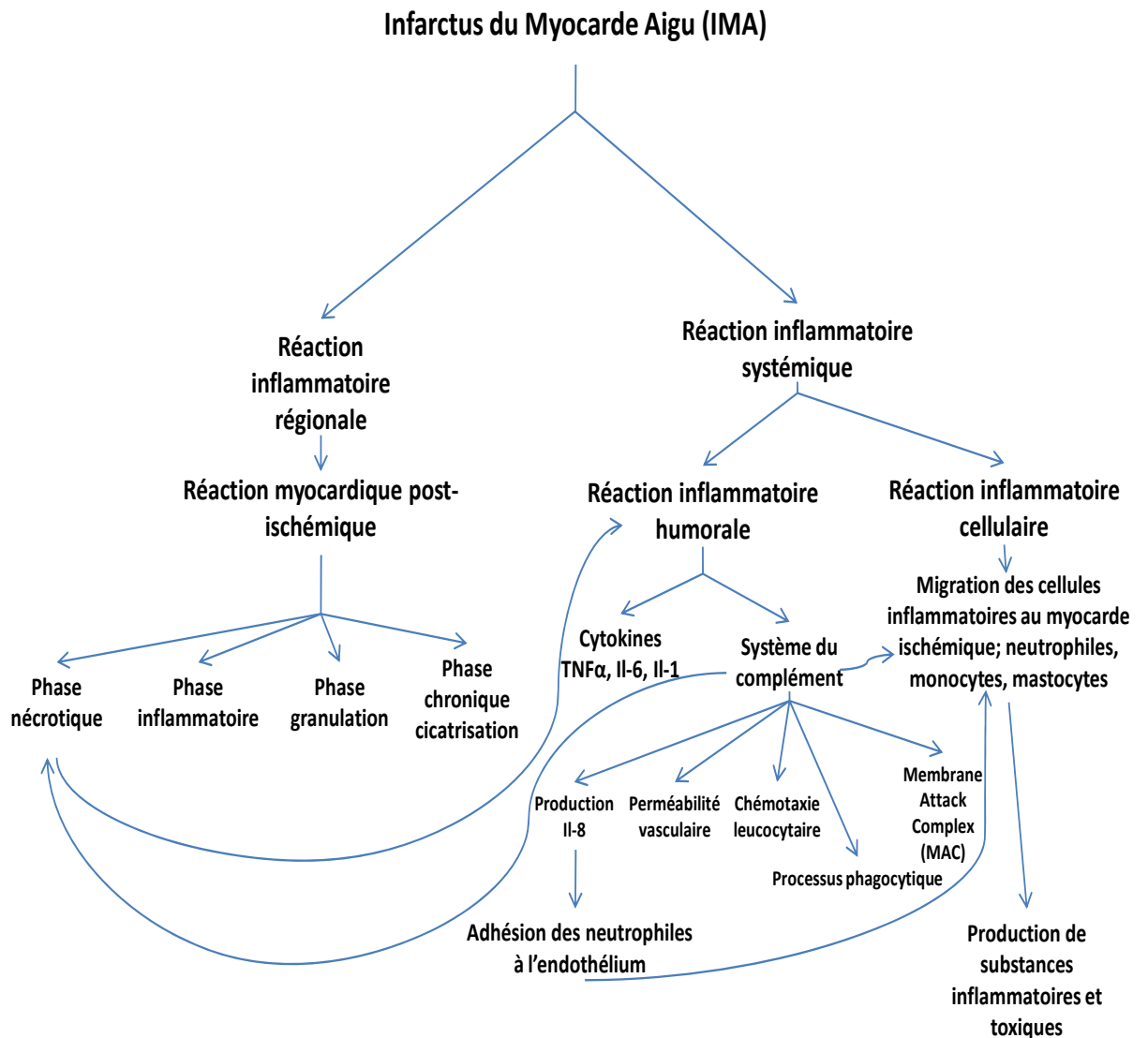


Figure 1.1 Schéma illustrant les étapes inflammatoires suivant un IM. Suivant un IM, deux types de réactions inflammatoires sont présents; régionale et systémique. La réponse inflammatoire régionale est nécessaire pour la cicatrisation de l'infarctus et la réponse inflammatoire systémique permet le débarras des cellules mortes et des débris par les neutrophiles. Une réponse inflammatoire exagérée va causer la libération de substances toxiques et conduire à des lésions de reperfusion.

1.8 Apoptose

Des périodes ischémiques de plus de vingt minutes font apparaître des dommages myocardiques irréversibles ainsi qu'une mort cellulaire subséquente par apoptose ou nécrose (Scarabelli and Gottlieb, 2004). L'apoptose est une mort cellulaire dite programmée, qui est active et requiert de l'énergie. C'est une mort cellulaire hautement contrôlée n'amorçant pas de réponse inflammatoire importante (Searle et al., 1982) et impliquant l'activation de caspases. Cette mort cellulaire est responsable d'étapes clés lors de l'embryogénèse et du développement ainsi que pour maintenir l'homéostasie (Abbate et al., 2006). Contrairement à la nécrose, l'apoptose n'entraîne pas de débris cellulaires, mais plutôt elle est basée sur une fragmentation de l'ADN, un rétrécissement de la cellule, une condensation de la chromatine ainsi que la formation de corps apoptotiques possédant une membrane cellulaire intacte et qui sont finalement phagocytés par les cellules environnantes (Eefting et al., 2004, Abbate et al., 2006, Zhao et al., 2000).

La nécrose, quant à elle, s'exécute suite à une insulte fatale externe. Suivant un traumatisme, la membrane cellulaire va exhiber un gonflement pour ensuite éclater et déverser tout le contenu cellulaire dans le tissu environnant. C'est cet écoulement du contenu de la cellule qui va provoquer une réponse inflammatoire caractérisée par l'infiltration de leucocytes et la phagocytose (Scarabelli and Gottlieb, 2004).

Les caspases sont les principaux régulateurs de l'apoptose. Il existe deux sous-groupes fonctionnels de caspases soit les caspases initiatrices (caspase-2, caspase-8, caspase-9 et caspase-10) et les caspases effectrices (caspase-3, caspase-6 et caspase-7). Comme c'est le cas pour la majorité des protéases, les caspases doivent être clivées pour devenir actives. En effet, les caspases sont synthétisées sous une forme enzymatique inactive dénommée proenzyme. La conversion de la forme inactive à la forme active des caspases est l'étape décisive dans l'initiation de l'apoptose (Zhao and Vinten-Johansen, 2002).

L'activation de caspases peut se dérouler selon trois mécanismes distincts. La première méthode veut que les caspases effectrices soient activées par une caspase en amont dans la cascade enzymatique. Cette cascade de caspase est utilisée par la cellule pour l'activation de trois caspases soit la caspase-3, -6 et -7. Cette méthode est très utile pour amplifier et intégrer les signaux pro-apoptotiques mais, elle n'explique cependant pas l'activation de la première caspase au tout début (Hengartner, 2000). Il existe deux principales méthodes pour activer les caspases initiatrices. Les caspases initiatrices comme la caspase-8 peuvent être activées par la leur propre proximité. En effet, une fois les récepteurs de mort activés par leurs ligands (les récepteurs et leurs ligands seront vus en plus amples détails plus loin), il y a une association de ces derniers et un complexe signalétique se forme. Ce complexe va alors recruter plusieurs pro-caspases-8 (pas encore activées) qui vont pouvoir s'auto-activer et se cliver les unes les autres. Une deuxième manière d'activer les caspases initiatrices est avec l'aide d'un complexe catalytique. En effet, la caspase-9 est la seule caspase activée par une sous-unité catalytique. Elle est activée par l'oligomérisation de Apaf-1 avec le cytochrome c (relâché par la mitochondrie) et suivant l'hydrolyse d'un ATP. L'association de la caspase-9 avec Apaf-1 forme un complexe nommé apoptosome et ce complexe Apaf-1/caspase-9 devient la forme active de la caspase-9 (Hengartner, 2000).

Le processus de l'apoptose (que ce soit au niveau myocardique ou dans le système limbique) peut être initié selon deux voies différentes; la voie intrinsèque (indépendante du récepteur de mort) et extrinsèque (dépendante du récepteur). Ces deux voies requièrent l'activation des caspases de la forme inactive à la forme active (Haunstetter and Izumo, 2000). La voie extrinsèque nécessite l'activation des récepteurs de morts tel que le récepteur TNFR1 (aussi appelé p55 ou CD120a) dont le ligand est le TNF- α . Une fois cette voie activée, une cascade signalétique s'en suivra et ceci mènera ultimement à l'apoptose. L'activation de la voie extrinsèque comprend le recrutement des procaspases-8 et -10 pour ensuite avoir une activation subséquente des caspases-3, -6 et -7. La caspase 3 est maintenant reconnue comme étant fondamentale en gouvernant la dégradation du cytosquelette ainsi que des protéines nucléaires; phénomènes qui sont observés lors de l'apoptose suite à l'ischémie et la

reperfusion (Zhao and Vinten-Johansen, 2002). L'activation de la caspase-3 induit obligatoirement l'apoptose (Zeiss, 2003).

La voie intrinsèque, quant à elle, est activée par des facteurs intracellulaires comme les radiations, l'hypoxie et les infections virales. La mitochondrie en est l'exécutrice principale et une relâche de cytochrome c sera observée lors de l'activation de cette voie (ceci sera discuté en plus de détails dans les prochains paragraphes). Il est important de mentionner qu'il y a possibilité d'une réponse croisée entre la voie extrinsèque et la voie intrinsèque. En effet, l'activation des récepteurs de mort (voie extrinsèque) peut entraîner la protéolyse de Bid (une protéine pro-apoptotique). Une fois clivée, Bid se déplacera alors vers la mitochondrie et l'activation de la voie intrinsèque sera initiée provoquant le déversement du cytochrome c par la mitochondrie.

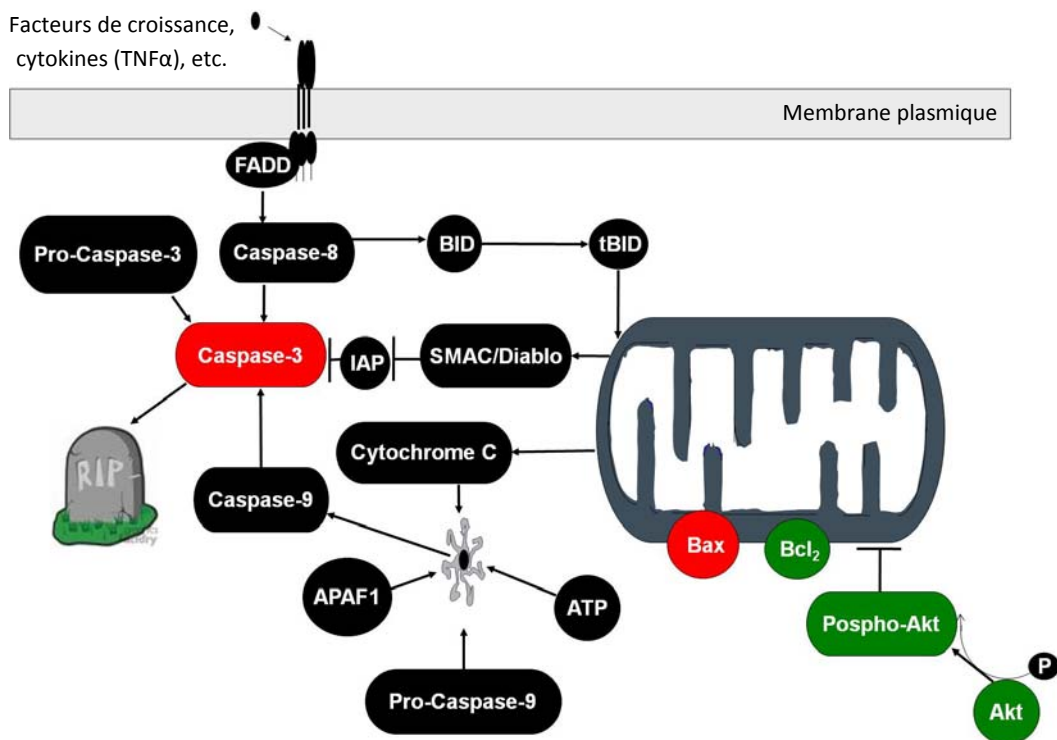


Figure 1.2 Représentation schématique des deux différentes voies apoptotiques. L'apoptose est caractérisée par deux voies distinctes soit la voie extrinsèque et la voie intrinsèque. Les deux voies

nécessitent l'activation de pro-caspase en caspase. Il existe une réponse croisée entre les deux voies et ceci mène ultimement à la mort cellulaire programmée.

1.8.1 La famille Bcl-2 comme régulateurs

La famille des protéines Bcl-2, des régulateurs apoptotiques, a été divisée en trois groupes. Le groupe I possède des propriétés anti-apoptotiques et les groupes II et III vont promouvoir la mort cellulaire. Le groupe I est composé de Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Bag-1 et BI-1. Lorsque ces protéines sont surexprimées, elles vont atténuer l'expression d'un large groupe de protéines pro-apoptotiques comme Bax, Bak, Bad, Bid et Bim. Une étude clinique effectuée par Misao et coll. (Misao et al., 1996) a démontré la présence de l'expression de la protéine Bcl-2 dans les myocytes sauvés se trouvant au pourtour de l'infarctus et que la protéine pro-apoptotique Bax était surexprimée dans la région myocardique infarctée.

La mitochondrie joue un rôle primordial dans la régulation de l'apoptose en agissant comme un réservoir d'une panoplie de protéines impliquées dans l'apoptose telles que le cytochrome c, Smac/Diablo, AIF, endonucléase G et les pro-caspases-2, -3, -8 et -9 (Parone et al., 2002). L'augmentation de l'expression de la protéine Bax modifie la perméabilité de la membrane mitochondriale et permet la relâche de facteurs mitochondriaux. Inversement, la protéine Bcl-2 (anti-apoptotique) prévient la perte de la perméabilité de la mitochondrie et la relâche de facteurs mitochondriaux (Saikumar et al., 1999). Une augmentation du ratio Bax/Bcl-2 indique donc un changement de la perméabilité mitochondriale et engendre un signal pro-apoptotique (Zhao et al., 2000). La mitochondrie possède le pouvoir d'intégrer divers stimuli et de les relayer en une cascade de signaux qui la rend le centre décisionnel du sort de la cellule.

La relâche du cytochrome c par la mitochondrie dans le cytosol suite à l'association avec Apaf-1 permet l'activation de la caspase-9. Smac/Diablo une fois relâché dans le cytosol va

interagir avec les inhibiteurs de l'apoptose (Inhibitors of Apoptosis; IAPs) et va empêcher les effets inhibiteurs qu'ils exercent sur les caspases effectrices.

Contrairement au cytochrome c et à Smac/Diablo, la relâche d'AIF et de l'endonucléase G de la membrane mitochondriale ne va pas mener à l'activation de caspases. En effet, AIF (une flavoprotéine) va passer de la mitochondrie vers le cytosol pour finalement se rendre dans le noyau où elle va induire la fragmentation de l'ADN. Finalement l'endonucléase G est habituellement responsable de la réplication de l'ADN mitochondrial. Par contre, lorsque le processus de l'apoptose est enclenché cette dernière va se rendre au noyau pour procéder à la fragmentation de l'ADN.

La mitochondrie est un important réservoir protéique et est un facteur important pour l'apoptose dépendante ou non de l'activation de caspases. De nombreuses études ont démontré une très forte corrélation entre la dysfonction mitochondriale et l'activation de caspases lors de l'apoptose suivant une ischémie-reperfusion. En effet, dans un modèle animal du rat, Holly et coll. (Holly et al., 1999) ont démontré qu'il y a relâche du cytochrome c ainsi qu'une activation de la caspase 3 et 9 lors d'une ischémie-reperfusion myocardique régionale.

Le cytochrome c est la protéine qui est la plus étudiée quant à sa relâche dans le cytosol. Le cytochrome c est contenu dans l'espace inter membranaire de la mitochondrie et pour qu'il se retrouve dans le cytosol, il doit traverser la membrane externe de la mitochondrie. Il est maintenant connu que la famille des protéines Bcl-2 est responsable de ce passage.

Comment la famille Bcl-2 contrôle-t-elle la relâche du cytochrome c? Malgré aucune réponse définitive, il existe plusieurs hypothèses.

Depuis qu'il est connu que les protéines de la famille Bcl-2 peuvent former des canaux ioniques ou agir comme des protéines à ancrages (Reed, 1997), une des hypothèses veut que

les membres de la famille Bcl-2 forment des canaux dans la membrane externe de la mitochondrie et ceci faciliterait le transport de molécules comme le cytochrome c.

Une seconde hypothèse stipule que les membres de la famille Bcl-2 interagissent avec d'autres protéines (VDAC) pour former des canaux. Dans le but de former des pores suffisamment larges pour relâcher le cytochrome c, des protéines apoptotiques de la famille Bcl-2 (comme Bax) peuvent recruter et interagir avec des porines (Voltage Dependent Activated Channels; VDACS) (Shimizu et al., 1999).

Finalement, il est possible que les membres de la famille Bcl-2 rupturent la membrane externe de la mitochondrie. Cette dernière hypothèse postule qu'il y a une rupture de la membrane extracellulaire de la mitochondrie permettant ainsi la relâche des protéines pro-apoptotiques de l'espace intermembranaire dans le cytosol. Cette rupture serait causée par une association des protéines de la famille Bcl-2 et une ouverture subséquente de pores de transition de perméabilité sur la membrane externe mitochondriale.

1.8.2 L'apoptose et la cellule myocardique

Pendant de nombreuses années la nécrose était associée à la perte de myocytes suivant un IM. Ce n'est qu'à la fin des années 1980s et au début des années 1990s que les investigateurs ont commencé à regarder l'apoptose comme cause de mort cellulaire des myocytes. En effet, l'apoptose était considérée comme étant restreinte aux cellules capables de division cellulaire (Scarabelli and Gottlieb, 2004). Puisque les cardiomyocytes ne sont capables de se diviser que lors du développement fœtal et jusqu'à 2 ou 3 jours suivant la naissance (Pignatti and Stefanelli, 2003), ce n'est que lors des deux dernières décennies qu'il a été reconnu que les cellules cardiaques, étant différenciées et indivisibles, pouvaient entrer en apoptose suite à une lésion comme l'ischémie-reperfusion (Scarabelli and Gottlieb, 2004). En effet, on retrouve dans le myocarde ischémique humain les deux types de mort cellulaire (Itoh et al., 1995).

