

Université de Montréal

**Atténuation de la dépression post-infarctus par une diète
riche en oméga-3 ou par la prise de probiotiques**

par

Kim Gilbert

Département de pharmacologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Sciences
en Pharmacologie
option cardiovasculaire

Juin, 2011

© Kim Gilbert, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Atténuation de la dépression post-infarctus par une diète riche en oméga-3 ou par la prise
de probiotiques

Présenté par :

Kim Gilbert

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Christian Beauséjour, président-rapporteur

Guy Rousseau, directeur de recherche

Jolanta Gutkowska, membre du jury

Résumé

L'Infarctus du myocarde (IM) provoque, chez le rat, une augmentation de l'apoptose dans le système limbique en plus d'induire des symptômes qui s'apparentent à la dépression chez l'humain. Nous avons démontré qu'une diète élevée en oméga-3 ou la prise de probiotiques pouvaient être efficaces pour réduire ces effets si ces interventions débutaient avant l'induction de l'ischémie myocardique. Cette étude a pour objectif de déterminer l'efficacité de ces interventions si elles débutent après l'ischémie myocardique.

L'IM a été induit chez le rat mâle Sprague-Dawley par l'occlusion de l'artère coronaire descendante antérieure gauche pendant 40 minutes. À la suite de l'ischémie, les rats ont reçu des probiotiques (1 billion de bactéries vivantes de *L. helveticus* R0052 et de *B. longum* R0175) ou un véhicule dans leur eau de boisson en présence d'une diète élevée ou faible en oméga-3. À 3 jours post-IM, l'activité enzymatique de la caspase-3 et le nombre de cellules d'UTP nick-end labelling (TUNEL) positives sont diminués dans les régions CA1 et le corps godronné de l'hippocampe ainsi que dans l'amygdale en présence de la diète élevée en oméga-3. La prise de probiotiques atténue également l'activité de la caspase-3 et le nombre de cellules TUNEL positives dans le corps godronné et l'amygdale médiane. À 2 semaines post-IM, le comportement dépressif évalué par 3 tests comportementaux (test d'interaction sociale, test de nage forcée et test d'évitement passif) a été observé chez le groupe recevant la diète faible en oméga-3 sans probiotiques et le comportement dépressif a été atténué avec la diète élevée en oméga-3 et/ou la prise de probiotiques. Les probiotiques ont augmenté les niveaux plasmatiques d'interleukine-4 (IL-4) tandis que la diète élevée en oméga-3 a montré une diminution de la protéine chimiotactique monocyttaire 1 (MCP-1).

Ces résultats indiquent qu'une diète élevée en oméga-3 ou la prise de probiotiques, débutant à la suite de l'IM, s'avèrent bénéfiques pour atténuer la dépression et l'apoptose dans le système limbique.

Mots-clés : Oméga-3, probiotiques, infarctus du myocarde, dépression, apoptose, cytokines

Abstract

Proinflammatory cytokines play a central role in depressive-like behavior and apoptosis in the limbic system after myocardial infarction (MI). Polyunsaturated fatty acids (PUFA) omega-3 diet or the combination of *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 probiotics, when given before ischemic period, reduce circulating proinflammatory cytokines as well as apoptosis in the limbic system. This study was designed to determine if the same nutritional interventions maintain their beneficial effects when started after the onset of the reperfusion period and attenuate depressive-like behavior.

MI was induced by the occlusion of the left anterior descending coronary artery for 40 minutes in rats. After the onset of reperfusion, animals were fed with a high or low PUFA omega-3 diet, combined or not with 1 billion live bacteria of *L. helveticus* R0052 and *B. longum* R0175. At 3 days post-MI, caspase-3 enzymatic activities and terminal dUTP nick-end labelling (TUNEL)-positive cells were decreased in the CA1, dentate gyrus and amygdala with the high PUFA omega-3 diet as compared to the other diet. Probiotics attenuated caspase-3 activity and TUNEL-positive cells in the dentate gyrus and the medial amygdala. At 2 weeks post-MI, depressive-like behaviour, evaluated by 3 behavioural tests (social interaction, passive avoidance and forced swim test), was observed in the low PUFA omega-3 diet without probiotics and this behavior was attenuated with the high PUFA omega-3 diet or/and probiotics. Probiotics increased interleukin-4 plasmatic concentrations while high PUFA omega-3 diet decreased monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1). These results indicate that a high PUFA omega-3 diet or the administration of probiotics, starting

after the onset of reperfusion, are beneficial to attenuate post-MI depression and apoptosis in the limbic system.

Keywords : Omega-3, probiotics, myocardial infarction, depression, apoptosis, cytokines

Table des matières

Chapitre 1. Infarctus du myocarde.....	1
1.1 Ischémie.....	1
1.2 Reperfusion.....	5
1.2.1 Lésions de reperfusion.....	5
1.3 Cardioprotection.....	15
1.3.1 Voie Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)	15
1.3.2 Voie « Survivor Activating Factor Enhancement » (SAFE)	17
Chapitre 2 : Dépression post-infarctus.....	19
2.1 Étiologie de la dépression.....	19
2.2 Dépression post-infarctus	23
2.2.1 Cytokine-dépendante	23
2.2.2 Axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien dépendante.....	30
Chapitre 3 : Acide Gras Polyinsaturé Oméga-3	34
3.1 Structure et nomenclature.....	34
3.2 Métabolisme des oméga-3 et oméga-6.....	36
3.2.1 Voie des prostaglandines	38
3.2.2 Voie des leucotriènes.....	41
3.3 Ratio oméga3/oméga6.....	44
3.4 Propriétés des Oméga 3 et Oméga-6.....	45
3.4.1 Maladies Cardiovasculaires	47
3.4.2 Dysfonctionnement cérébral	51
Chapitre 4 : Les probiotiques	55
4.1 Probiotiques et physiologie intestinale.....	56
4.1.1 Barrière intestinale.....	56
4.2 Probiotiques et stress.....	60
4.3 Probiotiques et oméga-3	62
Chapitre 5 : Hypothèses	64

