

Université de Montréal

**Effet des probiotiques *Lactobacillus helveticus* RO052 et
Bifidobacterium longum RO175 sur la dépression post-
infarctus du myocarde chez le rat**

par

Jessica Arseneault-Bréard

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Mémoire présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Sciences
en Pharmacologie
option cardiovasculaire

Avril, 2011

© Jessica Arseneault-Bréard, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Effet des probiotiques *Lactobacillus helveticus* RO052 et *Bifidobacterium longum* RO175
sur la dépression post-infarctus du myocarde chez le rat

Présenté par :

Jessica Arseneault-Bréard

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Suhayla Mukaddam-Daher, président-rapporteur

Guy Rousseau, directeur de recherche

Marc Servant, membre du jury

Résumé

Nous avons déjà démontré que les probiotiques réduisaient l'apoptose observée dans le système limbique après un infarctus du myocarde (IM), suggérant un rôle anti-dépresseur potentiel des probiotiques. Cette étude a été conçue pour déterminer si les probiotiques pouvaient atténuer le comportement dépressif observé après un infarctus du myocarde. Un autre objectif visait à démontrer qu'une altération de la barrière intestinale pourrait avoir lieu lors d'un IM et que les probiotiques pourraient empêcher cette altération de la perméabilité intestinale. **Méthodes:** Des rats mâles Sprague-Dawley ont reçu des probiotiques (1 milliard de cellules bactériennes vivantes de *Lactobacillus helveticus* R0052 et *Bifidobacterium longum* R0175) ou le véhicule tous les jours en dilution dans leur eau, débutant 1 semaine avant l'induction d'une ischémie myocardique. Un infarctus a ensuite été induit chez la moitié des rats, par l'occlusion de l'artère coronaire antérieure gauche (40 minutes) suivie d'une reperfusion. Les rats témoins, l'autre moitié de la cohorte, ont été soumis à la même procédure sans occlusion coronarienne. Une semaine après l'infarctus, les animaux ont été resoumis au traitement préalable jusqu'au moment du sacrifice. Le comportement dépressif a été évalué par trois tests soit: l'interaction sociale, le test de nage forcée et le test d'évitement passif. **Résultats:** Les résultats obtenus indiquent qu'en absence d'infarctus, les probiotiques n'ont pas d'effet significatif. Toutefois, en dépit de taille similaire IM, des rats traités avec des probiotiques, ont démontré davantage d'interactions sociales et une meilleure performance dans le test de nage forcée et d'évitement passif, comparativement à des rats du groupe IM sans probiotique ($p < 0,05$). **Conclusion:** Les probiotiques atténuent le comportement dépressif observé après infarctus du myocarde par un mécanisme qui pourrait impliquer l'intégrité des intestins.

Mots-clés : Probiotiques, infarctus du myocarde, dépression, inflammation, intestins

Abstract

We have already shown that probiotics reduce apoptosis in the limbic system after a myocardial infarct, suggesting a potential anti-depressive role of probiotics. This study was conceived to determine if probiotics could lessen the depressive behaviour observed after a myocardial infarction (MI). We tested the hypothesis that probiotics achieve their central effects through changes in the intestinal barrier. **Methods:** Male Sprague-Dawley rats received probiotics (1 billion live bacteria of *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) or placebo every day dissolved in drinking water, beginning one week before induction of myocardial ischemia. An infarct has been induced on half of the cohort, by the occlusion left anterior coronary artery (40 minutes) followed by reperfusion. The other half was subjected to the same procedure without coronary occlusion. One week after the infarction, the animals received probiotic treatment until sacrifice after 2 weeks. The depressive behaviour was evaluated by three tests: social interaction, forced swim and foot shock. **Results:** The obtained results indicate that in the absence of infarction, probiotics have no significant effect. Even though they are of the same MI gravity, the rats treated with the probiotics have shown more social interaction and have a better performance in the forced swim and foot shock tests compared to the untreated MI rats ($p < 0,05$). **Conclusion:** Probiotics diminish the depressive behaviour observed after a myocardial infarction by a mechanism which could implicate the integrity of the intestine barrier.

Keywords : Probiotics, myocardial infarction, depression, inflammation, intestine

Table des matières

Chapitre 1. Infarctus du myocarde.....	12
1.1 Ischémie.....	12
1.2 Reperfusion	16
1.2.1 Lésions létales de reperfusion.....	16
1.2.2 Autres lésions.....	17
1.3 Inflammation	18
1.4 Apoptose.....	22
1.4.1 La voie intrinsèque.....	23
1.4.2 La voie extrinsèque	23
1.5 Voies de cardioprotection.....	26
1.5.1 La voie de Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK).....	27
1.5.2 La voie de Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE)	28
Chapitre 2. La dépression	30
2.1 Étiologie de la dépression.....	31
2.2 Hypothèses impliquées dans la dépression post-infarctus du myocarde.....	34
2.2.1 Hypothèse cytokine-dépendante.....	34
2.2.2 Hypothèse de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien.....	38
Chapitre 3. Les probiotiques	42
3.1 Les probiotiques et la physiologie intestinale	44
3.1.1 Barrière physique.....	44
3.1.2 Barrière fonctionnelle	46
3.2 Utilisation clinique des probiotiques.....	48
3.3 Les probiotiques et le stress.....	50
Chapitre 4. Les hypothèses	52
Chapitre 5. Article scientifique	54
N. B. : références numérotées selon le mémoire.....	54
Combinaison of <i>L. helveticus</i> R0052 and <i>B. longum</i> R0175 reduces post-myocardial infarction depression symptoms and restores intestinal permeability in a rat model	54

Chapitre 6. Discussion	72
Perspectives futures.....	80

Liste des tableaux

Tableau I. Probiotiques communément utilisées dans la prévention ou le traitement clinique.....	43
---	----

Liste des figures

- Figure 1-1. Activation des voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose. L'activation de la voie intrinsèque implique la relâche du cytochrome c (cyto. c) de la mitochondrie qui vient activer la formation de l'apoptosome (complexe Apaf-1/pro-caspase-9). Ce complexe active par la suite la caspase-9 initiateur de l'apoptose, puis la caspase-3, effectrice de l'apoptose. La famille des protéines Bcl (Bax, Bcl2) régule le tout et les facteurs AIF, EndoG, Omi, Smac favorisent l'apoptose, tandis que IAP vient l'inhiber. La voie extrinsèque s'active par la signalisation d'un récepteur de mort cellulaire (TNFR en exemple ici) lors de la liaison de son ligand (facteurs de croissance, cytokines (TNF- α), etc.). Cette liaison engendre l'activation de la caspase-8 via un facteur FADD, puis de la caspase-3. Un lien entre les deux voies existe également par l'activation de BID qui engendra l'apoptose par le sentier mitochondriale. 25
- Figure 1-2. Schématisation des différentes voies de cardioprotection SAFE (gris), RISK (vert) et MAPK (bleu). 29
- Figure 5-1. Myocardial infarct size (I), expressed as a percentage of the area at risk (AR), shows no difference between groups. The AR, expressed as a percentage of the left ventricle (LV), is similar between groups. n = 9 per group. 66
- Figure 5-2. Social interaction between animals. The data indicate that MI-vehicle rats interact less than the other groups with their congeners. Time is expressed in seconds. n = 6-8 per group. *indicates $p < 0.05$ for MI – Vehicle vs MI - Probiotics. 67
- Figure 5-3. Performance of rats from the 4 different groups in the forced swimming test. Escape and swimming time is less in the MI-vehicle compared to the other groups. No interaction was found for the immobility parameter. However, the main effects (inset) indicate that probiotics decrease immobility time whereas MI rats show more immobility than the vehicle group. n = 8-10 per group. *indicates

- p < 0.05 for MI – Vehicle vs MI – Probiotics, Inset: *indicates p < 0.05 between groups..... 68
- Figure 5-4. In the passive avoidance step-down test, MI-vehicle rats take more time to succeed in the test than the other groups (*p < 0.05). Inset: The number of trials is significantly higher in the MI-vehicle than in the other groups. n = 8-10 per group. *indicates p < 0.05 for MI – Vehicle vs MI - Probiotics..... 69
- Figure 5-5. Probiotics rats present less plasma IL-1 α concentrations than vehicle controls (main effect presented in the inset). No other difference was detected between groups. n = 5-6 per group. *indicates p < 0.05 Vehicle vs Probiotics..... 70
- Figure 5-6. FITC-dextran concentrations measured in $\mu\text{g/ml}$ of plasma before sacrifice. The data indicate that FITC-dextran level is significantly higher in the MI-vehicle group than in the other groups. N = 5 per group. *indicates p < 0.05 for MI – Vehicle vs MI - Probiotics. 71
- Figure 6-1. Schéma illustrant le lien entre l'infarctus du myocarde (IM), l'intestin et l'apparition de symptômes dépressifs. L'IM induit une réponse inflammatoire qui augmente la concentration de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , ...) en circulation. Ces cytokines vont induire l'apoptose au niveau du système limbique ainsi que provoquer l'altération de la barrière intestinale (BI). L'apoptose au niveau du système limbique mène à l'apparition de symptômes dépressifs. Les probiotiques atténuent l'apparition de ces symptômes en empêchant l'altération de la BI possiblement par l'activation des TLR2 (hypothétique pour l'instant) ce qui empêche la réponse inflammatoire (induite par la libération du contenu intestinal tel que les LPS) et donc, l'apoptose qui mène à la dépression. 79

Liste des abréviations

ACTH: *Adrenocorticotropic Hormone*

AMPC: Adénosine monophosphate cyclique

ATP : Adénosine TriPhosphate

BDNF: *Brain-derived neurotrophic factor*

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

CE: Cellule Endothéliale

COX : Cyclooxygénase

CRH: *Corticotropin-Releasing Hormone*

DAG: Diacideglycérol

DC : Cellules dendritiques

ECG : Électrocardiogramme

EGFR : Récepteur du facteur de croissance Épidermal

ERK: *Extracellular signal-Regulated Kinase*

GC : Guanylate Cyclase

GC: Glycocorticoïdes

GR: Récepteurs des glycocorticoïdes

HPA: Axe Hypothalamo-hypophyso-surrénalien

HSP: *Heat Shock Protein*

IDO : Indoléamine-2,3- dioxigénase

Ig: Immunoglobuline

IGF : *Insulin-like Growth Factor*

IL: Interleukine

IM : Infarctus de myocarde

INF : Interféron

IP₃: Inositol-3-Phosphate

JAK: Janus Kinase

KO: *Knock Out*
KYN : Kynurénine
LPS : Lipopolysaccharides
MP : Métalloprotéinase
MR : Récepteurs des minéralocorticoïdes
MUC : Mucines
NF- κ B : *Nuclear Factor-Kappa B*
PAMP : *Pathogen-Associated Molecular Pattern*
PGE2 : Prostaglandine E2
PK: Protéine Kinase
PLC γ : Phospholipase C γ
PPAR : *Peroxisome proliferators-activated receptor*
PTPm : Pore mitochondrial
RCPG: Récepteur Couplé aux Protéines G
RISK : *Reperfusion Injury Kinase Signalling*
ROS : Radicaux libres
SAFE : *Survivor activating factor enhancement*
sCR1: Récepteur soluble du complément humain type 1
STAT : *signal transducer and activator of transcription*
Tj : Jonctions serrées
TKBr: Récepteur Tyrosine kinase B
TLRs : *Toll-Like Receptors*
TNF/TNFR: *Tumor Necrosis Factor Receptor*
Trp : Tryptophane

*À mes parents, Brigitte et Jean-Pierre, qui
ont toujours cru très fort en moi et à Samir
qui m'encourage et me supporte au
quotidien.*

Remerciements

Je tiens à remercier sincèrement les gens qui m'ont aidée dans cette enrichissante aventure. Certains m'ont donnée un coup de main dans l'élaboration et la bonne mise en pratique de mon protocole, d'autres m'ont tout simplement appuyée au fil de ce projet. Je vous remercie à tous.

Je remercie avant tout mon directeur de recherche, le Dr. Guy Rousseau, de m'avoir chaleureusement accueillie au sein de son équipe et de m'avoir fait confiance, malgré mon cheminement hors du commun. J'aimerais davantage le remercier d'avoir été aussi présent et à l'écoute de tout mes tracass quotidiens. Sans cela, le passage long et périlleux qu'est la maîtrise aurait été extrêmement ardu! J'aimerais aussi remercier le Dr. René Cardinal de m'avoir permis de pratiquer dans les laboratoires du Centre de Biomédecine de l'hôpital du Sacré-Cœur de Montréal et d'enrichir mes connaissances au Département de Pharmacologie de l'université de Montréal.

Mes sincères remerciements vont à Isabelle Rondeau et à Thierno Madjou Bah pour m'avoir guidé au départ de ma maîtrise. Ils ont été pour moi des mentors incomparables et une source d'inspiration. J'aimerais autant remercier Kim Gilbert de m'avoir accompagnée tout au long de cette aventure, elle a été d'une aide précieuse durant les moments difficiles, autant académiques que personnels, et est devenue pour moi une véritable amie. Je ne pourrais passer sans remercier mon très cher stagiaire et ami Fabio Flores-Monaco qui, par son enthousiasme quotidien et son souci du travail bien fait, a su faire de mon été un moment inoubliable. Mes remerciements vont aussi à Caroline Bouchard et à Louis Chiocchio qui ont été présents pour les petits moments de détresse lors des chirurgies. Sans eux, nos petits animaux ne se porteraient pas aussi bien! J'aimerais les remercier d'avoir su écouter mes joies et mes peines et de toujours trouver les mots justes.

Je dois spécialement remercier ma famille, pour la confiance qu'ils m'apportent et pour l'encouragement sincère qui me pousse à dépasser mes limites jour après jour. Mon amoureux et complice Samir, pour son appui continu et son endurance à mes

changements d'humeur et Dieu sait qu'ils ont été nombreux en période de stress! Ma belle-maman Irina qui, en parlant en toute connaissance de cause, a su me rassurer et me motiver à continuer. Et finalement, un merci particulier à mon sage ami Claude-Olivier, qui m'a appris que la persévérance nous mène où l'on désire. Sans lui, je n'aurais pas songé pouvoir être où je suis présentement.

Merci à vous tous qui m'avez fait grandir!

Introduction

Chapitre 1. Infarctus du myocarde

L'infarctus du myocarde (IM) représente l'une des principales causes de mortalité et morbidité au niveau mondial. Au Canada, 70 000 cas surviennent annuellement et parmi ceux-ci, 17 000 patients en succombent [1]. La mort survient à la suite d'une ischémie prolongée menant à une insuffisance cardiaque aiguë accompagnée ou non de l'apparition d'arythmies. Plusieurs facteurs, dont les antécédents familiaux et les habitudes de vie, peuvent favoriser le développement de cette pathologie et mener à l'infarctus du myocarde.

1.1. Ischémie

L'ischémie se définit par la diminution ou l'arrêt complet de l'irrigation sanguine artérielle et par le fait même, par une diminution de l'apport d'oxygène aux tissus. D'un point de vue cardiovasculaire, une artère coronaire est affectée le plus souvent par la formation de plaques athérosclérotiques ce qui cause une diminution de la circulation sanguine à ce niveau. Lorsque le cap fibreux de la plaque athéromateuse se rompt, le contenu de la lésion entre en contact avec le sang et ses éléments, favorisant la formation d'un thrombus qui peut occlure complètement la lumière vasculaire et induire une ischémie. Lorsque l'ischémie se prolonge, ceci entraîne la mort de cardiomyocytes et provoque ce que l'on appelle un infarctus du myocarde.

Les changements métaboliques qui suivent l'occlusion d'une artère coronaire majeure se traduisent par l'arrêt d'un métabolisme aérobie par la mitochondrie pour faire place à la glycolyse anaérobie engendrant ainsi l'accumulation de produits glycolytiques tels que le lactate et l'alpha-glycérol-phosphate [2]. L'épuisement de la créatine phosphate est aussi observé peu et peu, tout ces changements menant à des dysfonctions contractiles et à

l'altération de l'électrocardiogramme. Carmeliet et coll. propose trois hypothèses expliquant les dysfonctions contractiles myocardiques [3]. Tout d'abord, l'inhibition de la disponibilité du Ca^{2+} pour les myofibrilles, soit par la diminution de l'influx au-travers de la membrane plasmique ou par la diminution de sa relâche via le réticulum sarcoplasmique. Deuxièmement, la désensibilisation des myofibrilles au Ca^{2+} suite à l'acidose, c'est-à-dire par l'interaction entre $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ au niveau de la troponine. Finalement, la cause la plus évidente étant l'insuffisance en adénosine triphosphate qui représente la source première d'énergie, en condition normal, pour la contractilité du muscle cardiaque.

Plus précisément, dans les dix premières secondes survenant l'événement occlusif, la diminution de la pression artérielle et du débit sanguin provoque une hypoxie [4]. À ce moment, l'arrêt de la phosphorylation oxydative arrive simultanément avec la réduction du système de transport terminal d'électron provoquant l'élévation du ratio NADH_2/NAD [5]. La glycolyse anaérobie, qui devient l'unique source significative de phosphate hautement énergétique, procure seulement une partie de l'énergie produite lors du métabolisme aérobie. Afin de remédier à la forte demande énergétique, les cellules myocardiques utilisent alors les réserves de créatine phosphate, qui deviennent totalement épuisées au bout de 3 minutes seulement [6]. Le substrat principal de la glycolyse anaérobie est le glycogène qui est converti en lactate par une série de réactions biochimiques, ce dernier ne pouvant pas être métabolisé par manque d'oxygène [7]. Le catabolisme du glycogène mène à l'élévation de la charge osmotique par l'accumulation d'ions H^+ , de lactate et de phosphates inorganiques [8]. Cette hausse d'osmolarité établit un gradient cellulaire permettant ainsi l'entrée d'eau et de sodium, se traduisant par de l'œdème cellulaire [9] et une sortie d'ions K^+ expliquant, en partie, les événements arythmogéniques sur l'ECG [10, 11]. En effet, dans les minutes suivant l'ischémie, l'ATP disponible diminue, ce qui entraîne un ralentissement des contractions des myofibrilles. De la même façon, la pompe Na^+/K^+ ATPase ralentit son activité ce qui induit une augmentation du Na^+ cytoplasmique et une diminution du K^+ . Finalement, l'augmentation de la concentration du Na^+

intracellulaire favorise l'activation de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ induisant une augmentation de calcium intracellulaire [12].

Des études réalisées sur le cœur canin ont démontré que le temps critique d'ischémie est de 15-20 minutes avant d'observer l'apparition de lésions irréversibles [13]. Si la circulation est rétabli à ce moment là, les lésions demeurent réversibles et il y aura retour à une situation normale après un délai. Au contraire, si la durée dépasse ce seuil, les lésions deviendront de plus en plus sévères et les cardiomyocytes seront irréversiblement atteints. Les lésions réversibles sont caractérisées par de l'œdème au niveau des cardiomyocytes et de la mitochondrie et une légère margination de la chromatine. Une relaxation et un étirement des myofibrilles sont aussi observés [14]. Bref, les myocytes démontrent des différences mineures par rapport aux tissus sains, à ce stade de l'ischémie.

Après 20-25 min, l'apparition de nécrose indique le début de la phase irréversible. Les granules de glycogène se font maintenant absentes. Les myocytes démontrent des noyaux plus petits avec une margination plus prononcée de la chromatine et une agrégation [7, 15]. L'œdème mitochondriale et cellulaire est accentué et des densités amorphes apparaissent dans la matrice mitochondriale. Ces densités sont composées majoritairement de lipides, de protéines dénaturées et de calcium [15], ce dernier pouvant inhiber davantage la phosphorylation oxydative [16]. Finalement, les ruptures des unités trilaminaires de la membrane annonce une mort éminentes des cardiomyocytes [17].

Le chien est un modèle animal souvent utilisé pour l'étude du système cardiovasculaire à cause de ses multiples similarités avec l'humain. Les résultats obtenus avec le cœur canin démontrent que l'infarctus du myocarde progresse selon le phénomène en de vague de front, c'est-à-dire que plus le temps d'ischémie est prolongé, plus la nécrose progresse de l'endocarde vers l'épicarde [6, 18]. La zone nécrotique, qui représente environ 50% à ce stade, est au niveau subendocardique et progresse rapidement par manque d'énergie disponible. On observe une infiltration des neutrophiles [19, 20] et après 3 à 6 heures, la

nécrose devient transmurale. Ces lésions seront éventuellement remplacées par du tissu cicatriciel.

La taille d'infarctus peut être facilement déterminée dans des modèles expérimentaux en utilisant du chlorure de tri-phényl-tétrazolium (TTC). Cette solution a pour caractéristique de former un précipité rouge dans les zones encore viables du ventricule médié par la présence de déhydrogénases actives [15] alors que les zones dépourvues de ces enzymes, et donc les zones nécrotiques, présenteront une couleur blanchâtre. Au cours des années, plusieurs contributeurs au développement de la zone nécrotique ont été identifiés. L'un des déterminants est le travail cardiaque par son exigence à utiliser l'énergie. Ainsi plus le travail cardiaque est important, plus la taille de l'infarctus du myocarde sera accrue [21]. À celui-ci s'ajoutent la taille de la zone à risque et le débit collatéral qui ont aussi une influence directe sur la taille d'infarctus. La zone à risque se définit comme le territoire normalement irrigué par l'artère coronarienne. Ainsi plus la région à risque est importante, plus le nombre de cardiomyocytes affectés par l'ischémie sera imposant. Toutefois afin de normaliser sa contribution entre les groupes expérimentaux, la taille de l'infarctus est représentée en pourcentage de la zone à risque. Le débit collatéral se définit par l'apport sanguin provenant d'anastomoses entre les vaisseaux permettant d'irriguer la zone à risque. Ainsi plus l'apport sanguin provenant de la circulation collatérale est important, moins intense sera l'ischémie. Le chien présente naturellement un réseau important de collatérales nécessitant son évaluation lorsque nous utilisons ce modèle. Toutefois le porc, le rat ou la souris ne présente pas de circulation collatérale et donc l'évaluation de la circulation collatérale durant l'ischémie n'est pas nécessaire. Chez l'humain, 40% des patients ayant déjà subi un IM dans le passé démontrent une circulation collatérale bien développée qui diminue l'intensité d'une ischémie subséquente [22, 23].

1.2. Reperfusion

Lorsqu'un IM survient, la meilleure stratégie afin de réduire les dommages est sans aucun doute de reperfuser, c'est-à-dire de rétablir la circulation dans les régions ischémiques dans les plus brefs délais. L'urgence de rétablir la circulation sanguine vient de la progression rapide de la zone nécrotique; ainsi plus vite sera établie la reperfusion, plus petite sera la zone nécrotique [24].

En plus de permettre le réapprovisionnement des tissus ischémiques en oxygène, la reperfusion permet aux cellules de se départir des déchets métaboliques accumulés tels que le lactate, les ions H^+ , le NH_3 , etc... [25]. C'est à ce moment que les rétablissements du pH, de la concentration osmotique ainsi que le niveau d'ATP intracellulaire seront possibles.

1.2.1. Lésions létales de reperfusion

Le rétablissement rapide du flot sanguin peut paradoxalement être délétère pour les cellules du myocarde présentant des dommages réversibles. En effet, plusieurs chercheurs ont suggéré que le rétablissement de la circulation sanguine peut exacerber les lésions cellulaires suite à la période ischémique [26, 27]. Pour d'autres, les lésions de reperfusion se traduisent par la mort de cellules, qui étaient encore viables avant le processus de reperfusion, représentant la cause d'environ 50% de la taille de l'infarctus [28].

Le réapprovisionnement des tissus en oxygène génère un stress oxydatif très élevé dû à l'augmentation de la production de radicaux libres et qui diminue, par le fait même, la biodisponibilité de l'oxyde nitrique (NO) qui joue un rôle important dans la signalisation intracellulaire. En effet, les radicaux libres tels que O_2^- peuvent réagir avec le NO pour former le peroxy-nitrite, agent qui catalyse l'oxydation des acides gras polyinsaturés, composants essentiels des phospholipides [29]. Les radicaux libres, par la présence d'un électron libre, sont donc des molécules réactives très instables causant des dommages importants à l'ADN et aux membranes lipidiques [30]. La disponibilité réduite de NO

engendre une diminution des effets cardioprotecteurs normalement apportés par celle-ci incluant : l'inhibition de l'accumulation de neutrophiles, l'inactivation des radicaux superoxydes et l'amélioration du débit coronarien [31]. Un traitement de L-Arginine visant à induire le niveau de NO peut réduire la taille de l'infarctus dans un modèle animal [32], mais les essais cliniques à partir du donneur de NO, le nicorandil, ne sont pas concluants [33, 34].

Au moment de la reperfusion, la concentration intracellulaire en Ca^{2+} augmente abruptement suite aux dommages encourus par la membrane du réticulum sarcoplasmique. Cela a pour effet d'induire la mort des cardiomyocytes par l'ouverture du pore mitochondrial non-sélectif (PTPm) et la contraction excessive des cellules cardiaques [28, 35]. Des études expérimentales ont démontré une diminution significative de la taille de l'infarctus par l'administration d'antagonistes des canaux calciques [36] ou d'inhibiteurs de l'unipporteur calcique mitochondrial [37].

Finalement, un autre paradoxe qui explique les lésions de reperfusion vient du rétablissement rapide du pH physiologique. Effectivement, l'évacuation du lactate dans la circulation suivi de l'activation de l'échangeur Na^+/H^+ et du symporteur sodium-bicarbonate contribuent aux lésions létales de reperfusion [38]. La restauration du pH physiologique va également engendrer l'échange $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ce qui mène à la surcharge calcique H^+ -dépendante dans le cytosol et finalement à la mort cellulaire Ca^{2+} -dépendante [39, 40]. L'utilisation de l'eniporide en clinique, un inhibiteur de l'échangeur Na^+/H^+ , n'a toutefois pas démontré d'effet cardioprotecteur [41].

1.2.2. Autres lésions

La reperfusion cause quatre types de dysfonctions cardiaques, le plus sévère étant les lésions létales de reperfusion décrites dans la section précédente. Un autre type nommé dysfonction contractile des cellules endommagées de manière réversible (« stunning ») est

une dysfonction qui persiste malgré une irrigation sanguine normale [42]. Ce phénomène peut cependant être corrigé au bout de quelques heures à quelques jours selon la gravité et la durée de l'ischémie préalable.