L'apoptose myocardique semble contribuer de manière importante aux lésions d'ischémie-reperfusion (Zhao et al., 2001). L'apoptose observée suite à un infarctus du myocarde serait enclenchée par l'ischémie et peut-être accélérée durant la reperfusion ou débutée au moment de la reperfusion elle-même (Cokkinos et al., 2006). Puisque l'apoptose a besoin d'énergie et d'oxygène, cette dernière est surtout présente durant la reperfusion suivant l'occlusion d'une artère coronaire (Zhao et al., 2000). Le manque d'ATP causé par l'ischémie serait un facteur crucial pour déterminer le type de mort cellulaire que les cellules irréversiblement endommagées entreprendront (Leist et al., 1997).

Plusieurs groupes se sont interrogés à savoir si l'apoptose se produisait au cours de l'ischémie ou de la reperfusion. Un des premiers groupes à se pencher sur la question fut Gottlieb et coll. (Gottlieb et al., 1994) qui ont observé une mort myocardique et endothéliale par apoptose suivant 30 minutes d'ischémie et quatre heures de reperfusion chez le lapin. Par contre, cette mort cellulaire ne se retrouvait pas dans le myocarde normal ni dans le myocarde continuellement ischémique. De leur côté, Fliss et Gattinger (Fliss and Gattinger, 1996) ont démontré que chez le rat, suivant 45 minutes d'ischémie et 60 minutes de reperfusion, l'apparition de l'apoptose était accélérée par la reperfusion. Cependant, ils ont observé que le nombre total de cellules apoptotiques était moindre que dans le myocarde non reperfusé (continuellement ischémique). Selon cette étude, le développement de l'apoptose chez les cellules myocardiques continuellement ischémiques est plus lent mais plus considérable. Des expériences menées chez le chien semblent démontrer que l'apoptose n'apparaît que dans le myocarde ischémique ayant été soumis à la reperfusion et non chez le myocarde ischémique sans reperfusion (Zhao et al., 2000). Est-ce que ces résultats opposés proviennent du fait que différentes espèces animales sont étudiées? Malgré ces résultats contradictoires, il est nécessaire de comprendre que cette mort myocardique par apoptose durant l'ischémie et/ou la reperfusion provient d'un déséquilibre dans les signaux de survie et de mort (Zhao and Vinten-Johansen, 2002).

L'importance clinique potentielle de la prévention de l'apoptose myocardique suite à une ischémie-reperfusion a été démontrée par la diminution de l'apoptose par différentes techniques (par inhibition de caspases, protection mitochondriale par l'activation du gène anti-apoptotique Bcl-2, atténuation de la voie extrinsèque par l'inhibition cardiaque de TNF- α ou encore par la création de mutations au niveau génétique dans la cascade signalétique de l'apoptose). La diminution de l'apoptose induit non seulement une réduction de la mort cellulaire des myocytes mais est également associée à une augmentation de la fonction cardiaque (Scarabelli and Gottlieb, 2004).

Chapitre 2. La dépression post-infarctus du myocarde

2.1 Généralités (son occurrence et son importance)

Suite à un IM, l'observation de symptômes de dépression est fréquente et surtout non-négligeable. En effet, 65 pourcent des patients ayant subi un IM rapportent des symptômes de dépression et de ces patients, 15 à 22 pourcent développeront une dépression majeure (Carney et al., 1997). Le problème est que la dépression majeure suivant un IM augmente les risques de mortalité ainsi que les récurrences cardiovasculaires. Les personnes déprimées qui souffraient antérieurement de maladies cardiovasculaires ont 3.5 fois plus de risque de mortalité que les personnes qui ont des maladies cardiovasculaires sans souffrir de dépression (Guck et al., 2001). De plus, la dépression suivant un IM prédit la qualité de vie à long terme (de Jonge and Ormel, 2007). Chez les individus souffrant de dépression majeure, il est estimé que plus de 15 pourcent de ces derniers auront recours au suicide (Manji et al., 2001).

La dépression majeure, aussi appelée mélancolie ou dépression unipolaire, est un trouble épisodique grave caractérisé par des épisodes qui durent au moins deux semaines et jusqu'à un an s'ils ne sont pas traités. Cette dépression unipolaire est une dysfonction assez courante puisqu'environ 15% de la population générale en souffre (Tsai, 2004). La dépression majeure est une condition qui est sévère, commune, chronique et dans certains cas mortelle (Manji et al., 2001).

2.2 La dépression et le système limbique

Le système limbique est un groupe de structures du cerveau qui sont impliquées dans les émotions comme l'agressivité, la peur, le plaisir ainsi que la mémoire. Le système limbique comprend le cortex préfrontal, l'hypothalamus, l'hippocampe et l'amygdale. L'amygdale est responsable de l'agressivité, la peur et la gestion des émotions. Cette dernière serait

impliquée dans l'infarctus du myocarde, ainsi que dans la dépression post-infarctus du myocarde, puisque qu'elle est responsable de la régulation de l'homéostasie ainsi que des émotions (Nieuwenhuys, 1996, Kaloustian et al., 2007). Plusieurs études suggèrent que les symptômes dépressifs peuvent être associés à la présence d'apoptose dans certaines régions du cerveau, dont l'amygdale (Wann et al., 2006).

2.3 Hypothèses

2.3.1 L'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien (HPA)

L'atteinte du système limbique suite à un IM pourrait s'expliquer par une hyperactivité de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien (HPA). L'axe HPA est responsable de la neurobiologie des désordres de l'humeur tel que l'insomnie, l'anxiété, la fibromyalgie, le syndrome du côlon irritable et la dépression majeure. La dépression est définie par une hyperactivité de l'axe HPA et cette activation exagérée s'apparente à la réponse neuroendocrine au stress (Rostene, 2005).

Lors d'un stress, les zones associatives corticales et limbiques (amygdale et hippocampe) du cerveau sont activées et envoient des influx nerveux vers les neurones hypothalamiques. Ces dernières vont synthétiser la corticolibérine (CRH; *corticotropin-releasing hormone*). Cette hormone peptidique sera alors libérée dans le sang porte hypophysaire, qui circule à travers un système particulier de capillaires entre l'hypothalamus et l'hypophyse antérieure, où, à leur tour, des cellules endocrines activées vont sécréter l'hormone corticotrope (ACTH; *adrenocorticotropin hormone*). Une fois libérée dans le sang, l'ACTH va atteindre la glande surrénale (celle-ci se trouve au-dessus du rein) et la partie corticale synthétisera des glucocorticoïdes comme le cortisol. Les glucocorticoïdes vont pouvoir interagir avec leurs nombreux récepteurs nucléaires qui sont situés dans différents tissus et organes. Le cortisol pourra aussi agir en tant que rétrocontrôle négatif en se liant aux récepteurs dans l'axe HPA et inhibant ainsi la production de corticolibérine de l'hypothalamus et d'ACTH des cellules

endocrines. Une fois libéré, le cortisol peut agir sur le système immunitaire ou les muscles où il y aura production d'adrénaline et de noradrénaline (Rostene, 2005).

Une fois activé, l'axe HPA régule des fonctions périphériques du corps telles que le métabolisme et l'immunité. De plus l'axe HPA a des effets importants sur le cerveau (Jankord and Herman, 2008). En effet, les glucocorticoïdes permettent la survie neuronale et la neurogénèse et déterminent la grosseur de structures anatomiques comme l'hippocampe et le gain de nouvelles mémoires (Pariante and Lightman, 2008).

Chez les patients déprimés, l'activation de l'axe HPA, malgré que cela ne se produise que chez 50 à 70 pourcent d'entre eux, est le seul marqueur biologique constant (Dunn et al., 2005, Manji et al., 2001). Les patients affectés par une dépression majeure présentent des altérations dans les fonctions de l'axe HPA se manifestant comme des hauts niveaux de corticostéroïdes dans la salive, le plasma (dans 25 pourcent des cas) et l'urine (Pariante and Lightman, 2008, Swaab et al., 2005). Depuis longtemps, il a été remarqué que chez les déprimés, le niveau basal de la concentration de cortisol est élevé. Une hypothèse expliquant l'hyperactivité de l'axe HPA chez les patients dépressifs serait l'existence d'une fonction anormale des récepteurs de glucocorticoïdes (RG) (Raison et al., 2006). Il y aurait présence de récepteurs au cortisol anormaux dans l'hippocampe chez les patients dépressifs (Page et al., 1999). En effet, une réduction de la fonction des RG dans les tissus périphériques comme les cellules de la peau ainsi que les monocytes a été observée chez les patients déprimés (Pariante and Lightman, 2008). Une autre hypothèse qui expliquerait une hyperactivité de l'HPA serait la présence d'un hippocampe endommagé. Normalement, l'hippocampe a un rôle inhibiteur sur l'axe HPA (Bao et al., 2008), cependant suite à un IM et une apoptose subséquente de l'hippocampe (Wann et al., 2007), l'axe HPA se retrouvera dans une boucle de rétroaction positive et une hypersécrétion des glucocorticoïdes s'en suivra. Par contre, cette hypothèse n'est pas totalement vérifiée par certaines études. En effet, dans des analyses post-mortem chez des patients déprimés ou ayant été traités avec des stéroïdes synthétiques, ce présumé dommage à l'hippocampe causé par l'exposition exagérée aux stéroïdes n'a pu

être observé (Bao et al., 2008). Comme dernière hypothèse, l'hyperactivité de l'axe HPA peut être causée par la corticolibérine. En effet, certaines études démontrent une hypersécrétion de la corticolibérine lors de la dépression majeure (Raison et al., 2006) et même des niveaux de corticolibérine dans le liquide céphalo-rachidien plus élevés lors de la dépression majeure que dans la manie, l'anxiété ou chez les sujets témoins (Swaab et al., 2005). De plus, lors d'expériences chez les animaux, il a été observé que, suivant des injections intraventriculaires de corticolibérine, des symptômes étant associés et ressemblant étroitement à la dépression sont apparus; diminution de la prise de nourriture et d'activité sexuelle, perturbations du sommeil ainsi que de la locomotion et une augmentation de l'anxiété (Holsboer et al., 1992).

De plus, ces altérations de l'HPA ressemblent à celles qui sont rencontrées chez des animaux mis en condition de stress chronique (Rostene, 2005). Une hyperactivité de l'HPA est également démontrée lors de la séparation en période néonatale chez le rat ou le primate non-humain dont les changements persisteront jusqu'à l'âge adulte (Pariante and Lightman, 2008).

Plusieurs études ont démontré que les anomalies dans l'axe HPA observées chez les patients souffrant de dépression majeure seraient présentes avant le début des symptômes cliniques suggérant que de telles anomalies prédisposent le patient à l'épisode dépressif (Holsboer, 2000, Pariante and Lightman, 2008, Swaab et al., 2005).

2.3.2 Les cytokines

Depuis plusieurs années, il a été présumé que la dépression peut être causée par la sécrétion de cytokines associée à l'activation du système immunitaire (Dunn et al., 2005). Suivant l'hypothèse que les cytokines peuvent engendrer une dépression, l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires circulantes observée lors d'un IM pourrait expliquer la dépression suivant l'IM. Les cytokines sont des protéines et glycoprotéines agissant de manière locale ou systémique pour coordonner des réponses immunitaires de différents systèmes physiologiques comme le système nerveux central (Dunn et al., 2005).

Puisque les cytokines sont des molécules hydrophiles de grande taille (13 à 15 kDa), elles ne peuvent traverser aisément la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui sépare la circulation sanguine du système nerveux central (SNC). La BHE consiste principalement en des cellules endothéliales non-fenestrées qui sont interconnectées par des jonctions serrées (Zhang and Rivest, 2003).

Plusieurs hypothèses ont été émises pour tenter d'expliquer le passage des cytokines de l'autre côté de la BHE. Il est possible que les cytokines traversent la BHE lors de périodes de fièvre extrême ou quand la concentration plasmatique de ces dernières demeure élevée pendant une longue période de temps (Zhang and Rivest, 2003). Une autre hypothèse stipule que les cytokines pourraient se déplacer dans le SNC par les régions qui ont une BHE incomplète notamment les organes circumventriculaires. Les cytokines pourraient se lier à des récepteurs membranaires agissant comme des transporteurs sur l'endothélium. Par ailleurs grâce à l'activation de fibres afférentes, les cytokines pourraient transmettre leurs signaux à certaines régions spécifiques du cerveau (Raison et al., 2006). En effet, le nerf vague pourrait permettre un mode de communication rapide par les cytokines entre la périphérie et le système nerveux central (SNC) (Zhang and Rivest, 2003).

L'augmentation de cytokines pro-inflammatoires circulantes, en particulier l'Il-1, va augmenter la synthèse de la cyclo-oxygénase-2 (COX-2), une enzyme pro-inflammatoire, au niveau du cerveau. En effet, suivant une réaction inflammatoire systémique, l'expression enzymatique de COX-2 serait induite par les cellules endothéliales de la BHE (Laflamme et al., 1999, Zhang and Rivest, 2003). Les cellules endothéliales de la BHE sont d'excellentes cibles pour les cytokines puisqu'elles expriment en tout temps plusieurs récepteurs de cytokines et elles sont très sensibles à de bas niveaux de molécules pro-inflammatoires circulantes (Zhang and Rivest, 2003). L'augmentation de COX-2 va produire une augmentation de la prostaglandine PGE2 et c'est cette dernière qui va pouvoir traverser la BHE et stimuler l'activité de l'axe HPA et de la corticolibérine (Kaloustian et al., 2007). Conséquemment, il n'est pas surprenant de déceler chez les patients déprimés des niveaux de concentration élevés de prostaglandine E₂ (Lieb et al., 1983). De plus, Takadera et coll.

(Takadera et al., 2002) ont démontré que la prostaglandine PGE2 peut induire l'apoptose des cellules du cortex. Cette hypothèse est soutenue par le fait que, chez les patients dépressifs, il y a présence d'apoptose au niveau cérébral (Lucassen et al., 2006).

Plusieurs études révèlent que certaines cytokines entraîneraient la dépression chez l'homme. De nombreuses observations semblent converger vers cette hypothèse. Il a été démontré que le traitement de cancer ou de maladies infectieuses ayant recours à des cytokines (l'immunothérapie utilisant l'Il-2 ou l'interféron-alpha (IFN- α) (Anisman et al., 2005)) pouvait produire des symptômes de dépression chez jusqu'à 50 pourcent des patients (Raison et al., 2006). De plus, chez les patients déprimés, une plus grande incidence de l'activation du système immunitaire serait observée (Dunn et al., 2005).

Les patients souffrant de dépression majeure ont des niveaux de cytokines pro-inflammatoires (Il-2, Il-12 et TNF- α) significativement plus élevés et des niveaux de cytokines anti-inflammatoires (Il-4 et TGF- β 1) significativement plus bas que des patients non-atteints (Sutcgil et al., 2007).

Lors de la dépression majeure, une élévation de certaines cytokines comme Il-6, Il-1 β , interféron-gamma (INF- γ) et TNF- α peut être observée dans le plasma et/ou le système nerveux central (Schiepers et al., 2005, Logan and Katzman, 2005, Raison et al., 2006). Des augmentations de ces cytokines sont observées suivant un IM. Il a aussi été démontré que même des quantités très basses de cytokines circulantes pouvaient avoir un effet sur les activités du cerveau (Pollmacher et al., 2002). La dépression majeure, suivant un IM, pourrait-elle être causée par une augmentation de cytokines pro-inflammatoires?

Dans cette même pensée, il y a une forte apparition de la dépression chez les patients ayant des maladies associées avec des dysfonctions du système immunitaire (la sclérose en plaque, la maladie de Crohn) (Dunn et al., 2005, Maes, 2008). L'administration de l'antagoniste du TNF- α (étanercept ou infliximab) pour traiter des maladies auto-immunes semble réduire les symptômes dépressifs et ce, même avant de voir des améliorations dans les symptômes de la maladie elle-même (Lichtenstein et al., 2002).

Une autre hypothèse suggère que les cytokines aient des effets sur le métabolisme des neurotransmetteurs. Des altérations dans le métabolisme de la sérotonine, la norépinephrine et la dopamine auraient des effets sur le comportement puisque ces changements se produiraient dans le système limbique qui est responsable de la régulation des émotions (Raison et al., 2006). Anisman et coll. (Anisman et al., 1996) ont démontré que, lorsqu'injecté dans le péritoine (membrane séreuse tapissant l'abdomen et qui délimite de manière virtuelle la cavité péritonéale), l'Il-2 pouvait induire une réduction importante des concentrations de la dopamine dans le noyau accumbens (celui-ci jouant un rôle central dans le circuit de la récompense du cerveau) chez le rat. Les cytokines Il-1, Il-6 et TNF- α ont chacune un effet sur la transmission sérotoninergique dans le cerveau (Dunn et al., 2005).

Les cytokines peuvent influencer plusieurs systèmes neuroendocriniens. En effet, les cytokines activent principalement l'axe HPA, qui va ensuite provoquer la relâche d'ACTH et de glucocorticoïdes (Zhang and Rivest, 2003). De plus, il a été démontré que certaines cytokines pro-inflammatoires exogènes telles que l'Il-1, Il-6, TNF- α et IFN- γ ont la capacité d'activer l'axe HPA (Dunn et al., 2005, Swaab et al., 2005, Smith, 1991). Puisque l'axe HPA serait activé de manière exagérée chez les patients dépressifs, il est concevable que les cytokines en seraient la cause. Plus spécifiquement, l'Il-2 provoque l'anhédonie (l'incapacité de ressentir du plaisir), symptôme clé de la dépression (Anisman et al., 2005).

De plus, suivant un IM, de nombreuses cytokines pro-inflammatoires se retrouvent dans la circulation sanguine et ceci pourrait expliquer la présence d'apoptose dans l'amygdale observée par Kaloustian et coll (Kaloustian et al., 2007). Donc, cette apoptose provoquée par les cytokines circulantes et se retrouvant dans certaines régions du cerveau pourrait mener à la dépression.

Cependant, il est important de mentionner que le mécanisme expliquant l'apoptose retrouvée dans le système limbique suite à un IM n'est pas encore complètement élucidé. En effet, le groupe de Francis et coll ont démontré que l'apparition de cytokines pro-

inflammatoires dans le cerveau, suivant un IM, était indépendant des cytokines circulantes mais plutôt que ces dernières provenaient des nerfs cardiaques afférents activés par l'ischémie myocardique (Francis et al., 2004b).