Chapitre 6: Article	65
Chapitre 7 : Discussion	90

Liste des tableaux

Table I. Composition in polyunsaturated fatty acids of the different diets used (g/Kg).....	93
Table II. Percent of TUNEL-positive cells on total cell count in different limbic regions analyzed at 72 h after reperfusion.....	94

Liste des figures

Figure 1. Activation des voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.....	14
Figure 2. Structure et nomenclature des AG alpha-linolénique (ALA) et linoléique (LA) .	36
Figure 3. Synthèse des prostaglandines à partir des AG essentiels ω -3 (voie en bleu) et ω -6 (voie en rouge).....	41
Figures de la publication:	
Figure 4. TTC strains are shown	88
Figure 5A. Infarct size, assigned by necrosis area (I) expressed as a percentage of the area at risk (AR) is similar between groups high omega-3 PUFA diet with vehicle, high omega-3 PUFA diet with probiotics, low omega-3 PUFA diet with vehicle and low omega-3 PUFA diet with probiotics. There is also no difference in AR, expressed as a percentage of the left ventricle (LV) between groups at 72 h of reperfusion. B: After 18 days of reperfusion, there is no difference among the groups in infarct size-area at risk ratio (I/AR) neither in area at risk on left ventricle (AR/LV).	88
Figure 6. Caspase-3 activity, expressed as a percent of the high omega-3 PUFA diet + vehicle, in different limbic regions assessed by <i>in vitro</i> spectrofluorescence after 72 h of reperfusion.....	89
Figure 7. Results of social interaction test proceed on the 12 th day of reperfusion in seconds	89
Figure 8. Results of the forced swim test proceed on the 16 th day of reperfusion	90
Figure 9. Results of the passive avoidance test proceed on the 17 th day of reperfusion. A. Time to succeed in seconds B. Number of trials	91
Figure 10. Plasma concentrations of IL-4 and MCP-1.	92

Abréviations

AA= acide arachidonique
ACTH= corticotrophine
AG=acide gras
ALA= acide alpha-linolénique
AMPA= α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate
APAF = *Apoptotic peptidase activating factor*
AR= area at risk
ATP= adénosine triphosphate
BDNF= *brain derived neurotrophic factor*
BH₄= tétrahydrobiopterine
BHE= barrière hémato-encéphalique
CA1= Cornu Ammonis area 1
COX= cyclooxygénase
CRH= corticolibérine
DD= *death domain*
DHA= acide docosahexaénoïque
DISC= *death-inducing signaling complex*
DR= *death receptor*
eNOS= synthase de l'oxyde nitrique endothéliale
EPA= acide eicosapentaénoïque
GABA= acide gamma-aminobutyrique
GC= glucocorticoïde
GR= récepteur des glucocorticoïdes
HPA= Axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien
I= infarct size
IAF= facteur qui induit l'apoptose
IAP= protéines inhibitrices d'apoptose
IDO= indoleamine 2,3 dioxygénase
IFN= interféron
I κ B= kinase de NF- κ B
IL= interleukine
IM = infarctus du myocarde
JAK= janus kinase
KO=*knock out*
LA= acide linoléique
LOX= lipoxygénase
LPS= lipopolysaccharide
LT= leucotriène
LV= left ventricule
MAPK= *mitogen-activated protein kinase*

mPTP = pore de transition de perméabilité mitochondriale
MR= récepteur minéralocorticoïde
NERI= inhibiteurs sélectifs pour la recapture de la norépinéphrine
NF- κ B = *nuclear factor kappa-B*
NMDA= N-méthyl-D-aspartate
NO= oxyde nitrique
NOD= *nucleotide-binding oligomerization domains*
P70s6k : protéine ribosomale kinase S6 de 70 kDa
PI3K= phosphoinositide 3-kinase
PG= prostaglandine
PK= protéine kinase
PPAR= *peroxisome proliferator-activated receptors*
ROS= espèce réactive d'oxygène
TLR= *toll-like receptor*
TNF= facteur de nécrose tumorale
TNFR = récepteur du facteur de nécrose tumorale
TUNEL= terminal dUTP nick-end labelling
TX= thromboxane
RCPG= récepteur couplé aux protéines G
RISK= *Reperfusion Injury Kinase Signalling*
Rv= résolvines
RXR= *retinoid X receptor*
SAFE= *Survivor Activating Factor Enhancement*
SNRI= inhibiteur de la recapture de la norépinéphrine et de la sérotonine
SSRI= inhibiteurs sélectifs pour la recapture de la sérotonine
STAT= *Signal transducer and activator of transcription*
VLDL= *very low density lipoprotein*
 ω -3= oméga-3
 ω -6= oméga-6

*À mes parents qui m'ont encouragée,
à mes professeurs qui m'ont formée,
à mon amour qui m'a supportée*

Remerciements

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de recherche Guy Rousseau pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Cette expérience enrichissante en recherche m'a permis de me découvrir un intérêt grandissant pour ce domaine. Un merci particulier pour la formation scientifique qui m'a été offerte, et qui ne fait que débiter. Merci aussi de me permettre d'échanger et d'élargir mes connaissances scientifiques dans différents congrès et réunions scientifiques.