Un troisième phénomène observable est le « no-reflow » qui se définit par l'incapacité de restaurer un débit myocardique en dépit du fait que l'obstruction ait été levée [43]. Il est causé par l'impédance du flot sanguin microvasculaire rencontrée lors de l'ouverture de l'artère coronaire responsable de l'infarctus [44].

Finalement, le dernier type de dysfonction comprend les arythmies cardiaques surtout ventriculaires, qui peuvent potentiellement être dangereuses, mais plusieurs traitements pharmacologiques sont maintenant disponibles diminuant ainsi les risques encourus [45].

1.3. Inflammation

Par inflammation on entend ici un ensemble inné d'événements non spécifiques, étroitement liés entre eux et déclenchés par un envahisseur étranger, une lésion tissulaire, ou les deux à la fois [46]. La reperfusion des tissus myocardiques cause un processus inflammatoire important qui pourrait expliquer en partie les lésions observées. Le contenu des cellules lésées, lors de l'infarctus, se retrouve dans la circulation sanguine du fait que l'inflammation augmente la perméabilité membranaire. Ce phénomène provoque une réponse inflammatoire innée qui implique les *Toll-Like Receptors* (TLRs) présents dans le tissu myocardique et les vaisseaux sanguins. Les TLRs sont des protéines transmembranaires capables de détecter un répertoire distinct de molécules des pathogènes très conservées. En effet, les débris cellulaires libérés dans la circulation, tels que la fibronectine, le HMGB1 et les *Heat Shock Proteins* (HSP), déclenchent un signal de danger qui active la libération de cytokines pro-inflammatoires via ces récepteurs. La confirmation

du rôle important du TLR4 dans un modèle d'ischémie-reperfusion vient de la réduction de la taille d'infarctus dans un modèle KO de TLR4 [47].

De plus, la réponse inflammatoire innée peut aussi être activée par le système du complément composé d'un ensemble de protéines désignées par des numéros (C1-C9). La plupart d'entre-elles circulent dans le sérum sous une forme de proenzymes inactives jusqu'à leur activation par un clivage protéolytique, éliminant ainsi le fragment inhibiteur et exposant le site actif. Il existe trois voies d'activation du complément, mais la voie classique est celle entreprise par le myocarde. Une cascade d'activité protéolytique mène à l'activation séquentielle de la voie classique du complément. Tout d'abord, cette voie débute habituellement par la formation de complexes immuns ou par la liaison d'un anticorps à un antigène à la surface d'une cible. Un changement conformationnel de la région Fc de la molécule d'IgM est alors induit par la formation du complexe immun exposant ainsi le site de liaison du composant C1 du complément. De cette façon, C1 activé peut se lier à ces deux substrats, C2 et C4, qui engendre la formation de la C3 convertase (C4b2a). La C3 convertase va à son tour cliver C3 et former la C5 convertase (C4b2a3b). Finalement, la liaison du segment C5b aux composantes restantes (C6-C9) forme le complexe d'attaque membranaire (MAC) qui forme un pore en s'insérant dans la membrane [48]. La cellule subit alors une déstabilisation osmotique par la diffusion libre des ions et des petites molécules engendrant la mort de celle-ci. Par ailleurs, le clivage protéolytique mène à l'apparition d'anaphylatoxines (C3-4-5a) qui sont de puissantes substances chimioattractantes [49]. L'inhibition de l'activation du complément soit par l'administration d'anticorps contre C5a ou de récepteurs solubles du complément humain de type 1 (sCR1) s'est montrée efficace à réduire la taille d'infarctus [50, 51].

Les tissus endommagés lors de l'IM libèrent des ligands endogènes (HSP, hyaluronate, fragments de fibronectine) qui induisent un signal de danger et par le fait même, activent les TLRs [52]. La famille des TLRs comprend 12 membres, mais leurs rôles respectifs dans les pathologies cardiaques ne sont pas encore bien connus. Cependant,

nous savons que TLR4 est exprimé au niveau du cœur et son expression est fortement induite lors d'infarctus chez le rat et la souris [53]. Un modèle TLR4 KO a démontré une diminution de la taille de l'infarctus et une réduction de la réponse inflammatoire suggérant un rôle important de TLR4 dans les lésions occasionnées par l'infarctus [47]. Les TLRs, une fois activés, peuvent à leur tour activer les membres du groupe des pentraxine (superfamille de protéines multimériques de « pattern-recognition ») dont la protéine C-réactive (CRP). L'accumulation de CRP au niveau du cœur active localement la cascade du complément décrite ci-haut et accentue les lésions des cardiomyocytes suite à l'IM [54].

L'activation des TLRs, la cascade du complément et la présence de radicaux oxygénés sont tous des déclencheurs de l'inflammation post-infarctus médiée par le facteur nucléaire kappa B (NF- κ B). Ce dernier est un facteur de transcription important dans la régulation de nombreux gènes dont les cytokines pro-inflammatoires. Pour ce faire, la PLC γ active hydrolyse une composante phospholipidique membranaire produisant ainsi le DAG et l'IP $_3$. Certaines isoformes de PKC sont alors activées par le DAG et le Ca $^{2+}$ ce qui crée l'activation de la kinase IKK [48]. NF- κ B, sous sa forme inactive au niveau du cytoplasme, est lié à la protéine cytoplasmique I κ B, dont les régulateurs I κ B α et I κ B β , ce qui l'empêche d'être transféré au noyau. La phosphorylation de I κ B par IKK (I κ B kinase) activée libère NF- κ B, qui peut alors transloquer au noyau afin de se lier à son promoteur et activer la transcription des gènes [55]. Il a été démontré que la surexpression d'un inhibiteur d'I κ B médiée par un adénovirus au moment de la reperfusion diminue la taille de l'infarctus chez le rat [56].

Le processus inflammatoire enclenché durant l'ischémie mène à la production d'une multitude de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 et TNF α . Les TNF α , IL-2 et IL-6 sont des inotropes négatifs qui inhibent la contractilité du muscle papillaire via la NO synthase myocardique [57]. L'administration d'un inhibiteur de NO synthase, L-NMMA, inhibe l'effet inotrope négatif [57]. L'IL-8 fait partie de la famille des récepteurs de chimiokines ce qui induit le chimiotactisme des leucocytes à la zone

infarctie [48, 58]. En effet, les chimiokines constituent un sous-groupe de cytokines, dont la signature fonctionnelle est leur capacité d'agir comme chimioattractants [48]. Bien que ces cytokines induisent l'apoptose dans de nombreux types cellulaires, il semble que celles-ci ne soient pas en cause dans la taille de l'infarctus. En effet, l'inhibition de la cytokine TNF α [59, 60] et l'administration de pentoxifylline [61], un inhibiteur de la synthèse de cytokines, n'ont pas démontré une réduction de la taille de l'infarctus.

Les cytokines et les protéines du complément ont des propriétés de chimiotactisme qui créent une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales (CE) et des leucocytes. Les neutrophiles sont les premiers à se fixer sur l'endothélium des régions inflammatoires et à extravaser dans les tissus. Pour ce faire, le roulement est initié par une liaison transitoire des sélectines de l'endothélium vasculaire aux mucines PSGL-1 et ESL-1 des neutrophiles, interaction semblable à du velcro. Les chimioattractants au site inflammatoire activent une voie de transduction du signal en se fixant sur des récepteurs spécifiques à la surface des neutrophiles. Les molécules intégrines subissent alors un changement de conformation leur permettant d'adhérer fermement, via CD11/CD18, aux molécules ICAM à la surface des CE. L'extravasation des neutrophiles vers le tissu myocardique ischémique se fait par PE-CAM-1 au niveau des jonctions endothéliales [58].

Lors d'une réponse immunitaire, les neutrophiles répondent à des signaux intercellulaires afin d'initier une réponse efficace contre l'agent à éliminer. Dans le cas de l'ischémie-reperfusion, le signal est généré par les cardiomyocytes endommagés et les cellules endothéliales. Les neutrophiles arrivent avec de nombreuses armes de défense à déployer. Bien que la phagocytose soit le principal mécanisme, deux autres moyens additionnels sont employés, que l'on nommera ici : l'attaque non-oxydative et l'attaque oxydative. Dans le premier cas, la défense a lieu quand les neutrophiles fusionnent avec les phagosomes, ajoutant ainsi des protéases et lysosymes qui détruiront des composants structuraux par cassure hydrolytique [62]. L'attaque oxydative, tant qu'à elle, se base sur la

libération de ROS déclenchée par la phagocytose, qui active la NADPH phagosome oxydase [63]. Il est donc évident que ces mécanismes de défense induits par les neutrophiles peuvent être délétères pour le tissu myocardique. De plus, l'accumulation de ceux-ci peut provoquer une diminution de la circulation sanguine. Toutefois les études démontrent des résultats mitigés concernant l'implication réelle de ceux-ci dans les lésions de reperfusion. Certaines démontrent clairement un effet néfaste par l'observation d'une diminution de la taille de l'infarctus lors d'administration d'anticorps ciblant les molécules d'adhésion ou lors d'une situation leucopénique [64-66]. À l'opposé, d'autres études ne démontrent aucune différence significative pour des situations similaires [67].

Bien que l'inflammation augmente l'effet nocif de la reperfusion, ce processus est tout de même essentiel pour la préparation de la cicatrisation et la réparation ultérieure des tissus affectés [46]. Il est donc impératif de ne pas l'inhiber en totalité, ce qui occasionnerait des dommages plus importants.

1.4. Apoptose

L'infarctus du myocarde engendre deux types de mort cellulaire distincts soit, la nécrose et l'apoptose. La nécrose est une mort cellulaire résultant d'une lésion et mène à l'activation du processus inflammatoire local décrit ci-haut. Les changements observés au niveau de la cellule sont l'agrégation de la chromatine, le gonflement des organites et la floculence des mitochondries [68, 69]. Ces changements mènent à la désintégration de la cellule et à la libération du contenu intracellulaire, créant ainsi l'inflammation [70].

L'apoptose est plutôt une mort cellulaire programmée, processus dans lequel la cellule participe activement à sa disparition. Ce procédé est un facteur essentiel de la régulation homéostatique de nombreux types de populations cellulaires [48]. Les changements morphologiques caractéristiques sont la convolution, la condensation et la ségrégation de la chromatine ainsi que la condensation du cytoplasme [71]. Ces

modifications mènent à la fragmentation nucléaire et à la turgescence de la membrane plasmique causant la formation de corps apoptotiques. Contrairement à la nécrose, les corps apoptotiques, qui sont phagocytés par le signal de la phosphatidylsérine, ne déversent pas leur contenu intracellulaire ce qui empêche l'induction de l'inflammation. Bien que certains chercheurs ont démontré que l'apoptose serait la cause de plus de 80% de la mort cellulaire lors de l'ischémie [72], cela s'explique mal par le fait que ce processus est ATP-dépendant [73]. Deux voies principales d'apoptose sont connues : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque. Tous deux mènent à l'activation de caspases, qui sont des protéases à cystéine responsables des changements biochimiques et morphologiques observés.

1.4.1. La voie intrinsèque

La voie intrinsèque (**fig. 1-1.**), dont la mitochondrie est l'actrice principale, est régulée par des protéines de la famille des Bcl-2. Les principales causes d'activation de cette voie sont l'hypoxie et le stress oxydatif. La grande famille de protéines homologues à Bcl-2 se compose de protéines pro-apoptotiques (Bax, Bid) et de protéines anti-apoptotique (Bcl-2, Bcl-X_L). Ces dernières empêchent l'ouverture du PTPm et la libération du facteur apoptogénique cytochrome c [74, 75]. Du coup, les molécules anti-apoptotiques inhibent la formation du complexe cyt c/ Apaf-1/ pro-caspase 9 (apoptosome) [76] qui, lorsque formé, enclenche la cascade de caspases (9 et 3) menant à l'apoptose cellulaire [77]. Au contraire, Bax induit le relargage de cytochrome c via l'ouverture du pore membranaire activant ainsi la formation de l'apoptosome [78]. Ce complexe va alors activer la caspase 9 qui activera à son tour la caspase 3, ce qui conduira à la mort programmée des cellules.

1.4.2. La voie extrinsèque

La voie extrinsèque (**fig. 1-1.**) implique les récepteurs de mort cellulaire de la super-famille des récepteurs TNF (TNFR-1, FAS et DR). Ces récepteurs, lorsque liés à leurs ligands respectifs, vont recruter un complexe formé de la pro-caspase 8 ainsi que d'une

molécule adaptatrice FADD. Ce complexe active par changement conformationnel la caspase 8 qui peut à son tour cliver et activer directement la caspase 3 [79, 80]. La caspase 8 peut aussi activer indirectement la caspase 3 via tBid, la portion active de Bid clivé par la caspase 8 [81], qui permet la libération de cytochrome c au niveau de la mitochondrie. Cette libération mène à l'activation de la caspase 3 par la caspase 9 comme discuté dans la voie intrinsèque indiquant un lien entre les deux voies.

Peu importe la voie apoptotique empruntée, le but ultime de ceux-ci est l'apoptose cellulaire. L'infarctus du myocarde et la reperfusion qui s'en suit, cause des dommages aux tissus myocardiques. Il a été observé qu'une longue période d'ischémie serait associée à de la nécrose tandis qu'une période prolongée de reperfusion serait plutôt associée à l'apoptose. Des traitements visant à diminuer la taille de l'infarctus lors de la reperfusion ont démontré beaucoup de succès. Parmi ceux-ci, mentionnons entre autres l'administration d'inhibiteurs de caspases [82, 83] ou encore la surexpression de Bcl-2 [84, 85] qui ont tous deux donné des résultats significatifs suggérant un rôle important de l'apoptose dans la taille de l'infarctus du myocarde.

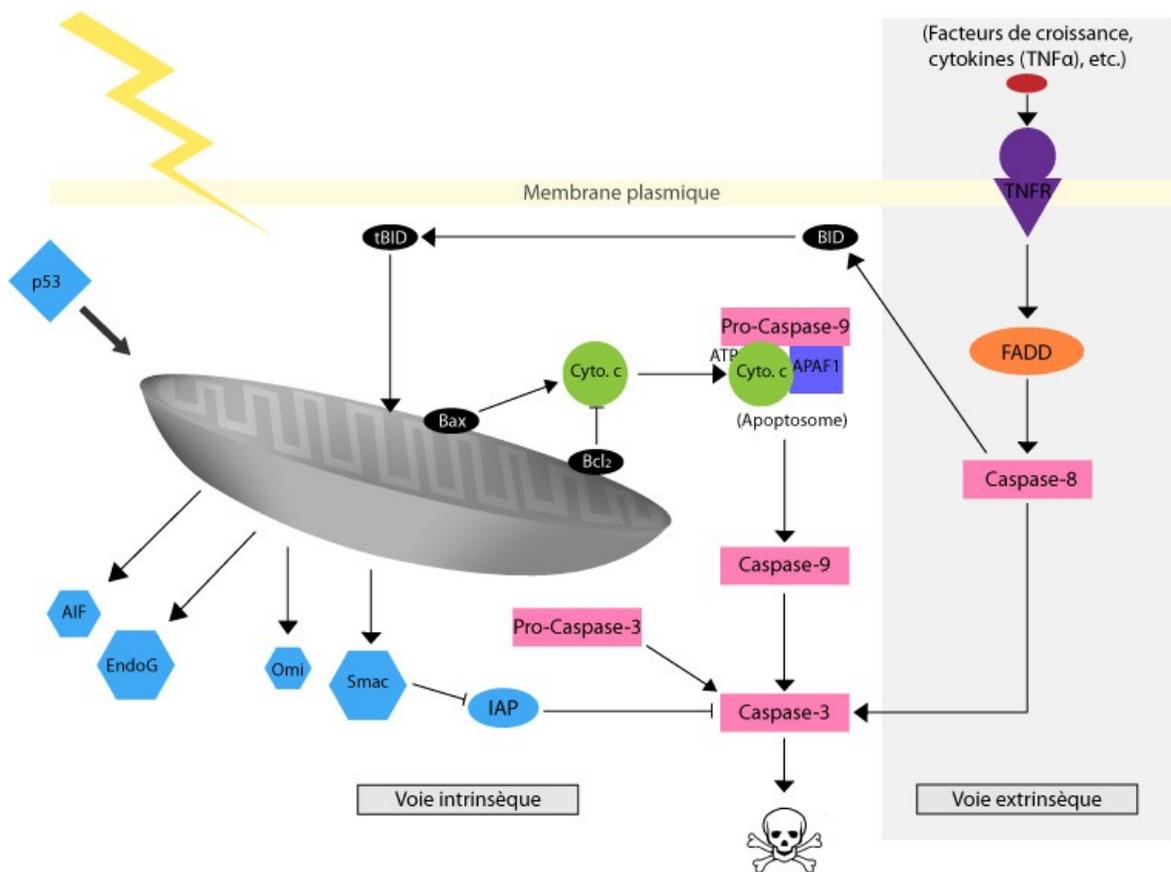


Figure 1-1. Activation des voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose. L'activation de la voie intrinsèque implique la relâche du cytochrome c (cyto. c) de la mitochondrie qui vient activer la formation de l'apoptosome (complexe Apaf-1/pro-caspase-9). Ce complexe active par la suite la caspase-9 initiatrice de l'apoptose, puis la caspase-3, effectrice de l'apoptose. La famille des protéines Bcl (Bax, Bcl₂) régule le tout et les facteurs AIF, EndoG, Omi, Smac favorisent l'apoptose, tandis que IAP vient l'inhiber. La voie extrinsèque s'active par la signalisation d'un récepteur de mort cellulaire (TNFR en exemple ici) lors de la liaison de son ligand (facteurs de croissance, cytokines (TNF- α), etc.). Cette liaison engendre l'activation de la caspase-8 via un facteur FADD, puis de la caspase-3. Un lien entre les deux voies existe également par l'activation de BID qui engendra l'apoptose par le sentier mitochondriale.

1.5. Voies de cardioprotection

Les effets délétères de la reperfusion ayant été décrit précédemment, il est dans la logique des choses de discuter des moyens présentement à l'étude qui permettraient d'éviter de tels dommages et de réduire la taille de l'infarctus. Pour ce faire, Murry et coll. [25] ont démontré pour la toute première fois les bénéfices du préconditionnement [86], qui consiste à créer de brèves occlusions suivies de courtes périodes de reperfusion intermittentes avant une occlusion soutenue. Les effets bénéfiques de ce processus se traduisent par une vitesse de déplétion de l'ATP diminuée lors d'ischémies subséquentes. De plus, la reperfusion intermittente permet l'évacuation des catabolites en grande partie responsables des lésions tels que le lactate, H^+ , NH_3 , etc. [25]. Dû au fait que ce procédé demande la connaissance du moment exact où aura lieu l'ischémie, il est cliniquement impossible d'appliquer cette méthode de cardioprotection. Toutefois, le phénomène peut être naturellement existant chez les patients souffrant d'angine chronique [25]. En effet, l'angine pré-infarctus diminue aussi les effets négatifs associés à la reperfusion et augmente le délai de la mort cellulaire si l'on compare ces patients à ceux qui n'ont jamais eu d'antécédents cardiovasculaires.

En 2003, Zhao et coll. [87] ont obtenus des résultats similaires, cette fois-ci, avec une méthode de postconditionnement. Cette étude, effectuée chez le chien, consistait à interrompre la reperfusion par 3 cycles d'ischémie de trente secondes suivant une période prolongée d'ischémie de 45 minutes. Cette méthode démontra une réduction de la taille de l'infarctus de 47% à 11% [87] et ce, en réduisant le stress oxydatif, diminuant la surcharge calcique et en améliorant du coup, la fonction endothéliale [28].

Parallèlement à ces études sur le pré- ou post-conditionnement, des interventions pharmacologiques avant ou au moment de la reperfusion permettent également de réduire la taille de l'infarctus [88-91]. Ces études ont permis d'identifier deux voies de protection qui doivent être activées au moment de la reperfusion pour induire une cardioprotection soit: la voie *Reperfusion Injury Salvage Kinase* (RISK) [92] et la voie *Survivor Activating Factor*

Enhancement (SAFE) [93] toutes deux agissant via l'inhibition de l'ouverture du PTPm [94].

1.5.1. La voie de Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)

La voie RISK (**fig. 1-2.**) est composée d'un groupe de kinases pro-survie incluant PI3K-Akt, MEK 1/2 et ERK 1/2 qui, lorsqu'activées au moment de la reperfusion, confèrent une protection du myocarde. Cette voie peut être activée par plusieurs agents dont l'insuline [95], la cardiotrophine-1 (CT-1), l'agoniste des récepteurs A2A de l'adénosine CGS21680[96] et l'atorvastatine [97, 98] par la modulation de l'expression de NOS.

Plus en détails, un stimulus de pré- ou postconditionnement active un récepteur et mène à la transactivation du récepteur de facteur de croissance épidermal (EGFR) via la matrice de métalloprotéinases (MP). Une fois activé, EGFR active de manière Src-kinase dépendante la voie PI3K-Akt. La signalisation de cette voie mène à la phosphorylation et l'activation de eNOS qui active à son tour la guanylate cyclase (GC) par la production de NO. La GC active alors la protéine kinase G (PKG) par la guanine-5-monophosphate cyclique (cGMP) et la PKG, à l'aide de la PKC ϵ , vont ensuite phosphoryler et ouvrir le canal K_{ATP} mitochondrial (mK_{ATP}). L'influx net de K⁺ ainsi généré cause une alcalinisation de la matrice mitochondriale et induit la production de ROS, au niveau du complexe I (NADH : ubiquinone oxidoréductase), qui agissent en seconds messagers [99]. Ces seconds messagers activent par la suite les médiateurs de pré-conditionnement tels que MEK1/2 et ERK1/2 par un mécanisme encore inconnu. L'activation de ces kinases bloque l'ouverture du mPTP ce qui empêche la libération du cytochrome c essentiel à la cascade d'activation des caspases ce qui résulte finalement en l'inhibition de l'activation de la caspase 3, qui possède un rôle déterminant dans l'apoptose, par une signalisation Ras-dépendante [100]. De plus, l'activation d'Akt peut supprimer la voie mitochondriale d'apoptose en phosphorylant la pro-caspase 9 [101], qui devient alors inactive, et en phosphorylant eNOS qui, par sa production de NO va aussi empêcher l'ouverture du mPTP. La protéine pro-

apoptotique Bax doit subir un changement conformationnel afin de s'insérer dans la membrane mitochondriale, étape également inhibée par Akt [102]. La voie RISK est, de plus, associée à l'augmentation des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 [103]. Le résultat final s'observe par une réduction de 40 à 50% de la taille de l'infarctus.

1.5.2. La voie de Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE)

La voie de RISK décrite précédemment a été démontrée comme ayant un rôle dans le pré et postconditionnement via l'activation des protéines kinases Akt et ERK1/2 [104, 105]. Une étude récente a démontré que l'inhibition de ces kinases n'altérait toutefois pas l'effet cardioprotecteur suggérant ainsi l'implication d'une autre voie cardioprotectrice indépendante de la voie RISK [106]. L'activation de la voie SAFE (**fig. 1-2.**), incluant l'activation du facteur de nécrose tumorale alpha ($TNF\alpha$) et du facteur de transcription STAT-3, est maintenant reconnue pour conférer une protection dans l'ischémie de préconditionnement [88, 89, 107].

$TNF\alpha$ est une cytokine pro-inflammatoire activée durant le processus de reperfusion, causant des dysfonctions cardiaques et induisant l'apoptose. Par contre, durant le préconditionnement, l'effet cardioprotecteur de cette molécule vient du fait que sa concentration dans le myocarde est réduite au moment de la reperfusion [108]. Plusieurs agents dont la bradykinine, l'insuline et les opioïdes peuvent enclencher la voie SAFE [109]. Ainsi, $TNF\alpha$ se lie à son récepteur membranaire spécifique, TNFR2, et active la transphosphorylation des tyrosines kinases JAK afin qu'elles phosphorylent à leur tour le médiateur principal STAT-3. Une fois activé, celui-ci va être transloqué à la mitochondrie et au noyau. De cette façon, l'ouverture du PTPm est inhibée et l'activation du signal de suppression de cytokines (SOCS) au noyau va empêcher la stimulation excessive des récepteurs JAK afin d'éviter que l'effet cardioprotecteur soit renversé [89, 107].

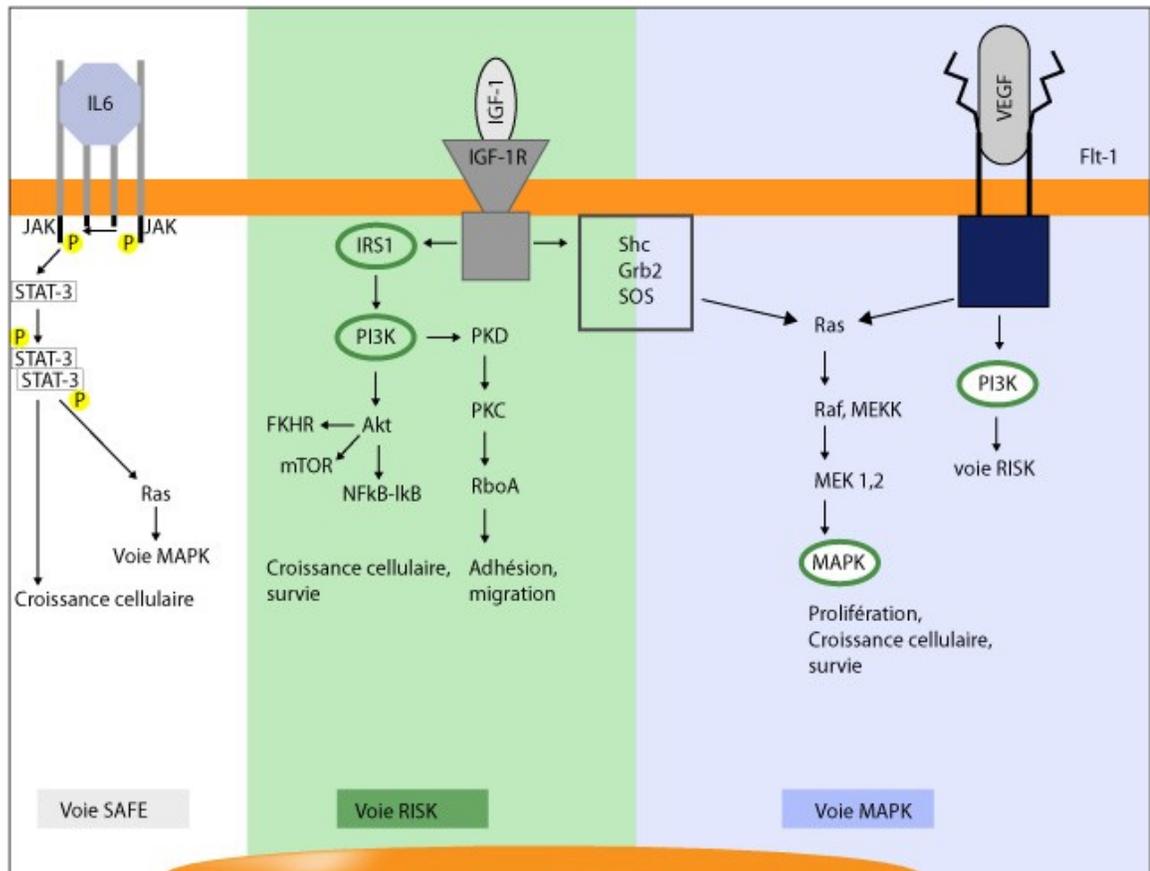


Figure 1-2. Schématisation des différentes voies de cardioprotection SAFE (gris), RISK (vert) et MAPK (bleu).