De plus, la mort neuronale fut souvent associée avec l'augmentation de TNF- α ainsi que d'IL-1 β (Huang et al., 2005). Tel que mentionné précédemment, le processus apoptotique implique soit une activation dépendante du récepteur de mort ou une activation indépendante du récepteur. Lors de l'activation d'un récepteur de mort, un déséquilibre des protéines pro-apoptotiques (famille Bcl₂ groupes II et III) ainsi qu'une activation des protéases cytosoliques (famille des caspases) sont observés. En effet, il est cru que la protéine TRAIL serait responsable de la mort cellulaire dans plusieurs maladies neurodégénératives. Lors de l'apoptose observée au niveau du cerveau, la protéine TRAIL se lie au récepteur de mort DR4. Ensuite, ce dernier va s'oligomériser avec le récepteur de mort DR5. Cette liaison mènera ultimement au recrutement de la caspase-8 et donc une mort cellulaire ayant recours principalement à la voie extrinsèque de l'apoptose (Huang et al., 2005).

Finalement, certaines études démontrent que des bactéries potentiellement bénéfiques, qui sont diminuées lors de stress et de maladies chroniques, pourraient influencer la dépression par plusieurs mécanismes (Logan and Katzman, 2005). Il a été suggéré que des modifications de la flore intestinale puissent engendrer des changements immunitaires se manifestant au-delà du système gastro-intestinal. Les bactéries bénéfiques (les probiotiques qui seront discutés dans le prochain chapitre) peuvent notamment diminuer la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, IL-1 β , TNF- α et IFN- γ dans la périphérie et pourraient conséquemment agir sur la dépression (Ghosh et al., 2004).

Chapitre 3. Les probiotiques

La notion de probiotiques a pris naissance en 1908 suite à une théorie proposée par le scientifique russe, récipiendaire d'un prix Nobel, Eli Metchnikoff. Celui-ci avançait que la durée de vie augmentée chez les paysans bulgares provenait de la consommation de produits laitiers fermentés (Fioramonti et al., 2003). Cependant, ce n'est qu'en 1965 que le terme « probiotique » a été utilisé pour la première fois par Lilly et Stillwell pour décrire « des substances sécrétées par un micro-organisme qui stimule la croissance d'un autre » (Lilly and Stillwell, 1965). Les probiotiques sont maintenant définis comme étant des micro-organismes vivants se retrouvant soit dans la nourriture ou dans des suppléments alimentaires et qui, lorsque pris en quantité suffisante, améliorent la santé de l'hôte à des niveaux supérieurs qu'une nutrition simple (Fuller, 1989). Cette définition est reconnue et utilisée par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) ainsi que par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

En ce qui concerne les probiotiques, les genres les plus utilisés sont les fermentations à base lactique (*Lactobacillus*), de bifidobactéries (*Bifidobacterium*) et de levure de bière active (*Saccharomyces boulardii*)

3.1 Les probiotiques et le système gastro-intestinal

Les probiotiques ont de nombreuses influences sur le système gastro-intestinal. En effet, certains probiotiques peuvent agir sur la fonction de la barrière épithéliale, le système immunitaire de la muqueuse intestinale ainsi que l'environnement luminal de l'intestin (Ng et al., 2008b). Grâce à leurs effets positifs sur le système gastro-intestinal, ces micro-organismes ont été utilisés pour la prévention et le traitement de maints désordres infectieux et inflammatoires (Zareie et al., 2006). De plus, il est démontré que l'ingestion de probiotiques est utile pour les maladies du tractus gastro-intestinal comme la diarrhée associée à la prise

d'antibiotiques (Cremonini et al., 2002), le cancer du côlon (Wollowski et al., 2001) et la pouchite (une maladie inflammatoire de l'intestin) (Floch et al., 2008).

Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer comment les probiotiques, en interagissant avec les cellules épithéliales ou encore le système immunitaire inné et/ou spécifique, exercent leurs effets bénéfiques sur le système digestif.

La sécrétion de bactériocines par les probiotiques est une caractéristique que ces derniers possèdent et qui leur confère un effet bénéfique. Les bactériocines sont des protéines synthétisées par certaines bactéries ayant des propriétés antibiotiques. L'activité inhibitrice des bactériocines varie grandement en fonction de l'espèce bactérienne. Plusieurs bactériocines appartenant au genre des Lactobacilles ont été décrites; certaines inhibent d'autres bactéries lactobacilles tandis que d'autres sont dirigées contre une plus grande variété de bactéries à Gram positif, bactéries à Gram négatif ainsi que certaines levures (Ng et al., 2008b).

Les probiotiques empêchent la colonisation de la barrière épithéliale par des bactéries pathogéniques par inhibition compétitive (Lutgendorff et al., 2008). Effectivement, pour que les bactéries puissent coloniser le système gastro-intestinal, celles-ci doivent d'abord être capables d'adhérer à la surface des cellules épithéliales. Puisque les probiotiques colonise de manière transitoire l'intestin ceux-ci peuvent, par compétition, empêcher l'adhésion et la translocation des souches pathogènes (Zareie et al., 2006). La translocation de bactéries est définie comme étant le passage de bactéries vivantes du tractus gastro-intestinal à travers l'épithélium jusqu'à d'autres sites comme les ganglions lymphatiques mésentériques. Une multitude de facteurs peuvent stimuler cette translocation comme une augmentation de la perméabilité de l'épithélium intestinal, une augmentation de populations de bactéries dans la lumière intestinale ou une diminution des défenses immunitaires de l'hôte.

Les probiotiques réduisent le pH dans la lumière intestinale. En effet, un des moyens que possède la flore intestinale d'empêcher l'invasion de bactéries pathogéniques est la régulation

d'un environnement physiologique limitatif en ce qui concerne le pH, le potentiel redox, ainsi que la production de sulfure d'hydrogène (H₂S) (Ng et al., 2008b). Chez les patients souffrants de colite ulcéreuse (maladie inflammatoire chronique intestinale qui est caractérisée par la présence d'ulcères dans le côlon), Venturi et coll. (Venturi et al., 1999) ont démontré que l'administration du mélange de probiotiques VSL#3 (contenant quatre espèces de Lactobacilles soit; *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum* et *L. delbrueckii*) diminuait le pH dans le lumen de l'intestin (Venturi et al., 1999). Dans cette étude, il a été démontré que, suivant la diminution du pH par le mélange de probiotiques VSL#3, une augmentation des concentrations de bactéries « protectrices » dans la microflore intestinale survenait.

La surface luminale du tractus gastro-intestinal est couverte d'un gel visqueux et élastique qui agit comme une barrière protectrice contre l'environnement externe. Les bactéries pathogéniques doivent en premier lieu traverser cette muqueuse avant de pouvoir s'adhérer, coloniser et finalement traverser les cellules épithéliales (Fioramonti et al., 2003). Plusieurs bactéries probiotiques ont la capacité de s'attacher à la muqueuse intestinale. En effet, à peu près 45 pourcent des *Lactobacillus GG* et 30 pourcent des *Bifidobacterium lactis* Bb12, lorsque consommées oralement chez l'homme, ont été retrouvées adhérees au mucus des échantillons fécaux (Kirjavainen et al., 1998). En plus de pouvoir s'adhérer à la muqueuse, les probiotiques peuvent empêcher que des bactéries pathogéniques s'attachent eux-aussi. Dans la muqueuse de l'intestin grêle porcin, la bactérie probiotique *Enterococcus faecium* 18C23 empêche l'adhésion de la bactérie pathogénique *Escherichia coli* K88 (Jin et al., 2000). En plus de pouvoir dégrader la muqueuse intestinale, les bactéries sont aussi responsables de la quantité ainsi que de la nature du mucus sécrété. Certaines bactéries probiotiques augmentent l'expression du gène MUC ainsi que la sécrétion de mucus (Ng et al., 2008b). En effet, les probiotiques VSL#3 ainsi que *E. coli* Nissle augmente l'expression des gènes ainsi que des protéines MUC2, MUC3 et MYC5AC (Otte and Podolsky, 2004). Puisque la muqueuse intestinale est nécessaire pour prévenir l'adhésion de bactéries pathogéniques et ainsi maintenir l'intégrité de la barrière intestinale, une augmentation de

l'expression des gènes ou des protéines du mucus conférée par les probiotiques contribue à leurs effets positifs.

Les jonctions serrées de l'épithélium intestinal sont une composante essentielle de la barrière intestinale et elles exercent un rôle pivot dans le contrôle de la perméabilité (Fioramonti et al., 2003). De nombreux désordres gastro-intestinaux tels que la maladie de Crohn, les intolérances alimentaires ainsi que les maladies intestinales infectieuses sont associés à des modifications de la perméabilité intestinale (Bjarnason et al., 1995). Chez le rat, il a été observé que l'administration de methotrexate (médicament normalement utilisé dans le traitement de certains cancers ainsi que certaines maladies auto-immunes) augmentait la perméabilité intestinale ainsi que la translocation de bactéries à travers les cellules épithéliales celles-ci se rendant jusque dans le rein, le foie et le sang (Fioramonti et al., 2003). Par contre, Mao et coll. (Mao et al., 1996) ont démontré que chez des animaux traités par les probiotiques *Lactobacillus reuteri* ou *Lactobacillus plantarum*, 3 jours avant et après l'administration de méthotrexate, il y a une diminution significative de la perméabilité ainsi que de la translocation des bactéries. Donc, les probiotiques, en restaurant les jonctions serrées de l'épithélium intestinal, pourraient avoir des effets positifs lors de certaines maladies gastro-intestinales et même prévenir certains effets secondaires de médicaments prescrits.

De plus, des études ont montré que les probiotiques exercent leurs effets bénéfiques sur l'hôte en compétitionnant avec les espèces pathogènes pour les nutriments essentiels ainsi qu'en induisant la production de protéines de choc thermique (HSP) (Lutgendorff et al., 2008).

Une fois ingérés, les probiotiques interagissent constamment avec les cellules épithéliales de l'intestin. Lors de cette interaction, les cellules épithéliales sont capables de différencier les probiotiques des bactéries pathogéniques. Une fois reconnus, les probiotiques peuvent influencer la cascade signalétique ainsi que la production de cytokines qui s'ensuivra. En effet, les probiotiques sont capables d'agir à travers des protéines reconnaissant des motifs

moléculaires conservés soit les récepteurs de type Toll (TLR) comme TLR-2 et TLR-4 (Ng et al., 2008b). Ces interactions entre les probiotiques et les récepteurs de type Toll vont mener à la production de cytokines protectrices qui vont promouvoir l'homéostasie ainsi que la résistance contre des dommages envers les cellules épithéliales et vont réduire l'apoptose de ces cellules (Rakoff-Nahoum et al., 2004).

Les probiotiques stimulent la production de cytokines anti-inflammatoires comme l'interleukine-10 (IL-10) et diminuent les cytokines pro-inflammatoires tel que l'IL-12 et le TNF α (Lorea Baroja et al., 2007). En effet, certaines études ont démontré que les probiotiques ont des effets anti-inflammatoires au niveau de la surface muqueuse (O'Mahony et al., 2001). Il est important de mentionner que différentes espèces de probiotiques produisent différentes réponses suite à l'interaction avec l'épithélium intestinal. Cette interaction engendre la production de diverses cytokines (Delcenserie et al., 2008, Candela et al., 2008). L'avantage qui incite le plus l'utilisation des probiotiques est la capacité qu'ils possèdent de moduler l'immunité de leur hôte (Medina et al., 2007). En effet, les Lactobacilles et les Bifidobactéries ont l'habileté de réguler la production de cytokines anti- et pro-inflammatoires. Plusieurs études ont démontrées que les propriétés anti-inflammatoires de certains probiotiques pouvaient être utilisées pour traiter différentes maladies inflammatoires chroniques comme la dermatite atopique et les maladies inflammatoires chroniques intestinales (maladie de Crohn et la colite ulcéreuse) (Lorea Baroja et al., 2007). Malgré qu'une grande majorité des études conduites sur les probiotiques et la production de cytokines se concentre principalement sur les effets au niveau du système gastro-intestinal, il semble y avoir de plus en plus d'évidences appuyant l'effet systémique de ces cytokines (Logan and Katzman, 2005). Les probiotiques atténuent les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , TNF α , IL-6 et IFN γ dans la périphérie au-delà de la muqueuse gastro-intestinale (Ghosh et al., 2004). Une recherche menée par Baharav et coll. (Baharav et al., 2004) a démontré que des probiotiques (*Lactobacillus GG*) administrés oralement réduisaient l'inflammation des jointures chez des rats souffrant d'arthrite. L'effet inhibitoire des cytokines pro-

inflammatoires conféré par les probiotiques pourrait alors se retrouver non seulement dans le système gastro-intestinal mais aussi dans d'autres organes périphériques.

3.2 Les probiotiques et le stress

Tel que discuté dans la section précédente, nombreuses sont les études réalisées concernant l'effet des probiotiques sur la modulation de la flore intestinale ainsi que leurs effets sur la réponse inflammatoire de l'hôte. Malgré que les résultats obtenus semblent démontrer que les probiotiques ont des effets positifs sur l'inflammation et la prévention de l'attachement de bactéries pathogéniques sur la muqueuse intestinale de l'hôte, il reste à déterminer si ces effets bénéfiques peuvent être reproduits dans d'autres désordres gastro-intestinaux durant lesquels l'intégrité de la barrière intestinale est compromise.

En effet, l'influence du stress sur la microflore intestinale a été le sujet d'abondantes recherches réalisées tant chez l'humain que chez l'animal (Logan and Katzman, 2005). Dans un modèle animal, il a été observé qu'un stress psychologique chronique induit une dysfonction de la muqueuse intestinale (Zareie et al., 2006). Cette dysfonction de la barrière provoque une diminution de la sécrétion d'ions (qui va conduire à une diminution de la sécrétion d'eau qui normalement « rince » la surface muqueuse des matériaux nocifs (Gareau et al., 2007)), une augmentation de la perméabilité épithéliale et de l'attachement de pathogènes sur la surface épithéliale, ainsi que l'initiation de l'inflammation de la muqueuse (Soderholm and Perdue, 2001). En effet, le stress a un impact majeur sur la physiologie de l'intestin et peut, de cette façon, favoriser le développement de maladies gastro-intestinales (Lutgendorff et al., 2008). Des situations de stress peuvent prédisposer un individu à développer un désordre de l'intestin tel que le syndrome du côlon irritable (Mayer, 2000). De plus, des conditions de stress peuvent exacerber les symptômes et l'aboutissement clinique de maladies intestinales auto-immunes telles que la maladie de Crohn.

Chez un modèle animal, il a été démontré que le stress peut réduire le nombre de Lactobacilles, augmenter le nombre de bactéries anaérobiques (Suzuki et al., 1983) et favoriser l'incorporation, la croissance ainsi que l'adhérence épithéliale de bactéries à gram-négatives pathogéniques. De plus, lors d'un stress, les bactéries opportunes pathogéniques peuvent ressentir cet état de faiblesse et augmenter leurs facteurs de virulence (Lutgendorff et al., 2008). Des études effectuées chez l'homme ont démontré que le stress émotionnel peut mener à une diminution à court et à long terme du nombre de Lactobacilles et de Bifidobactéries (Lizko, 1987). De plus, une étude menée auprès de patients bénévoles souffrant de symptômes associés au stress a démontré que l'administration d'une combinaison de probiotiques (*Lactobacillus helveticus* R0052 et *Bifidobacterium longum* R0175) diminuait de manière significative deux symptômes gastro-intestinaux causés par le stress soit la douleur abdominale et la nausée/vomissement (Diop et al., 2008a).

Des études récentes suggèrent que des changements dans la fonction de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien (HPA) ainsi que des altérations au niveau des interactions entre les bactéries et la muqueuse intestinale soient induites suite à des modifications dans l'inflammation gastro-intestinale causées par le stress (Mawdsley and Rampton, 2005). Parallèlement, des changements dans la composition de la flore intestinale, définis par une diminution des Lactobacilles ainsi que des Bifidobactéries, observés chez les patients souffrant du syndrome du côlon irritable causerait une augmentation de l'activité de l'axe HPA (Dinan et al., 2006). En effet, l'axe HPA est non seulement le système endocrinien affecté par le stress, mais ce dernier est aussi un lien important entre le système immunitaire de l'intestin et le cerveau (Dinan et al., 2006). Zareie et coll. (Zareie et al., 2006) ont démontré, dans un modèle de stress chronique chez le rat, que l'administration de probiotiques (*Lactobacillus rhamnosus* R0011 et *Lactobacillus helveticus* R0052) en prophylaxie réduisait l'adhérence des bactéries ainsi que leur translocation dans les ganglions lymphatiques mésentériques. Il existe chez l'animal d'autres modèles de stress, entre autre la séparation néonatale. Ce modèle de séparation traumatique illustre les altérations dans la physiologie du côlon caractérisées par une augmentation de la motilité, une augmentation de

la perméabilité moléculaire ainsi qu'une hyperalgésie viscérale (Gareau et al., 2007). Suite à ces changements particuliers, cette séparation néonatale est non seulement un modèle de stress mais aussi un modèle de syndrome du côlon irritable. Puisque les probiotiques ont été utilisés avec succès pour contrer la dysfonction de la barrière épithéliale, Garcia-Rodenas et coll. (Garcia-Rodenas et al., 2006) ont confirmé que, suite à la séparation néonatale, l'administration de probiotiques (*Lactobacillus paracasei* NCC2461) augmentait les fonctions gastro-intestinales.

Chapitre 4. Les hypothèses

L'IM est un processus inflammatoire important impliquant de nombreuses cytokines pro-inflammatoires. Chaque année au Canada, 14 000 patients souffrent de dépression suivant un IM. Cette condition est non-négligeable puisqu'elle augmente le risque de récurrences cardiovasculaires et augmente le risque de mortalité. Un modèle expérimental de dépression post-infarctus du myocarde a été développé chez le rat (Wann et al., 2006). Cette dépression post-IM implique l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires. De plus, cette condition est constamment accompagnée d'une mort cellulaire par apoptose dans certaines régions du cerveau. En effet, des cellules apoptotiques sont retrouvées dans l'amygdale et l'hippocampe; structures faisant partie du système limbique. Comme le système limbique est impliqué dans les émotions, il est concevable qu'une mort cellulaire physiologique dans cette région résulte en symptômes dépressifs. Donc un lien expérimental se dessine entre l'apoptose, les cytokines et l'IM.

Tel que décrit dans la section précédente, plusieurs études ont démontré que les probiotiques agissaient sur la balance des cytokines pro et anti-inflammatoires. En effet, les probiotiques semblent diminuer les cytokines pro-inflammatoires (IL-12 et TNF- α) et augmenter les cytokines anti-inflammatoires (IL-10) (Lorea Baroja et al., 2007).