Un remerciement va également aux étudiantes Isabelle Rondeau et Jessica Arsenault- Bréard qui m'ont appris les différentes techniques utilisées dans mon projet de recherche. Merci pour vos conseils, vos trucs et pour votre temps.

Je tiens également à mentionner l'aide des mes stagiaires, Cynthia Béchar, Fabio Flores Monaco et Alexanne Beaudoin qui ont grandement aidé dans l'accomplissement de ce projet. Puis, Caroline Bouchard et Louis Chiochio du service de l'animalerie du Centre de recherche de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, merci pour votre soutien, vos réponses et votre aide.

Je veux aussi mentionner l'aide financière obtenue du centre de recherche de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal par la bourse J.A. de Sève.

Pour terminer, merci à mon entourage pour la patience et pour votre encouragement depuis le début dans ce parcours scolaire.

Introduction

Chapitre 1. Infarctus du myocarde

On estime le nombre d'infarctus du myocarde (IM) à 70 000 par année au Canada, ce qui correspond à un événement toutes les sept minutes [1]. L'IM survient lorsqu'une ou plusieurs artères coronaires se bouchent. L'ischémie (*iskhaimos* : qui arrête le sang) produite par cette occlusion prive les cardiomyocytes d'oxygène et de nutriments, ce qui nuit à leur fonctionnement. Le terme IM reflète donc la mort cellulaire des cardiomyocytes causée par l'ischémie. Cette dernière entraîne un déséquilibre dans la perfusion, générant ainsi une hypoxie. Les cellules normalement irriguées par l'artère occluse subissent alors des lésions, conduisant possiblement à leur mort en quelques heures. Puis, les fibroblastes s'activent pour former du tissu fibreux non contractile en remplacement des cellules mortes ce qui altère la contractilité du muscle cardiaque. Selon l'étendue de l'obstruction et de la région atteinte, les dégâts seront plus ou moins importants, mais pourraient tout de même perturber le système de conduction du cœur et causer la mort via le déclenchement d'une fibrillation ventriculaire. Toutefois, le muscle cardiaque peut fonctionner au repos avec un apport de seulement de 10 à 15% de l'irrigation sanguine normale. L'ischémie est généralement identifiée par l'historique médical du patient ou à partir du tracé de l'électrocardiogramme. L'obstruction de l'artère coronaire est généralement due à l'occlusion d'une artère par un thrombus ou par la rupture d'une plaque athéromateuse. L'occlusion peut être levée par l'injection d'agents thrombolytiques, par l'angioplastie percutanée ou à l'aide d'un pontage aortocoronarien [2, 3].

1.1 Ischémie

L'ischémie myocardique se présente lorsque le flux artériel ne peut amener assez d'oxygène pour combler la demande du tissu afin qu'il maintienne sa fonction. Le

myocarde ischémique passe donc d'un métabolisme aérobie à un métabolisme anaérobie. Les conséquences qui en résulteront seront dues à l'hypoxie et au manque de substrats générés par l'ischémie, mais aussi à une accumulation des métabolites ischémiques [3].

L'ischémie peut se produire selon différents grades de sévérité dépendamment du degré de l'occlusion (de faible à complet), du territoire nourri par l'occlusion et de la présence ou non d'anastomose (vaisseaux collatéraux qui nourrissent une même région). Il y a une relation visible entre le site d'occlusion et l'étendue de la nécrose observée; la zone à risque (région nourrie par l'artère occluse) semble donc être un facteur prédominant dans la taille de l'infarctus [4]. Il y a aussi une relation linéaire entre la taille de l'infarctus et la durée de l'ischémie, du moins durant les trois premières heures de l'ischémie. Plus celle-ci est longue, plus les dommages sont élevés et le risque d'avoir des lésions irréversibles est accru [5]. La présence d'une circulation collatérale, se caractérisant par un apport sanguin provenant d'anastomoses entre les vaisseaux irriguant la zone à risque, est aussi un facteur important. Les patients ayant un réseau de vaisseaux collatéraux développé montrent une diminution de signes ischémiques et de la mortalité à la suite d'un épisode d'ischémie myocardique. L'adulte sain, le cochon, le rat et le lapin ne présentent pas de vaisseaux collatéraux au niveau du cœur contrairement au chien, au chat et au patient possédant des antécédents de maladies coronariennes [6].

Lors d'une ischémie prolongée, plus de 20 minutes, la région sous-endocardique sera la première à présenter de la mort cellulaire. La mort cellulaire progressera, avec la durée de l'ischémie, vers les régions sous-épicardiques (atteinte transmurale). Il s'agit du « wavefront phenomen », décrit depuis plusieurs décennies par des résultats obtenus dans le modèle canin [5] ou par le patient avec maladie coronarienne [6], tous deux ayant un système de collatérales bien développé, soit de façon native pour le chien ou pathologique

pour l'humain. Dans ce cas, la région sous-endocardique est plus vulnérable à l'ischémie que la région épicaudique.

En condition normale aérobie, le cœur soutire de 60 à 80% de son énergie via l'oxydation des acides gras (AG). Les 20 à 40% restants sont acquis par la glycolyse à partir du glucose. À la suite de quelques secondes d'ischémie (huit à dix secondes), la présence d'oxygène se fait rare. Le métabolisme énergétique passe donc de la glycolyse aérobie à la glycolyse anaérobie. La contraction des cardiomyocytes hypoxiques est altérée, le potentiel membranaire diminue et des changements sur l'électrocardiogramme surgissent, dont un sus/sous-décalage du segmente ST [3].