Chapitre 2. La dépression

Selon l'organisation mondiale de la santé, la dépression était la principale cause d'incapacité dans le monde en 2000 et continue à ce jour. Cette maladie mentale reste présentement méconnue par la majeure partie de la population. Elle représente un fardeau pour les personnes atteintes, puisqu'elles se sentent jugées et incomprises, ainsi que pour la société en engendrant des conséquences économiques importantes [110]. Les causes de cette maladie sont incertaines, mais de fortes tendances poussent à croire que, d'un point de vue social, le stress serait un élément déclencheur important. En effet, des études antérieures ont montré que les personnes ayant une vie dotée d'un plus haut taux de stress, au travail et ailleurs, sont beaucoup plus vulnérables à un grand nombre de problèmes de santé mentale [111, 112].

En plus de la pression sanguine élevée, les facteurs psychosociaux peuvent également prédire l'apparition de maladies cardiovasculaires telle que l'infarctus du myocarde [113]. Bien que plusieurs facteurs comme le tabagisme, le régime alimentaire et nos habitudes de vie en général nous rendent plus vulnérables aux troubles coronariens [114], la prédisposition des individus dépressifs aux maladies cardiovasculaires semble être indépendante de ces facteurs de risque [115]. En effet, une étude longitudinale réalisée chez 2 832 américains démontre que la dépression augmente les risques de maladies cardiovasculaires ischémiques fatales et non-fatales [116], ces résultats étant également appuyés par de nombreuses études [117-119]. La relation inverse est également valable. Après un infarctus du myocarde, 65% des patients présentent des symptômes de dépression [120] et parmi ceux-ci, 20% vont éventuellement développer une dépression majeure [120, 121]. Il faut mentionner que le risque de mortalité de cause cardiaque est accru dans les 6 mois suivant l'infarctus et est approximativement quadruplé chez les patients dépressifs en comparaison avec les patients ne présentant aucun symptôme de dépression [122]. L'association entre la mortalité cardiovasculaire et la dépression majeure est observable

jusqu'à 10 ans suivant l'infarctus du myocarde [123]. Il va sans dire que les patients présentant certains symptômes doivent être sérieusement pris en charge afin de leur fournir le bon diagnostic, étape qui semble être une faille dans le système actuel [122, 124-126].

D'un point de vue clinique, la dépression majeure se diagnostique actuellement par une analyse psychologique lors d'une rencontre patient-spécialiste. Les symptômes vont souvent de l'anhédonie à des difficultés cognitives en passant par des troubles d'appétit et de sommeil, et ce sur une période de deux semaines et plus [127]. Dans certains cas, cette détresse psychologique et physique peut mener au suicide lorsqu'elle n'est pas traitée adéquatement.

2.1. Étiologie de la dépression

Un bon nombre d'études histologiques et fonctionnelles sont en cours depuis plusieurs années afin de permettre une meilleure compréhension de la pathophysiologie de la dépression majeure. Chose certaine, il existe véritablement un lien entre la dépression et les maladies coronariennes. Afin de mieux comprendre ce phénomène, une description de l'étiologie de la dépression s'impose. La dépression est une maladie comportant de nombreuses inconnues, mais quelques hypothèses, lorsque pris ensemble, semblent répondre aux nombreux points d'interrogation [128].

La première hypothèse, appelée monoaminergique, a été émise à la suite de l'administration de réserpine aux patients souffrant d'hypertension. Chez ces patients, une diminution de la concentration de monoamines causée par ce médicament concordait avec l'apparition de symptômes dépressifs [129]. Les traitements anti-dépresseurs actuels se basent sur cette hypothèse dans le but de moduler les concentrations de neurotransmetteurs [130]. Les neurotransmetteurs monoaminergiques comprennent les catécholamines (dopamine, adrénaline, noradrénaline) et la sérotonine [131]. Au niveau synaptique, quelques heures après l'administration du traitement, l'augmentation de sérotonine ou de

dopamine se détecte en inhibant soit le recaptage présynaptique, soit l'enzyme de dégradation des monoamines (monoamine oxydase) [132]. Cependant, chaque drogue n'étant efficace que chez 60 à 70% des patients [133] et le fait que certains anti-dépresseurs n'agissent pas directement sur le système monoaminergique (p.e. antagoniste du glutamate) [127] suggèrent que d'autres mécanismes sont impliqués dans la neurobiologie de la dépression.

La seconde hypothèse provient du fait que des modifications moléculaires et structurelles ont été observées chez des patients dépressifs [134]. Cela suggère que des altérations dans la plasticité neuronale seraient en cause de l'état de ces patients. Des études post-mortem chez des patients souffrant de dépression majeure ont démontré une atrophie des régions de l'hippocampe et du cortex préfrontal [135-138] ainsi qu'une modification de la densité et de la forme des cellules gliales et des neurones [139]. Ces régions font partie du système limbique qui régit les émotions, les fonctions motrices et cognitives [140]. Le facteur de croissance neurotrophique BDNF (de l'anglais *brain-derived neurotrophic factor*) est un acteur important dans la neurogenèse et la régulation de la plasticité neuronale [127]. Son effet vient de l'activation de son récepteur tyrosine kinase B (TKBr) au niveau des neurones et des cellules gliales. Des études réalisées chez des humains et chez des animaux démontrent une association entre le stress et une réduction des niveaux de BDNF. Cette perte de facteurs neurotrophiques contribue aux changements structurels observés au niveau de l'hippocampe, le gyrus cingulaire et le cortex préfrontal. L'hippocampe est important pour la mémoire contextuelle et la régulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA) [127]. Le gyrus cingulaire est, pour sa part, important dans la gestion des émotions et le cortex préfrontal joue un rôle dans l'apprentissage, la mémoire et les émotions [127]. Il va de soit que des modifications importantes au niveau de ces structures, telle qu'une perte de volume, peuvent mener à des désordres dépressifs prolongés. En effet, des évidences cliniques rapportent que le volume de ces régions est diminué chez des patients dépressifs [137, 141]. De plus, ces changements doivent nécessairement être associés à une diminution de facteurs

neurotrophiques affectant la neurogenèse. Effectivement, des études sur des humains ont rapporté une association entre la dépression et une chute des niveaux de BDNF dans le liquide céphalo-rachidien et le sérum ainsi qu'une diminution de l'activité du TKBr [127]. Les anti-dépresseurs administrés à long terme renversent ces altérations neurobiologiques en augmentant les concentrations de BDNF cérébrale via la voie de l'AMPC qui induit son expression [142-144].

L'interaction entre les facteurs neurotrophiques et leurs récepteurs est essentielle pour engendrer la prolifération, la migration et la différenciation neuronale et veiller également au maintien de l'intégrité neuronale à l'âge adulte. La diminution de ces facteurs observée dans la dépression mèneront éventuellement à l'apoptose des neurones [145]. En effet, une étude clinique réalisée chez des patients souffrant de dépression majeure a démontré la présence d'apoptose et de fragmentation d'ADN, dans les régions de l'hippocampe, du subiculum, du corps godronné, du CA1 et du CA4, chez 11 des 15 patients [146]. Dans un même ordre d'idées, le modèle d'infarctus du myocarde chez le rat utilisé dans notre laboratoire présente également de l'apoptose au niveau de diverses régions cérébrales [61, 147-149]. Ce même modèle a mené à l'identification d'un modèle de dépression chez le rat par l'apparition de symptômes s'apparentant fortement à la dépression observée chez l'humain. Dans ce même modèle, le système limbique démontre clairement une augmentation des marqueurs apoptotiques [149]. L'apoptose jouerait donc un rôle crucial dans la dépression majeure et ce fait est appuyé par les propriétés anti-apoptotiques de nombreux anti-dépresseurs. Toujours dans notre modèle animal, l'administration de sertraline a démontré une réduction des symptômes de dépression en plus de réduire l'apoptose précédemment observée dans certaines régions du système limbique [149].

Deux autres hypothèses semblent amener des réponses sur l'étiologie de la dépression, plus précisément sur la dépression post-infarctus du myocarde soit : l'hypothèse cytokines-dépendante et l'hypothèse de l'axe HPA.

2.2. Hypothèses impliquées dans la dépression post-infarctus du myocarde

2.2.1. Hypothèse cytokine-dépendante

Afin d'obtenir une réponse immunitaire efficace, plusieurs types cellulaires sont impliqués telles que les cellules lymphoïdes, les cellules de l'inflammation et les cellules hématopoïétiques. La communication complexe entre ces cellules est médiée par les cytokines, protéines sécrétées par les cellules immunes en réponse à divers stimulus (p.e. antigène étranger ou lésion cellulaire) [48]. Ces molécules de signalisation jouent également un rôle important dans le mouvement, la prolifération et la différenciation cellulaire [150]. Elles ont un effet sur la majorité des cellules de l'organisme, à condition que ces dernières possèdent les récepteurs appropriés à leur membrane, et peuvent agir de façon autocrine, paracrine ou endocrine. Les cytokines sont divisées en trois catégories, soit; les cytokines hématopoïétiques (IL-3, IL-5, G-CSF), les cytokines anti-inflammatoires (IL-3, IL-4, IL-10) et finalement les cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF) qui induisent la réponse immunitaire locale et systémique [151] et semble être en cause dans cette hypothèse cytokine-dépendante de la dépression.

Cette hypothèse se base sur des observations cliniques réalisées sur des patients traités à long terme à l'aide de thérapie à base d'IL-2 et d'INFs [152, 153]. Ces patients, bien qu'ils démontrent une nette amélioration de leur pathologie première, présentent également des symptômes caractéristiques de la dépression [154, 155]. Ces traitements sont communément utilisés en oncologie contre le sarcome de Kaposi ou autres formes de cancer résistants à la chimiothérapie et à la radiothérapie et chez les patients atteints de l'hépatite C [156]. Dans la plupart des cas, les anti-dépresseurs, tels que la paroxétine, se sont avérés efficaces pour prévenir l'apparition de ces symptômes [154, 157].

Les cytokines pro-inflammatoires principales impliquées dans l'apparition de symptômes dépressifs sont l'IL-1 β et le TNF- α . En effet, plusieurs études ont démontré que

l'administration systémique de LPS induit l'expression d'IL-1 β et l'augmentation d'ARNm de différentes protéines pro-inflammatoires dans le cerveau [158-162]. Cependant, la barrière hémato-encéphalique (BHE) est une série de structures formées de cellules endothéliales et de jonctions serrées, d'astrocytes et de pompes à efflux, limitant la pénétration et la diffusion des substances hydrophiles [156]. Seules les molécules lipophiles d'un poids moléculaire inférieur à 400 Da peuvent y traverser librement par diffusion [163]. Puisque les cytokines sont des molécules hydrophiles d'environ 15 à 25 KDa [164], elles doivent nécessairement être aidées par différents mécanismes afin de passer du milieu périphérique pour atteindre le cerveau. À ce jour, quatre voies ont été proposées afin d'expliquer le phénomène. La première voie implique les nerfs afférents; la production locale de cytokines suite à une infection engendre la liaison de celles-ci à leurs récepteurs associés à des nerfs tels que le nerf vague ce qui active la transmission du signal des cytokines au cerveau [165, 166]. La seconde voie en est une humorale impliquant les TLRs en surface des cellules *macrophage-like* des organes périventriculaires qui activent la production de cytokines pro-inflammatoires en réponse à des PAMPs (de l'anglais *pathogen-associated molecular patterns*) circulants [167]. Puisque ces organes sont à l'extérieur de la BHE, les cytokines peuvent ensuite entrer par diffusion de volume [168], une forme de neurotransmission qui permet aux neurotransmetteurs et aux cytokines d'atteindre les récepteurs extra-synaptiques [156]. La troisième voie engage les transporteurs à influx au niveau de la BHE. Les nombreuses cytokines pro-inflammatoires présentes dans la circulation systémique peuvent gagner l'accès au cerveau via ce système de transport saturable [169]. Finalement, la dernière voie implique les récepteurs IL-1 localisés sur les macrophages périvasculaires et les cellules endothéliales des veinules du cerveau [170, 171]. L'activation de ces récepteurs par les cytokines en circulation résulte en une production locale de prostaglandine E2 (PGE2) [156]. Bref, la communication du système immunitaire vers le cerveau utilise deux processus soit, un lent humoral et un rapide où les nerfs afférents sont impliqués [156].

Au niveau des cellules de la BHE, la transcription de gènes est enclenchée par les cytokines pro-inflammatoires. La voie NF- κ B est activée par l'IL-1 β et mène à la production de la cyclo-oxygénase 2 (COX-2) dans le cerveau [172]. Cette étape semble être cruciale dans l'émergence des symptômes de dépression observés après une quelconque stimulation du système immunitaire. En effet, la COX-2 est une enzyme limitante qui catalyse la conversion de l'acide arachidonique (AA) en PGE2 [172]. De nombreuses études indiquent que l'injection centrale de PGE2 cause de la fièvre [173-175], de l'anorexie [176-178] et l'apparition de symptômes dépressifs [173]. De plus, il a été démontré que PGE2 induit de manière dose-dépendante l'apoptose par l'activation des caspases dans les cellules du cortex cérébrale de rat [179]. Comme mentionné dans le précédent chapitre, l'apoptose au niveau du système limbique pourrait être en cause dans la dépression [59]. L'augmentation des concentrations de PGE2 activé par les cytokines qui induisent l'expression de la COX-2 serait donc fortement liée à ce phénomène. Dans ce sens, l'inhibition de la voie NF- κ B bloque l'induction de COX-2 dans le cerveau et rétablit les niveaux d'interactions sociales et de mobilité chez la souris après l'activation du système immunitaire par IL-1 β [180].

L'administration aigue ou chronique de cytokines induit une modification des concentrations de neurotransmetteurs menant à des troubles comportementaux qui concordent à ceux observés chez les patients dépressifs [164]. Par exemple, l'injection intra-musculaire de l'IFN- α chez le rat cause une diminution des concentrations de tetrahydrobiopterine (BH₄), coenzyme importante dans la synthèse de la dopamine, et également de la dopamine [181]. Une autre façon pour les cytokines d'altérer la concentration des neurotransmetteurs se fait via la stimulation de multiples voies de signalisation de l'inflammation telles que NF- κ B et MAPK. Par ces voies, les cytokines peuvent activer l'indoléamine-2,3-dioxygénase (IDO), une enzyme qui catabolisera le tryptophane (Trp) en kynurénine (KYN) [164]. Le tryptophane est un acide aminé précurseur de la sérotonine et donc, lorsque catabolisé, diminue la biodisponibilité de cette dernière [156, 182]. Appuyant le rôle de l'IDO dans l'induction de la dépression cytokine-

dépendante, une étude clinique a démontré que la diminution de Trp et l'augmentation en KYN dans la circulation périphérique sont associées avec le développement de la dépression chez des patients traités à l'IFN- α [183]. En ce sens, l'inhibition de l'IDO chez des souris auxquelles des LPS ont été administrés, diminue les symptômes dépressifs auparavant observés [184].

De plus, l'administration d'inducteurs de cytokines chez des volontaires sains appuie également cette hypothèse. En effet, l'injection de LPS chez ces volontaires provoque une augmentation des symptômes dépressifs et d'anxiété [185], et l'administration du vaccin à base de *Salmonella typhi* chez des individus en santé induit également une humeur dépressive, de la fatigue et un ralentissement des fonctions psychomotrices [186]. Dans les deux cas, la sévérité des symptômes est en corrélation avec l'induction de la concentration de cytokines dans le sang périphérique [164]. Il faut noter aussi l'importance de la balance entre les cytokines pro-/anti-inflammatoires. Chez les patients dépressifs majeurs, on remarque une réduction des cytokines anti-inflammatoires [187] au profit des cytokines impliquées dans l'inflammation (IL-1, IL-6 et TNF- α) [188, 189]. Dans divers modèles animaux, l'administration de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 ou l'IGF-1 semble moduler la durée et l'intensité des symptômes dépressifs [190-192]. Ces données sont appuyées par une étude réalisée sur des souris qui démontre que la fièvre induite par les LPS est exagérément prononcée et plus prolongée chez les IL-10 KO [193]. Également, les anti-dépresseurs inhibent la production de cytokines pro-inflammatoires induite par les LPS et engendrent la production de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 [194].

Notre modèle d'infarctus du myocarde chez le rat ne fait qu'appuyer davantage cette hypothèse cytokine-dépendante de la dépression. En effet, l'infarctus du myocarde enclenche un processus inflammatoire important augmentant ainsi la concentration de cytokines en périphérie et également dans l'hypothalamus, par les nerfs afférents provenant du cœur [195]. L'apoptose observée au niveau du système limbique dans notre modèle

animal est sans doute causée par l'augmentation accrue des cytokines pro-inflammatoires [59]. Comme discuté dans le chapitre précédent, les cytokines ont la capacité d'activer directement la voie extrinsèque de l'apoptose [79]. De plus, le fait que les cytokines puissent induire la production de PGE2 a aussi été observé par notre équipe. En effet, une augmentation de l'apoptose après un IM a été observée dans les régions de l'amygdale et de l'hippocampe [61], deux régions où l'on retrouve une forte concentration de récepteurs de PGE2 [196]. Cet effet a été renversé dans l'amygdale par l'inhibition de la COX-2 par le celecoxib [197]. L'inhibition de la synthèse des cytokines par la pentoxifylline s'est aussi montrée efficace dans la réduction de l'apoptose au niveau du système limbique [61]. Finalement, toujours dans notre modèle animal, l'agoniste des récepteurs A2A de l'adénosine (CGS 21680) [198] et la sertraline [149], qui possèdent des propriétés anti-inflammatoires, ont également réduit l'apoptose dans le système limbique.

En somme, le processus inflammatoire et le déséquilibre ainsi créé entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires sont vraisemblablement en cause dans l'apoptose cérébrale observée et l'apparition subséquente de symptômes dépressifs après un IM. Cependant, la section qui suit s'attardera sur une autre hypothèse pouvant expliquer cette pathologie soit, l'hypothèse de l'axe HPA, qui peut également être modulée par les cytokines. L'importance individuelle de chacune des hypothèses reste donc ambiguë actuellement et demande davantage d'investigation de la part des chercheurs.

2.2.2. Hypothèse de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien

En présence d'événements stressants, le corps réagit par une réponse physiologique impliquant diverses régions du cerveau, y compris celles du système limbique, afin de répondre rapidement à l'agression. Tout débute par l'envoi d'un stimulus aux neurones de l'hypothalamus ce qui active l'axe HPA [199]. Les neurones se situant dans le noyau paraventriculaire sécrètent alors la corticolibérine (CRH), une hormone hypophysiotrope. La CRH est alors libérée dans le système porte et ensuite dirigée vers l'hypophyse où elle

agit synergiquement avec la vasopressine pour enclencher la libération de l'hormone corticotrophine (ACTH) par les cellules endocrines de l'hypophyse. L'ACTH ainsi libérée va lier ses récepteurs au niveau de la partie corticale des glandes surrénales via la circulation sanguine. Cette liaison engendre la synthèse de glucocorticoïdes (GC), principalement le cortisol chez l'humain (corticostérone chez les rongeurs) [200, 201], pouvant agir à de multiples endroits du corps. Les GC vont ensuite interagir avec les récepteurs des GC (GR) et les récepteurs des minéralocorticoïdes (MR), se situant à la surface de divers tissus et organes, avec une différente affinité [200]. En effet, les MR ont une plus grande affinité pour les GC endogènes (cortisol) par rapport au GR qui ont plutôt une affinité pour les GC de synthèse (dexaméthasone) [164]. L'interaction entre les GC et les récepteurs active la boucle de rétroaction négative, lorsque les concentrations de GC sont trop élevées, ce qui permet le retour aux conditions physiologiques en diminuant la relâche de CRH par l'hypothalamus et d'ACTH par l'hypophyse [200, 201]. Ces hormones contrôlent les fonctions métaboliques périphériques et la réponse immunitaire.

Cependant, l'activation de l'axe HPA n'a pas pour seul rôle le contrôle du métabolisme et des fonctions immunes, elle peut aussi avoir des effets prononcés sur le cerveau. Effectivement, les GC veillent à la survie neuronale, régulent la neurogenèse et la taille de certaines structures du système limbique qui sont importantes pour la mémoire et les émotions [202]. Un dérèglement de cet axe mène à des dommages importants à ce niveau. En ce sens, la dépression est associée à des anomalies hormonales causées en partie par une dysfonction de l'axe HPA. Les patients souffrant de dépression majeure démontrent dans la majorité des cas une augmentation des niveaux de cortisol dans l'urine, le sang et le liquide céphalo-rachidien [203] ainsi qu'une augmentation de la taille de l'hypophyse et de la glande surrénale [204]. Les études démontrent que l'homéostasie médiée par l'axe HPA fait défaut puisque les sujets démontrent toujours une augmentation du cortisol malgré un test de suppression à la dexaméthasone. En condition normale, la dexaméthasone devrait lier son récepteur GR et enclencher la boucle de rétroaction négative des hormones, ce qui est un échec dans ce cas-ci. Des épisodes de stress intense en

bas âge, tels que la séparation néonatale [205] ou les cas d'abus sexuels [206], ont également démontré des répercussions au niveau hormonal à l'âge adulte. L'administration d'anti-dépresseurs, tels que l'antagoniste de GR mifepristone, dans ces cas ont démontré un renversement des anomalies hormonales [207]. Il est intéressant de noter que certains patients diagnostiqués du syndrome de Cushing allaient consulter dans le but de diagnostiquer une dépression à la base. En effet, cette maladie est causée par un adénome de l'hypophyse qui provoque une hypersécrétion d'ACTH et de cortisol par la glande surrénale et engendre des troubles de l'humeur semblable à la dépression. Tout ces cas suggèrent que la dépression pourrait être déclenchée par l'hyperactivité de l'axe HPA.

Des évidences récentes démontrent que les anomalies des GR jouent un rôle crucial dans la pathophysiologie de l'hyperactivité de l'axe HPA dans la dépression. Comme mentionné précédemment, les patients souffrant de dépression majeure échouent le test de freinage à la dexaméthasone, mais une réduction de l'expression des GR a également été rapportée par une étude post-mortem sur des cerveaux d'humains dépressifs [200]. Des modèles expérimentaux de réduction de l'expression des GR ont montré une occurrence accrue vers les symptômes de dépression [208]. D'un point de vue moléculaire, les modèles ont démontré que les cytokines pro-inflammatoires ont le pouvoir de réduire les fonctions des GR via l'activation de la voie p38 MAPK [209]. De plus, les dérèglements des GR occasionnent des concentrations de GC très élevées ce qui intensifient la sensibilité de la région de l'hippocampe CA1 au glutamate et à l'hypoxie [210]. Dans un même ordre d'idées, on observe une atrophie des dendrites apicales des cellules pyramidales dans la région CA3 de l'hippocampe suite à de telles concentrations en GC [211]. La maturation et la survie des nouveaux neurones au niveau du corps godronné et du noyau paraventriculaire sont aussi altérées par une hausse anormale en GC [212]. L'inhibition des GR chez des patients dépressifs psychotiques permet de diminuer les symptômes ce qui appuie cette hypothèse en cause du déclenchement de la dépression [207].

L'hyperactivité de l'axe HPA peut être expliquée par des épisodes de stress intense, par une prédisposition héréditaire occasionnée par les différents polymorphismes des GR [213] ou encore par les cytokines pro-inflammatoires. En effet, l'inflammation et l'hyperactivité de l'axe HPA semblent prendre part d'un même processus physiopathologique [214]. L'hyperactivité de l'axe HPA est un marqueur de la résistance aux GC, se traduisant par l'activation d'une réponse immune engendrée par l'incapacité des hormones GC à agir sur leurs tissus cibles. De la même façon, un processus inflammatoire peut stimuler l'activation de l'axe HPA via l'action directe des cytokines sur le cerveau ou indirectement par l'induction de la désensibilisation aux GC [200]. Plus précisément, les médiateurs de l'inflammation vont activer les molécules médiatrices des voies signalétiques incluant NF- κ B, p38 MAPK et STAT-5 qui ont la capacité d'inhiber les GR [164]. Cette inhibition peut se produire par la suppression de la translocation du GR du cytoplasme vers le noyau ou encore via l'interaction de GR avec la protéine STAT-5 qui empêche la fixation ultérieure de GR à l'élément de réponse de l'ADN [215].

Chez les patients ayant subi un IM, une hypercortisolémie est associée aux symptômes dépressifs ce qui indique un dérèglement de l'axe HPA [216]. De toute évidence, les deux dernières hypothèses sont inter-reliées dans la dépression post-IM et ne peuvent qu'être considérées comme un tout impliqué dans l'apparition de troubles dépressifs quels qu'ils soient.