Puisque les probiotiques agissent sur la balance des cytokines, les travaux présentés dans ce mémoire visaient à démontrer si cet effet pouvait diminuer l'apoptose observée dans le système limbique suite à un IM. De plus, suivant un IM, la reperfusion des tissus ischémiques, bien que nécessaire, peut engendrer des dommages nommés lésions de reperfusion. Comme discuté précédemment, ces lésions de reperfusion peuvent être causées par une réaction inflammatoire exagérée. Puisqu'en inhibant les lésions de reperfusion il est possible de diminuer la taille de l'infarctus et puisque les probiotiques diminuent les cytokines pro-inflammatoires, ces travaux voulaient démontrer si l'administration d'une combinaison des probiotiques *Lactobacillus helveticus* R0052 et *Bifidobacterium longum* R0175 pouvait diminuer la taille de l'IM.

Chapitre 5. *Lactobacillus helveticus* and *Bifidobacterium longum* taken in combination reduce the apoptosis propensity in the limbic system after myocardial infarction in a rat model.

Abstract

Myocardial infarction stimulates the release of pro-inflammatory substances that induce apoptosis in the limbic system. Pro-inflammatory cytokines are considered as the root cause of apoptosis although the mechanism is not fully explained and/or understood at this time. In addition, depression may induce gastrointestinal perturbations that maintain the elevated levels of pro-inflammatory cytokines. It has been shown that some specific probiotic formulations may reduce gastrointestinal problems induced by the stress and the pro/anti-inflammatory cytokine ratio. Therefore, we hypothesized that probiotics, when given prophylactically, may diminish the apoptosis propensity in the limbic system following a myocardial infarction. Male adult Sprague-Dawley rats were given probiotics (*Lactobacillus helveticus* and *Bifidobacterium longum* in combination) or placebo in their drinking water for 4 consecutive weeks. A myocardial infarction was then induced in the rats by occluding the left anterior coronary artery for 40 minutes. Rats were killed following a 72 hours reperfusion period. Infarct size was not different in the two groups. Bax/Bcl-2 (pro-apoptotic/anti-apoptotic) ratio and caspase-3 (pro-apoptotic) activity were reduced in the amygdala (lateral and medial), as well as in the dentate gyrus in the probiotics group when compared to the placebo. Akt activity (anti-apoptotic) was increased in these same three regions. No significant difference was observed in Ca1 and Ca3 for the different markers measured. In conclusion, the probiotics *Lactobacillus helveticus* and *Bifidobacterium longum*, given in combination as preventive therapy, reduced the predisposition of apoptosis found in different cerebral regions following a myocardial infarction.

Introduction

Myocardial infarction induces the release of pro-inflammatory substances that may affect the function of other tissues(1, 2). For example, we have observed that 3 days after myocardial infarction, different structures of the limbic system such as the amygdala, the hippocampus or the hypothalamus present an increase of apoptosis(3, 4). Although the link is not clearly established, this cell death may account for post-MI depression that we have documented in this experimental model(3, 5). Reduction of this early apoptosis by pharmacological interventions results in an attenuation of the depressive behavior(3) and thus seems to be beneficial since post-MI depression patients present a 3 to 4 times increase in mortality as compared to non-depressive patients(6, 7).

Pro-inflammatory cytokines are among the different substances that may explain the presence of apoptosis in the limbic system after myocardial infarction(4). Inhibition of the synthesis of pro-inflammatory cytokines by pentoxifylline is sufficient to prevent apoptosis in the limbic system(4). This observation leads us to predict that interventions that induce a shift in the anti-/pro-inflammatory cytokine ratio must reduce the apoptosis tendency in the limbic system after myocardial infarction.

Stress conditions, such as depression, may affect other organs that could perpetuate this condition. For example, it has been reported that stress predisposes individuals to develop functional bowel disorders or exacerbate symptoms of irritable bowel syndrome by decreasing mucosal barrier function(8, 9) and thus increasing translocation of LPS from gram negative bacteria(10, 11). Increased LPS translocation may result in maintenance of the activation of the inflammatory response system and elevated pro-inflammatory cytokines.

To prevent this gastrointestinal problems, probiotics defined as live microorganisms which, when consumed in adequate amounts confer a health benefit on the host, have been applied as an alternative approach of prevention and therapy. Probiotics may exert beneficial antibacterial effect on pathogens through the production of antibacterial substances, decrease

adhesion of both pathogens and their toxins, increase barrier functions and inhibit proinflammatory cytokine production(12, 13). It has been reported that a probiotic formulation beneficially affects the human stress response and its impact may be mediated through the gut-brain axis. In healthy volunteers suffering from stress-induced gastrointestinal symptoms in which the combination of probiotics *Lactobacillus helveticus* and *Bifidobacterium longum* was given showed a significant reduction of gastrointestinal symptoms(14). Other studies with *L. helveticus* has shown that it can reduce *E. coli* induced lesions(15) and modulate motility (in stress studies(16)) whereas *B. longum* has been shown to down-regulate TNF-alpha(17) and maintain remission in ulcerative colitis patients(18) indicating a potential anti-inflammatory action. Therefore, we hypothesize that the regular intake of two biotherapeutic microbes, *Lactobacillus helveticus* and *Bifidobacterium longum*, in combination in a probiotic formulation as a prophylactic agent, may diminish the apoptosis propensity induced by the inflammatory condition observed after myocardial infarction in different brain regions.

Material and Methods

Experimental Groups (animals and housing)

A total of 35 rats were used in this experiment. They were 10 weeks old adult Male Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, Saint-Constant, Canada) weighing between 325 and 350g (at the beginning of the experiment). The rats were housed individually under constant conditions (temperature of 21 to 22°C and humidity of 40 to 50%). The animals were maintained on a 12-hr dark-light cycle which began at 8:00 a.m. Chow pellets (5075-U.S. Charles River Rodent) and tap water were available *ad libitum* throughout the study. An acclimatization period of 5 days after delivery by the supplier was allowed before the rats were randomly distributed to one of two groups, probiotics (n = 18) or placebo (n = 17). Both of the groups underwent a 40 minutes occlusion of the left anterior descending coronary artery. The animals were fed over a 4 week period and were killed following 3 days of reperfusion.

Probiotic treatment

The commercial probiotic given was a combination of two genus; *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 (Probio'Stick™ provided by Institut Rosell inc., Montreal, Canada). The probiotics were administered by dissolving the freeze-dried culture or the vehicle only (maltodextrin) in 200ml of drinking tap water. Each rat in the probiotic group received a daily dose of 10^9 CFU/ml. The drinking solution was newly prepared every second or third day for 4 consecutive weeks. Water intake was monitored throughout the entire investigation to ensure enough bacteria were administered. The body weight of each rat was also monitored every second or third day.

In-vivo surgical procedure

Animals underwent anesthesia following a ketamine/xylazine (50mg/kg and 5mg/kg respectively) i.m. injection. Subsequently, the rats were intubated and anesthesia was maintained using isoflurane (1.5%) ventilation. ECG and heart rate were monitored throughout the procedure using electrodes placed on their paws. A left thoracotomy was carried out at the fifth intercostal space permitting the occlusion of the left anterior descending coronary artery using a 4-0 silk suture (Syneture; Covidien, Mansfield, MA). Ischemia was confirmed by alterations of the ST segment and myocardial surface cyanosis. After 40 minutes of ischemia, the thread was removed permitting reperfusion of the myocardial tissue. After the thorax was sutured by means of a 2-0 silk suture (Syneture; Covidien, Mansfield, MA), the animals were given an antibiotic injection (15,000IU penicillin G; Duplocillin LA, Intervet Canada Ltd, Ontario, Canada)) as well as an analgesic injection (2mg/kg butorphanol) before being returned to their respective cages.

Decapitation, measurements the area at risk of the heart and myocardial infarction size and tissue dissection

After 3 days of reperfusion, the rats were restrained in a cone bag and rapidly decapitated. Decapitation was preferred as the killing method to avoid any alteration of biochemical pathways that could arise ensuing anesthesia or CO₂ exposure. The heart was taken and the brain was placed on a dish positioned on ice. Brain regions were identified according to the atlas of Paxinos and Watson(19); frontal cortex, prefrontal cortex, hippocampus (Ca1, Ca3 and dentate gyrus), amygdala (medial and lateral parts) and hypothalamus (anterior and posterior parts). Tissues were frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until needed.

The heart was removed and the left anterior descending coronary artery was occluded at the same site to establish the area at risk (AR) with infusion of Evans Blue (0.5%) by retrograde perfusion into aorta. The heart was then placed at -80°C for 5 minutes and sliced in 4 to 5 transverse sections of 2 mm. Each section was incubated 5 minutes at 37°C in a triphenyltetrazolium chloride solution (TTC 1%, pH 7.4) to better distinguish the area of necrosis (I) from AR. Myocardial infarction was expressed as a percentage of necrosis (I) of the AR ($[I/AR] \times 100$). Additionally, AR was expressed as a percentage of left ventricle (LV) area.

Caspase-3 activity

Cytosolic proteins were extracted in lysis buffer (1% Triton X-100, 0.32 M sucrose, 10 mol/mL Tris [pH 8.0], 5 mmol/mL ethylenediamine tetra-acetate, 2 mmol/mL DL-1,4-dithiothreitol [DLL], 1 mmol/mL phenylmethanesulfonyl fluoride [PMSF], 10 mg/mL Leupeptin, 10 mg/mL Pepstatin A, 10 g/mL Aprotinin). Enzymatic reactions were carried out in a reaction buffer (50 mmol/mL Tris [pH 7.5], 5 mmol/mL MgCl₂, 1 mmol/mL ethylene glycol bis-2-aminoethyl ether-N,N',N_n,n'-tetra-acetic acid, 0.1% 3-cholamidopropyl dimethylammonio]-1-propanesulfonate [CHAPS], 1 mmol/mL DTT), with 25 mg of proteins and a fluorogenic substrate, N-acetyl-asp-glu-val-asp-7-amido-4

methylcoumarin (Ac-DEVD-AMC) (40 $\mu\text{mol/mL}$). Reactions were incubated at 37°C for 3 hours and stopped with the addition of 0.4 M NaOH and 0.4 M glycine buffer. Fluorescence was quantified using a spectrofluorometer (Photon Technology International, Lawrenceville, NJ) at an excitation wavelength of 365 nm and an emission wavelength of 465 nm.

Western blot

Brain tissue samples were lysed in a buffer containing protease and phosphatase inhibitors (leupeptin, microcystine and benzamidine). After solubilisation, equal amounts of proteins (60 μg) in each line were loaded on a 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and after migration, proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane. Primary antibody directed against Akt (1:2000), Phospho-Akt (1:1000; NEB biolabs), Bax or Bcl-2 (1:500; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, Calif) was incubated overnight at 4°C. After 3 washes, a secondary peroxidase-coupled antibody (1:5000) was added for 1 hour at room temperature (anti-rabbit immunoglobulin-horseradish peroxidase [IgG-HRP] from Santa Cruz Biotechnology, Calif.). A Renaissance chemiluminescence kit (Perkin Elmer, Mississauga, Ont.) was used to visualize the bands, and the quantitative analysis was conducted with a Kodak ImageStation. After quantification, membranes were placed in stripping buffer (0.1 M glycine, 1% SDS, pH 2.0, 1 hour at room temperature). The same procedures were repeated with the other antibody (Akt or Phospho-Akt) to obtain the Phospho-Akt:Akt ratio.

Statistics

Results are expressed as mean (\pm standard error of the mean). Differences between groups were evaluated using student t-test. $p < 0.05$ was considered significant. All the variances were equal and the data normally distributed.

Ethics Statement

The investigation conformed to the *Animal Care guidelines* published by the Canadian Council and the procedures were approved by the Local Animal Care Committee.

Results

Infarct Size

Area at risk (AR), expressed as a percentage of left ventricle (LV) area was similar for both groups (placebo $53.0 \pm 4.3\%$; probiotics $62.1 \pm 8.3\%$ of LV; $p = 0.36$). Following 40 minutes of ischemia and 72 hours of reperfusion, the myocardial infarct size (I/AR) represented $44.1 \pm 2.5\%$ of the area at risk for the placebo group as compared to $45.2 \pm 3.3\%$ for the probiotics group ($p = 0.80$). There were no significant differences between the probiotic and the placebo groups.

Bax:Bcl-2 content

Bax/Bcl-2 ratio was measured in five different regions (Figure 1). A significant decrease in Bax/Bcl-2 ratio was observed in the dentate gyrus, medial and lateral amygdala in the probiotic group as compared to the placebo group. In contrast, Ca1 and Ca3 regions indicate no significant difference in the ratio between groups.

Caspase-3 activation

After 72 hours of reperfusion, caspase-3 activity was significantly reduced in the probiotic group in the lateral amygdala, medial amygdala and dentate gyrus as compared to the placebo group (Figure 2). No significant difference was observed between the groups in the Ca1 and Ca3 regions.

PhosphoAkt:Akt content

PhosphoAkt:Akt ratios were significantly different between the placebo and probiotic groups in the 3 different brain regions, lateral amygdala, medial amygdala, Dentate gyrus (Figure 3). No significant difference was observed between groups in the Ca1 and Ca3 regions.

Discussion

The data obtained in this study are the first reported observation that the gut-brain axis can modulate the apoptosis propensity observed in the limbic system after myocardial infarction. However, there are numerous observations in the literature suggesting a link between depression and gastrointestinal diseases(11). It has been observed that intestinal mucosal dysfunction, characterized by an increased translocation of gram-negative bacteria, plays a role in the inflammatory pathophysiology of depression inducing the sickness behavior(11). In a mouse model, depression increases the sensitivity to experimental colitis, which can be reversed by antidepressants(20). It is also reported that patients with irritable bowel syndrome have a high prevalence of psychiatric disorders suggesting a link between brain and gut. The mechanisms are not clearly established, but it has been suggested that prolonged exposure to stress can induce low-grade inflammation, causing ultrastructural epithelial abnormalities, alter bacterial-host interactions allowing an increase in bacteria translocation(10) which in turn affects the brain. For example, treatment of mice with lipopolysaccharide (LPS) increases insulin transport across the blood brain barrier (BBB) by about threefold. The brain endothelial cells, which comprise the BBB, secrete many substances including cytokines and such secretion can be stimulated from one side of the BBB with release into the other side(21). However, in contradiction to this hypothesis, Verdu et al showed that the bacterial content of the gut influenced the rate of recovery of host pathophysiology induced by chronic *H. pylori* infection, including behavioural changes, and that these changes were not associated with modulation of intestinal permeability(22).

Probiotics have multiple and diverse influences on the host which may include antimicrobial activity, enhancement of barrier function and immunomodulation. Recent

investigations suggest specific probiotics and gut microbiota can impact the immune system at both a systemic and a mucosal level(23). Studies show that certain probiotic bacteria may increase the production of anti-inflammatory cytokines including IL-10(12). Alternately, probiotics could inhibit pro-inflammatory cytokine production such as TNF α and IL-8, two pro-inflammatory cytokines(24). The alteration of the pro/anti-inflammatory cytokine balance may explain the reduction of apoptosis that we observed in the different limbic regions. While the mechanisms have not been elucidated, it has been suggested that pro-inflammatory cytokines participate in the limbic cell death after myocardial infarction(4).

The effect of probiotics on the susceptibility of apoptosis observed in the amygdala and in the dentate gyrus is similar to drugs with anti-inflammatory properties tested in our myocardial infarction model such as cytokine inhibitor(4), anti-depressant(3) or A_{2A} adenosine receptor agonist(25).

In the present study, we observed that probiotics are unable to reduce the apoptosis observed in the Ca1 suggesting that different mechanisms are involved in this region. Apoptosis can be induced by at least two different pathways, extrinsic and intrinsic, although there are some proteins that are common to both such as caspase-3(26). Our data from amygdala and dentate gyrus suggests that the extrinsic signaling pathway is involved in the apoptosis in these regions as shown by the change in the Bax/Bcl-2 ratio. In contrast, intrinsic signaling pathway may be involved in the apoptosis observed in Ca1. It has been shown that the Ca1 region of the brain is the most sensitive to hypoxia(27). It is well known that hypoxia can activate the intrinsic signaling pathway(28) and thus can explain why probiotics are unable to reduce the apoptosis tendency in Ca1. However previous data indicates that Ca1 apoptosis can be attenuated in presence of pentoxifylline. This observation leads us to formulate the hypothesis that in addition to hypoxia, cytokines must also be involved in the apoptosis observed in Ca1. This can be verified by the effect of pentoxifylline(4) on the Bax/Bcl-2 ratio. The effect of *L. helveticus* and *B. longum* in

combination on the extrinsic apoptotic pathway is probably not sufficient to attenuate apoptosis susceptibility in this region.

We also observe a higher level of activation of Akt in presence of the combination of *L. helveticus* and *B. longum* as compared to the placebo group. Akt plays a critical role in the proliferation, differentiation and apoptosis; and inhibition of the PI3K/Akt invariably leads to cell cycle arrest and/or apoptosis(29-32). One possibility that explains this result is a low molecular weight soluble factor released from the bacteria that stimulates Akt activation(13). Alternatively, it has been shown that some proteins isolated from bacteria may activate Akt(33). However this is less probable since this protein needs to be present in the limbic system to activate Akt.

Myocardial reperfusion is associated with an important inflammatory response that can modulate the infarct size(34, 35). Since specific probiotic strains are capable of acting on the balance between pro/anti-inflammatory cytokines, the probiotics used in our model had the potential of attenuating the inflammatory process and the infarct size. However, the absence of the effect of probiotics on MI size is in accordance with our previous results indicating that pentoxifylline, a cytokine synthesis inhibitor, did not affect the infarct size(4). Although many studies seem to indicate that the reduction of pro-inflammatory cytokines has a beneficial effect on infarct size(36, 37), other studies show that diminution of pro-inflammatory cytokines such as TNF α have no beneficial effect(38-40). Overall, in our experimental model, the administration of *Lactobacillus helveticus* and *Bifidobacterium longum* in combination as a prophylactic agent seems to have only a minor effect on myocardial infarct size. However, this lack of effect eliminates the infarct size as a possible explanation for the reduction of apoptosis susceptibility in the limbic system.

In conclusion, the probiotic preparation containing both *Lactobacillus helveticus* and *Bifidobacterium longum* in combination reduced the apoptosis susceptibility observed in the limbic system after myocardial infarction but did not have any significant effect on myocardial infarct size.

Acknowledgements

The authors thank Caroline Bouchard for her skilful assistance and technical expertise.

Conflicts of interest

G.R. is a scholar of “*Fonds de la recherche en santé du Québec*” (FRSQ). T.M.B. and S.K. hold a studentship from the FRSQ. This study was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC; # 250234-07) and Institut Rosell inc. All the authors declare that they have no conflict of interest with respect to this study or its publication.