La glycolyse anaérobie prend alors le dessus (15-20 secondes d'ischémie). De 80 à 90% de l'énergie est fournie par celle-ci, bien que son efficacité soit moindre que le métabolisme aérobie. Le flot artériel n'amenant pas de glucose en quantité suffisante, les granules de glycogène sont utilisées. Celles-ci sont brisées en glucose-1-phosphate par l'action de phosphorylases, et lorsque converti en lactate, ceci génère deux molécules d'adénosine triphosphate (ATP) par molécule de glucose, ce qui est nettement insuffisant pour assurer la fonction cardiaque [7]. À ce niveau, l'ATP permet la survie via l'alimentation des pompes membranaires pour entretenir les gradients de sodium, de potassium et de calcium à travers la membrane. Ensuite, une déplétion en créatine phosphate survient, car la demande devient plus grande que les réserves disponibles. Celles-ci sont épuisées à trois minutes d'ischémie. Jusqu'à environ 15 à 20 minutes d'ischémie, les dommages sont réversibles; le retour du flot sanguin permet aux cardiomyocytes de retrouver leur fonction, notamment grâce aux 35% d'ATP restant encore à ce niveau d'ischémie [3].

Autour de 20 minutes d'ischémie, des dommages irréversibles, c'est-à-dire la mort des cardiomyocytes par nécrose, commencent à apparaître. Le front de mort cellulaire s'étendra de la région sous-endocardique vers la région sous-épicardique chez le chien avec circulation collatérale. À 30 minutes, une légère dilatation du réticulum sarcoplasmique et des disques intercalaires s'observe [5, 6].

Les étapes conduisant à la mort des cardiomyocytes se succèdent. La concentration en électrolytes des cellules est altérée. Le potassium et le magnésium quitteront la cellule pour laisser entrer le sodium, le calcium, le chlore et l'eau. Ces derniers s'accumuleront dans la cellule en raison, entre autre, de l'affaiblissement de l'activité de la pompe sodium/potassium ATPase, ce qui favorise l'entrée d'ions calciques par l'échangeur sodique/calcique. Par la suite, le glycogène diminuera, et, à l'inverse, les concentrations de lactate, de phosphate inorganique et de créatine vont augmenter. Il en résultera une augmentation de la charge osmotique, un œdème cellulaire ainsi qu'un pH abaissé. Il y aura aussi agrégation de la chromatine, accentuation de l'œdème mitochondriale, rupture des bandes Z et des myofibrilles, diminution de la quantité de lysosomes, apparition de densités amorphes dans la matrice mitochondriale et rupture des unités trilaminaires de la membrane. La dégradation de l'ATP fera en sorte d'augmenter la concentration de xanthine, ce qui génère des radicaux libres, et causera la peroxydation lipidique des membranes et des AG [8].

À 40 minutes d'ischémie, il ne reste que 10% de la quantité initiale d'ATP. Cinquante pour cent des cellules seront, à ce niveau, atteintes de manière irréversible. À une heure d'ischémie, il y aura œdème mitochondriale prononcée, diminution de la densité de la matrice, désorganisation des crêtes, agglutination de la chromatine et les granules de glycogène auront complètement disparues des cellules cardiaques. En plus de la mort cellulaire, il y aura infiltration de cellules polymorphonucléaires et des lésions cicatricielles

apparaîtront plus tardivement. La déplétion en ATP pourrait être à l'origine des lésions irréversibles, tout comme l'accumulation de lactate et toutes les conséquences qui y sont associées [8, 9].

1.2 Reperfusion

Afin de réduire l'impact de l'ischémie, la reperfusion du tissu myocardique doit se faire le plus rapidement possible. Pour rétablir le fonctionnement des cellules encore atteintes de façon réversible et ainsi diminuer la taille d'un infarctus, le retour du flot sanguin est essentiel. Tel que mentionné précédemment, à la suite de 20 minutes d'ischémie, les lésions irréversibles commencent à apparaître et ne peuvent pas être sauvées par la reperfusion. L'efficacité de la reperfusion dépendra donc de la durée de l'ischémie.

Toutefois, le retour du flot sanguin peut entraîner des lésions appelées lésions de reperfusion. Le rétablissement de la circulation vient léser le myocarde à la suite d'une période ischémique et peut même conduire à la mort cellulaire des cardiomyocytes qui étaient vivants avant la reperfusion. Ainsi, en ne contrôlant pas les lésions de reperfusion, nous atténuons l'efficacité de cette dernière à stopper les dommages irréversibles [10].

1.2.1 Lésions de reperfusion

La reperfusion est le traitement le plus efficace pour réduire les dommages ischémiques, mais les effets bénéfiques engendrés par le rétablissement de la circulation sanguine sont contrebalancés, du moins en partie, par les lésions de reperfusion. Plusieurs observations ont montré que des phénomènes présents durant la reperfusion étaient à l'origine de la mort des cardiomyocytes qui étaient encore viables auparavant. Effectivement, les lésions de reperfusion seraient responsables probablement de 40 à 50% de la taille d'un infarctus [11].

Jennings et coll. ont été l'un des premiers groupes à rapporter les changements des cardiomyocytes reperfusés à la suite d'une ischémie chez le chien. Ils ont décrit un gonflement cellulaire, la contraction des myofibrilles, une rupture du sarcolemme, des granules intramitochondriales de phosphate et de calcium, la perte des mitochondries, une libération d'enzymes cytoplasmiques et la nécrose en bandes de contraction [12].