Chapitre 3. Les probiotiques

Il est écrit dans le vieux testament qu'Abraham associait directement sa consommation de lait aigre à sa longévité [217], mais le premier réel concept théorique de probiotiques vient d'un scientifique Russe Nobélisé du nom d'Eli Metchnikoff qui suggéra, en 1908, que la durée de vie prolongée des paysans Bulgares résultait de la consommation de produits laitiers fermentés [218]. Toutefois, l'utilisation du terme « probiotiques » pour définir les « substances sécrétées par un microorganisme qui stimulent la croissance d'un autre » est fait en 1965 par Lilly et Stillwell [219]. Avec les années, la définition a été modifiée à maintes reprises. Depuis que les probiotiques ont démontré la capacité de traiter plusieurs troubles gastro-intestinaux, ils sont maintenant considérés comme des agents thérapeutiques. La définition officielle acceptée par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) ainsi que par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) est que les probiotiques sont des microorganismes vivants qui, lorsque pris en quantité suffisante, apportent des bénéfices marqués sur la santé de l'hôte [220].

Les probiotiques les plus communément utilisés sont les bactéries lactiques des genres *Lactobacillus sp.*, *Bifidobacterium sp.* et *Streptococcus sp.* (Tableau I), les deux premières mentionnées étant reconnues pour être résistantes aux sels biliaires, à l'acide gastrique et aux enzymes pancréatiques leur permettant d'adhérer à la muqueuse et de coloniser le tractus intestinal.

Tableau I. Probiotiques communément utilisées dans la prévention ou le traitement clinique.

Genres	Espèces
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> * (<i>helveticus</i> †)
	<i>L. bulgaricus</i> *
	<i>L. casei</i> *
	<i>L. rhamnosus</i> GG
	<i>L. johnsonii</i>
	<i>L. paracasei</i>
	<i>L. plantarum</i> *
	<i>L. reuteri</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>L. salivarius</i>
	<i>B. animalis</i>
	<i>B. bifidum</i> †
	<i>B. breve</i> *
	<i>B. infantis</i> *
	<i>B. lactis</i>
<i>B. longum</i> *	
<i>Streptococcus</i>	<i>S. salivarius</i> ssp. <i>Thermophilus</i> *
<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i> Nissle 1917
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. boulardii</i>

* Composition du mélange VSL#3

† Composition du mélange Probio-Stick

3.1. Les probiotiques et la physiologie intestinale

Une des tâches principales de l'intestin consiste à créer une barrière entre le milieu interne et externe afin d'empêcher l'entrée de composés qui pourraient s'avérer nocifs pour la santé de l'individu. En effet, les sécrétions intestinales, le péristaltisme et la sécrétion d'IgA amène une grande protection contre les pathogènes qui pourraient coloniser le tractus gastro-intestinal. De plus, la flore normale de l'intestin aide à maintenir un pH réduit au niveau du lumen et le potentiel redox sans compter que certaines entérobactéries produisent du sulfure d'hydrogène qui permet l'inhibition enzymatique lorsqu'une réaction a lieu avec d'autres métalloprotéinases (peroxydase, catalase) [221]. Tout cela représente des mécanismes supplémentaires afin de contrer la colonisation des pathogènes [222]. Il est possible de séparer les composants de cette barrière en deux catégories soit; les composantes physiques tels que les cellules épithéliales et les composantes fonctionnelles telles que les cellules immunitaires qui se retrouvent dans le mur intestinal [217].

3.1.1. Barrière physique

Les cellules épithéliales sont des cellules spécialisées dans le transport vectoriel d'éléments nutritifs et sont le type cellulaire prédominant qui tapisse la surface de l'intestin [223]. La membrane est couverte d'une épaisse couche de glycoprotéines transmembranaires fibreuses, que l'on nomme glycocalyx, servant de protection à la membrane cellulaire [224, 225]. La membrane plasmique des cellules épithéliales de l'intestin représente une excellente barrière contre les substances hydrophiles et la présence d'une série de jonctions intercellulaires tout au long des membranes latérales des cellules sert à joindre les espaces paracellulaires [226]. Ces jonctions, que l'on nomme jonctions serrées (TJ de l'anglais tight junction), jouent un rôle primordial dans le contrôle de la perméabilité intestinale permettant le passage de solutés par diffusion passive [217]. Des études cliniques ont démontré une altération de la perméabilité intestinale dans un bon nombre de troubles digestifs incluant les infections intestinales, la maladie de Crohn et les intolérances alimentaires [227]. La flore commensale joue un rôle déterminant sur la

fonction de la barrière. En effet, la colonisation d'un anse du côlon de rat avec *E. coli* induit une augmentation de la perméabilité paracellulaire tandis que la colonisation avec *Lactobacillus brevis* la prévient [228]. De plus, un rat traité au dexaméthasone démontre une perméabilité accrue ainsi qu'une réduction du nombre de bactéries qui adhèrent à la muqueuse [229]. Similairement, l'adhésion de la souche entéropathogène d'*E. coli* à une couche de cellules épithéliales, *in vitro*, démontre une perturbation des TJs [230]. Cela suggère que les changements observés dans la perméabilité sont étroitement associés à l'adhésion des bactéries au niveau de la muqueuse intestinale et que les probiotiques auraient un rôle positif dans la prévention de l'altération de la perméabilité membranaire.

La surface luminale du tractus gastro-intestinal est couverte d'un mucus viscoélastique qui offre une protection contre l'environnement hostile du lumen [217]. Les cellules caliciformes sont des cellules polarisées présentes tout au long de l'épithélium intestinal et qui sécrètent le mucus [223]. Cette substance est sécrétée de façon constitutive, mais aussi en réponse à divers stimuli tels que les entérotoxines des bactéries ou la présence de probiotiques [231]. Ce gel muqueux comprend plusieurs composants structuraux, mais le principal est sans doute les mucines. Ces dernières sont un groupe de protéines riches en sérine et en thréonine et fortement glycosylées représentant les ligands des sélectines [48]. Parmi les neuf mucines humaines dénombrées, on retrouve entre autres les MUC1, MUC2, MUC3, MUC4 et MUC5AC exprimées au niveau du côlon [232]. Par contre, la mucine principale formatrice du gel dans le petit et grand intestin est MUC2 [233]. Toute altération de la composition de ce mucus peut compromettre la défense que procure cette barrière. Pour cette raison, la capacité de dégrader le mucus est un indicateur considérable de la pathogénicité et de la toxicité des bactéries présentes au niveau du lumen [234]. Par exemple, la bactérie *Helicobacter pylori*, responsable de la formation d'ulcères, supprime l'expression des gènes MUC1 et MUC5A dans une lignée de cellules gastriques humaines [235]. D'un autre côté, certaines bactéries telles que les probiotiques, ont la capacité de se fixer au mucus sans toutefois le dégrader. Cette propriété intéressante des probiotiques procure en quelque sorte une barrière supplémentaire en inhibant l'adhésion des bactéries

pathogènes au mucus. Par exemple, une étude faite sur un petit intestin porcin a démontré l'inhibition de la souche entérotoxique d'*E. coli* K88 au mucus, par une souche d'*Enterococcus faecium*, une souche fortement utilisée dans les préparations de probiotiques [236]. Il a été démontré que *L. plantarum* 299v et *L. rhamnosus* GG induisent l'expression des gènes MUC2 et MUC3 en culture dans une lignée de cellules du côlon HT29 [217]. Comme mentionné ci-haut, ce sont les mucines responsables de la formation du gel visqueux ce qui expliquerait l'inhibition de l'adhérence des bactéries pathogènes à l'épithélium intestinal. En effet, selon des études obtenues avec des cellules HEP-2, une lignée cellulaire tumorale de l'épiderme exprimant de faibles taux d'ARNm, les probiotiques (*Lactobacillus plantarum* 299v et *Lactobacillus rhamnosus* GG) seraient incapables d'inhiber l'adhérence de bactéries pathogènes dans de telles conditions [237] démontrant le rôle de MUC 2/3 dans ces actions bénéfiques.

3.1.2. Barrière fonctionnelle

La dérégulation de la réponse immune innée et adaptative dans l'intestin est impliquée dans un bon nombre de maladies. Dans la couche sous-muqueuse de la bordure intestinale se trouvent les plaques de Peyer qui représentent des nodules de follicules lymphoïdes primaires et secondaires [48]. Ces plaques sont une importante source de l'induction d'IgA sécrétoires, molécules qui ont pour fonction de neutraliser les microbes pathogènes pouvant se trouver dans l'intestin ainsi que de veiller au maintien de la flore commensale [238]. Les muqueuses représentent les principaux sites d'entrée des pathogènes. Les IgA activement sécrétées par l'intestin ont un rôle central dans la création d'une barrière contre les bactéries et les virus susceptibles d'y entrer [48].

Les probiotiques ont démontré des effets positifs, se traduisant par un renforcement de cette barrière, dans plusieurs études. En effet, la résistance bactérienne est augmentée chez des souris préalablement traitées avec *B. lactis* HN019 [239] (résultats similaires avec *L. rhamnosus* [240]) et infectées par la suite avec la bactérie entérohémorragique *E. coli*

O157:H7. Ces souris ont démontré une augmentation marquée d'IgA anti-*E. coli* dans le tractus intestinal et une diminution du taux de morbidité. L'immunité virale est aussi augmentée par les probiotiques. Une étude faite chez des enfants âgés de 15 à 31 mois, immunisés avec le vaccin de la polio, a démontré une augmentation des niveaux fécaux totaux d'IgA et d'IgA anti-poliovirus, après l'administration de lait enrichi en probiotiques (Formule de *B. lactis* Bb-12) durant 21 jours, par rapport à la période précédant l'administration [241]. Finalement, les probiotiques peuvent également entraîner une résistance parasitaire. En effet, après 5 jours d'infection avec *Trichinella spiralis* de souris traitées avec une culture de *L. casei*, la présence de vers était réduite à près de 50% par rapport aux souris non traitées [242].

La réponse immune innée est la première ligne de défense contre les pathogènes et est médiée par les macrophages, les cellules dendritiques (DC) et les cellules épithéliales. Bien que ces dernières soient impliquées dans la barrière physique, elles possèdent des récepteurs capables de reconnaître des motifs conservés et caractéristiques des microbes pathogènes. Ces récepteurs incluent les TLRs (de l'anglais Toll-like receptors) et les NODs (de l'anglais Nucleotide-binding oligomerization domains). Dépendant du stimulus, l'activation des TLRs sur les cellules épithéliales peut induire des changements dans l'apoptose et l'activation de la prolifération cellulaire [243], sur la perméabilité paracellulaire [244, 245], sur la sécrétion de cytokines [246-248] et finalement, sur l'internalisation et la translocation des bactéries [223, 249]. Il va sans dire que ces récepteurs ont un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie du système digestif et de l'ensemble des autres systèmes. Les probiotiques peuvent jouer un rôle à ce niveau en modulant la perméabilité intestinale et l'inflammation par interactions avec les TLR2 induisant ainsi l'activation de la protéine kinase C et l'augmentation de l'étanchéité au niveau des TJs [244, 245, 250].

Certaines souches de probiotiques peuvent aussi induire la réponse anti-inflammatoire et/ou inhiber la voie de NF- κ B dans les cellules épithéliales par le biais

d'une multitude de mécanismes incluant : le blocage de la dégradation de I κ B par l'inhibition de l'ubiquitination [251], par inhibition de la fonction des protéasomes [252, 253] et par la régulation du mouvement nucléo-cytoplasmique de RelA via la voie PPAR- γ -dépendante [254]. De plus, elles ont la capacité d'induire la production de cytokines anti-inflammatoires. Par exemple, *in vitro*, la formule VSL#3 (voir Tableau I) génère la production de cytokines IL-10 par les cellules dendritiques de l'intestin qui possèdent des propriétés régulatrices et anti-inflammatoires [255]. De plus, ces résultats ont été extrapolés *in vivo* puisque des patients atteints de la colite ulcéreuse, traité avec ce même mélange VSL#3, ont aussi démontré une plus grande production de cytokines IL-10 et une réduction de cytokines IL-12p40 [223].

Autre point à mentionner concernant les probiotiques est leur capacité de produire et sécréter des bactériocines. Ces protéines synthétisées par la bactérie ont des propriétés antimicrobiennes, ce qui leur confère un effet bénéfique. En effet, certaines probiotiques appartenant en majeure partie au genre *Lactobacillus sp.* ont été décrites; certaines inhibant la croissance des bactéries du même genre et d'autres ayant un spectre plus large allant des bactéries Gram négatif et Gram positif jusqu'aux levures [222]. L'activité inhibitrice de ces bactériocines est donc grandement variée selon l'espèce bactérienne en cause.

Tout compte fait, il est important de bien tenir compte de l'espèce de probiotiques à employer pour obtenir l'effet désiré puisque celles-ci n'agissent pas tous de la même façon.

3.2. Utilisation clinique des probiotiques

Dans plusieurs maladies inflammatoires, non seulement intestinales, les probiotiques les plus étudiés chez les patients présentant des diarrhées aiguës sont les

genres *Lactobacillus sp.* et *Bifidobacterium sp.*, utilisés seuls ou en culture mixte avec d'autres bactéries.

Les patients qui doivent subir ou qui ont subi une chirurgie abdominale courent un risque accru d'une perturbation sévère de la flore intestinale ainsi qu'un facteur de risque élevé de translocation bactérienne [256]. En effet, les antibiotiques administrés peuvent mener à la surcroissance de bactéries indésirables [257] et une perte des fonctions de la barrière intestinale peut survenir suite à la manipulation de l'intestin et à une alimentation parentérale [258]. De plus, le stress occasionné par la chirurgie et les produits dérivés du sang peuvent mener à une diminution importante du système immunitaire [259].

La colite ulcéreuse est une maladie inflammatoire chronique affectant le gros intestin. Cette maladie se traduit par une inflammation continue de la muqueuse de la face distale de l'intestin. Dans ce genre de maladie, on observe le développement d'une vascularisation facilitant vraisemblablement l'influx à grande échelle des leucocytes, ce qui contribue à l'inflammation chronique. Diverses cytokines, en particulier l'INF- γ et le TNF- α , y jouent aussi un rôle important [48]. L'administration de probiotiques s'avère bénéfique dans une telle situation puisque ceux-ci ont la capacité d'augmenter le ratio de cytokines anti-inflammatoires par rapport aux cytokines pro-inflammatoires [260]. Une étude a ainsi démontré la prévention de l'apoptose induite par les cytokines par l'activation de Akt (molécule anti-apoptotique) et l'inhibition de p38/MAPK (pro-apoptotique) par la probiotique *Lactobacillus GG* [261]. Un autre mécanisme s'observe par *E. coli* Nissle 1917 via la production de β -défensine, un peptide antimicrobien, permettant la prévention de l'invasion et de l'adhérence bactérienne [262]. À présent, les probiotiques représentent la première ligne de traitement complémentaire administrer chez les patients atteints et démontrent une évidence de l'induction et du maintien de la rémission de la colite ulcéreuse [263].

Chez les patients atteints de la maladie de Crohn ou d'une colite ulcéreuse réfractaire, la coloprotectomie devient malheureusement l'option de choix. Dans ce cas, une anastomose iléo-anale (confection d'un réservoir) est pratiquée. La complication à long terme la plus commune est l'inflammation de ce réservoir iléal que l'on nomme la pouchite. Une étude a observé la diminution de lactobacilles et des valeurs élevés de pH dans la poche formée des patients atteints [264]. Cela a donc suggéré l'utilisation de formules probiotiques contenant ce genre de bactéries lesquelles ont démontré une diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-8 ainsi qu'une diminution de l'influx des cellules polymorphonuclées chez les patients traités [265]. Des améliorations cliniques et endoscopiques ont été observées chez des patients traités avec un produit de lait fermenté contenant des lactobactéries et des bifidobactéries [266], avec *E. coli* Nissle 1917 [267] et avec la culture mixte VSL#3 [268].

3.3. Les probiotiques et le stress

Les sections discutées précédemment démontrent qu'un bon nombre d'études sont réalisées sur l'effet bénéfique que peuvent avoir les probiotiques sur la modulation de la flore intestinale. D'autres études leur accordent aussi des effets positifs sur la prévention de la réponse inflammatoire et de l'attachement des bactéries pathogènes à la muqueuse intestinale de l'hôte. Bien qu'il existe plusieurs facteurs en cause dans les troubles gastro-intestinaux, le stress semble être une composante majeure amenant des dysfonctions à ce niveau. En effet, des événements de la vie causant des stress importants jouent un rôle prédominant dans le développement de symptômes fonctionnels [269] qui diminuent la qualité de vie de l'être atteint [270]. Prenons l'exemple des patients souffrant du syndrome du colon irritable; le stress chez ces derniers occasionne l'apparition de diarrhée ou de constipation par la modification de la motilité intestinale [271-273]. D'autres symptômes tels que les flatulences et les douleurs viscérales sont aussi associés à des événements psychosociaux stressants [274, 275]. Les probiotiques ont déjà démontré leur capacité à altérer la composition ou le volume des selles et des gaz [276] et d'induire la sécrétion de

mucus [277]. Ces effets peuvent moduler les symptômes décrits précédemment en modulant la flore intestinale et le système immunitaire [278-280].

Plusieurs études animales et cliniques ont démontré des améliorations significatives des symptômes causés par le stress. Chez le rat, l'hypersensibilité abdominale est observée suite à l'exposition au stress [281], qui diminue le nombre de lactobacilles, augmente le nombre de bactéries anaérobiques et favorise la croissance et l'adhérence épithéliale des bactéries pathogènes [282]. Cette douleur est prévenue par l'administration de lactobacilles [280, 283, 284]. Des études effectuées chez l'homme ont démontré que le stress émotionnel peut mener à une réduction du nombre de bifidobactéries et de lactobacilles dans la flore intestinale [285]. L'administration de la même combinaison de probiotiques que celle utilisée dans ce présent mémoire (*Lactobacillus helveticus* RO052 et *Bifidobacterium longum* RO175) a démontré une diminution significative de la douleur abdominale et des nausées et/ou vomissements, symptômes associés au stress [286].

Il a été suggéré récemment que l'inflammation gastro-intestinale causée par le stress pouvait induire l'altération des interactions bactéries/muqueuse et provoquer des changements dans la fonction de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA) [287]. De plus, les changements dans la composition de la flore intestinale des patients souffrant du syndrome du colon irritable causerait également une augmentation de l'axe HPA [288]. Cet axe devient donc un lien important entre le cerveau et le système immunitaire de l'intestin [288].

Chapitre 4. Les hypothèses

Suivant un infarctus du myocarde, 65% des patients développent des symptômes dépressifs et parmi ceux-ci 15-20% des patients développent une dépression majeure [120, 121]. Un pronostic précoce et juste s'impose puisque la dépression augmente l'occurrence aux maladies coronariennes et amplifie également le risque de mortalité dans les 6 à 18 mois suivant l'événement. L'IM engendre un processus inflammatoire important impliquant une hausse de la concentration de cytokines pro-inflammatoires. Notre laboratoire, lors d'études antérieures, a développé un modèle animal de dépression post-IM chez le rat et a démontré l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires qui y sont associées dans tous les cas [148]. Notre modèle démontre une phase précoce d'apoptose culminant à 3 jours après le début de la reperfusion. Cette apoptose a été observée particulièrement dans l'amygdale et l'hippocampe, deux régions du système limbique impliqués dans la pathophysiologie de la dépression [61, 149]. Nous avons préalablement démontré que cette apoptose peut être renversée par des traitements pharmacologiques tels que la sertraline (un anti-dépresseur) [149] et le célécoxib (un anti-inflammatoire) [197]. De plus, des études ont démontré que les probiotiques semblent diminuer les cytokines pro-inflammatoires (IL-12 et TNF- α) et augmenter les cytokines anti-inflammatoires (IL-10) [289]. Nous avons récemment appuyé ces résultats en démontrant qu'une combinaison des probiotiques *Lactobacillus helveticus* et *Bifidobacterium longum* diminue l'apoptose au niveau du système limbique [59]. Puisque l'apoptose dans le système limbique, qui est impliqué dans la régulation des émotions, peut être diminuée avec cette combinaison de probiotiques, cela nous suggère que les symptômes de dépression post-IM pourraient être également diminués avec cette même combinaison. Les travaux dans ce présent mémoire visaient à démontrer cette hypothèse. De plus, puisque les probiotiques sont administrés oralement, un autre objectif visait à démontrer qu'une altération de la barrière intestinale pourrait avoir lieu lors d'un IM, ce qui représenterait une cause supplémentaire d'induction

de cytokines pro-inflammatoires en circulation, et que les probiotiques pourraient empêcher cette altération de la perméabilité intestinale.

Chapitre 5. Article scientifique

N. B. : références numérotées selon le mémoire

Combination of *L. helveticus* R0052 and *B. longum* R0175 reduces post-myocardial infarction depression symptoms and restores intestinal permeability in a rat model

Jessica A. Bréard^{1,2}, Isabelle Rondeau^{1,2}, Kim Gilbert^{1,2}, Stéphanie-Anne. Girard^{1,2}, Thomas A. Tompkins³, Roger Godbout^{1,4}, Guy Rousseau^{1,2}

¹*Centre de biomédecine, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, Montréal, QC, Canada H4J 1C5*

²*Department of Pharmacology, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada H3C 3J7*

³*Institut Rosell-Lallemand inc., Montréal, QC, Canada H4P 2R2*

⁴*Department of Psychiatry, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada H3C 3J7*

Running head: Probiotics and depression in MI rats

Number of pages: 16

Number of figures: 6

Address for correspondence and reprints:

Guy Rousseau, Ph.D.

Centre de biomédecine

Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal

5400 boul. Gouin Ouest

Montréal (Québec) Canada H4J 1C5

Telephone: +1-514-338-2222 Extension 3421

Fax: +1-514-338-2694

Abstract

Myocardial infarction (MI) in rats is accompanied by apoptosis in the limbic system and a behavioral syndrome similar to models of depression. We have already shown that probiotics can reduce post-MI apoptosis and designed the present study to determine if probiotics can also prevent post-MI depressive behavior. We tested the hypothesis that probiotics achieve their central effects through changes in the intestinal barrier. MI was induced in anesthetized rats via 40-minute transient occlusion of the left anterior coronary artery. Sham rats underwent the same surgical procedure without actual coronary occlusion. For 7 days before MI and between the 7th post-MI day and sacrifice, half the MI and sham rats were given 1 billion live bacterial cells of *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 per day dissolved in drinking water while the remaining animals received only the vehicle. Depressive behavior was evaluated 2 weeks post-MI in social interaction, forced swimming and passive avoidance step-down tests. Intestinal permeability was evaluated by gavage with fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran, 4 hours before sacrifice, 2 weeks post-MI. MI rats displayed less social interaction and impaired performance in the forced swimming and passive avoidance step-down tests compared to the sham controls ($p < 0.05$). Probiotics reversed the behavioral effects of MI ($p < 0.05$) but did not alter the behavior of sham rats. Intestinal permeability was increased in MI rats and reversed by probiotics. In conclusion, *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 combination interferes with the development of post-MI depressive behavior and restores intestinal barrier integrity in MI rats.

Key words: Probiotics, myocardial infarction, depression, intestinal barrier

Introduction

After myocardial infarction (MI), 65% of patients present depressive symptoms [120], and about 20% of them incur major depression [120, 121]. Evidence of a poor prognosis is particularly strong in patients with such symptoms [122, 124-126]: the risk of cardiac death within 6 months after acute MI is approximately 4 times greater in patients with depression compared to non-depressed control subjects [122]. The mechanism is still hypothetical, but it has been postulated that the inflammatory state observed after MI is responsible for post-MI depression [214]. Elevation of pro-inflammatory cytokine levels [290, 291] has been documented after myocardial ischemia, and their attenuation is correlated with depressive behavior reduction [292].

Our rat model of post-MI depression manifests an early wave of apoptosis, with a peak at 3 days after MI, in the hippocampus and amygdala, regions of the limbic system involved in the pathophysiology of depression [61, 147]. We have demonstrated that this apoptosis can be blocked by antidepressant [149] or anti-inflammatory treatments [61, 197], indicating a link between inflammation, apoptosis and depression. We have also shown that the probiotics *Lactobacillus helveticus* and *Bifidobacterium longum* can reverse MI-induced apoptosis in the limbic system [293], but behavioral measures have not been tested.

We have observed that MI induces perturbation of the blood-brain barrier [294] via an unknown mechanism. We suspect that other barriers, such as the intestinal system, could be impacted. In these experiments, we investigated whether probiotics modulate intestinal barrier permeability in our post-MI model, which could have an effect on circulating pro-inflammatory cytokines [295].

The aim of the present study was to test if probiotics can reverse the behavioral syndrome induced by MI. Since an anti-apoptotic outcome may be achieved through an increase in the anti/pro-inflammatory cytokine ratio [261, 296] and changes in the intestinal barrier

[295, 297], another objective was to assess intestinal permeability before and after treatment with probiotics.

Materials and Methods

Experimental groups (animals and housing)

Forty 12-week-old Sprague-Dawley male rats (Charles River Canada, St-Constant, QC, Canada), weighing between 325 and 350 g at the beginning of the experiments, were housed individually under constant conditions (temperature: 21-22°C; humidity: 40-50%) and maintained on a 12-h light-dark cycle, with lights on at 8:00 a.m. Chow pellets (5075-US Charles River Rodent) and tap water were available *ad libitum* throughout the study. All animals were acclimatized to the housing conditions for 3 days after delivery by the supplier before they were randomly distributed among 1 of 4 groups: MI rats treated with probiotics or vehicle and controls treated with probiotics or vehicle.

Probiotics treatment

The commercial probiotics given were a combination of *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 (Probio'Stick™, provided by Institut Rosell-Lallemand, Montréal, QC, Canada). They were administered by dissolving freeze-dried cultures or vehicle (maltodextrin) in 200 ml of tap water. For 7 days before MI and between the 7th post-MI day and sacrifice, half of the MI and sham rats had access to 1 billion live bacterial cells of *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 per d dissolved in water while the remaining animals received only the vehicle. The drinking solution was prepared every 2nd d for the duration of the experiments. Water intake was monitored throughout to ensure that enough bacteria were ingested.