SAG: Contributes to experiments, data analysis and writing.

TMB: Contributes to experiments, data analysis and writing.

SK: Contributes to experiments, data analysis and writing.

LLM: Contributes to experiments, data analysis and writing.

IR: Contributes to experiments, data analysis and writing.

TAT: Contributes to the conception of the experiments, data analysis and writing

RG: Contributes to the conception of the experiments, data analysis and writing

GR: Contributes to the conception of the experiments, data analysis and writing

References

1. Francis J, Chu Y, Johnson AK, Weiss RM, Felder RB. Acute myocardial infarction induces hypothalamic cytokine synthesis. *Am J Physiol.* 2004;286:H2264-H71.

2. Francis J, Zhang Z-H, Weiss RM, Felder RB. Neural regulation of the proinflammatory cytokine response to acute myocardial infarction. *Am J Physiol.* 2004;287:H791-H7.
3. Wann BP, Bah TM, Kaloustian S, Boucher M, Dufort AM, Le Marec N, et al. Behavioural signs of depression and apoptosis in the limbic system following myocardial infarction: effects of sertraline. *J Psychopharmacol.* 2008 Jun 18.
4. Wann BP, Boucher M, Kaloustian S, Nim S, Godbout R, Rousseau G. Apoptosis detected in the amygdala following myocardial infarction in the rat. *Biol Psychiatry.* 2006 Mar 1;59(5):430-3.
5. Wann BP, Bah TM, Boucher M, Courtemanche J, Le Marec N, Rousseau G, et al. Vulnerability for apoptosis in the limbic system after myocardial infarction in rats: a possible model for human postinfarct major depression. *J Psychiatry Neurosci.* 2007 Jan;32(1):11-6.
6. Frasure-Smith N, Lesperance F, Talajic M. Depression following myocardial infarction. Impact on 6-month survival. *JAMA.* 1993 Oct 20;270(15):1819-25.
7. Lesperance 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 Mar 5;105(9):1049-53.
8. Mawdsley JE, Rampton DS. Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut.* 2005 Oct;54(10):1481-91.

9. Monnikes H, Tebbe JJ, Hildebrandt M, Arck P, Osmanoglou E, Rose M, et al. Role of stress in functional gastrointestinal disorders. Evidence for stress-induced alterations in gastrointestinal motility and sensitivity. *Dig Dis*. 2001;19(3):201-11.
10. Gareau MG, Silva MA, Perdue MH. Pathophysiological mechanisms of stress-induced intestinal damage. *Curr Mol Med*. 2008 Jun;8(4):274-81.
11. Maes M, Kubera M, Leunis JC. The gut-brain barrier in major depression: intestinal mucosal dysfunction with an increased translocation of LPS from gram negative enterobacteria (leaky gut) plays a role in the inflammatory pathophysiology of depression. *Neuro Endocrinol Lett*. 2008 Feb;29(1):117-24.
12. Lammers KM, Brigidi P, Vitali B, Gionchetti P, Rizzello F, Caramelli E, et al. Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003 Sep 22;38(2):165-72.
13. Yan F, Polk DB. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem*. 2002 Dec 27;277(52):50959-65.
14. Diop L, Guillou S, Durand H. Probiotic food supplement reduces stress-induced gastrointestinal symptoms in volunteers: a double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Nutrition Research*. 2008;28:1-5.
15. Sherman PM, Johnson-Henry KC, Yeung HP, Ngo PS, Goulet J, Tompkins TA. Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements. *Infect Immun*. 2005 Aug;73(8):5183-8.

16. Gareau MG, Jury J, MacQueen G, Sherman PM, Perdue MH. Probiotic treatment of rat pups normalises corticosterone release and ameliorates colonic dysfunction induced by maternal separation. *Gut*. 2007 Nov;56(11):1522-8.
17. Wallace TD, Bradley S, Buckley ND, Green-Johnson JM. Interactions of lactic acid bacteria with human intestinal epithelial cells: effects on cytokine production. *J Food Prot*. 2003 Mar;66(3):466-72.
18. Haskey N, Dahl WJ. Synbiotic Therapy Improves Quality of Life and Reduces Symptoms in Pediatric Ulcerative Colitis. *Infant, Child, and Adolescent Nutrition* 2009.
19. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press; 1986.
20. Varghese AK, Verdu EF, Bercik P, Khan WI, Blennerhassett PA, Szechtman H, et al. Antidepressants attenuate increased susceptibility to colitis in a murine model of depression. *Gastroenterology*. 2006 May;130(6):1743-53.
21. Banks WA. The blood-brain barrier as a regulatory interface in the gut-brain axes. *Physiol Behav*. 2006 Nov 30;89(4):472-6.
22. Verdu EF, Bercik P, Huang XX, Lu J, Al-Mutawaly N, Sakai H, et al. The role of luminal factors in the recovery of gastric function and behavioral changes after chronic *Helicobacter pylori* infection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008 Oct;295(4):G664-70.
23. Ng SC, Hart AL, Kamm MA, Stagg AJ, Knight SC. Mechanisms of action of probiotics: Recent advances. *Inflamm Bowel Dis*. 2008 Jul 14.

24. Bai AP, Ouyang Q, Xiao XR, Li SF. Probiotics modulate inflammatory cytokine secretion from inflamed mucosa in active ulcerative colitis. *Int J Clin Pract*. 2006 Mar;60(3):284-8.
25. Boucher M, Wann BP, Kaloustian S, Cardinal R, Godbout R, Rousseau G. Reduction of apoptosis in the amygdala by an A2A adenosine receptor agonist following myocardial infarction. *Apoptosis*. 2006 Jul;11(7):1067-74.
26. Adams JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev*. 2003 Oct 15;17(20):2481-95.
27. Sugawara T, Fujimura M, Noshita N, Kim GW, Saito A, Hayashi T, et al. Neuronal death/survival signalling pathways in cerebral ischemia. *NeuroRx*. 2004 Jan;1(1):17-25.
28. Reyland ME. Protein kinase C and apoptosis. In: Srivastava R, editor. *Apoptosis, Cell signaling , and human Diseases*. Totowa, NJ: Humana Press; 2007. p. 31-55.
29. Datta K, Bellacosa A, Chan TO, Tsichlis PN. Akt is a direct target of the phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*. 1996;271:30835-9.
30. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 1997;91:231-41.
31. Lawlor MA, Alessi DR. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci*. 2001 Aug;114(Pt 16):2903-10.

32. Morley S, Wagner J, Kauppinen K, Sherman M, Manor D. Requirement for Akt-mediated survival in cell transformation by the *dbl* oncogene. *Cell Signal*. 2007 Jan;19(1):211-8.
33. Yan F, Cao H, Cover TL, Whitehead R, Washington MK, Polk DB. Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. *Gastroenterology*. 2007 Feb;132(2):562-75.
34. de Lorgeril M, Rousseau G, Basmadjian A, St-Jean G, Tran D, Latour J. Spatial and temporal profiles of neutrophil accumulation in the reperfused ischemic myocardium. *Am J Cardiovasc Path*. 1990;3:143-54.
35. Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2004;61:481-97.
36. Gu Q, Yang XP, Bonde P, DiPaula A, Fox-Talbot K, Becker LC. Inhibition of TNF-alpha reduces myocardial injury and proinflammatory pathways following ischemia-reperfusion in the dog. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006 Dec;48(6):320-8.
37. Maekawa N, Wada H, Kanda T, Niwa T, Yamada Y, Saito K, et al. Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor-alpha. *J Am Coll Cardiol*. 2002 Apr 3;39(7):1229-35.
38. Deuchar GA, Opie LH, Lecour S. TNFalpha is required to confer protection in an in vivo model of classical ischaemic preconditioning. *Life Sci*. 2007 Apr 10;80(18):1686-91.
39. Dawn B, Guo Y, Rezazadeh A, Wang OL, Stein AB, Hunt G, et al. Tumor necrosis factor-alpha does not modulate ischemia/reperfusion injury in naive myocardium but is

essential for the development of late preconditioning. *J Mol Cell Cardiol.* 2004 Jul;37(1):51-61.

40. McVey M, Perrone MH, Clark KL. Does tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) contribute to myocardial reperfusion injury in anaesthetized rats? *Gen Pharmacol.* 1999 Jan;32(1):41-5.

Western Blot Bax/Bcl-2 after 72 hours of reperfusion

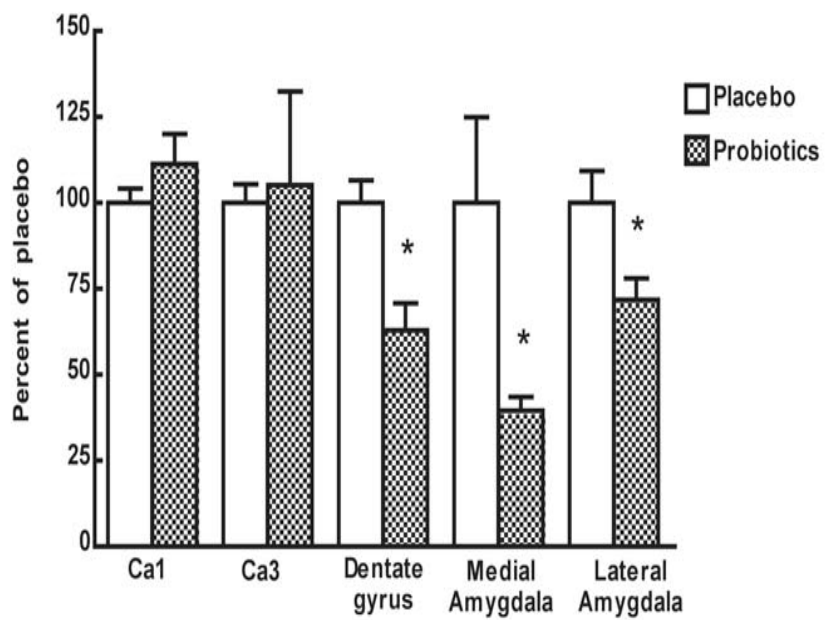


Figure 1

Figure 1. Bax/Bcl-2 ratio in the different regions assessed by Western blot (n= 6-8/ group; *p<0.05 indicating a significant difference between the placebo group and the probiotic group. Ca1 p = 0.26; Ca3 p = 0.86; Dentate gyrus p = 0.007; Medial amygdala p =0.034; and Lateral amygdala p = 0.01).

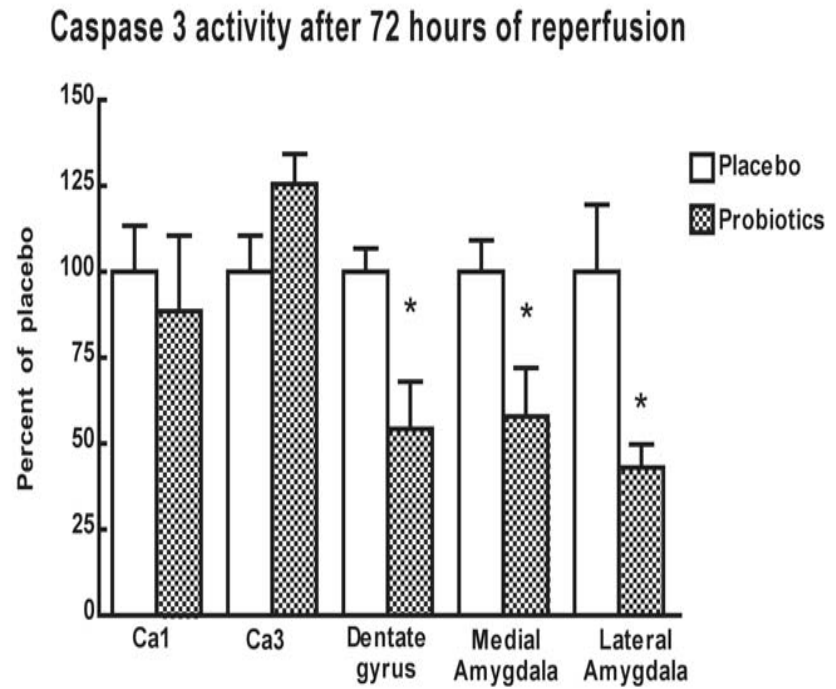


Figure 2

Figure 2. Caspase-3 activity in the different regions assessed by in vitro spectrofluorescence (n= 6-8/ group; *p<0.05 indicating a significant difference between the placebo group and the probiotic group. Ca1 p = 0.67; Ca3 p =0.09, Dentate gyrus p = 0.017; Medial amygdala p = 0.026; Lateral amygdala p = 0.015).

Western Blot PhosphoAkt/Akt after 72 hours of reperfusion

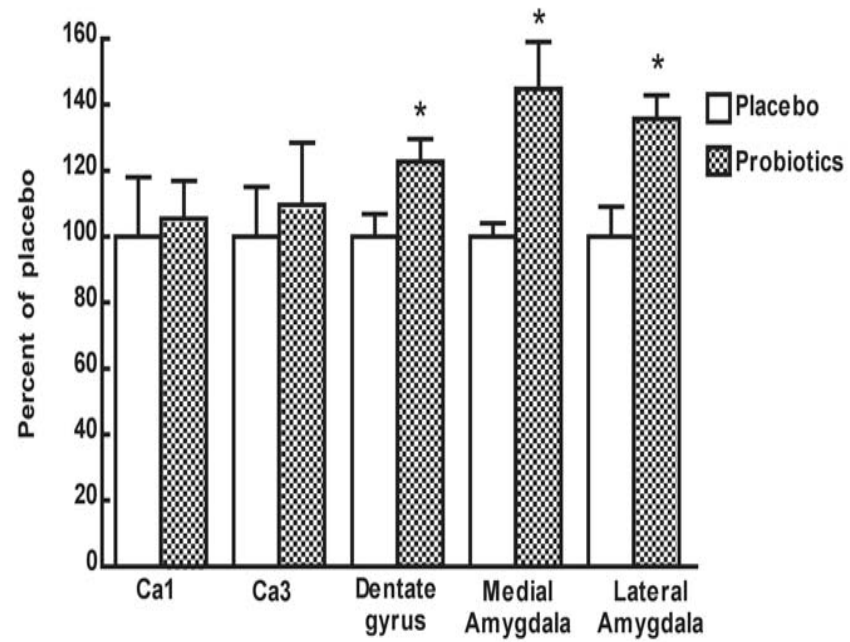


Figure 3

Figure 3. Akt activity in the different regions assessed by the ratio of phospho-Akt on total Akt evaluated by western blot (n= 6-8/ group; *p<0.05 indicating a significant difference between the placebo group and the probiotic group. Ca1 p = 0.80; Ca3 p = 0.69; Dentate gyrus p = 0.032, Medial amygdala p = 0.004; Lateral amygdala p = 0.01).

Chapitre 6. La discussion générale des résultats

Dans cette étude, nous avons évalué l'effet d'une combinaison des probiotiques *Lactobacillus helveticus* R0052 et *Bifidobacterium longum* R0175 sur l'apoptose dans le système limbique suite à un IM chez un modèle animal. Nous avons observé une diminution de l'apoptose dans l'amygdale latérale et médiale ainsi que dans le gyrus denté chez le groupe traité aux probiotiques. Cependant, nous n'avons pas observé de diminution de la taille de l'infarctus du myocarde chez le groupe traité aux probiotiques par rapport au groupe placebo.

Nous avons démontré que, suivant un IM chez le rat, la production de cytokines pro-inflammatoires pouvait induire l'apoptose dans certaines régions du système limbique (Wann et al., 2006). Puisqu'il y a présence d'apoptose, causée par les cytokines pro-inflammatoires, dans le système limbique et puisque ce dernier est responsable, entre autre, des émotions ceci pourrait expliquer l'occurrence de dépression suivant un IM. En effet, un lien a été proposé entre la mort cellulaire dans le système limbique et les marqueurs comportementaux de la dépression (Wann et al., 2007). De plus, cette apoptose discernée dans l'amygdale et l'hippocampe concorde avec la réduction de volume observé dans ces structures chez les patients dépressifs (Sheline et al., 1998). Comment peut-on expliquer que l'administration des probiotiques *Lactobacillus helveticus* R0052 et *Bifidobacterium longum* R0175 en combinaison diminue l'apoptose observée dans le système limbique? Cette observation suggère que l'intestin exerce un rôle important au niveau du cerveau, l'effet qu'a le cerveau sur l'intestin a longuement été établi. En effet, les premières études scientifiques ayant comme sujet l'effet du cerveau sur le système gastro-intestinal remontent aux années soixante. Durant ces années, il a été démontré que certains changements au niveau du cerveau, tels que le stress ou l'anxiété, influencent la physiologie de l'intestin en altérant l'environnement de la microflore intestinale (communications personnelles du Docteur Stephen Collins du Centre Médical de l'Université McMaster). En particulier, le syndrome du côlon irritable est associé avec des troubles qui sont non seulement gastro-intestinaux mais aussi psychosociaux et cette

maladie est très souvent accompagnée de symptômes dépressifs (Desbonnet et al., 2008). De plus, il est suggéré que des évènements quotidiens stressants au niveau émotionnel provenant de l'environnement contribuent au développement et à la réactivation de l'inflammation intestinale dans les troubles fonctionnels intestinaux, dans le syndrome du côlon irritable ainsi que dans le développement des allergies alimentaires (Collins, 2001). En effet, des stimuli stressants sont reconnus comme étant capables d'affecter des fonctions gastro-intestinales telles que la motilité et la sécrétion intestinale ainsi qu'augmenter la perméabilité cellulaire (Eutamene and Bueno, 2007).

Il est davantage admis que la flore intestinale puisse, à son tour, influencer la physiologie et l'immunité au niveau de la muqueuse intestinale et que des perturbations à ce niveau peuvent aussi influencer le comportement. Par exemple, les patients souffrants du syndrome du côlon irritable ont une plus grande chance de souffrir de désordres d'ordre psychiatrique. Une dysfonction au niveau de la muqueuse intestinale, caractérisée par une augmentation de la translocation de bactéries à Gram négatif, jouerait un rôle dans la physiopathologie inflammatoire de la dépression en induisant des comportements de maladie (fièvre, activations neuroendocriniennes, anorexie, anhédonie, repli sur soi, perte d'intérêt pour l'environnement...). Comment l'intestin peut-il affecter le cerveau? Suite à un IM, qu'est-ce qui cause la mort cellulaire observée dans certaines régions du cerveau? Comment les probiotiques peuvent-ils diminuer l'apoptose observée dans certaines régions du cerveau? Qu'est-ce que l'infarctus du myocarde, la dépression post-infarctus du myocarde et les probiotiques ont tous en commun? Toutes ces questions semblent converger vers une réponse commune (malgré qu'elle ne soit sûrement pas exclusive) ; les cytokines.