La première hypothèse pouvant expliquer les lésions dues à la reperfusion implique l'oxygène. La reperfusion du myocarde ischémique génère un stress oxydatif. Il y a une augmentation importante de radicaux libres sous forme d'espèces réactives d'oxygène (ROS), dont l'anion superoxyde O_2^- , le radical hydroxyl OH^- et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Les deux premiers ont un électron non-pairé qui rend la molécule instable et très réactive. De plus, l'expression des enzymes anti-oxydantes semble diminuer en période d'ischémie. Donc, le stress oxydatif généré par une augmentation des radicaux libres et une diminution de l'activité anti-oxydante semblerait jouer un rôle dans la mort des cardiomyocytes conduisant à une dysfonction cardiaque. Le stress oxydatif conduit entre autres à la peroxydation lipidique et aux bris des membranes [13]. Cette hypothèse est toutefois contredite : certains admettent que l'administration de la superoxyde dismutase lors de la reperfusion diminue les lésions [14], tandis que d'autres n'y ont pas vu d'effets [15]. Le stress oxydatif à lui seul n'explique pas tout le phénomène des lésions de reperfusion, d'autres mécanismes sont aussi probables.

La seconde hypothèse implique le calcium. Lors de la reperfusion, il y a une augmentation intracellulaire brutale de celui-ci [11]. Cet excès de calcium cause une contraction soutenue qui peut être à l'origine de la mort des cardiomyocytes. Afin de restaurer le pH durant la période de reperfusion, il y a activation de l'échangeur sodium-hydrogène afin d'éliminer les ions hydrogène et de l'échangeur sodium-calcium pour rétablir les concentrations de sodium, ce qui génère une augmentation de la concentration

de calcium dans la cellule. De plus, durant les premières minutes de reperfusion, le calcium, en combinaison avec les ROS, peut induire l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) localisé dans la membrane interne, ce qui abolit la chaîne respiratoire et induit l'affaiblissement de la membrane mitochondriale [13]. Un antagoniste du calcium [16] ou encore un extrait de thé vert [17], administré au moment de la reperfusion, diminuent l'excès de calcium ainsi que la contraction excessive des myofibrilles et réduisent les lésions de reperfusion.

1.2.1.1 Inflammation

Il est clairement établi que la reperfusion est associée à une augmentation de l'inflammation dans le myocarde, contribuant aux lésions de reperfusion [13].

La relâche de constituants membranaires lors des lésions apparentes au moment de l'ischémie et de la période de reperfusion active le système du complément par la voie classique. L'expression de l'ARNm et des protéines composantes de la voie du complément sont augmentées à la suite d'un IM. Le système du complément comporte principalement neuf protéines (C1 à C9) et peut s'activer par trois différentes voies : classique, alternative ou lectine. La protéine C réactive semblerait être impliquée dans l'activation de la voie classique lors de la reperfusion. Les précurseurs zymogènes des protéines du complément circulent sous forme inactive, et sont activés localement. Dans ce cas-ci, ils le sont par les débris cellulaires qui lient le C1q pour ensuite activer C1, puis C4, C2 et C3. Finalement, les effecteurs C5 à C9 seront à leur tour activés et permettront le recrutement de cellules inflammatoires, essentiellement les neutrophiles [18]. Cibler les composants du complément lors de l'IM semblerait cardioprotecteur et pourrait réduire les lésions de reperfusion : l'infusion d'un récepteur soluble du complément a diminué de façon significative la taille d'un infarctus dans un modèle d'ischémie-reperfusion [19].

Les ROS et l'activation du complément activent NF- κ B (*nuclear factor kappa B*), un facteur de transcription nucléaire impliqué dans la réponse inflammatoire, l'adhésion cellulaire, le contrôle de la réplication, la survie cellulaire et l'apoptose. NF- κ B se trouve sous sa forme inactive au niveau du cytoplasme lié à des régulateurs I κ B dont I κ B α et I κ B β . Lorsque les régulateurs sont phosphorylés par les I κ B kinase (I κ K), ils sont dégradés et permettent la translocation de NF- κ B au noyau qui vient se lier sur différents promoteurs pour engendrer la transcription de gènes cibles [20]. Un traitement avec un inhibiteur de I κ K β a montré une atténuation de la phosphorylation de I κ B α ainsi qu'une réduction de cytokines pro-inflammatoires et de la taille de l'infarctus [21]. Toutefois, des souris transgéniques exprimant un mutant de I κ B α prévenant la translocation nucléaire de NF- κ B ont montré une plus grande zone infarctée, ainsi qu'une augmentation d'apoptose [22]. NF- κ B agit à plusieurs niveaux et pourrait avoir un rôle dans la génération de la phase inflammatoire à l'origine des lésions de reperfusion, mais pourrait aussi avoir un certain effet cardioprotecteur de par ses propriétés d'encourager la survie cellulaire.

L'activation du complément, la génération de ROS et l'activation de la voie NF- κ B stimulent la synthèse de cytokines [20]. Effectivement, de nombreuses études ont montré une activation et une augmentation de la synthèse des cytokines (dont le facteur de nécrose tumorale (TNF- α) et les interleukines (IL-1 β , IL-6, IL-8)) au niveau du myocarde ischémique et reperfusé [23]. TNF- α pourrait tout autant être cardioprotecteur que délétère. Des souris TNF- α KO sont protégées contre une dysfonction chronique à la suite de l'IM et montrent une réponse inflammatoire moindre ainsi qu'une activité métalloprotéinase diminuée. Toutefois, l'inhibition de TNF- α peut aussi être nuisible au rétablissement du myocarde. Ces rôles contradictoires pourraient être dus à la double signalisation de cette cytokine via les récepteurs de type 1 (TNFR1) et de type 2 (TNFR2). La signalisation par le premier serait plutôt néfaste, tandis que le second serait protecteur [24]. TNF- α , tout comme l'IL-1, stimulent l'expression de cytokines pro-inflammatoires, des chémokines,

des molécules d'adhésion et sont impliqués dans le remodelage cardiaque post-infarctus. L'IL-6 favorise l'hypertrophie cardiaque à la suite de l'IM, puis l'IL-8 participe au recrutement des neutrophiles dans le myocarde ischémique et reperfusé [25]. Les cytokines peuvent aussi induire l'apoptose (expliquée ultérieurement), mais ne sembleraient pas avoir un impact sur la taille d'un infarctus. L'administration du récepteur soluble de TNF [26] et de pentoxifylline (inhibiteur de la synthèse de cytokines) [27] ne montrent pas d'effets cardioprotecteurs lorsque donnés avant et après l'occlusion coronaire.