In vivo surgical procedure

The animals were anesthetized by intramuscular ketamine/xylazine (50 mg/kg and 5 mg/kg, respectively) injection. They were subsequently intubated and anesthesia was maintained with isoflurane (1%) ventilation. Electrocardiography was undertaken and heart rate

monitored throughout the procedure with electrodes placed on their paws. A left thoracotomy was performed at the 5th intercostal space, permitting occlusion of the left anterior descending coronary artery with 4-0 silk suture (Syneture; Covidien, Mansfield, MA, USA). Ischemia was confirmed by ST segment alteration and myocardial surface cyanosis. After 40 minutes of ischemia, the suture was removed, permitting myocardial tissue reperfusion. After the thorax was closed with 2-0 (ribs and muscle) and 3-0 (skin) silk sutures (Syneture; Covidien), the animals were injected with antibiotic (15,000 IU penicillin G; Duplocillin LA, Intervet Canada Ltd., Whitby, ON, Canada) intramuscularly and analgesic (0.05 mg/kg buprenorphine; Schering-Plough Ltd., Hertfordshire, UK) subcutaneously before being returned to their respective cages. They received a second analgesic injection (0.05 mg/kg buprenorphine) in the morning after surgery.

Behavioral measures

The tests employed were selected on the basis of their validity regarding behavioral depression syndrome. All tests were conducted individually, in the morning, starting 9 days after surgery. Social interaction was evaluated on day 9, the forced swimming test was performed on days 14 and 15, and the passive avoidance step-down test on day 16. All animals were sacrificed on day 17.

Social interaction test

One pair of rats which received the same diet (either probiotics or vehicle) was placed together in a cage for 10 minutes, between 9:00 and 11:00 a.m. During this period, 2 observers blinded to the experimental condition each observed 1 animal, and the following dependent measures were computed: duration and number of interactions with the other rat, number of grooming events and number of rearings.

Forced swimming test

Rats were placed individually in a transparent 25-cm diameter pool filled to a depth of 30 cm with 22-25°C water, with no possible escape. Two identical chronometers were

needed to time the immobile and escape trial periods of the animals. The test was conducted on 2 days: day 1 comprised 15 minutes of habituation, and day 2 entailed the actual 5-minute test. On the 2nd day, immobility time was translated into depressive symptoms by comparison to the controls. Groups of MI and control rats were tested between 9:00 and 11:00 a.m.

Passive avoidance step-down test

Rats were placed individually in the passive avoidance test chamber (14 cm x 23 cm) on one platform (14 cm x 19 cm) higher than another (14 cm x 14 cm); to reach the test criterion, they needed to stay on this platform for 60 seconds, over 3 consecutive trials (inter-trial interval = 30 seconds). If they stepped down onto the second platform (2.5 cm lower), resting all 4 paws on its grid floor, they received a mild shock to the feet (1 second, 8 mA). The test was started between 1:00 and 3:00 p.m. The number of trials needed to reach the test criterion and the number needed to learn the test were noted. Groups of MI and control rats were tested 1 day before they were sacrificed.

Fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran assessment

The animals were starved the night before sacrifice. Four hours before being killed, they received FITC-dextran diluted in water (60 mg/100 g body weight) by gavage. At sacrifice, blood was collected and immediately centrifuged at 3,000g at 4°C for 15 minutes. Plasma was obtained and the sample (50 µl in triplicate) was deposited in a 96-well plate for quantification against a standard curve prepared from stock solution. Measurements were performed on a Cary Eclipse spectrophotometer (Varian, Mississauga, ON, Canada) with excitation wavelength at 350 nm and emission at 515 nm.

Infarct size

After 17 days of reperfusion, the rats were restrained in a cone bag and decapitated rapidly. Blood was collected for plasma interleukin-1 beta (IL-1β) and FITC-dextran measurements. The heart was removed and the left anterior descending coronary artery was

occluded at the same site to quantify the area at risk (AR) with Evans Blue (0.5%) infusion via retrograde perfusion into the aorta. The heart was then frozen at -80°C for 5 minutes and sliced into 4 transverse sections of 2 mm. Each section was incubated for 5 minutes at 37°C in a triphenyltetrazolium chloride (1%, pH 7.4) solution to distinguish the area of necrosis (I) from the AR. MI was expressed as a percentage of necrosis (I) of the AR ($[\text{I}/\text{AR}] \times 100$). In addition, the AR was expressed as a percentage of left ventricle (LV) area.

IL-1 β measurement

Blood was sampled at the onset of sacrifice and centrifuged for 15 minutes at 3,000g. Plasma was then obtained and frozen at -80°C until radioimmunoassay. Plasma IL-1 β concentrations were quantified with commercial kits from R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's specifications.

Statistical analyses

The results are expressed as means \pm standard errors. MI size and AR were compared by Student's t-test. Factorial ANOVA designs (2 x 2) were adopted with MI and Probiotics as factors. Simple effects were estimated according to [298] whenever an interaction between factors was significant; otherwise, only main effects were reported. In the passive avoidance step-down test, the numbers of trials were evaluated by Kruskal-Wallis tests, followed by Mann-Whitney U-tests, with Bonferroni correction for the number of comparisons. A $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Infarct size

The AR, expressed as a percentage of LV area, was similar in both groups and represented 45%-55% of the LV. After 40 minutes of ischemia and 17 days of reperfusion, MI size was similar between groups (Figure 1) and represented 35-40% of the AR.

Social interaction

There was a significant interaction effect between MI and probiotics [$F(1,24) = 4.80, p < 0.05$] (Figure 2); analysis of simple effects indicated that probiotics did not influence interaction time in the sham controls but increased it in MI rats [$F(1,25) = 5.92; p < 0.05$]. No differences were detected in the number of rearings and groomings (data not shown).

Forced swimming test

We observed significant interaction between factors (MI and probiotics) in Swimming time [$F(1,31) = 5.90, p < 0.05$] and Escape time [$F(1,31) = 4.83; p < 0.05$] (Figure 3). Analysis of simple effects revealed lower values at baseline in the MI groups and improved Swimming time [$F(1,32) = 10.13, p < 0.05$] and Escape time [$F(1,32) = 6.47, p < 0.05$] with treatment. No differences were apparent in the sham groups. Immobility time showed a significant main effect of probiotics [$F(1,31) = 5.60, p < 0.05$] and MI [$F(1,32) = 10.05, p < 0.05$].

Passive avoidance step-down test

We noted significant interaction between MI and probiotics regarding time to learn the test [$F(1,30) = 5.45, p < 0.05$]; analysis of simple effects indicated that probiotics decreased time to learning the test in MI rats [$F(1,31) = 4.12; p = 0.05$] but not in sham rats (Figure 4). The main effects (MI or probiotics) were not significant. The number of trials was significantly different between groups ($\chi^2 = 8.475, df = 3; p = 0.037$) and significantly higher in the MI vs. the sham group ($Z = -2.847; p = 0.004$).

Plasma IL-1 β concentrations

No significant Treatment x MI interactions were evident. A main probiotics effect was evident, with probiotics significantly reducing plasma IL-1 β concentrations compared to vehicle [$F(1,18) = 5.70, p < 0.05$] (Figure 5). No significant MI main effect was observed.

Intestinal barrier permeability

We noted significant interaction between MI and Treatment on FITC-dextran concentrations [$F(1,16) = 8.60, p < 0.05$] (Figure 6). Analysis of simple effects disclosed that FITC-dextran concentrations were significantly increased in MI rats treated with vehicle compared to MI rats given probiotics [$F(1,17) = 14.92; p < 0.05$]. No significant effects were observed in sham controls.

Discussion

We have previously shown that our model of post-MI depression replicates some of the behavioral characteristics of human depression, including anhedonia (sucrose preference test) and behavioral despair (forced swimming test) [149]. The results obtained in the present experiments constitute further converging evidence that post-MI syndrome is indeed associated with a behavioral repertoire similar to other rat models of depression, and extend behavioral markers to impaired social behavior (social interaction test) and processing of emotional memory (passive avoidance step-down test).

The present study demonstrates that a probiotic-enriched diet with *Lactobacillus helveticus* and *Bifidobacterium longum* can prevent behavioral despair, abnormal social behavior and blighted processing of emotional memory. We decided to administer probiotics before MI, as reported previously, to determine if the beneficial effect that we observed on apoptosis in the limbic system [293] is reflected in depressive behavior. We also know that the administration of probiotics before MI has no influence on infarct size, reducing potential bias in performance in the behavioral tests. However, after the surgical procedures, antibiotics were administered to all animals, and to avoid any benefit of probiotics on the potential action of antibiotics, we decide to stop the probiotics for the first 7 days of reperfusion.

Although the mechanistic relationship between MI and depression is still hypothetical, we postulate that inflammation is probably a key element. It has indeed been documented that

pro-inflammatory cytokines can induce depression. For example, IL-1 β and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) injection can elicit behavioral changes modeling symptoms of depression, such as decreased locomotion, diminished exploration of the environment, reduced food and water intake, dwindling social interactions and impaired learning as well as memory [299, 300]. IL-1 β and TNF- α are also associated in animals with neuroendocrine changes similar to those in depressed humans and responsible for the stress response at the hypothalamic-pituitary-adrenal axis level [301]. In addition, there is evidence that antidepressants antagonize the action of cytokines in the brain (for review see [302]), although the mechanism has not yet been elucidated. We believe that the therapeutic effects of *Lactobacillus helveticus* and *Bifidobacterium longum* on behavioral signs of depression also involve pro-inflammatory cytokines since we observed a significant diminution of circulating IL-1 β in the probiotics groups. Interestingly, it has been demonstrated that *L. helveticus* R0052 and *L. rhamnosus* R0011 prevent stress-induced memory deficits in mice infected by pathogens [303], reinforcing the immune-gut-brain axis hypothesis.

The intestinal epithelium forms a barrier between the external environment and luminal contents in which tight junction complexes play an important regulatory role [304]. Exposure to pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α , decreases epithelial barrier function and may thus lead to translocation of the bacterial component to the bloodstream. The present results indicate that intestinal barrier permeability may be involved since we found it to be altered 2 weeks post-MI. As observed in chronic heart failure [305], increased intestinal permeability has been documented and said to contribute to chronic inflammation in this pathological condition. Intestinal dysfunction may add to endotoxin translocation and ultimately augment blood lipopolysaccharide (LPS) concentrations. Interestingly, normal volunteers injected with LPS exhibited acute increases in depression and anxiety symptoms, and their severity correlated with augmented peripheral blood cytokine concentrations [306].

The presence of probiotics has a beneficial effect on intestinal barrier integrity through nuclear factor-kappa B pathway inhibition and intact extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 signaling [295]. Another explanation may be related to the anti-apoptotic effect observed with these probiotics [293] although this has not been demonstrated in the present study in intestinal tissue. Indeed, it has been determined that apoptosis affects intestinal barrier integrity [307], and inhibition of apoptosis, through reduction of a cytokine-dependent mechanism, could be beneficial to intestinal integrity. The activation of Toll-like receptors (TLRs), a class of transmembrane pattern-recognition receptors that play a key role in microbial recognition, is another hypothesis that could explain the beneficial effect of probiotics on intestinal barrier integrity [245]. Probiotics activate TLRs, such as TLR-2, and prevent intestinal barrier impairment, indicating a link between these events [297, 308]. Additional studies are needed to determine the mechanism by which *Lactobacillus helveticus* and *Bifidobacterium longum* may be advantageous for intestinal barrier integrity.

In conclusion, our study provided the first evidence of a positive outcome of probiotics combination (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) on post-MI depression. The beneficial impact of probiotics combination also includes the maintenance of intestinal barrier integrity which may contribute to the inflammatory state observed after MI.

Limitations

One concern is the possible physical consequences of thoracic surgery and MI itself in the capacity of rats to perform physically-demanding behavioral tasks. We have previously shown, however, that sham and MI rats, having undergone the same thoracic surgery as reported here, performed similarly in the Morris water maze task, a test of motor performance and spatial memory requiring an intact hippocampus [148, 309], whether they were treated with the antidepressant desipramine or saline, and improved on the forced swimming test. The present results also indicated that, for similar myocardial infarct size,

probiotics-treated MI rats were as efficient as sham controls on motor output measures, such as swimming and escape time in the forced swimming test, which suggests that the level of injury was not sufficient to interfere with the results.

Acknowledgments

The authors thank Melanie Gareau for her help in the measurement of intestinal barrier integrity. This study was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC #250234-07). Institut Rosell-Lallemand provided the probiotics administered in these experiments.

JAB, IR, KG, SAG and TAT contributed to the experiments, data analysis and writing, and RG and GR contributed to conception of the experiments, data analysis and writing.

Ethics statement

These experiments conformed to animal care guidelines published by the Canadian Council on Animal Care, and the procedures performed were approved by the Animal Care Committee of Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal.

Figure legends

Figure 1

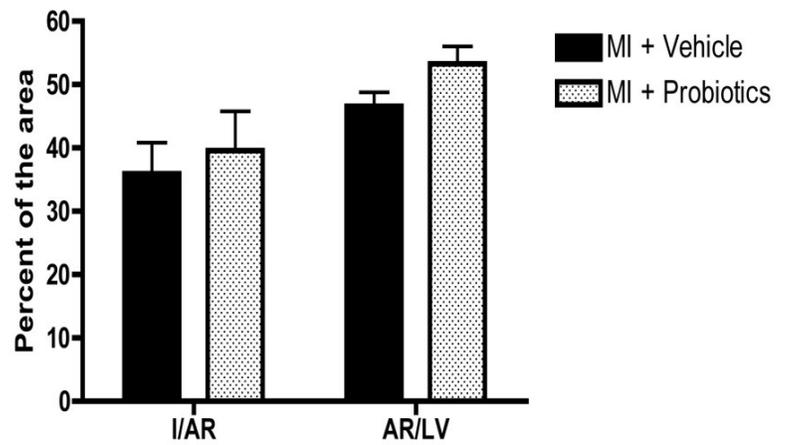


Figure 5-1. Myocardial infarct size (I), expressed as a percentage of the area at risk (AR), shows no difference between groups. The AR, expressed as a percentage of the left ventricle (LV), is similar between groups. n = 9 per group.

Figure 2

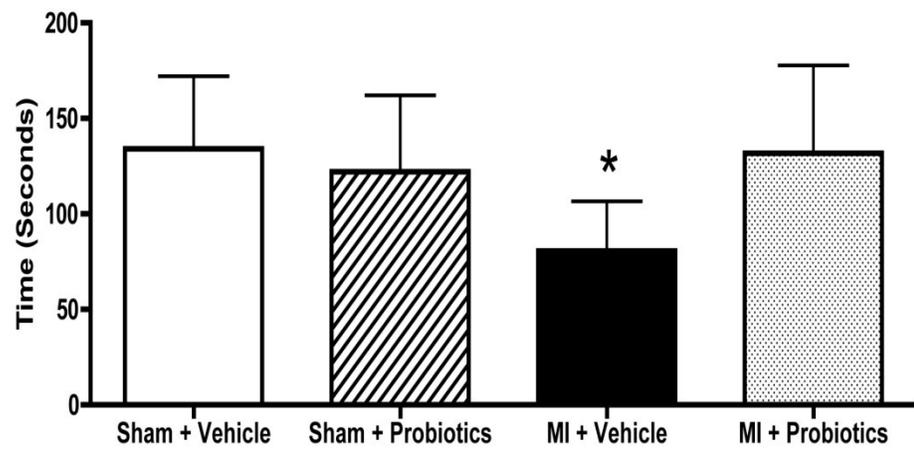


Figure 5-2. Social interaction between animals. The data indicate that MI-vehicle rats interact less than the other groups with their congeners. Time is expressed in seconds. n = 6-8 per group. *indicates $p < 0.05$ for MI – Vehicle vs MI - Probiotics.

Figure 3

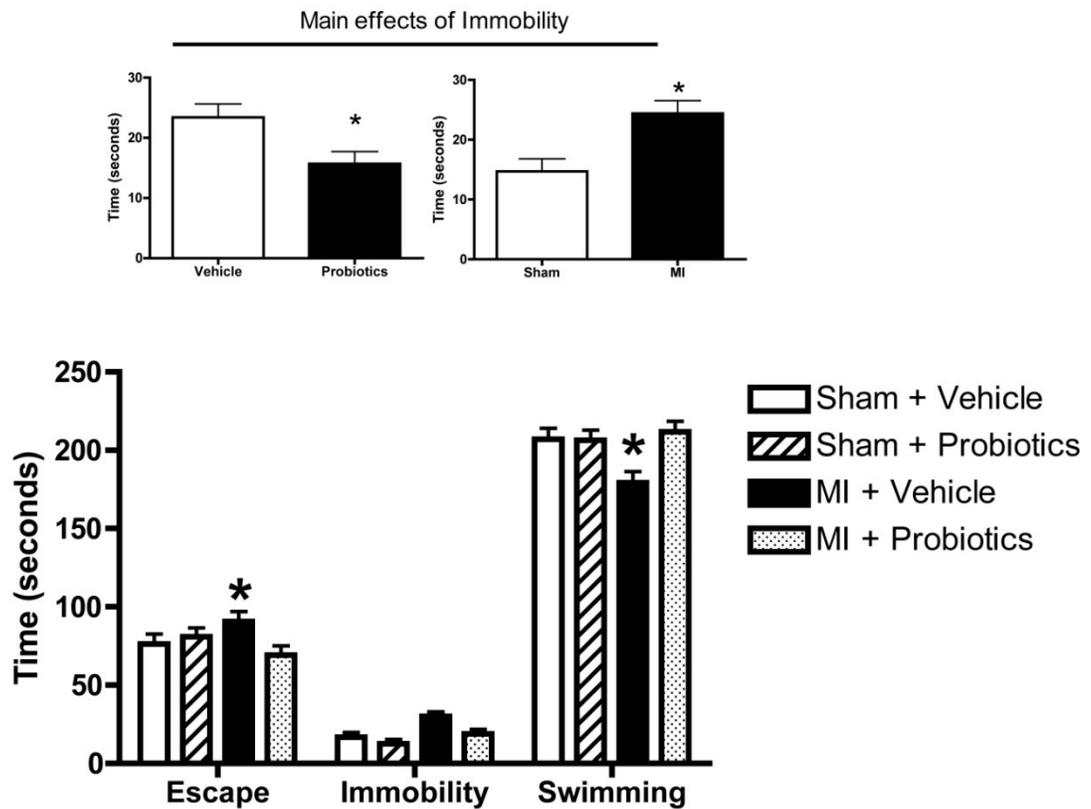


Figure 5-3. Performance of rats from the 4 different groups in the forced swimming test. Escape and swimming time is less in the MI-vehicle compared to the other groups. No interaction was found for the immobility parameter. However, the main effects (inset) indicate that probiotics decrease immobility time whereas MI rats show more immobility than the vehicle group. n = 8-10 per group. *indicates $p < 0.05$ for MI – Vehicle vs MI – Probiotics, Inset: *indicates $p < 0.05$ between groups.

Figure 4

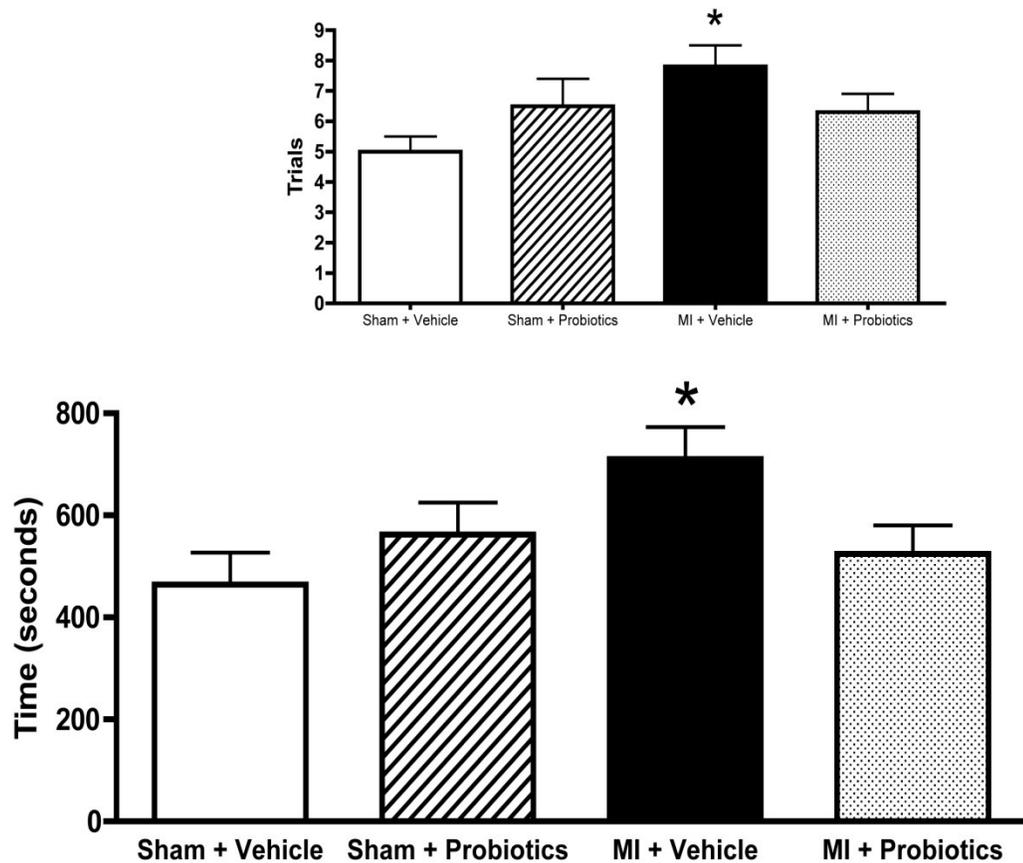


Figure 5-4. In the passive avoidance step-down test, MI-vehicle rats take more time to succeed in the test than the other groups (* $p < 0.05$). Inset: The number of trials is significantly higher in the MI-vehicle than in the other groups. $n = 8-10$ per group. *indicates $p < 0.05$ for MI – Vehicle vs MI - Probiotics.

Figure 5

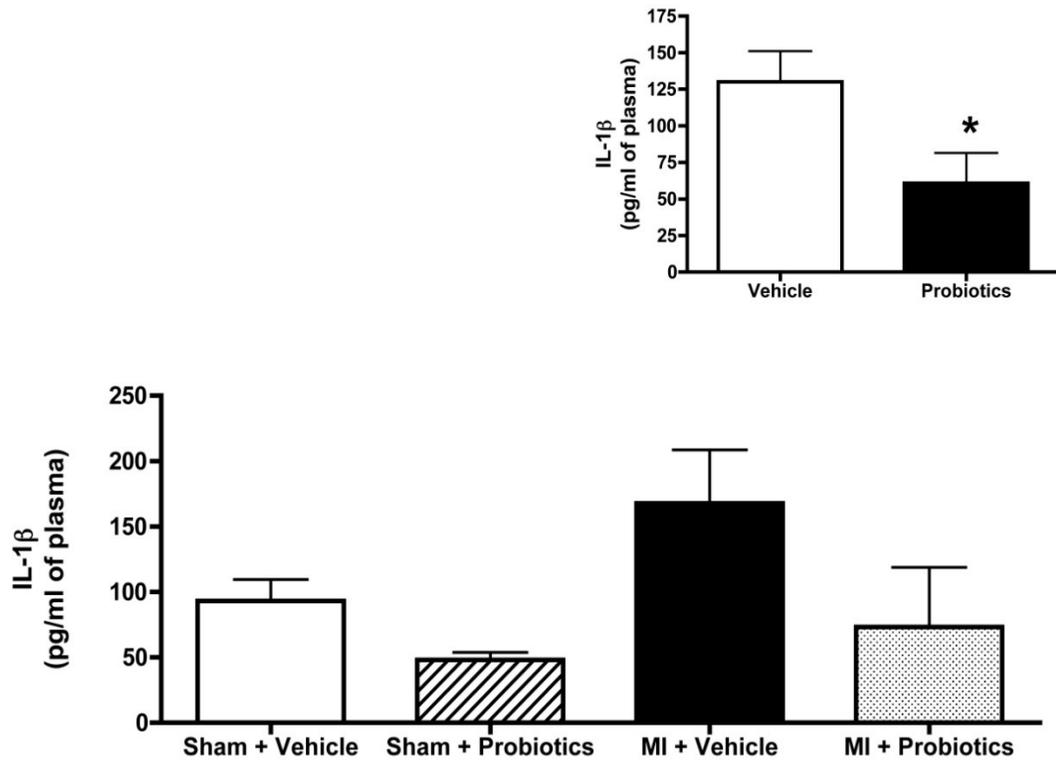


Figure 5-5. Probiotics rats present less plasma IL-1 β concentrations than vehicle controls (main effect presented in the inset). No other difference was detected between groups. n = 5-6 per group. *indicates p < 0.05 Vehicle vs Probiotics

Figure 6

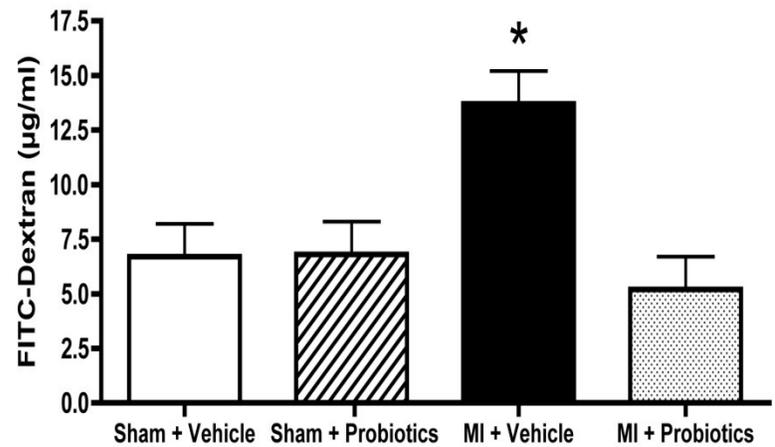


Figure 5-6. FITC-dextran concentrations measured in µg/ml of plasma before sacrifice. The data indicate that FITC-dextran level is significantly higher in the MI-vehicle group than in the other groups. N = 5 per group. *indicates $p < 0.05$ for MI – Vehicle vs MI - Probiotics.