Des stress externes (psychologiques) ainsi que des stress internes (organiques), induisant l'activation de la réponse du système inflammatoire, sont reliés à l'apparition d'épisodes dépressifs (Maes et al., 2008). Puisque certaines maladies auto-immunes sont considérées comme des stress internes, dans notre modèle expérimental de dépression post-infarctus du myocarde, il est raisonnable de considérer que l'IM agisse comme un stress organique. En

effet, tel que mentionné précédemment, l'IM cause une augmentation systémique des niveaux de cytokines pro-inflammatoires. Maes et coll. ont démontré qu'un stress psychologique peut activer le système inflammatoire en augmentant la production de cytokines pro-inflammatoires telles que IFN- γ et TNF- α (Maes et al., 1998). L'hypothèse de l'activation du système immunitaire comme cause de dépression majeure provient du fait qu'il y a une haute comorbidité entre la dépression majeure et les maladies inflammatoires telles que la sclérose en plaque, les maladies coronariennes, le syndrome du côlon irritable ainsi que l'arthrite rhumatoïde (Maes et al., 2008). Puisque l'IM implique un processus inflammatoire important et augmente la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'Il-1 β , l'Il-6 et le TNF- α (Prabhu et al., 2000, Deten and Zimmer, 2002), il est concevable que cette condition inflammatoire participe à la dépression majeure suivant l'augmentation de ces cytokines. Comment les cytokines pro-inflammatoires peuvent-elles affecter le système nerveux central (SNC)? Il y a un amoncellement de données qui démontrent que l'inflammation en périphérie peut affecter les fonctions du cerveau (Altman, 1999, Pollmacher et al., 2002). Suivant un IM, les cytokines relâchées par le myocarde reperfusé (principalement l'Il-1 et l'Il-6), au site de l'inflammation, semblent jouer un rôle important en tant que premiers signaux. Ces cytokines vont stimuler la production de cytokines pro-inflammatoires (Il-1 β et TNF- α entre autre) dans le cerveau selon différentes voies telles que décrites dans la revue de la littérature.

Il a été démontré que lors de la dépression majeure, une barrière intestinale perméable permet la translocation de LPS (lypopolysaccharide; une endotoxine) produit par les bactéries à Gram négatif, augmentant ainsi la réponse inflammatoire. En effet, une augmentation de LPS systémique va entraîner une augmentation des niveaux de TNF- α dans le cerveau et ceux-ci peuvent rester élevés pendant plus de dix mois (Qin et al., 2007). Une augmentation de la cytokine TNF- α dans le cerveau pourrait activer l'apoptose via la voie extrinsèque dans certaines régions du cerveau.

De plus, cette augmentation de la perméabilité de la barrière intestinale et l'activation du système inflammatoire suite à la dépression majeure perpétuent la réponse inflammatoire.

D'un autre côté, l'augmentation de la perméabilité de la barrière intestinale peut aussi s'observer avant la présence de la dépression majeure. Une activation de la réponse inflammatoire par des stress internes caractérisés par une augmentation d'IFN- γ et d'Il-6 (comme l'IM) entraîne la perte de l'intégrité de la barrière intestinale et permet la création de grands espaces entre les cellules épithéliales de l'intestin. Cette perte de fonction des cellules épithéliales permet le passage d'entérobactéries à travers la muqueuse (Gareau et al., 2008). Une augmentation de la translocation de LPS cause non seulement une réponse inflammatoire systémique, mais aussi une neuro-inflammation centrale. En effet, plusieurs études suggèrent un lien entre la dépression majeure et une réponse auto-immune dirigée contre les phospholipides (Maes et al., 1993). Ceci peut-être expliqué par le fait que les entérobactéries possèdent des sites antigéniques très similaires à ceux des structures lipidiques dans les tissus neuronaux (Maes et al., 2008). Donc, ces antigènes iront dans maints tissus et susciteront l'inflammation locale puis, lorsque la production d'auto-anticorps surviendra, cette inflammation deviendra chronique. Éventuellement, cette translocation systémique de LPS pourra créer une réponse auto-immunitaire dirigée contre les tissus neuronaux partageant le caractère antigénique du LPS.

Les probiotiques affectent directement le système gastro-intestinal en diminuant la colonisation par des pathogènes, en modulant le système immunitaire ainsi qu'en augmentant la fonction de la barrière intestinale. Les probiotiques ont donc des effets bénéfiques locaux. O'Mahony et coll. ont montré que la bactérie probiotique *Bifidobacterium infantis* 35624 soulageait les symptômes du syndrome du côlon irritable en normalisant le ratio de cytokines pro-inflammatoires Il-12/Il-10 (O'Mahony et al., 2005). Par contre, cet impact avantageux que semblent avoir les probiotiques au niveau du système immunitaire de la muqueuse se retrouve aussi au niveau systémique. En effet, des études ont démontré que l'administration de certains probiotiques peut réduire considérablement l'inflammation chez des rats arthritiques (Baharav et al., 2004). Il a donc été suggéré que

l'effet favorable des probiotiques provienne de leur capacité d'altérer la balance des cytokines pro et anti-inflammatoires. Des études ont établi que les probiotiques peuvent diminuer des cytokines pro-inflammatoires comme l'Il-12 et TNF- α et peuvent induire la synthèse de cytokines anti-inflammatoires telles que l'Il-10 (Lorea Baroja et al., 2007, Lammers et al., 2002). Madsen et coll. ont démontré qu'un mélange de probiotiques nommé VSL#3 diminuait la production de cytokines pro-inflammatoires (comme IFN γ) responsables de l'augmentation de la perméabilité intestinale (Madsen et al., 2001). C'est donc cet effet inhibiteur dirigé vers les cytokines pro-inflammatoires, suite à un IM, qui pourrait potentiellement expliquer la diminution de l'apoptose dans certaines régions du système limbique observée lors de cette expérience.

Par ailleurs, la diminution de l'apoptose dans certaines régions du système limbique (l'amygdale et le gyrus denté) conférée par les probiotiques et observée dans cette expérience est similaire à l'effet d'autres drogues testées dans ce même modèle. En effet, des drogues ayant des propriétés anti-inflammatoires comme un inhibiteur de cytokines (pentoxifylline) (Wann et al., 2006), un antidépresseur (sertraline) (Wann et al., 2008, Wann et al., 2009) et un agoniste des récepteurs de l'adénosine A_{2A} (Boucher et al., 2006) semblerait avoir la capacité de potentiellement diminuer l'apoptose limbique suite à un IM. De plus, il a été démontré, lors d'études *in vitro*, qu'en plus de diminuer les symptômes de dépression, les antidépresseurs tricycliques et les antidépresseurs inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine peuvent aussi supprimer la production de cytokines pro-inflammatoires et promouvoir celle des cytokines anti-inflammatoires (Altman, 1999). Puisque les probiotiques semblent avoir un effet similaire sur la balance des cytokines anti- et pro-inflammatoires et que cette même balance semble jouer un rôle important dans la pathophysiologie de la dépression (Maes et al., 1995); les probiotiques peuvent-ils possiblement être des agents antidépresseurs?

Plusieurs études se sont interrogées à savoir si les probiotiques possèdent des propriétés antidépresseives. En effet, Sherman et coll. (Sherman, 2004) ont démontré qu'en plus de leurs effets sur le système immunitaire, les probiotiques améliorent la malabsorption des

glucides qui est associée non seulement aux signes avant-coureurs de la dépression mais aussi à des niveaux de tryptophane (précurseur de la sérotonine) réduits. De plus, Desbonnet et coll. (Desbonnet et al., 2008) ont montré que chez le rat Sprague-Dawley l'administration de *Bifidobacteria infantis*, en prophylaxie pendant 14 jours, atténue les réponses immunitaires pro-inflammatoires et augmente les niveaux de tryptophane.

Les probiotiques, par leurs actions bénéfiques sur le tractus gastro-intestinal (maintient de la barrière intestinale), la production de cytokines anti-inflammatoires et la suppression de cytokines pro-inflammatoires ainsi que leurs effets favorables sur l'axe HPA, pourraient potentiellement contribuer à la diminution de l'apoptose dans le système limbique suite à un IM et, du moins, participer à la diminution de la dépression post-infarctus du myocarde.

Puisque la microflore intestinale a la capacité de réguler la réponse de l'axe HPA suivant un stress (Sudo et al., 2004), nous soupçonnons que les probiotiques peuvent agir sur l'axe HPA suivant un IM. Certaines études ont démontré que l'administration de probiotiques normalisait l'activité de l'axe HPA. Les résultats obtenus par Gareau et coll. révèlent que, dans un modèle animal de séparation maternelle (donc dans un modèle de stress), l'administration de certains probiotiques améliore l'hyperactivité de l'axe HPA (Gareau et al., 2007). Par contre, les mécanismes précis élucidant comment les probiotiques modulent l'axe intestin-cerveau demeurent encore inconnus. Il a été démontré que certains probiotiques ont la capacité de provoquer la production d'Il-10 par les cellules régulatrices T en modulant les cellules dendritiques (Smits et al., 2005). De plus, l'Il-10 et son récepteur sont exprimés dans les tissus de l'hypothalamus et de l'hypophyse et donc cette interleukine peut orchestrer l'expression de gènes dans des cellules originaires de l'axe HPA (Tu et al., 2007). En effet, il a été montré que lors d'un stress immunitaire et physiologique, des souris normales produisaient moins de corticostérone que des souris transgéniques déficientes en Il-10 (Eutamene and Bueno, 2007). Puisque l'interleukine-10 est un important régulateur endogène de l'axe HPA et parce que les probiotiques favorisent la production de cette dernière ceci pourrait être une hypothèse quand à leurs propriétés antidépressives potentielles.

Puisque la reperfusion myocardique est associée à une réponse inflammatoire pouvant potentiellement causer des lésions de reperfusion et moduler la taille de l'infarctus (zone nécrotique), les probiotiques agissant sur la balance des cytokines anti et pro-inflammatoires auraient la capacité de diminuer la taille de l'infarctus. Par contre, lors de notre expérience, nous avons obtenu comme résultat que l'administration d'une combinaison des probiotiques *Lactobacillus helveticus* R0052 et *Bifidobacterium longum* R0175, en prophylaxie, n'a pas d'effets sur la taille de l'IM. En effet, des études effectuées antérieurement semblent démontrer que les lactobacilles auraient des effets cardioprotecteurs. Oxman et coll. (Oxman et al., 2000) ont démontré que l'administration de lactobacilles réduisait les arythmies cardiaques suivant la reperfusion et améliorait le rétablissement des cœurs ischémiques de rats. Par contre, les cœurs utilisés lors de cette expérience étaient des cœurs isolés et reperfusés en mode Langerdorff et lors de notre expérience les analyses ont toutes été faites *in vivo*. D'autre part, pour appuyer nos résultats, il a été démontré que l'administration de pentoxifylline (un inhibiteur de la synthèse des cytokines) ne produit aucun effet sur la taille de l'infarctus (Francis et al., 2004a, Wann et al., 2006). Donc, une inhibition des cytokines n'aurait que très peu d'effets sur la taille de l'infarctus. Par contre, l'effet qu'ont les cytokines sur la taille de l'infarctus demeure encore controversé et il se peut qu'une modulation plus générale des cytokines par les probiotiques (ou encore par la pentoxifylline) ne permette pas d'agir précisément sur la taille de l'infarctus. À notre avantage, puisque la taille de l'infarctus demeure la même dans les deux groupes, soit le groupe recevant la combinaison des probiotiques *L. helveticus* R0052 et *B. longum* R0175 et le groupe recevant le placebo, nous pouvons affirmer avec une plus grande certitude que l'effet observé suite à l'IM au niveau du cerveau est attribuable à l'effet anti-apoptotique des probiotiques et non pas à l'effet d'une taille d'infarctus différente.

Il est important de mentionner que cette combinaison de probiotiques semble avoir des effets positifs sur l'apoptose retrouvée dans le système limbique suite à un IM. Par contre, cet effet bénéfique ne sera pas observé systématiquement suite à l'administration de

différents probiotiques. En effet, différentes espèces de probiotiques exercent différentes fonctions métaboliques (Bengmark, 1996). De plus, différents probiotiques faisant partie de la même espèce peuvent aussi varier dans leur impact sur l'expression des cytokines. L'espèce de lactobacilles (Christensen et al., 2002) ou de bifidobactéries (He et al., 2002) utilisée peut engendrer la production de différentes cytokines. De plus, dans un produit contenant plusieurs probiotiques, leurs effets individuels peuvent non seulement se combiner et se compléter mais peuvent aussi avoir un effet synergétique (Jonkers and Stockbrugger, 2007). Une connaissance plus approfondie de chaque espèce, sous-espèce et souche de probiotiques permettra de choisir les bactéries appropriées en fonction de leurs différents effets et ainsi traiter efficacement diverses conditions.

Une des principales limitations de cette étude résulte du fait que, malgré que certains probiotiques aient été montrés capables d'agir sur l'inflammation en diminuant les cytokines inflammatoires, aucunes mesures de cytokines ne furent effectuées. En effet, une mesure de cytokines systémiques au début de l'expérience ainsi que suivant l'IM pourrait confirmer que l'infarctus du myocarde augmente les cytokines pro-inflammatoires circulantes. De plus, la comparaison des cytokines inflammatoires dans les deux groupes expérimentaux pourrait montrer l'effet potentiel des probiotiques *L. helveticus* R0052 et *B. longum* R0175 sur les cytokines par rapport au groupe recevant le placebo. Une fois la réduction de l'inflammation systémique démontrée, la détermination de la diminution de cytokines pro-inflammatoires au niveau du système limbique pourrait expliquer la corrélation potentielle avec la présence d'apoptose. En effet, si les probiotiques *L. helveticus* R0052 et *B. longum* R0175 diminuent les cytokines pro-inflammatoires au niveau systémique peut-être peuvent-ils diminuer les cytokines pro-inflammatoires au niveau du système limbique. Puisque les cytokines pro-inflammatoires furent associées à la présence d'apoptose dans certaines régions du système limbique, une analyse des cytokines présentes dans ces régions suivant l'administration des probiotiques pourrait peut-être expliquer la participation des probiotiques *L. helveticus* R0052 et *B. longum* R0175 dans la réduction de la mort cellulaire observée suite à un IM.

Conclusion

Ces travaux ont permis de démontrer que l'administration de la combinaison des probiotiques *Lactobacillus helveticus* R0052 et *Bifidobacterium longum* R0175 en prophylaxie permet de diminuer l'apoptose dans certaines régions du cerveau suite à un IM.

Ces résultats ont également démontré que la diminution de l'apoptose se produisait dans certaines régions spécifiques du système limbique soit l'amygdale latérale et médiane et le gyrus denté. En effet, une diminution de l'activité de la caspase-3 (effet anti-apoptotique), du ratio Bax/Bcl2 (effet anti-apoptotique) ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation d'Akt (effet anti-apoptotique) ont été observées dans ces régions chez le groupe ayant reçu la combinaison des probiotiques.

Finalement, ces résultats semblent très prometteurs pour ce qui est d'une nouvelle branche thérapeutique permettant la diminution de l'apoptose dans le système limbique. De plus, cette étude suggère un effet systémique des probiotiques leur attribuant non seulement des propriétés anti-inflammatoires intestinales locales mais aussi des effets favorables au niveau d'organes éloignés. Donc, l'utilisation de cette combinaison spécifique de probiotiques en prévention pourrait peut-être avoir des effets sur la dépression post-infarctus du myocarde.

Bibliographie

- ABBATE, A., BUSSANI, R., AMIN, M. S., VETROVEC, G. W. & BALDI, A. (2006) Acute myocardial infarction and heart failure: role of apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol*, 38, 1834-40.
- ADAMS, J. M. (2003) Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev*, 17, 2481-95.
- ALTMAN, J. (1999) Inflamed Brains: Neuroimmune Interactions in Diseases of the Nervous System Fondation IPSEN. *CNS Drug Reviews*, 5, 64-9.
- ANISMAN, H., KOKKINIDIS, L. & MERALI, Z. (1996) Interleukin-2 decreases accumbal dopamine efflux and responding for rewarding lateral hypothalamic stimulation. *Brain Res*, 731, 1-11.
- ANISMAN, H., MERALI, Z., POULTER, M. O. & HAYLEY, S. (2005) Cytokines as a precipitant of depressive illness: animal and human studies. *Curr Pharm Des*, 11, 963-72.
- BAHARAV, E., MOR, F., HALPERN, M. & WEINBERGER, A. (2004) Lactobacillus GG bacteria ameliorate arthritis in Lewis rats. *J Nutr*, 134, 1964-9.
- BAI, A. P., OUYANG, Q., XIAO, X. R. & LI, S. F. (2006) Probiotics modulate inflammatory cytokine secretion from inflamed mucosa in active ulcerative colitis. *Int J Clin Pract*, 60, 284-8.
- BANKS, W. A. (2006) The blood-brain barrier as a regulatory interface in the gut-brain axes. *Physiol Behav*, 89, 472-6.
- BAO, A. M., MEYNEN, G. & SWAAB, D. F. (2008) The stress system in depression and neurodegeneration: focus on the human hypothalamus. *Brain Res Rev*, 57, 531-53.
- BARANDON, L., COUFFINHAL, T., DUFOURCQ, P., DARET, D., ALLIERES, C., ALZIEU, P., DEVILLE, C. & DUPLAA, C. (2004) [Study of postmyocardial infarction scar-formation mechanisms: advantage of an experimental myocardial infarction model in mice]. *Can J Cardiol*, 20, 1467-75.
- BENGMARK, S. (1996) Ecnutrition and health maintenance--a new concept to prevent GI inflammation, ulceration and sepsis. *Clin Nutr*, 15, 1-10.
- BIRDSALL, H. H., GREEN, D. M., TRIAL, J., YOUKER, K. A., BURNS, A. R., MACKAY, C. R., LAROSA, G. J., HAWKINS, H. K., SMITH, C. W., MICHAEL, L. H., ENTMAN, M. L. & ROSSEN, R. D. (1997) Complement C5a, TGF-beta 1, and MCP-1, in sequence, induce migration of monocytes into ischemic canine myocardium within the first one to five hours after reperfusion. *Circulation*, 95, 684-92.
- BJARNASON, I., MACPHERSON, A. & HOLLANDER, D. (1995) Intestinal permeability: an overview. *Gastroenterology*, 108, 1566-81.
- BOLLI, R. (1988) Oxygen-derived free radicals and postischemic myocardial dysfunction ("stunned myocardium"). *J Am Coll Cardiol*, 12, 239-49.