La reperfusion myocardique induit une importante accumulation de neutrophiles dans la zone précédemment ischémique, nombre variant entre deux et six fois celui que l'on retrouve dans le myocarde non-ischémique. Une première phase d'accumulation débute immédiatement au moment de la reperfusion et s'étend jusqu'à six heures post-reperfusion, puis une deuxième phase débute 24 heures plus tard. Leur concentration est augmentée via les médiateurs pro inflammatoires (ROS et cytokines dont l'IL-1 β et le TNF- α) [28].

L'infiltration des neutrophiles génère des radicaux libres et libère des enzymes qui contribuent au nettoyage de la zone infarctée des cellules mortes et des débris cellulaires [20]. Par contre, les neutrophiles lèsent les cellules du parenchyme par le relâchement de produits toxiques. Une corrélation s'observe d'ailleurs entre les neutrophiles présents dans le myocarde et les lésions de reperfusion. L'accumulation de neutrophiles mène à la relâche d'enzymes protéolytiques, des métabolites de l'acide arachidonique (AA) et des ROS dans les zones lésées, ce qui peut aussi nuire à la survie des cardiomyocytes. Le contenu de granules azurophiliques relâchées par les neutrophiles peuvent aussi contribuer aux lésions de reperfusion en dégradant les membranes. Ces substances sont relâchées quasi exclusivement par les neutrophiles adhérents liés aux cardiomyocytes [28].

Il a été démontré, dans diverses études, qu'une délétion en neutrophiles induit une diminution de la taille de l'infarctus comparativement à un groupe témoin, suggérant un rôle contributoire majeur des neutrophiles dans les lésions de reperfusion [28].

Bien que la réponse inflammatoire soit probablement responsable en partie des lésions de reperfusion, une phase inflammatoire est nécessaire pour le processus de guérison. Les médiateurs inflammatoires et les leucocytes jouent un rôle crucial dans le nettoyage de la zone infarctée par la phagocytose des cellules mortes et des débris cellulaires [20]. Par contre, cette réponse inflammatoire doit être transitoire, rester local et se résoudre, sinon, une activation soutenue sera à l'origine des lésions de reperfusion, contribuant à une augmentation de la taille de l'infarctus.

1.2.1.2 Apoptose

Selon certaines études, l'apoptose pourrait contribuer aux lésions de reperfusion. L'apoptose est une mort cellulaire programmée et déclenchée par une cellule en réponse à un signal qui nécessite de l'énergie. C'est pourquoi elle survient en période de reperfusion et cause peu d'inflammation. Lors de la reperfusion, c'est surtout l'apoptose qui prédomine sur la nécrose [29].

L'apoptose se décrit morphologiquement comme une rétraction progressive de la cellule, un bourgeonnement membranaire, une condensation du noyau et de la chromatine ainsi qu'une fragmentation de la cellule, de l'ADN conduisant à la formation de corps apoptotiques qui seront phagocytés. Du côté moléculaire, l'apoptose peut être initiée par une perturbation de l'homéostasie cellulaire, par des signaux de stress qui activeront la voie intrinsèque ou par des signaux extracellulaire (TNF α , ligand Fas) qui vont plutôt activer la voie extrinsèque de l'apoptose et ainsi déclencher la cascade des caspases [30]. Les caspases sont des protéines à cystéine, exprimées à l'état zymogène, et qui, pour être activées, doivent être clivées au niveau des résidus aspartate, se regroupant ainsi en

hétérotétramère. Dans le cytoplasme, la forme active des caspases peut être inhibée par des protéines inhibitrices d'apoptose (IAP). Chez l'humain, 14 caspases sont répertoriées, dont certaines sont dites initiatrices (caspase 2,8,9,10) et d'autres effectrices (caspase 3,6,7) [31].

La voie intrinsèque de l'apoptose peut être activée par l'hypoxie, le stress oxydatif ou un manque de facteur de croissance. La famille de protéines BCL-2 régule en partie l'activation de l'apoptose via cette voie. Cette famille se divise en trois classes : anti-apoptotique dont Bcl-2 et Bcl-XL, pro-apoptotiques avec Bax et Bak puis protéines BH-3 dont Bim et Bid. Ces protéines agissent en homodimère (Bcl-2-Bcl-2) ou en hétérodimère (Bcl-2-Bax) [32]. Ils ont tous un domaine transmembranaire qui leur permettent de s'ancrer dans la membrane des mitochondries. Les membres Bax et Bak forment un canal dans la membrane lipidique qui peut être inhibée par les protéines anti-apoptotiques tel que Bcl-2 [33]. Un stimulus apoptotique vient activer les types BH-3 qui peuvent ensuite activer l'apoptose de deux façons: activer Bax ou Bak, leur permettant de s'insérer dans la membrane et ainsi augmenter la perméabilité mitochondriale ou en liant Bcl-2, ce qui permet la libération des protéines pro-apoptotiques leur permettant de venir s'ancrer dans la membrane et faire un pore pour augmenter la perméabilité. Tous deux mènent au relâchement du cytochrome c. Puis, il y aura assemblage de l'apoptosome avec le *Apoptotic peptidase activating factor 1* (APAF-1), de l'ATP et la caspase-9. La caspase-9 ira activer à son tour les caspases effectrices, dont la caspase-3 qui conduira à la dégradation de la cellule et à la formation de corps apoptotiques [30].