Chapitre 6. Discussion

Dans cette étude, nous avons évalué l'effet d'une combinaison des probiotiques *Lactobacillus helveticus* RO052 et *Bifidobacterium longum* RO175 sur la dépression post-infarctus du myocarde chez le rat. Nous avons observé une diminution des symptômes dépressifs suite à l'IM chez le groupe traité aux probiotiques. De plus, une prévention de l'altération de la barrière intestinale suite à l'IM s'est aussi démarquée chez ce même groupe. Les niveaux plasmatiques d'IL-1 β ont également été réduits chez les groupes ayant reçu les probiotiques en comparaison avec les groupes contrôles et ce, indépendamment de la présence d'IM.

Nous avons préalablement démontré que notre modèle animal de dépression post-IM réplique certains symptômes de dépression observés chez l'humain. Ces symptômes incluaient l'anhédonie (test de préférence au sucrose) et le désespoir comportemental (test de Porsolt) [149]. Dans cette présente étude, d'autres marqueurs comportementaux se sont ajoutés aux précédents soit l'augmentation de l'anxiété et trouble de la mémoire affective (test d'évitement passif) et finalement des problèmes de comportements sociaux (test d'interactions sociales). Ces tests ont été effectués dans le but de confirmer les symptômes dépressifs de l'animal tout en éliminant le doute que ces symptômes pourraient être dus par les dommages encourus au cœur suite à l'IM. En effet, ces tests impliquent moins le système cardio-vasculaire comparativement au test de Porsolt (nage forcée). Nous avons aussi démontré une augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires suite à l'IM qui pourrait expliquer l'augmentation de l'apoptose observée au niveau du système limbique [61]. Le système limbique est une région particulièrement importante dans la gestion des émotions et de l'apprentissage. Un lien a donc été établi entre la mort cellulaire dans le système limbique et les marqueurs comportementaux de la dépression suite à un IM [148]. En effet, les symptômes de dépression observés dans notre modèle suivant l'événement occlusif sont liés avec l'apoptose observée chez ces mêmes animaux. De plus,

des études réalisées chez des patients dépressifs ont démontré une réduction du volume de l'amygdale et de l'hippocampe et l'apoptose observée dans ces mêmes structures du système limbique pourrait expliquer cette réduction [310]. Un autre fait intéressant provenant de notre laboratoire par est la diminution de l'apoptose observée dans le système limbique par l'administration en prophylaxie des probiotiques *Lactobacillus helveticus* RO052 et *Bifidobacterium longum* RO175 [59]. Ces résultats nous ont donné la première évidence d'un lien de l'intestin vers le cerveau. Dans ce présent mémoire, nous voulions donc observer si les symptômes de dépression pouvaient également être atténués par l'administration de ces mêmes probiotiques.

Le lien inverse, cerveau vers l'intestin, à longuement été étudié et un bon nombre d'études documentent sur le sujet. En effet, le stress et l'anxiété sont des facteurs prédisposant à des modifications physiologiques au niveau de l'intestin [269, 271]. Par exemple, chez les patients souffrant du syndrome du colon irritable, le stress induit des modifications de la motilité gastro-intestinale se traduisant par l'apparition de diarrhée ou de constipation [271, 273]. De plus, cette maladie est souvent associée à des troubles dépressifs [311]. Une étude expérimentale a aussi démontré une augmentation de la perméabilité au niveau de la muqueuse intestinale et une altération de l'interaction entre les bactéries et l'hôte suite à l'exposition au stress [312]. En effet, des stimuli stressants sont reconnus pour avoir la capacité d'affecter les fonctions gastro-intestinales telles que la sécrétion de substance viscoélastique au niveau de la muqueuse, la perméabilité cellulaire et la motilité [313].

Comment pouvons-nous expliquer que l'administration des probiotiques *Lactobacillus helveticus* RO052 et *Bifidobacterium longum* RO175 en combinaison peut amoindrir les symptômes de dépression post-IM? Quel est le lien existant entre l'infarctus du myocarde, la dépression et les probiotiques? L'explication semble converger vers un mécanisme, encore hypothétique, où l'inflammation serait l'élément clé. En ce sens, les cytokines pro-inflammatoires peuvent induire la dépression. En particulier, l'administration

d'IL-1 β et de TNF- α dans le traitement de certains cancers ont démontré l'apparition de symptômes dépressifs [314, 315]. Ces cytokines ont également été associées à des changements neuroendocriniens, chez des animaux, similaires à ceux observés chez des patients dépressifs et qui seraient responsables de la réponse au stress au niveau de l'axe HPA [316].

Divers événements stressants, qu'ils soient psychologiques (externes) ou organiques (internes), induisent l'activation de la réponse inflammatoire et l'apparition d'épisodes dépressifs subséquents [317]. Certaines maladies auto-immunes étant considérées comme un stress interne, l'infarctus du myocarde dans notre modèle animal sera traité de la même façon et représente donc un stress organique. En effet, l'IM cause une augmentation systémique des concentrations de cytokines pro-inflammatoires. De plus, une comorbidité existe entre la dépression et les maladies inflammatoires telles que les maladies coronariennes, la sclérose en plaque et le syndrome du colon irritable [317] ce qui mène une fois de plus à l'hypothèse de l'activation du système immunitaire dans la dépression majeure. Puisque l'IM implique un processus inflammatoire important haussant les niveaux des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α [318, 319], nous pouvons émettre l'hypothèse que cette condition inflammatoire peut mener à la dépression majeure suite à l'augmentation de ce type de cytokines. Dans cette étude, nous avons observé une diminution significative des niveaux d'IL-1 β circulantes dans les groupes probiotiques ce qui semble démontrer que l'effet thérapeutique des probiotiques *Lactobacillus helveticus* RO052 et *Bifidobacterium longum* RO175 proviendrait d'une modulation des cytokines pro-inflammatoires. Fait intéressant, il a été démontré récemment que les probiotiques *L. helveticus* RO052 et *L. rhamnosus* RO011 préviennent les déficits de la mémoire induits par le stress chez des souris infectées par des pathogènes [303] ce qui renforce notre hypothèse de l'axe « *immune-gut-brain* ».

Suivant l'IM, le myocarde reperfusé enflammé engendre le relâchement d'IL-1 et d'IL-6 qui stimulent la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et le

TNF- α dans le cerveau selon les différentes voies apoptotiques décrites précédemment. Les mécanismes sont encore méconnus, mais l'augmentation de ces cytokines semble être impliquée dans l'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose (**fig. 1-1.**) dans le système limbique [61]. De plus, la hausse des niveaux de cytokines circulantes enclenche la transcription des gènes de NF- κ B et de COX-2, au niveau des cellules de la BHE, ce qui engendre la production de PGE2 qui traverse alors la BHE et active l'axe HPA et la sécrétion de corticolibérine [320]. On se rappellera ici que les dépressifs majeurs démontrent également une hyperactivité de l'axe HPA, ce qui implique une fois de plus le système inflammatoire, activé par l'IM, dans la pathologie de la dépression.

Un dérèglement de la flore intestinale, tel qu'observer chez les patients atteints du syndrome du colon irritable, peut mener à des désordres émotionnels similaires à ceux observés dans les cas de dépression. En effet, des troubles au niveau des muqueuses gastro-intestinales favorisent la translocation de bactéries pathogènes entraînant des comportements de maladie (fièvre, anhédonie, anorexie, activation neuroendocrinienne, etc...) [156]. Notre étude a démontré qu'il y a une altération flagrante de l'intégrité de la barrière intestinale suite à un IM se traduisant par une augmentation de la perméabilité intestinale. La perte de fonction des cellules épithéliales permet alors le passage d'entérobactéries à travers la muqueuse [321]. Les entérobactéries sont des bactéries GRAM négatives composées de LPS, qui sont utilisés comme inducteurs de la réponse immunitaire dans un bon nombre d'études. En plus de la réponse inflammatoire qu'ils provoquent, les LPS causent aussi une neuro-inflammation centrale. En effet, les entérobactéries ont des sites antigéniques qui sont très similaires à ceux des structures lipidiques des tissus neuronaux [317] et la translocation de ces bactéries cause éventuellement une réponse auto-immunitaire dirigée contre les tissus neuronaux. Des études suggèrent effectivement un lien entre une réponse auto-immune contre les phospholipides et la dépression majeure [322].

L'augmentation de la perméabilité intestinale suite à l'infarctus du myocarde engendre donc une autre vague d'inflammation qui s'ajoute à celle créée par l'IM en soi ce qui favorise davantage la mort cellulaire programmée au cerveau et par le fait même, la dépression. L'administration de notre combinaison de probiotiques en prophylaxie a démontré une diminution des symptômes dépressifs observés chez le rat après un infarctus du myocarde. Ces résultats peuvent s'expliquer premièrement par la diminution des cytokines pro-inflammatoires causant l'apoptose au niveau du système limbique telle qu'observée dans l'étude antécédente à celle-ci dans notre laboratoire [59]. Il a d'ailleurs été démontré que les probiotiques ont la capacité de moduler la balance des cytokines pro- et anti-inflammatoire en diminuant les cytokines pro-inflammatoires (IL-12 et TNF- α) et en induisant la synthèse des cytokines anti-inflammatoires (IL-10) [289]. Deuxièmement, puisque les probiotiques sont administrées oralement et se retrouvent dans le système digestif, il est adéquat d'émettre l'hypothèse qu'elles modulent le système immunitaire en augmentant la fonction de la barrière intestinale. Nous avons effectivement observé un renversement de l'altération de l'intégrité de la barrière intestinale par les probiotiques ne permettant plus le passage de molécule comme le FITC-DEXTRAN. En effet, la présence de probiotiques a un effet bénéfique sur l'intégrité de la barrière intestinale par l'inhibition de la voie de NF- κ B et via une signalisation de ERK 1/2 [323].

Une autre hypothèse du mécanisme d'action des probiotiques sur la barrière intestinale serait l'action de ceux-ci sur les TLRs. Les TLRs sont une classe de récepteurs transmembranaires reconnaissant des motifs préservés chez les microbes et qui ont la capacité de contrôler la réponse immunitaire adaptative [324]. Un des membres de la famille des TLRs, TLR2, a la capacité de reconnaître, entre autres, les peptidoglycanes des bactéries GRAM positives telles que les probiotiques employées [48]. Les TLR2 sont exprimés sur plusieurs types cellulaires distincts au long du tractus gastro-intestinal incluant les cellules épithéliales intestinales [325] et les cellules mononucléaire de la lamina propria [304]. Lorsque ceux-ci sont activés par leurs ligands, les peptidoglycanes, ils induisent la production d'IL-10 qui abolit alors l'inflammation chronique par leur

pouvoir anti-inflammatoire [304]. De plus, la stimulation de TLR2 préserve efficacement l'intégrité de la barrière associée à la ZO-1 (protéine d'échafaudage majeure des TJs) des cellules épithéliales intestinales contre les dommages induits par le stress, qui sont critiqueusement contrôlés par la voie PI3K/Akt via MyD88 [245]. MyD88 est une importante protéine adaptatrice qui, lorsque recrutée, mène à diverses réponses immunitaires comme la production de cytokines anti-inflammatoire IL-10 par le recrutement de complexe de signalisation tel que l'activation de NF- κ B. De la même manière, nous pouvons raisonner en émettant l'hypothèse que les probiotiques vont stimuler les TLR2 sur les cellules intestinales permettant donc la sauvegarde de l'intégrité de la barrière intestinale et le maintien de la balance des cytokines après un IM tel qu'observé dans cette étude, et que l'infarctus du myocarde étant un stress interne altère la barrière et y cause des dommages lorsqu'il y a absence de probiotiques amplifiant ainsi la réponse inflammatoire. Cette réponse inflammatoire exagérée mène éventuellement à l'apoptose au niveau du système limbique et provoque les symptômes de dépression.

Par ailleurs, nous avons démontré que des drogues ayant des propriétés anti-inflammatoires telles que la pentoxifylline (inhibiteur de cytokines) [61], la sertraline (anti-dépresseur) [149] et un inhibiteur des récepteurs A2A de l'adénosine [198] pouvaient également diminuer l'apoptose suite à un IM. En effet, en plus de leur rôle primaire, les anti-dépresseurs peuvent aussi être bénéfiques en modulant la balance des cytokines [132]. Les probiotiques, en agissant de manière similaire sur la balance des cytokines et en réduisant les symptômes dépressifs après un infarctus du myocarde pourraient donc éventuellement être considéré comme des anti-dépresseurs naturels. D'autres études vont également dans ce sens en leur accordant un rôle dans la malabsorption des glucides (associée à la dépression) [326] et en augmentant les niveaux de tryptophane (précurseur de la sérotonine) [311]. De plus, comme mentionné dans l'introduction, les patients dépressifs démontrent une hyperactivité de l'axe HPA. Le groupe de Gareau et coll. ont démontré sur un modèle animal de stress (séparation néonatale) que l'administration de probiotiques améliore cette hyperactivité de l'axe HPA [327].

Finalement, il est important de justifier quelques limitations apparentes dans l'étude actuelle. Puisque l'ensemble des rats ont subi une thoracotomie, il est facile de croire que nos résultats obtenus lors des tests comportementaux sont biaisés par une diminution des performances physiques occasionnée par la chirurgie. Cependant, nous avons préalablement démontré que les rats, malgré leur thoracotomie, avaient une performance similaire dans le test de la piscine de Morris, indépendamment qu'ils aient subi ou non un IM et indépendamment du traitement (anti-dépresseur ou placebo) [148]. Ce test comportemental évalue effectivement la performance motrice et spatiale de l'animal [328] qui n'est aucune affectée par la thoracotomie en soi dans cette étude. De plus, la taille de l'infarctus a été mesurée et aucune différence significative entre les groupes n'a été reportée. Nous avons également démontré dans l'étude de Girard et coll. que les probiotiques n'ont aucune effet sur la taille de l'infarctus [59]. Pris ensemble, ces résultats démontrent que les effets bénéfiques observés sont attribuables à part entière aux probiotiques et ne sont aucunement biaisés par la chirurgie, la taille de l'infarctus et les défaillances locomotrices qui pourraient s'en suivre.

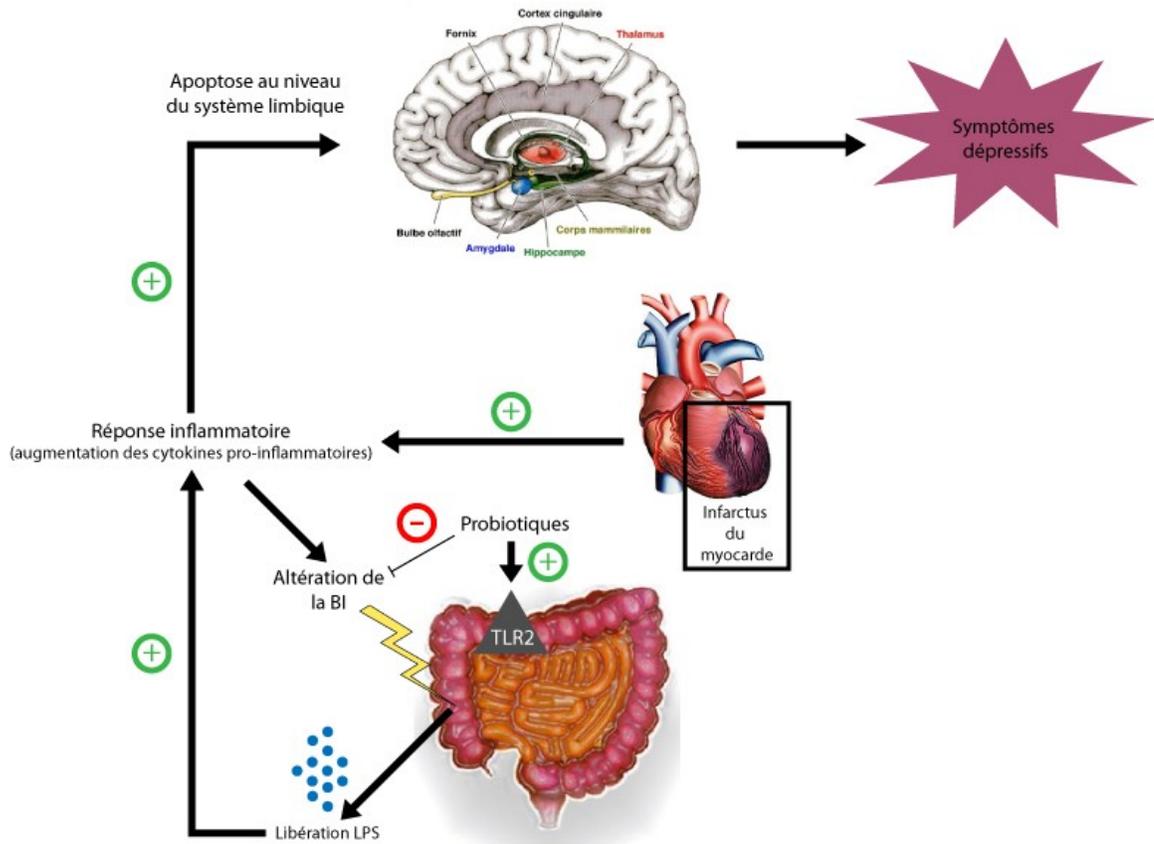


Figure 6-1. Schéma illustrant le lien entre l'infarctus du myocarde (IM), l'intestin et l'apparition de symptômes dépressifs. L'IM induit une réponse inflammatoire qui augmente la concentration de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , ...) en circulation. Ces cytokines vont induire l'apoptose au niveau du système limbique ainsi que provoquer l'altération de la barrière intestinale (BI). L'apoptose au niveau du système limbique mène à l'apparition de symptômes dépressifs. Les probiotiques atténuent l'apparition de ces symptômes en empêchant l'altération de la BI possiblement par l'activation des TLR2 (hypothétique pour l'instant) ce qui empêche la réponse inflammatoire (induite par la libération du contenu intestinal tel que les LPS) et donc, l'apoptose qui mène à la dépression.

6.1. Perspectives futures

Cette présente étude ouvre des portes à une multitude de projets de recherche. Tout d'abord, concernant les études effectuées dans notre laboratoire, bien que les probiotiques n'ont pas démontré un effet bénéfique au niveau de la cardioprotection, une autre étude au sein de notre équipe sur les oméga-3 a démontré une amélioration significative à ce niveau (données en voie de publication). Il serait donc intéressant d'évaluer si une diète composée d'une combinaison probiotiques/ oméga-3 réduirait davantage le processus inflammatoire (au niveau du cœur et du cerveau) causant la dépression. De plus, puisque l'IL-1 β est la cytokine principalement impliquée dans l'induction des symptômes dépressifs, il serait intéressant de voir si l'administration d'Anakinra (antagoniste du récepteur IL-1) réduirait ces cytokines circulantes réduisant ainsi l'apparition de symptômes dépressifs. Finalement, puisque les probiotiques semblent garder l'intégrité de la barrière intestinale par la possible activation des TLR-2 par les peptidoglycanes (ce qui reste encore hypothétique), un gavage aux peptidoglycanes plutôt que l'administration de probiotiques entières pourrait-il nous donner d'aussi bons résultats? On pourrait également bloquer les TLR-2 par un anticorps par exemple, pour voir leurs contributions dans ce modèle.

Ainsi, bien que nous ayons obtenu des résultats très intéressants, il est clair que plusieurs questions restent sans réponse et que d'autres expériences seront nécessaires afin d'avoir une meilleure compréhension de ces mécanismes.

Conclusion

Ces travaux ont permis de démontrer l'effet d'une combinaison de probiotiques sur les symptômes de dépression post-infarctus du myocarde chez le rat. En effet, l'administration de la combinaison de *Lactobacillus helveticus* RO052 et *Bifidobacterium longum* RO175 permet d'atténuer les symptômes dépressifs observés chez le rat suite à un IM.

Ces résultats ont également démontré que les niveaux plasmatiques d'IL-1 β étaient diminués dans les groupes ayant reçu des probiotiques par rapport aux groupes placebo et que cela pouvait être attribué en partie par le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale qu'offre ceux-ci en présence d'IM ainsi que par la modulation de la balance des cytokines pro-/anti-inflammatoires. La baisse des niveaux de cytokines pro-inflammatoires diminue les risques d'apoptose au niveau du cerveau et donc, l'apparition de symptômes dépressifs.

Bien que ces résultats semblent très prometteurs pour une éventuelle branche thérapeutique dans le traitement de la dépression post-IM, d'autres études seront nécessaires afin de rendre le tout cliniquement possible. En effet, les études à venir viseront à démontrer davantage l'implication des récepteurs TLRs à la barrière intestinale dans le maintien de l'intégrité observée par notre combinaison de probiotiques. De plus, les probiotiques ayant été administrés en prophylaxie, et l'infarctus du myocarde étant impossible à prévoir en clinique, il faudra voir si l'effet est tout autant bénéfique lorsque ceux-ci sont administrés seulement en post-infarctus du myocarde. Notre laboratoire tente actuellement d'élucider ces avenues. Tout compte fait, notre étude présente la première évidence des bienfaits qu'apportent la combinaison de probiotiques *Lactobacillus helveticus* RO052 et *Bifidobacterium longum* RO175 sur la dépression post-IM.

Bibliographie

1. *Statistiques*. 2009 [cited 2010 6 septembre]; Available from: <http://www.fmcoeur.com/site/c.ntJXJ8MMIqE/b.3562179/k.9FCD/Statistiques.htm>.
2. Jennings, R.B. and K.A. Reimer, *The cell biology of acute myocardial ischemia*. *Annu Rev Med*, 1991. **42**: p. 225-46.
3. Carmeliet, E., *Myocardial ischemia: reversible and irreversible changes*. *Circulation*, 1984. **70**(1): p. 149-51.
4. Sayen, J.J., et al., *Polarographic oxygen, the epicardial electrocardiogram and muscle contraction in experimental acute regional ischemia of the left ventricle*. *Circ Res*, 1958. **6**(6): p. 779-98.
5. Steenbergen, C., et al., *Heterogeneity of the hypoxic state in perfused rat heart*. *Circ Res*, 1977. **41**(5): p. 606-15.
6. Reimer, K.A., R.B. Jennings, and A.H. Tatum, *Pathobiology of acute myocardial ischemia: metabolic, functional and ultrastructural studies*. *Am J Cardiol*, 1983. **52**(2): p. 72A-81A.
7. Jennings, R.B., et al., *Development of cell injury in sustained acute ischemia*. *Circulation*, 1990. **82**(3 Suppl): p. II2-12.
8. Jennings, R.B., K.A. Reimer, and C. Steenbergen, *Myocardial ischemia revisited. The osmolar load, membrane damage, and reperfusion*. *J Mol Cell Cardiol*, 1986. **18**(8): p. 769-80.
9. Kloner, R.A. and R.B. Jennings, *Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1*. *Circulation*, 2001. **104**(24): p. 2981-9.
10. Weiss, J. and K.I. Shine, *Extracellular potassium accumulation during myocardial ischemia: implications for arrhythmogenesis*. *J Mol Cell Cardiol*, 1981. **13**(7): p. 699-704.
11. Harris, A.S., et al., *Excitatory factors in ventricular tachycardia resulting from myocardial ischemia; potassium a major excitant*. *Science*, 1954. **119**(3085): p. 200-3.
12. Buja, L.M., *Myocardial ischemia and reperfusion injury*. *Cardiovasc Pathol*, 2005. **14**(4): p. 170-5.
13. Jennings, R.B., et al., *Ischemic injury of myocardium*. *Ann N Y Acad Sci*, 1969. **156**(1): p. 61-78.
14. Jennings, R.B., et al., *Relation between high energy phosphate and lethal injury in myocardial ischemia in the dog*. *Am J Pathol*, 1978. **92**(1): p. 187-214.
15. Burke, A.P. and R. Virmani, *Pathophysiology of acute myocardial infarction*. *Med Clin North Am*, 2007. **91**(4): p. 553-72; ix.

16. Slater, E.C. and K.W. Cleland, *The effect of calcium on the respiratory and phosphorylative activities of heart-muscle sarcosomes*. *Biochem J*, 1953. **55**(4): p. 566-90.
17. Herdson, P.B., H.M. Sommers, and R.B. Jennings, *A Comparative Study of the Fine Structure of Normal and Ischemic Dog Myocardium with Special Reference to Early Changes Following Temporary Occlusion of a Coronary Artery*. *Am J Pathol*, 1965. **46**: p. 367-86.
18. Reimer, K.A. and R.B. Jennings, *The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow*. *Lab Invest*, 1979. **40**(6): p. 633-44.
19. Whalen, D.A., Jr., et al., *Effect of a transient period of ischemia on myocardial cells. I. Effects on cell volume regulation*. *Am J Pathol*, 1974. **74**(3): p. 381-97.
20. Kloner, R.A., et al., *Effect of a transient period of ischemia on myocardial cells. II. Fine structure during the first few minutes of reflow*. *Am J Pathol*, 1974. **74**(3): p. 399-422.
21. Lowe, J.E., K.A. Reimer, and R.B. Jennings, *Experimental infarct size as a function of the amount of myocardium at risk*. *Am J Pathol*, 1978. **90**(2): p. 363-79.
22. Fujita, M., et al., *Determinants of collateral development in patients with acute myocardial infarction*. *Clin Cardiol*, 1999. **22**(9): p. 595-9.
23. Miwa, K., et al., *Absence of myocardial ischemia during sudden controlled occlusion of coronary arteries in patients with well-developed collateral vessels*. *Coron Artery Dis*, 1999. **10**(7): p. 459-63.
24. Virmani, R., M.B. Forman, and F.D. Kolodgie, *Myocardial reperfusion injury. Histopathological effects of perfluorochemical*. *Circulation*, 1990. **81**(3 Suppl): p. IV57-68.
25. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium*. *Circulation*, 1986. **74**(5): p. 1124-36.
26. Kloner, R.A., *Does reperfusion injury exist in humans?* *J Am Coll Cardiol*, 1993. **21**(2): p. 537-45.
27. Ganz, W., *Direct Demonstration in Dogs of the Absence of Lethal Reperfusion Injury*. *J Thromb Thrombolysis*, 1997. **4**(1): p. 105-107.
28. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial reperfusion injury*. *N Engl J Med*, 2007. **357**(11): p. 1121-35.
29. Jean-François Toussaint, M.-P.J., Laurent Lagrost, John Chapman, Société Française d'Atherosclérose, *L'athérosclérose: Physiopathologie, diagnostics et thérapeutiques*. *L'athérosclérose*. 2003, Paris: Elsevier-Masson. 808.
30. Kloner, R.A., K. Przyklenk, and P. Whittaker, *Deleterious effects of oxygen radicals in ischemia/reperfusion. Resolved and unresolved issues*. *Circulation*, 1989. **80**(5): p. 1115-27.