- BOLLI, R., JEROUDI, M. O., PATEL, B. S., ARUOMA, O. I., HALLIWELL, B., LAI, E. K. & MCCAY, P. B. (1989) Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion. Evidence that myocardial "stunning" is a manifestation of reperfusion injury. *Circ Res*, 65, 607-22.
- BONVINI, R. F., HENDIRI, T. & CAMENZIND, E. (2005) Inflammatory response post-myocardial infarction and reperfusion: a new therapeutic target? *Eur. Heart J. Suppl.*, 7, I27-I36.
- BOUCHER, M., WANN, B. P., KALOUSTIAN, S., CARDINAL, R., GODBOUT, R. & ROUSSEAU, G. (2006) Reduction of apoptosis in the amygdala by an A2A adenosine receptor agonist following myocardial infarction. *Apoptosis*, 11, 1067-74.
- BRAUNWALD, E. (1985) The aggressive treatment of acute myocardial infarction. *Circulation*, 71, 1087-92.
- BRAUNWALD, E. & KLONER, R. A. (1982) The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation*, 66, 1146-9.
- BRAUNWALD, E. & KLONER, R. A. (1985) Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J Clin Invest*, 76, 1713-9.
- BUJA, L. M. (2005) Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol*, 14, 170-5.
- CANDELA, M., PERNA, F., CARNEVALI, P., VITALI, B., CIATI, R., GIONCHETTI, P., RIZZELLO, F., CAMPIERI, M. & BRIGIDI, P. (2008) Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *Int J Food Microbiol*, 125, 286-92.
- CARNEY, R. M., FREEDLAND, K. E., SHELINE, Y. I. & WEISS, E. S. (1997) Depression and coronary heart disease: a review for cardiologists. *Clin Cardiol*, 20, 196-200.
- CHATELAIN, P., LATOUR, J. G., TRAN, D., DE LORGERIL, M., DUPRAS, G. & BOURASSA, M. (1987) Neutrophil accumulation in experimental myocardial infarcts: relation with extent of injury and effect of reperfusion. *Circulation*, 75, 1083-90.
- CHRISTENSEN, H. R., FROKIAER, H. & PESTKA, J. J. (2002) *Lactobacilli* differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immunol*, 168, 171-8.
- COKKINOS, D. V., PANTOS, C., HEUSCH, G. & TAEGTMEYER, H. (2006) *Myocardial Ischemia: From Mechanisms to Therapeutic Potentials*, Birkhäuser.
- COLLINS, S. M. (2001) Stress and the Gastrointestinal Tract IV. Modulation of intestinal inflammation by stress: basic mechanisms and clinical relevance. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 280, G315-8.
- CREMONINI, F., DI CARO, S., NISTA, E. C., BARTOLOZZI, F., CAPELLI, G., GASBARRINI, G. & GASBARRINI, A. (2002) Meta-analysis: the effect of probiotic administration on antibiotic-associated diarrhoea. *Aliment Pharmacol Ther*, 16, 1461-7.

- DARSEE, J. R. & KLONER, R. A. (1980) The no reflow phenomenon: a time-limiting factor for reperfusion after coronary occlusion? *Am J Cardiol*, 46, 800-6.
- DE JONGE, P. & ORMEL, J. (2007) Depression and anxiety after myocardial infarction. *Br J Psychiatry*, 190, 272-3; author reply 273.
- DE LORGERIL, M., BASMADJIAN, A., LAVALLEE, M., CLEMENT, R., MILLETTE, D., ROUSSEAU, G. & LATOUR, J. G. (1989) Influence of leukopenia on collateral flow, reperfusion flow, reflow ventricular fibrillation, and infarct size in dogs. *Am Heart J*, 117, 523-32.
- DE LORGERIL, M., ROUSSEAU, G., BASMADJIAN, A., ST-JEAN, G., TRAN, D. & LATOUR, J. (1990) Spacial and temporal profiles of neutrophil accumulation in the reperfused ischemic myocardium. *Am. J. Cardiovasc. Path.*, 3, 143-154.
- DELCENSERIE, V., MARTEL, D., LAMOUREUX, M., AMIOT, J., BOUTIN, Y. & ROY, D. (2008) Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Curr Issues Mol Biol*, 10, 37-54.
- DESBONNET, L., GARRETT, L., CLARKE, G., BIENENSTOCK, J. & DINAN, T. G. (2008) The probiotic *Bifidobacteria infantis*: An assessment of potential antidepressant properties in the rat. *J Psychiatr Res*.
- DETEN, A. & ZIMMER, H. G. (2002) Heart function and cytokine expression is similar in mice and rats after myocardial infarction but differences occur in TNF α expression. *Pflugers Arch*, 445, 289-96.
- DHALLA, N. S. & DUHAMEL, T. A. (2007) The Paradoxes of Reperfusion in the Ischemic Heart. *Heart Metab.*, 37, 31-4.
- DINAN, T. G., QUIGLEY, E. M., AHMED, S. M., SCULLY, P., O'BRIEN, S., O'MAHONY, L., O'MAHONY, S., SHANAHAN, F. & KEELING, P. W. (2006) Hypothalamic-pituitary-gut axis dysregulation in irritable bowel syndrome: plasma cytokines as a potential biomarker? *Gastroenterology*, 130, 304-11.
- DIOP, L., GUILLOU, S. & DURAND, H. (2008a) Probiotic food supplement reduces stress-induced gastrointestinal symptoms in volunteers: a double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Nutr Res*, 28, 1-5.
- DIOP, L., GUILLOU, S. & DURAND, H. (2008b) Probiotic food supplement reduces stress-induced gastrointestinal symptoms in volunteers: a double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Nutrition Research*, 28, 1-5.
- DUNN, A. J., SWIERGIEL, A. H. & DE BEAUREPAIRE, R. (2005) Cytokines as mediators of depression: what can we learn from animal studies? *Neurosci Biobehav Rev*, 29, 891-909.
- EEFTING, F., RENSING, B., WIGMAN, J., PANNEKOEK, W. J., LIU, W. M., CRAMER, M. J., LIPS, D. J. & DOEVENDANS, P. A. (2004) Role of apoptosis in reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 61, 414-26.
- ENGLER, R. L., SCHMID-SCHONBEIN, G. W. & PAVELEC, R. S. (1983) Leukocyte capillary plugging in myocardial ischemia and reperfusion in the dog. *Am J Pathol*, 111, 98-111.
- ENTMAN, M. L., YOUKER, K., SHOJI, T., KUKIELKA, G., SHAPPELL, S. B., TAYLOR, A. A. & SMITH, C. W. (1992) Neutrophil induced oxidative injury of

- cardiac myocytes. A compartmented system requiring CD11b/CD18-ICAM-1 adherence. *J Clin Invest*, 90, 1335-45.
- EUTAMENE, H. & BUENO, L. (2007) Role of probiotics in correcting abnormalities of colonic flora induced by stress. *Gut*, 56, 1495-7.
- FIORAMONTI, J., THEODOROU, V. & BUENO, L. (2003) Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology? *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 17, 711-24.
- FLISS, H. & GATTINGER, D. (1996) Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res*, 79, 949-56.
- FLOCH, M. H., WALKER, W. A., GUANDALINI, S., HIBBERD, P., GORBACH, S., SURAWICZ, C., SANDERS, M. E., GARCIA-TSAO, G., QUIGLEY, E. M., ISOLAURI, E., FEDORAK, R. N. & DIELEMAN, L. A. (2008) Recommendations for probiotic use--2008. *J Clin Gastroenterol*, 42 Suppl 2, S104-8.
- FRANCIS, J., CHU, Y., JOHNSON, A. K., WEISS, R. M. & FELDER, R. B. (2004a) Acute myocardial infarction induces hypothalamic cytokine synthesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286, H2264-71.
- FRANCIS, J., ZHANG, Z. H., WEISS, R. M. & FELDER, R. B. (2004b) Neural regulation of the proinflammatory cytokine response to acute myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287, H791-7.
- FRANGOIANNIS, N. G. (2006a) The mechanistic basis of infarct healing. *Antioxid Redox Signal*, 8, 1907-39.
- FRANGOIANNIS, N. G. (2006b) Targeting the inflammatory response in healing myocardial infarcts. *Curr Med Chem*, 13, 1877-93.
- FRANGOIANNIS, N. G., MENDOZA, L. H., LINDSEY, M. L., BALLANTYNE, C. M., MICHAEL, L. H., SMITH, C. W. & ENTMAN, M. L. (2000) IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury. *J Immunol*, 165, 2798-808.
- FRANGOIANNIS, N. G., SMITH, C. W. & ENTMAN, M. L. (2002) The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, 53, 31-47.
- FRANGOIANNIS, N. G., YOUKER, K. A., ROSSEN, R. D., GWECHENBERGER, M., LINDSEY, M. H., MENDOZA, L. H., MICHAEL, L. H., BALLANTYNE, C. M., SMITH, C. W. & ENTMAN, M. L. (1998) Cytokines and the microcirculation in ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*, 30, 2567-76.
- FULLER, R. (1989) Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol*, 66, 365-78.
- GARCIA-RODENAS, C. L., BERGONZELLI, G. E., NUTTEN, S., SCHUMANN, A., CHERBUT, C., TURINI, M., ORNSTEIN, K., ROCHAT, F. & CORTHESEY-THEULAZ, I. (2006) Nutritional approach to restore impaired intestinal barrier function and growth after neonatal stress in rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 43, 16-24.
- GAREAU, M. G., JURY, J., MACQUEEN, G., SHERMAN, P. M. & PERDUE, M. H. (2007) Probiotic treatment of rat pups normalises corticosterone release and ameliorates colonic dysfunction induced by maternal separation. *Gut*, 56, 1522-8.
- GAREAU, M. G., SILVA, M. A. & PERDUE, M. H. (2008) Pathophysiological mechanisms of stress-induced intestinal damage. *Curr Mol Med*, 8, 274-81.

- GHOSH, S., VAN HEEL, D. & PLAYFORD, R. J. (2004) Probiotics in inflammatory bowel disease: is it all gut flora modulation? *Gut*, 53, 620-2.
- GIRN, H. R., AHILATHIRUNAYAGAM, S., MAVOR, A. I. & HOMER-VANNIASINKAM, S. (2007) Reperfusion syndrome: cellular mechanisms of microvascular dysfunction and potential therapeutic strategies. *Vasc Endovascular Surg*, 41, 277-93.
- GORDON, E. E. & MORGAN, H. E. (1986) Principles of metabolic regulation. IN FOZZARD, H. A., HABER, E., JENNINGS, R. B., KATZ, A. M. & MORGAN, H. E. (Eds.) *The Heart and Cardiovascular System: Scientific Foundations*. New York, Raven Press.
- GOTTLIEB, R. A., BURLESON, K. O., KLONER, R. A., BABIOR, B. M. & ENGLER, R. L. (1994) Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest*, 94, 1621-8.
- GUCK, T. P., KAVAN, M. G., ELSASSER, G. N. & BARONE, E. J. (2001) Assessment and treatment of depression following myocardial infarction. *Am Fam Physician*, 64, 641-8.
- HASKEY, N. & DAHL, W. J. (2009) Synbiotic Therapy Improves Quality of Life and Reduces Symptoms in Pediatric Ulcerative Colitis. *Infant, Child, and Adolescent Nutrition*
- HAUNSTETTER, A. & IZUMO, S. (2000) Toward antiapoptosis as a new treatment modality. *Circ Res*, 86, 371-6.
- HE, F., MORITA, H., OUWEHAND, A. C., HOSODA, M., HIRAMATSU, M., KURISAKI, J., ISOLAURI, E., BENNO, Y. & SALMINEN, S. (2002) Stimulation of the secretion of pro-inflammatory cytokines by Bifidobacterium strains. *Microbiol Immunol*, 46, 781-5.
- HEARSE, D. J. & YELLON, D. M. (1984) Therapeutic Approaches to Myocardial Infarct. IN PRESS, R. (Ed.) *Why Are We Still in Doubt about Infarct Size Limitation?* NY.
- HENGARTNER, M. O. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407, 770-6.
- HILL, J. H. & WARD, P. A. (1971) The phlogistic role of C3 leukotactic fragments in myocardial infarcts of rats. *J Exp Med*, 133, 885-900.
- HOLLY, T. A., DRINCIC, A., BYUN, Y., NAKAMURA, S., HARRIS, K., KLOCKE, F. J. & CRYNS, V. L. (1999) Caspase inhibition reduces myocyte cell death induced by myocardial ischemia and reperfusion in vivo. *J Mol Cell Cardiol*, 31, 1709-15.
- HOLSBOER, F. (2000) The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology*, 23, 477-501.
- HOLSBOER, F., SPENGLER, D. & HEUSER, I. (1992) The role of corticotropin-releasing hormone in the pathogenesis of Cushing's disease, anorexia nervosa, alcoholism, affective disorders and dementia. *Prog Brain Res*, 93, 385-417.
- HUANG, Y., ERDMANN, N., PENG, H., ZHAO, Y. & ZHENG, J. (2005) The role of TNF related apoptosis-inducing ligand in neurodegenerative diseases. *Cell Mol Immunol*, 2, 113-22.
- ITO, G., TAMURA, J., SUZUKI, M., SUZUKI, Y., IKEDA, H., KOIKE, M., NOMURA, M., JIE, T. & ITO, K. (1995) DNA fragmentation of human infarcted myocardial

- cells demonstrated by the nick end labeling method and DNA agarose gel electrophoresis. *Am J Pathol*, 146, 1325-31.
- JANKORD, R. & HERMAN, J. P. (2008) Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress. *Ann N Y Acad Sci*, 1148, 64-73.
- JENNINGS, R. B. (1970) Myocardial Ischemia: Observations, definitions, and speculations. *J Mol Cell Cardiol*, 1, 345-348.
- JENNINGS, R. B., MURRY, C. E., STEENBERGEN, C., JR. & REIMER, K. A. (1990) Development of cell injury in sustained acute ischemia. *Circulation*, 82, II2-12.
- JENNINGS, R. B. & REIMER, K. A. (1991) The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med*, 42, 225-46.
- JENNINGS, R. B., REIMER, K. A. & STEENBERGEN, C. (1986) Myocardial ischemia revisited. The osmolar load, membrane damage, and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*, 18, 769-80.
- JIN, L. Z., MARQUARDT, R. R. & ZHAO, X. (2000) A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus. *Appl Environ Microbiol*, 66, 4200-4.
- JONKERS, D. & STOCKBRUGGER, R. (2007) Review article: Probiotics in gastrointestinal and liver diseases. *Aliment Pharmacol Ther*, 26 Suppl 2, 133-48.
- JORDAN, J. E., ZHAO, Z. Q. & VINTEN-JOHANSEN, J. (1999) The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 43, 860-78.
- KALOUSTIAN, S., WANN, B. P., BAH, T. M., FALCAO, S., DUFORT, A. M., RYVLIN, P., GODBOUT, R. & ROUSSEAU, G. (2007) Celecoxib after the onset of reperfusion reduces apoptosis in the amygdala. *Apoptosis*, 12, 1945-51.
- KAMIKUBO, Y. (1993) [Cardiac dysfunction and endogenous cytokines in global ischemia and reperfusion injury]. *Hokkaido Igaku Zasshi*, 68, 813-26.
- KATZ, A. M. & HECHT, H. H. (1969) Editorial: the early "pump" failure of the ischemic heart. *Am J Med*, 47, 497-502.
- KIRJAVAINEN, P. V., OUWEHAND, A. C., ISOLAURI, E. & SALMINEN, S. J. (1998) The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiol Lett*, 167, 185-9.
- KLONER, R. A., FISHBEIN, M. C., LEW, H., MAROKO, P. R. & BRAUNWALD, E. (1978) Mummification of the infarcted myocardium by high dose corticosteroids. *Circulation*, 57, 56-63.
- KLONER, R. A., GANOTE, C. E. & JENNINGS, R. B. (1974a) The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest*, 54, 1496-508.
- KLONER, R. A., GANOTE, C. E., WHALEN, D. A., JR. & JENNINGS, R. B. (1974b) Effect of a transient period of ischemia on myocardial cells. II. Fine structure during the first few minutes of reflow. *Am J Pathol*, 74, 399-422.
- LACRAZ, S., NICOD, L. P., CHICHEPORTICHE, R., WELGUS, H. G. & DAYER, J. M. (1995) IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest*, 96, 2304-10.

- LAFLAMME, N., LACROIX, S. & RIVEST, S. (1999) An essential role of interleukin-1beta in mediating NF-kappaB activity and COX-2 transcription in cells of the blood-brain barrier in response to a systemic and localized inflammation but not during endotoxemia. *J Neurosci*, 19, 10923-30.
- LAMMERS, K. M., BRIGIDI, P., VITALI, B., GIONCHETTI, P., RIZZELLO, F., CAMELLI, E., MATTEUZZI, D. & CAMPIERI, M. (2003) Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 38, 165-72.
- LAMMERS, K. M., HELWIG, U., SWENNEN, E., RIZZELLO, F., VENTURI, A., CAMELLI, E., KAMM, M. A., BRIGIDI, P., GIONCHETTI, P. & CAMPIERI, M. (2002) Effect of probiotic strains on interleukin 8 production by HT29/19A cells. *Am J Gastroenterol*, 97, 1182-6.
- LÊ, V. H. V. & L'ALLIER, P. L. (2008) Traiter l'Infarctus Aigu du Myocarde Être un Bon Stratège! *Le Clinicien*, 23, 72-9.
- LEFER, A. M., TSAO, P. S., LEFER, D. J. & MA, X. L. (1991) Role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of reperfusion injury after myocardial ischemia. *Faseb J*, 5, 2029-34.
- LEIST, M., SINGLE, B., CASTOLDI, A. F., KUHNLE, S. & NICOTERA, P. (1997) Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med*, 185, 1481-6.
- LICHTENSTEIN, G. R., BALA, M., HAN, C., DEWOODY, K. & SCHAIBLE, T. (2002) Infliximab improves quality of life in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, 8, 237-43.
- LIEB, J., KARMALI, R. & HORROBIN, D. (1983) Elevated levels of prostaglandin E2 and thromboxane B2 in depression. *Prostaglandins Leukot Med*, 10, 361-7.
- LILLY, D. M. & STILLWELL, R. H. (1965) Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. *Science*, 147, 747-8.
- LIZKO, N. N. (1987) Stress and intestinal microflora. *Nahrung*, 31, 443-7.
- LOGAN, A. C. & KATZMAN, M. (2005) Major depressive disorder: probiotics may be an adjuvant therapy. *Med Hypotheses*, 64, 533-8.
- LOREA BAROJA, M., KIRJAVAINEN, P. V., HEKMAT, S. & REID, G. (2007) Anti-inflammatory effects of probiotic yogurt in inflammatory bowel disease patients. *Clin Exp Immunol*, 149, 470-9.
- LUCASSEN, P. J., HEINE, V. M., MULLER, M. B., VAN DER BEEK, E. M., WIEGANT, V. M., DE KLOET, E. R., JOELS, M., FUCHS, E., SWAAB, D. F. & CZECH, B. (2006) Stress, depression and hippocampal apoptosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 5, 531-46.
- LUTGENDORFF, F., AKKERMANS, L. M. & SODERHOLM, J. D. (2008) The role of microbiota and probiotics in stress-induced gastro-intestinal damage. *Curr Mol Med*, 8, 282-98.
- MADSEN, K., CORNISH, A., SOPER, P., MCKAIGNEY, C., JIJON, H., YACHIMEC, C., DOYLE, J., JEWELL, L. & DE SIMONE, C. (2001) Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology*, 121, 580-91.