En plus de relâcher le cytochrome c qui en liant Apaf-1 ira activer la caspase-9 puis la caspase-3, la mitochondrie relâche les facteurs SMAC/DIABLO qui lèvent l'inhibition de la caspase-3 et -9 en inhibant IAP. La mitochondrie relâche aussi d'autres facteurs facilitant l'apoptose, dont le facteur induisant l'apoptose (AIF), l'endonucléase G et les

protéines nécessitant des hautes températures (*high-temperature-requirement protein A2* : HtrA2) qui enclenche le relâche d'Omi [34] (voir figure 1).

D'un autre côté, l'apoptose peut aussi être activée par la voie extrinsèque, c'est-à-dire par des signaux extracellulaires. Les signaux de l'environnement sont perçus par des récepteurs de mort comme le TNFR1, Fas, DR (*death receptor*) 3, DR4, DR5, DR6 qui ont un domaine extracellulaire riche en cystéine responsable de la liaison du ligand et un domaine intracellulaire de mort (DD pour *death domain*). Les ligands reconnus par ces récepteurs sont le TNF- α , le ligand Fas, la lymphotoxine, Apo3 et TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*). Leur liaison conduira à la trimérisation de leur récepteur membranaire, puis au recrutement de protéines adaptatrices dont TRADD et FADD via le domaine DD des récepteurs. Celles-ci recruteront les initiateurs apoptotiques, la pro-caspase 8 et pro-caspase-3; le tout va former le complexe pro-apoptotique DISC (*death-inducing signaling complex*). Par un changement de conformation, la caspase-8 sera activée, puis les caspases effectrices le seront pour conduire à l'aboutissement de l'apoptose [35].

La caspase-8 peut aussi cliver Bid et engager le sentier apoptotique via la mitochondrie. Une fois Bid clivé, la partie terminale COOH se dirige vers la mitochondrie et entraîne la relâche du cytochrome c, dirigeant la cellule en apoptose. Les protéines FLIP ont été montrées inhibitrices de la voie extrinsèque en liant le complexe DISC et en inhibant l'activation de la caspase-8. SODD interagit aussi avec la partie DD des récepteurs de mort cellulaire, surtout au niveau de DR3 et du TNFR1, ce qui prévient la liaison des autres facteurs impliqués dans l'activation des caspases et de l'apoptose [36] (voir figure 1).

Une période d'ischémie prolongée mène à une augmentation de la nécrose tandis que la reperfusion favorise la mort par apoptose. La reperfusion restaure l'énergie cellulaire qui est nécessaire à l'apoptose. Cette dernière serait responsable de 86% de la mort des cardiomyocytes, tandis que 14% des cellules seraient affectées par la nécrose en période de reperfusion. L'apoptose s'observe quasi uniquement en période de reperfusion, ce qui lui suggère un rôle important dans les lésions de reperfusion [37]. Finalement, le fait d'inhiber pharmacologiquement l'apoptose réduit la mort cellulaire et la taille de l'infarctus. La surexpression de Bcl-2 dans un modèle expérimental d'ischémie-reperfusion s'est aussi avérée efficace afin de contrer les lésions de reperfusion [38], le tout confirmant le rôle important de l'activation des voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose dans la détermination de la taille d'un infarctus.