31. Zweier, J.L. and M.A. Talukder, *The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 2006. **70**(2): p. 181-90.
32. Weyrich, A.S., X.L. Ma, and A.M. Lefer, *The role of L-arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat*. Circulation, 1992. **86**(1): p. 279-88.
33. Ishii, H., et al., *Impact of a single intravenous administration of nicorandil before reperfusion in patients with ST-segment-elevation myocardial infarction*. Circulation, 2005. **112**(9): p. 1284-8.
34. Ono, H., et al., *Nicorandil improves cardiac function and clinical outcome in patients with acute myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention: role of inhibitory effect on reactive oxygen species formation*. Am Heart J, 2004. **148**(4): p. E15.
35. Piper, H.M., D. Garcia-Dorado, and M. Ovize, *A fresh look at reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 1998. **38**(2): p. 291-300.
36. Klein, H.H., et al., *Treatment of reperfusion injury with intracoronary calcium channel antagonists and reduced coronary free calcium concentration in regionally ischemic, reperfused porcine hearts*. J Am Coll Cardiol, 1989. **13**(6): p. 1395-401.
37. Carry, M.M., et al., *Reperfusion injury in ischemic myocardium: protective effects of ruthenium red and of nitroprusside*. Am J Cardiovasc Pathol, 1989. **2**(4): p. 335-44.
38. Lemasters, J.J., et al., *The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes*. EXS, 1996. **76**: p. 99-114.
39. Karmazyn, M., *Amiloride enhances postischemic ventricular recovery: possible role of Na⁺-H⁺ exchange*. Am J Physiol, 1988. **255**(3 Pt 2): p. H608-15.
40. Meng, H.P., B.B. Lonsberry, and G.N. Pierce, *Influence of perfusate pH on the postischemic recovery of cardiac contractile function: involvement of sodium-hydrogen exchange*. J Pharmacol Exp Ther, 1991. **258**(3): p. 772-7.
41. Zeymer, U., et al., *The Na(+)/H(+) exchange inhibitor eniporide as an adjunct to early reperfusion therapy for acute myocardial infarction. Results of the evaluation of the safety and cardioprotective effects of eniporide in acute myocardial infarction (ESCAMI) trial*. J Am Coll Cardiol, 2001. **38**(6): p. 1644-50.
42. Braunwald, E. and R.A. Kloner, *The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction*. Circulation, 1982. **66**(6): p. 1146-9.
43. Krug, A., R. Du Mesnil de, and G. Korb, *Blood supply of the myocardium after temporary coronary occlusion*. Circ Res, 1966. **19**(1): p. 57-62.
44. Ito, H., *No-reflow phenomenon and prognosis in patients with acute myocardial infarction*. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2006. **3**(9): p. 499-506.
45. Lambert, C. and P. Beaulieu, *Précis de pharmacologie : du fondamental à la clinique*. 2010, Montréal: Presses de l'Université de Montréal. 877.
46. Sherwood, L., *Physiologie humaine*. 2e éd. ed. 2006, Bruxelles: De Boeck. xxvii, 629, [105].

47. Oyama, J., et al., *Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice*. *Circulation*, 2004. **109**(6): p. 784-9.
48. Kindt, T.J., et al., *Immunologie : le cours de Janis Kuby : avec questions de révision*. Sciences sup. 2008, Paris: Dunod. xx, 684.
49. Diepenhorst, G.M., T.M. van Gulik, and C.E. Hack, *Complement-mediated ischemia-reperfusion injury: lessons learned from animal and clinical studies*. *Ann Surg*, 2009. **249**(6): p. 889-99.
50. Zacharowski, K., et al., *Reduction of myocardial infarct size with sCR1sLe(x), an alternatively glycosylated form of human soluble complement receptor type 1 (sCRI), possessing sialyl Lewis x*. *Br J Pharmacol*, 1999. **128**(5): p. 945-52.
51. Vakeva, A.P., et al., *Myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion: role of the terminal complement components and inhibition by anti-C5 therapy*. *Circulation*, 1998. **97**(22): p. 2259-67.
52. Beg, A.A., *Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses*. *Trends Immunol*, 2002. **23**(11): p. 509-12.
53. Frantz, S., et al., *Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium*. *J Clin Invest*, 1999. **104**(3): p. 271-80.
54. Pepys, M.B., et al., *Targeting C-reactive protein for the treatment of cardiovascular disease*. *Nature*, 2006. **440**(7088): p. 1217-21.
55. Frangogiannis, N.G., *The immune system and cardiac repair*. *Pharmacol Res*, 2008. **58**(2): p. 88-111.
56. Trescher, K., et al., *Adenovirus-mediated overexpression of inhibitor kappa B-alpha attenuates postinfarct remodeling in the rat heart*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2004. **26**(5): p. 960-7.
57. Finkel, M.S., et al., *Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide*. *Science*, 1992. **257**(5068): p. 387-9.
58. Frangogiannis, N.G., C.W. Smith, and M.L. Entman, *The inflammatory response in myocardial infarction*. *Cardiovasc Res*, 2002. **53**(1): p. 31-47.
59. Girard, S.A., et al., *Lactobacillus helveticus and Bifidobacterium longum taken in combination reduce the apoptosis propensity in the limbic system after myocardial infarction in a rat model*. *Br J Nutr*, 2009. **102**(10): p. 1420-5.
60. Kaloustian, S., et al., *Tumor necrosis factor-alpha participates in apoptosis in the limbic system after myocardial infarction*. *Apoptosis*, 2009. **14**(11): p. 1308-16.
61. Wann, B.P., et al., *Apoptosis detected in the amygdala following myocardial infarction in the rat*. *Biol Psychiatry*, 2006. **59**(5): p. 430-3.
62. Vinten-Johansen, J., *Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury*. *Cardiovasc Res*, 2004. **61**(3): p. 481-97.
63. Gaboury, J.P., D.C. Anderson, and P. Kubes, *Molecular mechanisms involved in superoxide-induced leukocyte-endothelial cell interactions in vivo*. *Am J Physiol*, 1994. **266**(2 Pt 2): p. H637-42.

64. Lefer, D.J., et al., *Combined inhibition of P-selectin and ICAM-1 reduces myocardial injury following ischemia and reperfusion*. Am J Physiol, 1996. **271**(6 Pt 2): p. H2421-9.
65. Ioculano, M., et al., *Antibodies against intercellular adhesion molecule 1 protect against myocardial ischaemia-reperfusion injury in rat*. Eur J Pharmacol, 1994. **264**(2): p. 143-9.
66. Rousseau, G., et al., *Diltiazem at reperfusion reduces neutrophil accumulation and infarct size in dogs with ischaemic myocardium*. Cardiovasc Res, 1991. **25**(4): p. 319-29.
67. Gill, E.A., Y. Kong, and L.D. Horwitz, *An oligosaccharide sialyl-Lewis(x) analogue does not reduce myocardial infarct size after ischemia and reperfusion in dogs*. Circulation, 1996. **94**(3): p. 542-6.
68. Wyllie, A.H., J.F. Kerr, and A.R. Currie, *Cell death: the significance of apoptosis*. Int Rev Cytol, 1980. **68**: p. 251-306.
69. Trump, B.F., et al., *Cellular change in human disease. A new method of pathological analysis*. Hum Pathol, 1973. **4**(1): p. 89-109.
70. Papaliagkas, V., et al., *The proteins and the mechanisms of apoptosis: a mini-review of the fundamentals*. Hippokratia, 2007. **11**(3): p. 108-13.
71. McCarthy, N.J. and G.I. Evan, *Methods for detecting and quantifying apoptosis*. Curr Top Dev Biol, 1998. **36**: p. 259-78.
72. Anversa, P., et al., *Apoptosis and myocardial infarction*. Basic Res Cardiol, 1998. **93 Suppl 3**: p. 8-12.
73. Saikumar, P., et al., *Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease*. Am J Med, 1999. **107**(5): p. 489-506.
74. Yang, J., et al., *Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked*. Science, 1997. **275**(5303): p. 1129-32.
75. Kluck, R.M., et al., *The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis*. Science, 1997. **275**(5303): p. 1132-6.
76. Li, P., et al., *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade*. Cell, 1997. **91**(4): p. 479-89.
77. Zou, H., et al., *Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3*. Cell, 1997. **90**(3): p. 405-13.
78. Goping, I.S., et al., *Regulated targeting of BAX to mitochondria*. J Cell Biol, 1998. **143**(1): p. 207-15.
79. Rossi, D. and G. Gaidano, *Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease*. Haematologica, 2003. **88**(2): p. 212-8.
80. Ashkenazi, A. and V.M. Dixit, *Death receptors: signaling and modulation*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1305-8.
81. Luo, X., et al., *Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors*. Cell, 1998. **94**(4): p. 481-90.

82. Holly, T.A., et al., *Caspase inhibition reduces myocyte cell death induced by myocardial ischemia and reperfusion in vivo*. J Mol Cell Cardiol, 1999. **31**(9): p. 1709-15.
83. Yaoita, H., et al., *Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor*. Circulation, 1998. **97**(3): p. 276-81.
84. Brocheriou, V., et al., *Cardiac functional improvement by a human Bcl-2 transgene in a mouse model of ischemia/reperfusion injury*. J Gene Med, 2000. **2**(5): p. 326-33.
85. Chen, Z., et al., *Overexpression of Bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial I/R injury in transgenic mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(5): p. H2313-20.
86. Reimer, K.A., et al., *Four brief periods of myocardial ischemia cause no cumulative ATP loss or necrosis*. Am J Physiol, 1986. **251**(6 Pt 2): p. H1306-15.
87. Zhao, Z.Q., et al., *Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**(2): p. H579-88.
88. Lecour, S., *Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway?* J Mol Cell Cardiol, 2009. **47**(1): p. 32-40.
89. Lecour, S., et al., *Pharmacological preconditioning with tumor necrosis factor-alpha activates signal transducer and activator of transcription-3 at reperfusion without involving classic prosurvival kinases (Akt and extracellular signal-regulated kinase)*. Circulation, 2005. **112**(25): p. 3911-8.
90. Yamashita, K., et al., *Reperfusion-activated Akt kinase prevents apoptosis in transgenic mouse hearts overexpressing insulin-like growth factor-1*. Circ Res, 2001. **88**(6): p. 609-14.
91. Sanada, S., et al., *Optimal windows of statin use for immediate infarct limitation: 5'-nucleotidase as another downstream molecule of phosphatidylinositol 3-kinase*. Circulation, 2004. **110**(15): p. 2143-9.
92. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 448-60.
93. Lacerda, L., et al., *Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway*. Cardiovasc Res, 2009. **84**(2): p. 201-8.
94. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion*. J Mol Cell Cardiol, 2003. **35**(4): p. 339-41.
95. Sack, M.N. and D.M. Yellon, *Insulin therapy as an adjunct to reperfusion after acute coronary ischemia: a proposed direct myocardial cell survival effect independent of metabolic modulation*. J Am Coll Cardiol, 2003. **41**(8): p. 1404-7.
96. Sheng, Z., et al., *Cardiotrophin 1 (CT-1) inhibition of cardiac myocyte apoptosis via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. Divergence from*

- downstream CT-1 signals for myocardial cell hypertrophy.* J Biol Chem, 1997. **272**(9): p. 5783-91.
97. *A coronary primary prevention study of Scottish men aged 45-64 years: trial design. The West of Scotland Coronary Prevention Study Group.* J Clin Epidemiol, 1992. **45**(8): p. 849-60.
 98. *Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S).* Lancet, 1994. **344**(8934): p. 1383-9.
 99. Andrukhiv, A., et al., *Opening mitoKATP increases superoxide generation from complex I of the electron transport chain.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(5): p. H2067-74.
 100. Terada, K., Y. Kaziro, and T. Satoh, *Analysis of Ras-dependent signals that prevent caspase-3 activation and apoptosis induced by cytokine deprivation in hematopoietic cells.* Biochem Biophys Res Commun, 2000. **267**(1): p. 449-55.
 101. Cardone, M.H., et al., *Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation.* Science, 1998. **282**(5392): p. 1318-21.
 102. Yamaguchi, H. and H.G. Wang, *The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change.* Oncogene, 2001. **20**(53): p. 7779-86.
 103. Boucher, M., et al., *Post-ischemic cardioprotection by A2A adenosine receptors: dependent of phosphatidylinositol 3-kinase pathway.* J Cardiovasc Pharmacol, 2004. **43**(3): p. 416-22.
 104. Tsang, A., et al., *Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway.* Circ Res, 2004. **95**(3): p. 230-2.
 105. Hausenloy, D.J., et al., *Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(2): p. H971-6.
 106. Skyschally, A., et al., *Ischemic postconditioning in pigs: no causal role for RISK activation.* Circ Res, 2009. **104**(1): p. 15-8.
 107. Lecour, S., et al., *Identification of a novel role for sphingolipid signaling in TNF alpha and ischemic preconditioning mediated cardioprotection.* J Mol Cell Cardiol, 2002. **34**(5): p. 509-18.
 108. Kin, H., et al., *Inhibition of myocardial apoptosis by postconditioning is associated with attenuation of oxidative stress-mediated nuclear factor-kappa B translocation and TNF alpha release.* Shock, 2008. **29**(6): p. 761-8.
 109. Lecour, S. and R.W. James, *When are pro-inflammatory cytokines SAFE in heart failure?* Eur Heart J, 2011.
 110. Greenberg, P.E., et al., *The economic burden of depression in 1990.* J Clin Psychiatry, 1993. **54**(11): p. 405-18.
 111. Amick, B.C., 3rd, et al., *Relationship of job strain and iso-strain to health status in a cohort of women in the United States.* Scand J Work Environ Health, 1998. **24**(1): p. 54-61.

112. Williams, R.B., et al., *Psychosocial correlates of job strain in a sample of working women*. Arch Gen Psychiatry, 1997. **54**(6): p. 543-8.
113. Barlow, D.H. and V.M. Durand, *Psychopathologie : une perspective multidimensionnelle*. 2e éd. ed. Ouvertures psychologiques. 2007, Bruxelles: De Boeck. xiv, 1178.
114. Thoresen, C.E. and L.H. Powell, *Type A behavior pattern: new perspectives on theory, assessment, and intervention*. J Consult Clin Psychol, 1992. **60**(4): p. 595-604.
115. Brown, A.D., D.A. Barton, and G.W. Lambert, *Cardiovascular abnormalities in patients with major depressive disorder: autonomic mechanisms and implications for treatment*. CNS Drugs, 2009. **23**(7): p. 583-602.
116. Anda, R., et al., *Depressed affect, hopelessness, and the risk of ischemic heart disease in a cohort of U.S. adults*. Epidemiology, 1993. **4**(4): p. 285-94.
117. Ferketich, A.K., et al., *Depression as an antecedent to heart disease among women and men in the NHANES I study*. National Health and Nutrition Examination Survey. Arch Intern Med, 2000. **160**(9): p. 1261-8.
118. Ford, D.E., et al., *Depression is a risk factor for coronary artery disease in men: the precursors study*. Arch Intern Med, 1998. **158**(13): p. 1422-6.
119. Wulsin, L.R. and B.M. Singal, *Do depressive symptoms increase the risk for the onset of coronary disease? A systematic quantitative review*. Psychosom Med, 2003. **65**(2): p. 201-10.
120. Guck, T.P., et al., *Assessment and treatment of depression following myocardial infarction*. Am Fam Physician, 2001. **64**(4): p. 641-8.
121. Meneses, R., et al., *Depression in patients with myocardial infarction*. Rev Port Cardiol, 2007. **26**(11): p. 1143-65.
122. Frasure-Smith, N., F. Lesperance, and M. Talajic, *Depression following myocardial infarction. Impact on 6-month survival*. JAMA, 1993. **270**(15): p. 1819-25.
123. Welin, C., G. Lappas, and L. Wilhelmsen, *Independent importance of psychosocial factors for prognosis after myocardial infarction*. J Intern Med, 2000. **247**(6): p. 629-39.
124. Frasure-Smith, N., F. Lesperance, and M. Talajic, *The impact of negative emotions on prognosis following myocardial infarction: is it more than depression?* Health Psychol, 1995. **14**(5): p. 388-98.
125. Bush, D.E., et al., *Even minimal symptoms of depression increase mortality risk after acute myocardial infarction*. Am J Cardiol, 2001. **88**(4): p. 337-41.
126. Lesperance, F., et al., *Five-year risk of cardiac mortality in relation to initial severity and one-year changes in depression symptoms after myocardial infarction*. Circulation, 2002. **105**(9): p. 1049-53.
127. Katzung, B.G., S.B. Masters, and A.J. Trevor, *Basic & clinical pharmacology*. 11th ed. 2009, New York ; Toronto, London: McGraw-Hill Medical ; McGraw-Hill distributor. xiii, 1218.

128. Krishnan, V. and E.J. Nestler, *The molecular neurobiology of depression*. Nature, 2008. **455**(7215): p. 894-902.
129. Freis, E.D. and R. Ari, *Clinical and experimental effects of reserpine in patients with essential hypertension*. Ann N Y Acad Sci, 1954. **59**(1): p. 45-53.
130. Delgado, P.L., *How antidepressants help depression: mechanisms of action and clinical response*. J Clin Psychiatry, 2004. **65 Suppl 4**: p. 25-30.
131. Chang, T. and M. Fava, *The future of psychopharmacology of depression*. J Clin Psychiatry, 2010. **71**(8): p. 971-5.
132. Katzung, B.G., et al., *Basic & clinical pharmacology*. 11th ed. 2009, New York ; London: McGraw-Hill Medical. 1 texte électronique.
133. Lanni, C., et al., *Depression and antidepressants: molecular and cellular aspects*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(18): p. 2985-3008.
134. Fuchs, E., et al., *Alterations of neuroplasticity in depression: the hippocampus and beyond*. Eur Neuropsychopharmacol, 2004. **14 Suppl 5**: p. S481-90.
135. Bremner, J.D., et al., *Hippocampal volume reduction in major depression*. Am J Psychiatry, 2000. **157**(1): p. 115-8.
136. Stockmeier, C.A., et al., *Cellular changes in the postmortem hippocampus in major depression*. Biol Psychiatry, 2004. **56**(9): p. 640-50.
137. MacQueen, G.M., et al., *Course of illness, hippocampal function, and hippocampal volume in major depression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(3): p. 1387-92.
138. Rajkowska, G., et al., *Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression*. Biol Psychiatry, 1999. **45**(9): p. 1085-98.
139. Rajkowska, G., *Postmortem studies in mood disorders indicate altered numbers of neurons and glial cells*. Biol Psychiatry, 2000. **48**(8): p. 766-77.
140. McLachlan, R.S., *A brief review of the anatomy and physiology of the limbic system*. Can J Neurol Sci, 2009. **36 Suppl 2**: p. S84-7.
141. Videbech, P. and B. Ravnkilde, *Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies*. Am J Psychiatry, 2004. **161**(11): p. 1957-66.
142. Malberg, J.E., *Implications of adult hippocampal neurogenesis in antidepressant action*. J Psychiatry Neurosci, 2004. **29**(3): p. 196-205.
143. Duman, R.S., G.R. Heninger, and E.J. Nestler, *A molecular and cellular theory of depression*. Arch Gen Psychiatry, 1997. **54**(7): p. 597-606.
144. Young, L.T., D. Bakish, and S. Beaulieu, *The neurobiology of treatment response to antidepressants and mood stabilizing medications*. J Psychiatry Neurosci, 2002. **27**(4): p. 260-5.
145. Lewin, G.R. and Y.A. Barde, *Physiology of the neurotrophins*. Annu Rev Neurosci, 1996. **19**: p. 289-317.
146. Lucassen, P.J., et al., *Hippocampal apoptosis in major depression is a minor event and absent from subareas at risk for glucocorticoid overexposure*. Am J Pathol, 2001. **158**(2): p. 453-68.
147. Kaloustian, S., et al., *Apoptosis time course in the limbic system after myocardial infarction in the rat*. Brain Res, 2008. **1216**: p. 87-91.

148. Wann, B.P., et al., *Vulnerability for apoptosis in the limbic system after myocardial infarction in rats: a possible model for human postinfarct major depression*. J Psychiatry Neurosci, 2007. **32**(1): p. 11-6.
149. Wann, B.P., et al., *Behavioural signs of depression and apoptosis in the limbic system following myocardial infarction: effects of sertraline*. J Psychopharmacol, 2009. **23**(4): p. 451-9.
150. Wilson, D.R. and L. Warise, *Cytokines and their role in depression*. Perspect Psychiatr Care, 2008. **44**(4): p. 285-9.
151. Yarlagadda, A., E. Alfson, and A.H. Clayton, *The blood brain barrier and the role of cytokines in neuropsychiatry*. Psychiatry (Edgmont), 2009. **6**(11): p. 18-22.
152. Denicoff, K.D., et al., *The neuropsychiatric effects of treatment with interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells*. Ann Intern Med, 1987. **107**(3): p. 293-300.
153. Renault, P.F., et al., *Psychiatric complications of long-term interferon alfa therapy*. Arch Intern Med, 1987. **147**(9): p. 1577-80.
154. Capuron, L., et al., *Neurobehavioral effects of interferon-alpha in cancer patients: phenomenology and paroxetine responsiveness of symptom dimensions*. Neuropsychopharmacology, 2002. **26**(5): p. 643-52.
155. Musselman, D.L., et al., *Paroxetine for the prevention of depression induced by high-dose interferon alfa*. N Engl J Med, 2001. **344**(13): p. 961-6.
156. Dantzer, R., et al., *From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain*. Nat Rev Neurosci, 2008. **9**(1): p. 46-56.
157. Kraus, M.R., et al., *Psychiatric symptoms in patients with chronic hepatitis C receiving interferon alfa-2b therapy*. J Clin Psychiatry, 2003. **64**(6): p. 708-14.
158. van Dam, A.M., et al., *Appearance of interleukin-1 in macrophages and in ramified microglia in the brain of endotoxin-treated rats: a pathway for the induction of non-specific symptoms of sickness?* Brain Res, 1992. **588**(2): p. 291-6.
159. Laye, S., et al., *Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice*. Brain Res Mol Brain Res, 1994. **27**(1): p. 157-62.
160. Quan, N., et al., *Induction of pro-inflammatory cytokine mRNAs in the brain after peripheral injection of subseptic doses of lipopolysaccharide in the rat*. J Neuroimmunol, 1999. **93**(1-2): p. 72-80.
161. Gatti, S. and T. Bartfai, *Induction of tumor necrosis factor-alpha mRNA in the brain after peripheral endotoxin treatment: comparison with interleukin-1 family and interleukin-6*. Brain Res, 1993. **624**(1-2): p. 291-4.
162. Breder, C.D., et al., *Regional induction of tumor necrosis factor alpha expression in the mouse brain after systemic lipopolysaccharide administration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(24): p. 11393-7.
163. Zlokovic, B.V., *The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders*. Neuron, 2008. **57**(2): p. 178-201.

164. Miller, A.H., V. Maletic, and C.L. Raison, *Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression*. Biol Psychiatry, 2009. **65**(9): p. 732-41.
165. Bluthé, R.M., et al., *Lipopolysaccharide induces sickness behaviour in rats by a vagal mediated mechanism*. C R Acad Sci III, 1994. **317**(6): p. 499-503.
166. Watkins, L.R., et al., *Neurocircuitry of illness-induced hyperalgesia*. Brain Res, 1994. **639**(2): p. 283-99.
167. Quan, N., M. Whiteside, and M. Herkenham, *Time course and localization patterns of interleukin-1beta messenger RNA expression in brain and pituitary after peripheral administration of lipopolysaccharide*. Neuroscience, 1998. **83**(1): p. 281-93.
168. Vitkovic, L., et al., *Cytokine signals propagate through the brain*. Mol Psychiatry, 2000. **5**(6): p. 604-15.
169. Banks, W.A., *The blood-brain barrier in psychoneuroimmunology*. Neurol Clin, 2006. **24**(3): p. 413-9.
170. Koonsman, J.P., et al., *Rat brain vascular distribution of interleukin-1 type-1 receptor immunoreactivity: relationship to patterns of inducible cyclooxygenase expression by peripheral inflammatory stimuli*. J Comp Neurol, 2004. **472**(1): p. 113-29.
171. Schiltz, J.C. and P.E. Sawchenko, *Distinct brain vascular cell types manifest inducible cyclooxygenase expression as a function of the strength and nature of immune insults*. J Neurosci, 2002. **22**(13): p. 5606-18.
172. Pecchi, E., et al., *Prostaglandins and sickness behavior: old story, new insights*. Physiol Behav, 2009. **97**(3-4): p. 279-92.
173. Forstermann, U., R. Heldt, and G. Hertting, *Effects of intracerebroventricular administration of prostaglandin D2 on behaviour, blood pressure and body temperature as compared to prostaglandins E2 and F2 alpha*. Psychopharmacology (Berl), 1983. **80**(4): p. 365-70.
174. Splawinski, J.A., et al., *Hyperthermic effects of arachidonic acid, prostaglandin E2 and F2alpha in rats*. Pflugers Arch, 1978. **374**(1): p. 15-21.
175. Morimoto, A., et al., *Multiple control of fever production in the central nervous system of rabbits*. J Physiol, 1988. **397**: p. 269-80.
176. Doggett, N.S. and K. Jawaharlal, *Anorectic activity of prostaglandin precursors*. Br J Pharmacol, 1977. **60**(3): p. 417-23.
177. Levine, A.S. and J.E. Morley, *The effect of prostaglandins (PGE2 and PGF2 alpha) on food intake in rats*. Pharmacol Biochem Behav, 1981. **15**(5): p. 735-8.
178. Lal, J., *Possible role of prostaglandins in the regulation of food intake in the newborn rat*. Arch Int Pharmacodyn Ther, 1984. **272**(1): p. 140-9.
179. Takadera, T., et al., *Prostaglandin E(2) induces caspase-dependent apoptosis in rat cortical cells*. Neurosci Lett, 2002. **317**(2): p. 61-4.