- MAES, M. (2008) The cytokine hypothesis of depression: inflammation, oxidative & nitrosative stress (IO&NS) and leaky gut as new targets for adjunctive treatments in depression. *Neuro Endocrinol Lett*, 29, 287-91.
- MAES, M., KUBERA, M. & LEUNIS, J. C. (2008) The gut-brain barrier in major depression: intestinal mucosal dysfunction with an increased translocation of LPS from gram negative enterobacteria (leaky gut) plays a role in the inflammatory pathophysiology of depression. *Neuro Endocrinol Lett*, 29, 117-24.
- MAES, M., MELTZER, H., JACOBS, J., SUY, E., CALABRESE, J., MINNER, B. & RAUS, J. (1993) Autoimmunity in depression: increased antiphospholipid autoantibodies. *Acta Psychiatr Scand*, 87, 160-6.
- MAES, M., SMITH, R. & SCHARPE, S. (1995) The monocyte-T-lymphocyte hypothesis of major depression. *Psychoneuroendocrinology*, 20, 111-6.
- MAES, M., SONG, C., LIN, A., DE JONGH, R., VAN GASTEL, A., KENIS, G., BOSMANS, E., DE MEESTER, I., BENOY, I., NEELS, H., DEMEDTS, P., JANCA, A., SCHARPE, S. & SMITH, R. S. (1998) The effects of psychological stress on humans: increased production of pro-inflammatory cytokines and a Th1-like response in stress-induced anxiety. *Cytokine*, 10, 313-8.
- MANJI, H. K., DREVETS, W. C. & CHARNEY, D. S. (2001) The cellular neurobiology of depression. *Nat Med*, 7, 541-7.
- MAO, Y., NOBAEK, S., KASRAVI, B., ADAWI, D., STENRAM, U., MOLIN, G. & JEPPSSON, B. (1996) The effects of Lactobacillus strains and oat fiber on methotrexate-induced enterocolitis in rats. *Gastroenterology*, 111, 334-44.
- MAWDSLEY, J. E. & RAMPTON, D. S. (2005) Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut*, 54, 1481-91.
- MAXWELL, S. R. & LIP, G. Y. (1997) Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *Int J Cardiol*, 58, 95-117.
- MAYER, E. A. (2000) The neurobiology of stress and gastrointestinal disease. *Gut*, 47, 861-9.
- MEDINA, M., IZQUIERDO, E., ENNAHAR, S. & SANZ, Y. (2007) Differential immunomodulatory properties of Bifidobacterium logum strains: relevance to probiotic selection and clinical applications. *Clin Exp Immunol*, 150, 531-8.
- MEHTA, J. L. & JAYARAM, K. (1997) Reperfusion Injury in Humans: Existence, Clinical Relevance, Mechanistic Insights, and Potential Therapy. *J Thromb Thrombolysis*, 4, 75-77.
- MEHTA, J. L., NICHOLS, W. W. & MEHTA, P. (1988) Neutrophils as potential participants in acute myocardial ischemia: relevance to reperfusion. *J Am Coll Cardiol*, 11, 1309-16.
- MISAO, J., HAYAKAWA, Y., OHNO, M., KATO, S., FUJIWARA, T. & FUJIWARA, H. (1996) Expression of bcl-2 protein, an inhibitor of apoptosis, and Bax, an accelerator of apoptosis, in ventricular myocytes of human hearts with myocardial infarction. *Circulation*, 94, 1506-12.
- NG, S. C., HART, A. L., KAMM, M. A., STAGG, A. J. & KNIGHT, S. C. (2008a) Mechanisms of action of probiotics: Recent advances. *Inflamm Bowel Dis*.

- NG, S. C., HART, A. L., KAMM, M. A., STAGG, A. J. & KNIGHT, S. C. (2008b) Mechanisms of action of probiotics: Recent advances. *Inflamm Bowel Dis*, 15, 300-310.
- NIEUWENHUYS, R. (1996) The greater limbic system, the emotional motor system and the brain. *Prog Brain Res*, 107, 551-80.
- NINOMIYA, K., HASHIDA, J., GEFT, I., CHAUX, E., SHELL, W., FISHBEIN, M., RIT, J., YANO, J. & GANZ, W. (1981) Brief repeat periods of ischemia have a cumulative effect and may cause myocardial necrosis. *Am J Cardiol*, 47, 445.
- O'MAHONY, L., FEENEY, M., O'HALLORAN, S., MURPHY, L., KIELY, B., FITZGIBBON, J., LEE, G., O'SULLIVAN, G., SHANAHAN, F. & COLLINS, J. K. (2001) Probiotic impact on microbial flora, inflammation and tumour development in IL-10 knockout mice. *Aliment Pharmacol Ther*, 15, 1219-25.
- O'MAHONY, L., MCCARTHY, J., KELLY, P., HURLEY, G., LUO, F., CHEN, K., O'SULLIVAN, G. C., KIELY, B., COLLINS, J. K., SHANAHAN, F. & QUIGLEY, E. M. (2005) Lactobacillus and bifidobacterium in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology*, 128, 541-51.
- OPIE, L. H. & COETZEE, W. A. (1988) Role of calcium ions in reperfusion arrhythmias: relevance to pharmacologic intervention. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2, 623-36.
- OTTE, J. M. & PODOLSKY, D. K. (2004) Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 286, G613-26.
- OXMAN, T., SHAPIRA, M., DIVER, A., KLEIN, R., AVAZOV, N. & RABINOWITZ, B. (2000) A new method of long-term preventive cardioprotection using Lactobacillus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 278, H1717-24.
- PAGE, C. P., CURTIS, M. J., SUTTER, M. C., HOFFMAN, B. B. & WALKER, M. J. (1999) *Pharmacologie Intégrée*, De Boeck Université.
- PARIANTE, C. M. & LIGHTMAN, S. L. (2008) The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends Neurosci*, 31, 464-8.
- PARONE, P. A., JAMES, D. & MARTINOU, J. C. (2002) Mitochondria: regulating the inevitable. *Biochimie*, 84, 105-11.
- PAXINOS, G. & WATSON, C. (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, San Diego, Academic Press.
- PIGNATTI, C. & STEFANELLI, C. (2003) Ischemia/reperfusion-induced apoptosis: connecting nitric oxide and cell cycle regulators. *Cardiovasc Res*, 59, 268-70.
- PIPER, H. M., GARCIA-DORADO, D. & OVIZE, M. (1998) A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 38, 291-300.
- POHL, T., SEILER, C., BILLINGER, M., HERREN, E., WUSTMANN, K., MEHTA, H., WINDECKER, S., EBERLI, F. R. & MEIER, B. (2001) Frequency distribution of collateral flow and factors influencing collateral channel development. Functional collateral channel measurement in 450 patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*, 38, 1872-8.

- POLLMACHER, T., HAACK, M., SCHULD, A., REICHENBERG, A. & YIRMIYA, R. (2002) Low levels of circulating inflammatory cytokines--do they affect human brain functions? *Brain Behav Immun*, 16, 525-32.
- PRABHU, S. D., CHANDRASEKAR, B., MURRAY, D. R. & FREEMAN, G. L. (2000) beta-adrenergic blockade in developing heart failure: effects on myocardial inflammatory cytokines, nitric oxide, and remodeling. *Circulation*, 101, 2103-9.
- QIN, L., WU, X., BLOCK, M. L., LIU, Y., BREESE, G. R., HONG, J. S., KNAPP, D. J. & CREWS, F. T. (2007) Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*, 55, 453-62.
- RAISON, C. L., CAPURON, L. & MILLER, A. H. (2006) Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol*, 27, 24-31.
- RAKOFF-NAHOUM, S., PAGLINO, J., ESLAMI-VARZANEH, F., EDBERG, S. & MEDZHITOV, R. (2004) Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 118, 229-41.
- REED, J. C. (1997) Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature*, 387, 773-6.
- REFFELMANN, T. & KLONER, R. A. (2007) Consequences of Reperfusion. *Heart Metab.*, 37, 5-8.
- REIMER, K. A., JENNINGS, R. B. & TATUM, A. H. (1983) Pathobiology of acute myocardial ischemia: metabolic, functional and ultrastructural studies. *Am J Cardiol*, 52, 72A-81A.
- REIMER, K. A., LOWE, J. E., RASMUSSEN, M. M. & JENNINGS, R. B. (1977) The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation*, 56, 786-94.
- REYLAND, M. E. (2007) Protein kinase C and apoptosis. IN SRIVASTAVA, R. (Ed.) *Apoptosis, Cell signaling, and human Diseases*. Totowa, NJ, Humana Press.
- RIOU, L. M., RUIZ, M., SULLIVAN, G. W., LINDEN, J., LEONG-POI, H., LINDNER, J. R., HARRIS, T. D., BELLER, G. A. & GLOVER, D. K. (2002) Assessment of myocardial inflammation produced by experimental coronary occlusion and reperfusion with 99mTc-RP517, a new leukotriene B4 receptor antagonist that preferentially labels neutrophils in vivo. *Circulation*, 106, 592-8.
- ROMSON, J. L., HOOK, B. G., KUNKEL, S. L., ABRAMS, G. D., SCHORK, M. A. & LUCCHESI, B. R. (1983) Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation*, 67, 1016-23.
- ROSTENE, W. (2005) [Claude Fortier: the great history of neuroendocrinology]. *Med Sci (Paris)*, 21, 551-5.
- ROUSSEAU, G., ST-JEAN, G., LATOUR, J. G., MERHI, Y., NATTEL, S. & WATERS, D. (1991) Diltiazem at reperfusion reduces neutrophil accumulation and infarct size in dogs with ischaemic myocardium. *Cardiovasc Res*, 25, 319-29.
- SAIKUMAR, P., DONG, Z., MIKHAILOV, V., DENTON, M., WEINBERG, J. M. & VENKATACHALAM, M. A. (1999) Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med*, 107, 489-506.
- SCARABELLI, T. M. & GOTTLIEB, R. A. (2004) Functional and clinical repercussions of myocyte apoptosis in the multifaceted damage by ischemia/reperfusion injury:

- old and new concepts after 10 years of contributions. *Cell Death Differ*, 11 Suppl 2, S144-52.
- SCHIEPERS, O. J., WICHERS, M. C. & MAES, M. (2005) Cytokines and major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 29, 201-17.
- SEARLE, J., KERR, J. F. & BISHOP, C. J. (1982) Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu*, 17 Pt 2, 229-59.
- SHELINE, Y. I., GADO, M. H. & PRICE, J. L. (1998) Amygdala core nuclei volumes are decreased in recurrent major depression. *Neuroreport*, 9, 2023-8.
- SHERMAN, P. M. (2004) Probiotics and lactose maldigestion. *Can J Gastroenterol*, 18, 81-2.
- SHERMAN, P. M., JOHNSON-HENRY, K. C., YEUNG, H. P., NGO, P. S., GOULET, J. & TOMPKINS, T. A. (2005) Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements. *Infect Immun*, 73, 5183-8.
- SHIMIZU, S., NARITA, M. & TSUJIMOTO, Y. (1999) Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*, 399, 483-7.
- SMITH, R. S. (1991) The macrophage theory of depression. *Med Hypotheses*, 35, 298-306.
- SMITS, H. H., ENGERING, A., VAN DER KLEIJ, D., DE JONG, E. C., SCHIPPER, K., VAN CAPEL, T. M., ZAAT, B. A., YAZDANBAKHSI, M., WIERENGA, E. A., VAN KOOYK, Y. & KAPSENBERG, M. L. (2005) Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J Allergy Clin Immunol*, 115, 1260-7.
- SODERHOLM, J. D. & PERDUE, M. H. (2001) Stress and gastrointestinal tract. II. Stress and intestinal barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 280, G7-G13.
- SUDO, N., CHIDA, Y., AIBA, Y., SONODA, J., OYAMA, N., YU, X. N., KUBO, C. & KOGA, Y. (2004) Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol*, 558, 263-75.
- SUGAWARA, T., FUJIMURA, M., NOSHITA, N., KIM, G. W., SAITO, A., HAYASHI, T., NARASIMHAN, P., MAIER, C. M. & CHAN, P. H. (2004) Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *NeuroRx*, 1, 17-25.
- SUTCIGIL, L., OKTENLI, C., MUSABAK, U., BOZKURT, A., CANSEVER, A., UZUN, O., SANISOGLU, S. Y., YESILOVA, Z., OZMENLER, N., OZSAHIN, A. & SENGUL, A. (2007) Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in major depression: effect of sertraline therapy. *Clin Dev Immunol*, 2007, 76396.
- SUZUKI, K., HARASAWA, R., YOSHITAKE, Y. & MITSUOKA, T. (1983) Effects of crowding and heat stress on intestinal flora, body weight gain, and feed efficiency of growing rats and chicks. *Nippon Juigaku Zasshi*, 45, 331-8.
- SWAAB, D. F., BAO, A. M. & LUCASSEN, P. J. (2005) The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Res Rev*, 4, 141-94.

- TAKADERA, T., YUMOTO, H., TOZUKA, Y. & OHYASHIKI, T. (2002) Prostaglandin E(2) induces caspase-dependent apoptosis in rat cortical cells. *Neurosci Lett*, 317, 61-4.
- TSAI, S. J. (2004) Down-regulation of the Trk-B signal pathway: the possible pathogenesis of major depression. *Med Hypotheses*, 62, 215-8.
- TSAO, P. S., AOKI, N., LEFER, D. J., JOHNSON, G., 3RD & LEFER, A. M. (1990) Time course of endothelial dysfunction and myocardial injury during myocardial ischemia and reperfusion in the cat. *Circulation*, 82, 1402-12.
- TU, H., RADY, P. L., JUELICH, T., TYRING, S. K., KOLDZIC-ZIVANOVIC, N., SMITH, E. M. & HUGHES, T. K. (2007) Interleukin-10 regulated gene expression in cells of hypothalamic-pituitary-adrenal axis origin. *Cell Mol Neurobiol*, 27, 161-70.
- VENTURI, A., GIONCHETTI, P., RIZZELLO, F., JOHANSSON, R., ZUCCONI, E., BRIGIDI, P., MATTEUZZI, D. & CAMPIERI, M. (1999) Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*, 13, 1103-8.
- VINTEN-JOHANSEN, J. (2004a) Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 61, 481-97.
- VINTEN-JOHANSEN, J. (2004b) Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.*, 61, 481-497.
- WALLACE, T. D., BRADLEY, S., BUCKLEY, N. D. & GREEN-JOHNSON, J. M. (2003) Interactions of lactic acid bacteria with human intestinal epithelial cells: effects on cytokine production. *J Food Prot*, 66, 466-72.
- WANN, B. P., BAH, T. M., BOUCHER, M., COURTEMANCHE, J., LE MAREC, N., ROUSSEAU, G. & GODBOUT, R. (2007) Vulnerability for apoptosis in the limbic system after myocardial infarction in rats: a possible model for human postinfarct major depression. *J Psychiatry Neurosci*, 32, 11-6.
- WANN, B. P., BAH, T. M., KALOUSTIAN, S., BOUCHER, M., DUFORT, A. M., LE MAREC, N., GODBOUT, R. & ROUSSEAU, G. (2008) Behavioural signs of depression and apoptosis in the limbic system following myocardial infarction: effects of sertraline. *J Psychopharmacol*.
- WANN, B. P., BAH, T. M., KALOUSTIAN, S., BOUCHER, M., DUFORT, A. M., LE MAREC, N., GODBOUT, R. & ROUSSEAU, G. (2009) Behavioural signs of depression and apoptosis in the limbic system following myocardial infarction: effects of sertraline. *J Psychopharmacol*, 23, 451-9.
- WANN, B. P., BOUCHER, M., KALOUSTIAN, S., NIM, S., GODBOUT, R. & ROUSSEAU, G. (2006) Apoptosis detected in the amygdala following myocardial infarction in the rat. *Biol Psychiatry*, 59, 430-3.
- WOLLOWSKI, I., RECHKEMMER, G. & POOL-ZOBEL, B. L. (2001) Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am J Clin Nutr*, 73, 451S-455S.
- YAN, F. & POLK, D. B. (2002) Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem*, 277, 50959-65.

- YANG, J., YANG, J., DING, J. W., CHEN, L. H., WANG, Y. L., LI, S. & WU, H. (2008) Sequential expression of TLR4 and its effects on the myocardium of rats with myocardial ischemia-reperfusion injury. *Inflammation*, 31, 304-12.
- ZAREIE, M., JOHNSON-HENRY, K., JURY, J., YANG, P. C., NGAN, B. Y., MCKAY, D. M., SODERHOLM, J. D., PERDUE, M. H. & SHERMAN, P. M. (2006) Probiotics prevent bacterial translocation and improve intestinal barrier function in rats following chronic psychological stress. *Gut*, 55, 1553-60.
- ZEISS, C. J. (2003) The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol*, 40, 481-95.
- ZHANG, J. & RIVEST, S. (2003) Is survival possible without arachidonate metabolites in the brain during systemic infection? *News Physiol Sci*, 18, 137-42.
- ZHAO, Z. Q., NAKAMURA, M., WANG, N. P., WILCOX, J. N., SHEARER, S., RONSON, R. S., GUYTON, R. A. & VINTEN-JOHANSEN, J. (2000) Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. *Cardiovasc Res*, 45, 651-60.
- ZHAO, Z. Q., VELEZ, D. A., WANG, N. P., HEWAN-LOWE, K. O., NAKAMURA, M., GUYTON, R. A. & VINTEN-JOHANSEN, J. (2001) Progressively developed myocardial apoptotic cell death during late phase of reperfusion. *Apoptosis*, 6, 279-90.
- ZHAO, Z. Q. & VINTEN-JOHANSEN, J. (2002) Myocardial apoptosis and ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res*, 55, 438-55.