180. Nadjar, A., et al., *Inactivation of the cerebral NFkappaB pathway inhibits interleukin-1beta-induced sickness behavior and c-Fos expression in various brain nuclei*. Neuropsychopharmacology, 2005. **30**(8): p. 1492-9.
181. Kitagami, T., et al., *Mechanism of systemically injected interferon-alpha impeding monoamine biosynthesis in rats: role of nitric oxide as a signal crossing the blood-brain barrier*. Brain Res, 2003. **978**(1-2): p. 104-14.
182. Schwarcz, R. and R. Pellicciari, *Manipulation of brain kynurenines: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **303**(1): p. 1-10.
183. Capuron, L., et al., *Interferon-alpha-induced changes in tryptophan metabolism. relationship to depression and paroxetine treatment*. Biol Psychiatry, 2003. **54**(9): p. 906-14.
184. O'Connor, J.C., et al., *Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice*. Mol Psychiatry, 2009. **14**(5): p. 511-22.
185. Reichenberg, A., et al., *Cytokine-associated emotional and cognitive disturbances in humans*. Arch Gen Psychiatry, 2001. **58**(5): p. 445-52.
186. Brydon, L., et al., *Peripheral inflammation is associated with altered substantia nigra activity and psychomotor slowing in humans*. Biol Psychiatry, 2008. **63**(11): p. 1022-9.
187. Sutcgil, L., et al., *Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in major depression: effect of sertraline therapy*. Clin Dev Immunol, 2007. **2007**: p. 76396.
188. Dowlati, Y., et al., *A meta-analysis of cytokines in major depression*. Biol Psychiatry, 2010. **67**(5): p. 446-57.
189. Lee, K.S., et al., *Simultaneous measurement of 23 plasma cytokines in late-life depression*. Neurol Sci, 2009. **30**(5): p. 435-8.
190. Bluthe, R.M., et al., *Central injection of IL-10 antagonizes the behavioural effects of lipopolysaccharide in rats*. Psychoneuroendocrinology, 1999. **24**(3): p. 301-11.
191. Bluthe, R.M., K.W. Kelley, and R. Dantzer, *Effects of insulin-like growth factor-I on cytokine-induced sickness behavior in mice*. Brain Behav Immun, 2006. **20**(1): p. 57-63.
192. Dantzer, R., et al., *Central administration of insulin-like growth factor-1 inhibits lipopolysaccharide-induced sickness behavior in mice*. Neuroreport, 1999. **10**(2): p. 289-92.
193. Leon, L.R., et al., *An antipyretic role for interleukin-10 in LPS fever in mice*. Am J Physiol, 1999. **276**(1 Pt 2): p. R81-9.
194. Kenis, G. and M. Maes, *Effects of antidepressants on the production of cytokines*. Int J Neuropsychopharmacol, 2002. **5**(4): p. 401-12.
195. Francis, J., et al., *Acute myocardial infarction induces hypothalamic cytokine synthesis*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **286**(6): p. H2264-71.

196. Zhang, J. and S. Rivest, *Distribution, regulation and colocalization of the genes encoding the EP2- and EP4-PGE2 receptors in the rat brain and neuronal responses to systemic inflammation*. Eur J Neurosci, 1999. **11**(8): p. 2651-68.
197. Kaloustian, S., et al., *Celecoxib after the onset of reperfusion reduces apoptosis in the amygdala*. Apoptosis, 2007. **12**(11): p. 1945-51.
198. Boucher, M., et al., *Reduction of apoptosis in the amygdala by an A2A adenosine receptor agonist following myocardial infarction*. Apoptosis, 2006. **11**(7): p. 1067-74.
199. Gardner, D.G., D.M. Shoback, and F.S. Greenspan, *Greenspan's basic & clinical endocrinology*. 8th ed. Lange medical book. 2007, New York ; Toronto: McGraw-Hill Medical. xiv, 1010.
200. Pariante, C.M. and S.L. Lightman, *The HPA axis in major depression: classical theories and new developments*. Trends Neurosci, 2008. **31**(9): p. 464-8.
201. Bao, A.M., G. Meynen, and D.F. Swaab, *The stress system in depression and neurodegeneration: focus on the human hypothalamus*. Brain Res Rev, 2008. **57**(2): p. 531-53.
202. Herbert, J., et al., *Do corticosteroids damage the brain?* J Neuroendocrinol, 2006. **18**(6): p. 393-411.
203. Sachar, E.J., et al., *Cortisol production in depressive illness. A clinical and biochemical clarification*. Arch Gen Psychiatry, 1970. **23**(4): p. 289-98.
204. Nemeroff, C.B. and W.W. Vale, *The neurobiology of depression: inroads to treatment and new drug discovery*. J Clin Psychiatry, 2005. **66 Suppl 7**: p. 5-13.
205. Sanchez, M.M., C.O. Ladd, and P.M. Plotsky, *Early adverse experience as a developmental risk factor for later psychopathology: evidence from rodent and primate models*. Dev Psychopathol, 2001. **13**(3): p. 419-49.
206. Heim, C. and C.B. Nemeroff, *Neurobiology of early life stress: clinical studies*. Semin Clin Neuropsychiatry, 2002. **7**(2): p. 147-59.
207. Belanoff, J.K., et al., *An open label trial of C-1073 (mifepristone) for psychotic major depression*. Biol Psychiatry, 2002. **52**(5): p. 386-92.
208. Chourbaji, S., M.A. Vogt, and P. Gass, *Mice that under- or overexpress glucocorticoid receptors as models for depression or posttraumatic stress disorder*. Prog Brain Res, 2008. **167**: p. 65-77.
209. Miller, A.H. and C.L. Raison, *Cytokines, p38 MAP kinase and the pathophysiology of depression*. Neuropsychopharmacology, 2006. **31**(10): p. 2089-90.
210. Tombaugh, G.C. and R.M. Sapolsky, *Corticosterone accelerates hypoxia- and cyanide-induced ATP loss in cultured hippocampal astrocytes*. Brain Res, 1992. **588**(1): p. 154-8.
211. Magarinos, A.M., M. Orchinik, and B.S. McEwen, *Morphological changes in the hippocampal CA3 region induced by non-invasive glucocorticoid administration: a paradox*. Brain Res, 1998. **809**(2): p. 314-8.

212. Wong, E.Y. and J. Herbert, *The corticoid environment: a determining factor for neural progenitors' survival in the adult hippocampus*. Eur J Neurosci, 2004. **20**(10): p. 2491-8.
213. Claes, S., *Glucocorticoid receptor polymorphisms in major depression*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1179**: p. 216-28.
214. Raison, C.L., L. Capuron, and A.H. Miller, *Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression*. Trends Immunol, 2006. **27**(1): p. 24-31.
215. Pace, T.W., F. Hu, and A.H. Miller, *Cytokine-effects on glucocorticoid receptor function: relevance to glucocorticoid resistance and the pathophysiology and treatment of major depression*. Brain Behav Immun, 2007. **21**(1): p. 9-19.
216. von Kanel, R., et al., *Stress hormones in patients with posttraumatic stress disorder caused by myocardial infarction and role of comorbid depression*. J Affect Disord, 2010. **121**(1-2): p. 73-9.
217. Fioramonti, J., V. Theodorou, and L. Bueno, *Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology?* Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2003. **17**(5): p. 711-24.
218. Metchnikoff, E., *The prolongation of life : optimistic studies*. 1908, New York: Putnam. xx, 343.
219. Lilly, D.M. and R.H. Stillwell, *Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms*. Science, 1965. **147**: p. 747-8.
220. Fuller, R., *Probiotics in man and animals*. J Appl Bacteriol, 1989. **66**(5): p. 365-78.
221. Beauchamp, R.O., Jr., et al., *A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity*. Crit Rev Toxicol, 1984. **13**(1): p. 25-97.
222. Ng, S.C., et al., *Mechanisms of action of probiotics: recent advances*. Inflamm Bowel Dis, 2009. **15**(2): p. 300-10.
223. *Probiotics- A Clinical Guide*. First ed, ed. M.H. Floch and A.S. Kim. 2010, Thorofare: SLACK Incorporated. 343.
224. Ito, S., *Form and function of the glycocalyx on free cell surfaces*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1974. **268**(891): p. 55-66.
225. Maury, J., et al., *The filamentous brush border glycocalyx, a mucin-like marker of enterocyte hyper-polarization*. Eur J Biochem, 1995. **228**(2): p. 323-31.
226. Van Itallie, C.M. and J.M. Anderson, *The molecular physiology of tight junction pores*. Physiology (Bethesda), 2004. **19**: p. 331-8.
227. Bjarnason, I., A. MacPherson, and D. Hollander, *Intestinal permeability: an overview*. Gastroenterology, 1995. **108**(5): p. 1566-81.
228. Garcia-Lafuente, A., et al., *Modulation of colonic barrier function by the composition of the commensal flora in the rat*. Gut, 2001. **48**(4): p. 503-7.
229. Spitz, J., et al., *The effect of dexamethasone administration on rat intestinal permeability: the role of bacterial adherence*. Gastroenterology, 1994. **106**(1): p. 35-41.

230. Spitz, J., et al., *Enteropathogenic Escherichia coli adherence to intestinal epithelial monolayers diminishes barrier function*. Am J Physiol, 1995. **268**(2 Pt 1): p. G374-9.
231. Moon, H.W., S.C. Whipp, and A.L. Baetz, *Comparative effects of enterotoxins from Escherichia coli and Vibrio cholerae on rabbit and swine small intestine*. Lab Invest, 1971. **25**(2): p. 133-40.
232. Aksoy, N. and O.F. Akinci, *Mucin macromolecules in normal, adenomatous, and carcinomatous colon: evidence for the neotransformation*. Macromol Biosci, 2004. **4**(5): p. 483-96.
233. Deplancke, B. and H.R. Gaskins, *Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer*. Am J Clin Nutr, 2001. **73**(6): p. 1131S-1141S.
234. Salminen, S., et al., *Demonstration of safety of probiotics -- a review*. Int J Food Microbiol, 1998. **44**(1-2): p. 93-106.
235. Byrd, J.C., et al., *Inhibition of gastric mucin synthesis by Helicobacter pylori*. Gastroenterology, 2000. **118**(6): p. 1072-9.
236. Jin, L.Z., R.R. Marquardt, and X. Zhao, *A strain of Enterococcus faecium (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic Escherichia coli K88 to porcine small intestine mucus*. Appl Environ Microbiol, 2000. **66**(10): p. 4200-4.
237. Mack, D.R., et al., *Probiotics inhibit enteropathogenic E. coli adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression*. Am J Physiol, 1999. **276**(4 Pt 1): p. G941-50.
238. Macpherson, A.J., et al., *The immune geography of IgA induction and function*. Mucosal Immunol, 2008. **1**(1): p. 11-22.
239. Shu, Q. and H.S. Gill, *A dietary probiotic (Bifidobacterium lactis HN019) reduces the severity of Escherichia coli O157:H7 infection in mice*. Med Microbiol Immunol, 2001. **189**(3): p. 147-52.
240. Shu, Q. and H.S. Gill, *Immune protection mediated by the probiotic Lactobacillus rhamnosus HN001 (DR20) against Escherichia coli O157:H7 infection in mice*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2002. **34**(1): p. 59-64.
241. Fukushima, Y., et al., *Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children*. Int J Food Microbiol, 1998. **42**(1-2): p. 39-44.
242. Bautista-Garfias, C.R., et al., *Effect of viable or dead Lactobacillus casei organisms administered orally to mice on resistance against Trichinella spiralis infection*. Parasite, 2001. **8**(2 Suppl): p. S226-8.
243. Ruemmele, F.M., et al., *Lipopolysaccharide modulation of normal enterocyte turnover by toll-like receptors is mediated by endogenously produced tumour necrosis factor alpha*. Gut, 2002. **51**(6): p. 842-8.
244. Cario, E., G. Gerken, and D.K. Podolsky, *Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C*. Gastroenterology, 2004. **127**(1): p. 224-38.

245. Cario, E., G. Gerken, and D.K. Podolsky, *Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function*. *Gastroenterology*, 2007. **132**(4): p. 1359-74.
246. Otte, J.M. and D.K. Podolsky, *Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004. **286**(4): p. G613-26.
247. Lee, J., et al., *Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells*. *Nat Cell Biol*, 2006. **8**(12): p. 1327-36.
248. Jijon, H., et al., *DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function*. *Gastroenterology*, 2004. **126**(5): p. 1358-73.
249. Neal, M.D., et al., *Enterocyte TLR4 mediates phagocytosis and translocation of bacteria across the intestinal barrier*. *J Immunol*, 2006. **176**(5): p. 3070-9.
250. Grabig, A., et al., *Escherichia coli strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis via toll-like receptor 2- and toll-like receptor 4-dependent pathways*. *Infect Immun*, 2006. **74**(7): p. 4075-82.
251. Neish, A.S., *Bacterial inhibition of eukaryotic pro-inflammatory pathways*. *Immunol Res*, 2004. **29**(1-3): p. 175-86.
252. Coban, C., et al., *Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin*. *J Exp Med*, 2005. **201**(1): p. 19-25.
253. Petrof, E.O., et al., *Probiotics inhibit nuclear factor-kappaB and induce heat shock proteins in colonic epithelial cells through proteasome inhibition*. *Gastroenterology*, 2004. **127**(5): p. 1474-87.
254. Kelly, D., et al., *Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA*. *Nat Immunol*, 2004. **5**(1): p. 104-12.
255. Hart, A.L., et al., *Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria*. *Gut*, 2004. **53**(11): p. 1602-9.
256. MacFie, J., et al., *Bacterial translocation studied in 927 patients over 13 years*. *Br J Surg*, 2006. **93**(1): p. 87-93.
257. Nieuwenhuijs, V.B., et al., *The role of interdigestive small bowel motility in the regulation of gut microflora, bacterial overgrowth, and bacterial translocation in rats*. *Ann Surg*, 1998. **228**(2): p. 188-93.
258. Deitch, E.A., et al., *Elemental diet and IV-TPN-induced bacterial translocation is associated with loss of intestinal mucosal barrier function against bacteria*. *Ann Surg*, 1995. **221**(3): p. 299-307.
259. Bengmark, S., *Gut microenvironment and immune function*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 1999. **2**(1): p. 83-5.
260. Vanderpool, C., F. Yan, and D.B. Polk, *Mechanisms of probiotic action: Implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases*. *Inflamm Bowel Dis*, 2008. **14**(11): p. 1585-96.
261. Yan, F. and D.B. Polk, *Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(52): p. 50959-65.

262. Wehkamp, J., et al., *NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by Escherichia coli Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium.* Infect Immun, 2004. **72**(10): p. 5750-8.
263. Floch, M.H., et al., *Recommendations for probiotic use--2008.* J Clin Gastroenterol, 2008. **42 Suppl 2**: p. S104-8.
264. Ruseler-van Embden, J.G., W.R. Schouten, and L.M. van Lieshout, *Pouchitis: result of microbial imbalance?* Gut, 1994. **35**(5): p. 658-64.
265. Lammers, K.M., et al., *Probiotic therapy in the prevention of pouchitis onset: decreased interleukin-1beta, interleukin-8, and interferon-gamma gene expression.* Inflamm Bowel Dis, 2005. **11**(5): p. 447-54.
266. Laake, K.O., et al., *Outcome of four weeks' intervention with probiotics on symptoms and endoscopic appearance after surgical reconstruction with a J-configured ileal-pouch-anal-anastomosis in ulcerative colitis.* Scand J Gastroenterol, 2005. **40**(1): p. 43-51.
267. Kuzela, L., M. Kascak, and A. Vavrecka, *Induction and maintenance of remission with nonpathogenic Escherichia coli in patients with pouchitis.* Am J Gastroenterol, 2001. **96**(11): p. 3218-9.
268. Gionchetti, P., et al., *High-dose probiotics for the treatment of active pouchitis.* Dis Colon Rectum, 2007. **50**(12): p. 2075-82; discussion 2082-4.
269. Monnikes, H., et al., *Role of stress in functional gastrointestinal disorders. Evidence for stress-induced alterations in gastrointestinal motility and sensitivity.* Dig Dis, 2001. **19**(3): p. 201-11.
270. Roth, B. and D. Robbins, *Mindfulness-based stress reduction and health-related quality of life: findings from a bilingual inner-city patient population.* Psychosom Med, 2004. **66**(1): p. 113-23.
271. Mayer, E.A., *The neurobiology of stress and gastrointestinal disease.* Gut, 2000. **47**(6): p. 861-9.
272. Valori, R.M., D. Kumar, and D.L. Wingate, *Effects of different types of stress and of "prokinetic" drugs on the control of the fasting motor complex in humans.* Gastroenterology, 1986. **90**(6): p. 1890-900.
273. Narducci, F., et al., *Increased colonic motility during exposure to a stressful situation.* Dig Dis Sci, 1985. **30**(1): p. 40-4.
274. Mertz, H., *Role of the brain and sensory pathways in gastrointestinal sensory disorders in humans.* Gut, 2002. **51 Suppl 1**: p. i29-33.
275. Creed, F., et al., *Health-related quality of life and health care costs in severe, refractory irritable bowel syndrome.* Ann Intern Med, 2001. **134**(9 Pt 2): p. 860-8.
276. Jiang, T. and D.A. Savaiano, *Modification of colonic fermentation by bifidobacteria and pH in vitro. Impact on lactose metabolism, short-chain fatty acid, and lactate production.* Dig Dis Sci, 1997. **42**(11): p. 2370-7.
277. Ouwehand, A.C., et al., *Effect of probiotics on constipation, fecal azoreductase activity and fecal mucin content in the elderly.* Ann Nutr Metab, 2002. **46**(3-4): p. 159-62.

278. Sullivan, A. and C.E. Nord, *Probiotics and gastrointestinal diseases*. J Intern Med, 2005. **257**(1): p. 78-92.
279. Goossens, D., et al., *Probiotics in gastroenterology: indications and future perspectives*. Scand J Gastroenterol Suppl, 2003(239): p. 15-23.
280. Verdu, E.F., et al., *Specific probiotic therapy attenuates antibiotic induced visceral hypersensitivity in mice*. Gut, 2006. **55**(2): p. 182-90.
281. Bradesi, S., et al., *Acute and chronic stress differently affect visceral sensitivity to rectal distension in female rats*. Neurogastroenterol Motil, 2002. **14**(1): p. 75-82.
282. Suzuki, K., et al., *Effects of crowding and heat stress on intestinal flora, body weight gain, and feed efficiency of growing rats and chicks*. Nippon Juigaku Zasshi, 1983. **45**(3): p. 331-8.
283. Ait-Belgnaoui, A., et al., *Lactobacillus farciminis treatment suppresses stress induced visceral hypersensitivity: a possible action through interaction with epithelial cell cytoskeleton contraction*. Gut, 2006. **55**(8): p. 1090-4.
284. Kamiya, T., et al., *Inhibitory effects of Lactobacillus reuteri on visceral pain induced by colorectal distension in Sprague-Dawley rats*. Gut, 2006. **55**(2): p. 191-6.
285. Lizko, N.N., *Stress and intestinal microflora*. Nahrung, 1987. **31**(5-6): p. 443-7.
286. Diop, L., S. Guillou, and H. Durand, *Probiotic food supplement reduces stress-induced gastrointestinal symptoms in volunteers: a double-blind, placebo-controlled, randomized trial*. Nutr Res, 2008. **28**(1): p. 1-5.
287. Mawdsley, J.E. and D.S. Rampton, *Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications*. Gut, 2005. **54**(10): p. 1481-91.
288. Dinan, T.G., et al., *Hypothalamic-pituitary-gut axis dysregulation in irritable bowel syndrome: plasma cytokines as a potential biomarker?* Gastroenterology, 2006. **130**(2): p. 304-11.
289. Lorea Baroja, M., et al., *Anti-inflammatory effects of probiotic yogurt in inflammatory bowel disease patients*. Clin Exp Immunol, 2007. **149**(3): p. 470-9.
290. Kaloustian, S., et al., *Tumor necrosis factor-alpha participates in apoptosis in the limbic system after myocardial infarction*. Apoptosis, 2009. **14**(11): p. 1308-1316.
291. Francis, J., et al., *Acute myocardial infarction induces hypothalamic cytokine synthesis*. Am. J. Physiol., 2004. **286**: p. H2264-H2271.
292. Koo, J.W. and R.S. Duman, *Evidence for IL-1 receptor blockade as a therapeutic strategy for the treatment of depression*. Curr Opin Investig Drugs, 2009. **10**(7): p. 664-71.
293. Girard, S.A., et al., *Lactobacillus helveticus and Bifidobacterium longum taken in combination reduce the apoptosis propensity in the limbic system after myocardial infarction in a rat model*. Br J Nutr, 2009: p. 1-6.
294. Wann, B.P., et al., *Permeability in the limbic system following myocardial infarction in the rat*. Society for Neuroscience 34th Annual meeting, 2004: p. #568.4.

295. Donato, K.A., et al., *Lactobacillus rhamnosus GG attenuates interferon- γ and tumor necrosis factor- α -induced barrier dysfunction and pro-inflammatory signalling*. Microbiology, 2010. **156**: p. 3288-97.
296. Lammers, K.M., 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. **38**(2): p. 165-72.
297. Eun, C.S., et al., *Lactobacillus casei prevents impaired barrier function in intestinal epithelial cells*. APMIS, 2011. **119**(1): p. 49-56.
298. Fields, A., *Discovering statistics using SPSS*. Third ed. 2009, London: SAGE Publications Ltd. 822.
299. Dantzer, R., *Cytokine-induced sickness behavior: Where do we stand?* Brain, Behavior and immunity, 2001. **15**: p. 7-24.
300. Kent, S., et al., *Sickness behavior as a new target for drug development*. Trends in Pharmacological Sciences, 1992. **13**: p. 24-28.
301. Besedovsky, H.O., et al., *Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones*. Science, 1986. **233**: p. 652-654.
302. Castanon, N., et al., *Effects of antidepressants on cytokine production and actions*. Brain, Behavior, and Immunity, 2002. **16**: p. 569-574.
303. Gareau, M.G., et al., *Bacterial infection causes stress-induced memory dysfunction in mice*. Gut, 2011. **60**(3): p. 307-17.
304. Cario, E., *Barrier-protective function of intestinal epithelial Toll-like receptor 2*. Mucosal Immunol, 2008. **1 Suppl 1**: p. S62-6.
305. Sandek, A., et al., *Altered intestinal function in patients with chronic heart failure*. J Am Coll Cardiol, 2007. **50**(16): p. 1561-9.
306. Yirmiya, R., et al., *Illness, Cytokines, and depression*. Ann. NY Acad. Sci USA, 2000. **917**: p. 478-487.
307. Bruewer, M., et al., *Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms*. J Immunol, 2003. **171**(11): p. 6164-72.
308. Karczewski, J., et al., *Regulation of human epithelial tight junction proteins by Lactobacillus plantarum in vivo and protective effects on the epithelial barrier*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010. **298**(6): p. G851-9.
309. Morris, R., *Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat*. J. Neuroscience Methods, 1984. **11**: p. 47-60.
310. Sheline, Y.I., M.H. Gado, and J.L. Price, *Amygdala core nuclei volumes are decreased in recurrent major depression*. Neuroreport, 1998. **9**(9): p. 2023-8.
311. Desbonnet, L., et al., *The probiotic Bifidobacteria infantis: An assessment of potential antidepressant properties in the rat*. J Psychiatr Res, 2008. **43**(2): p. 164-74.
312. Soderholm, J.D. and M.H. Perdue, *Stress and gastrointestinal tract. II. Stress and intestinal barrier function*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **280**(1): p. G7-G13.

313. Eutamene, H. and L. Bueno, *Role of probiotics in correcting abnormalities of colonic flora induced by stress*. Gut, 2007. **56**(11): p. 1495-7.
314. Dantzer, R., *Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand?* Brain Behav Immun, 2001. **15**(1): p. 7-24.
315. Kent, S., et al., *Sickness behavior as a new target for drug development*. Trends Pharmacol Sci, 1992. **13**(1): p. 24-8.
316. Besedovsky, H., et al., *Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones*. Science, 1986. **233**(4764): p. 652-4.
317. Maes, M., M. Kubera, and J.C. Leunis, *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. **29**(1): p. 117-24.
318. Deten, A. and H.G. Zimmer, *Heart function and cytokine expression is similar in mice and rats after myocardial infarction but differences occur in TNFalpha expression*. Pflugers Arch, 2002. **445**(2): p. 289-96.
319. Prabhu, S.D., et al., *beta-adrenergic blockade in developing heart failure: effects on myocardial inflammatory cytokines, nitric oxide, and remodeling*. Circulation, 2000. **101**(17): p. 2103-9.
320. Rivest, S., *How circulating cytokines trigger the neural circuits that control the hypothalamic-pituitary-adrenal axis*. Psychoneuroendocrinology, 2001. **26**(8): p. 761-88.
321. Gareau, M.G., M.A. Silva, and M.H. Perdue, *Pathophysiological mechanisms of stress-induced intestinal damage*. Curr Mol Med, 2008. **8**(4): p. 274-81.
322. Maes, M., et al., *Autoimmunity in depression: increased antiphospholipid autoantibodies*. Acta Psychiatr Scand, 1993. **87**(3): p. 160-6.
323. Donato, K.A., et al., *Lactobacillus rhamnosus GG attenuates interferon- γ and tumour necrosis factor-alpha-induced barrier dysfunction and pro-inflammatory signalling*. Microbiology, 2010. **156**(Pt 11): p. 3288-97.
324. Cario, E., *Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2*. Gut, 2005. **54**(8): p. 1182-93.
325. Cario, E., et al., *Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors*. J Immunol, 2000. **164**(2): p. 966-72.
326. Sherman, P.M., *Probiotics and lactose maldigestion*. Can J Gastroenterol, 2004. **18**(2): p. 81-2.
327. Gareau, M.G., et al., *Probiotic treatment of rat pups normalises corticosterone release and ameliorates colonic dysfunction induced by maternal separation*. Gut, 2007. **56**(11): p. 1522-8.
328. Morris, R., *Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat*. J Neurosci Methods, 1984. **11**(1): p. 47-60.