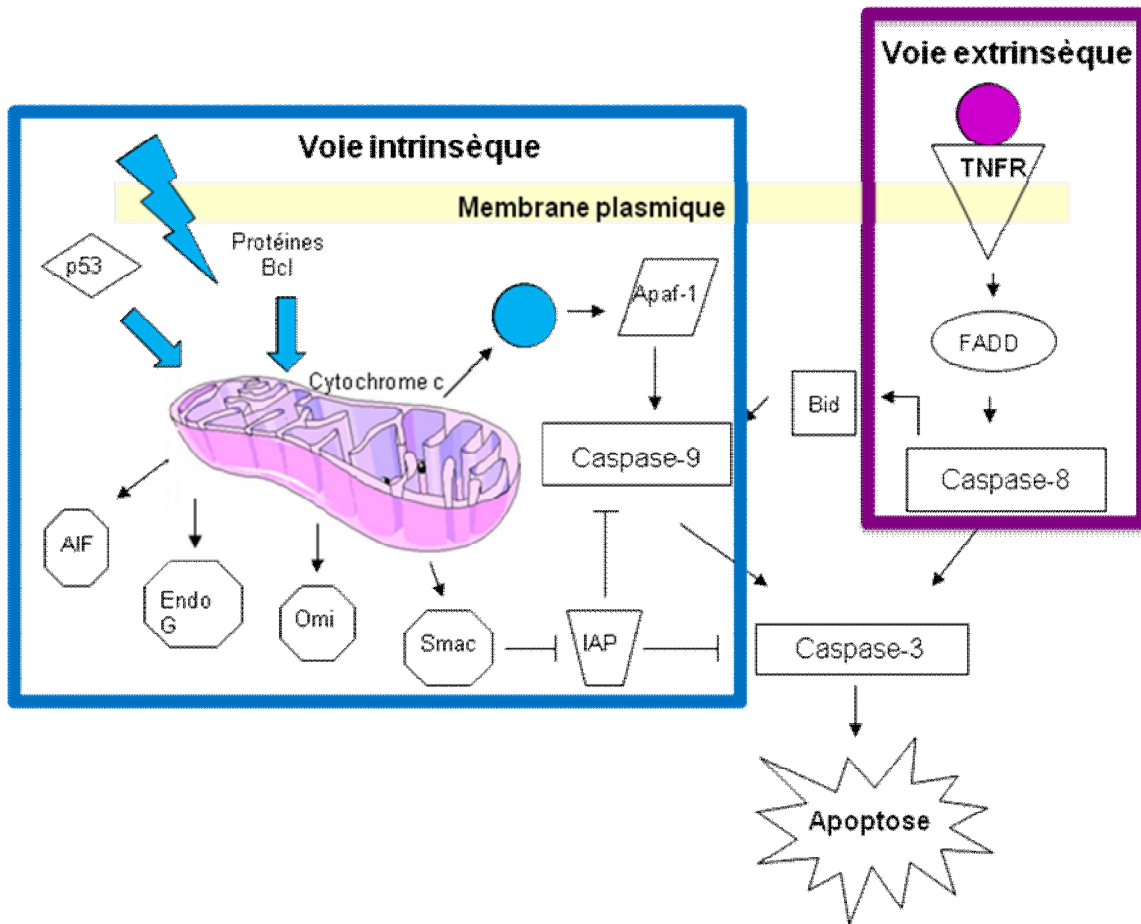


Figure 1. Activation des voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose. L'activation de la voie intrinsèque (encadré bleu) implique la relâche du cytochrome c de la mitochondrie qui vient activer Apaf-1, la caspase-9, initiatrice de l'apoptose, puis la caspase-3, effectrice de l'apoptose. Le tout est régulé par les protéines de la famille BCL et les facteurs AIF, l'endonucléase g, Omi et Smac encourageant l'apoptose, tandis que IAP vient l'inhiber. La voie extrinsèque (encadré mauve) s'active par la signalisation d'un récepteur de mort cellulaire lors de la liaison de son ligand (TNF est cité comme exemple), il y aura activation de la caspase-8 via un facteur FADD, puis de la caspase-3 ou encore par Bid qui engendra l'apoptose par le sentier mitochondrial.

1.3 Cardioprotection

C'est en 1986 que *Murry et al* ont mis au point un concept afin de protéger le myocarde des lésions de reperfusion. Il s'agit d'induire, de façon délibérée, de courtes périodes d'ischémie-reperfusion, ce qui réduit de façon importante la taille de l'infarctus. Chez le chien, l'occlusion à quatre reprises pendant dix minutes d'une artère coronaire séparée par 20 minutes de reperfusion prévient la mort cellulaire, nécrose et apoptose, des cardiomyocytes [39].

Depuis, cette technique, le post-conditionnement, a été mise au point. Celle-ci a montré une diminution de l'apoptose obtenue par la reperfusion, une diminution d'arythmie lors de la reperfusion, une diminution de l'adhérence et de l'accumulation des neutrophiles, des lésions de l'endothélium et, en restaurant de façon progressive le pH, une diminution de l'influx excessive de calcium. Cette stratégie s'est montrée positive chez le patient avec un épisode d'IM [40]. Le post-conditionnement peut être induit par l'activation de l'une ou l'autre des deux voies de cardioprotections : *Reperfusion Injury Kinase Signalling* (RISK) [41] ou *Survivor Activating Factor Enhancement* (SAFE) [42], tout comme plusieurs composés pharmacologiques montrent une cardioprotection par l'activation de ces voies.

1.3.1 Voie Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)

L'activation de la voie RISK impliquerait les protéines kinases Akt et Erk1/2 (un membre des MAPK : *mitogen-activated protein kinase*), qui lorsqu'activées au moment de la reperfusion confèrent une cardioprotection. Cette voie implique aussi d'autres kinases comme la protéine kinase C (PKC : l'isoforme PKC- ϵ), PKG, p70s6K (protéine ribosomale kinase S6 de 70 kDa) et le GSK-3 β (*glycogen synthase kinase 3*) qui sont cardioprotectives. À l'inverse, PKC- δ et rho-kinase inhibe la voie RISK [41].

L'activation de la voie RISK a de multiples propriétés anti-apoptotiques. Akt inhibe le changement conformationnel de la protéine pro-apoptotique Bax, l'empêchant de transloquer vers la mitochondrie et d'ainsi causer l'apoptose. Akt, activée par les facteurs de croissance tels que p70s6K ou l'*insulin growth factor*, vient phosphoryler Bad, l'inactiver, supprimer l'apoptose et promouvoir la survie cellulaire. Akt peut aussi phosphoryler la pro-caspase-9, inhibant ainsi son activité et l'apoptose [43]. L'activation du récepteur A_{2A} de l'adénosine au moment de la reperfusion contribue également à une diminution de la taille d'un infarctus via la voie PI3K (phosphoinositide 3-kinase)-Akt et de par une diminution de l'activation de la caspase-3 [44].

L'activation de cette voie converge vers l'inhibition du mPTP. Lors de la reperfusion, une augmentation du pH ou du calcium peut induire l'ouverture de ce pore, enclenchant ainsi la voie intrinsèque de l'apoptose et contribuant à une taille de l'infarctus plus importante. La façon exacte dont la voie RISK participe à l'inhibition de l'ouverture de ce pore est plutôt incertaine, toutefois plusieurs hypothèses sont émises. Les molécules endogènes impliquées dans la voie RISK peuvent contribuer à l'inhibition de ce pore. GSK-3 β a été montrée comme inhibant directement le mPTP, eNOS (synthase de l'oxyde nitrique endothéliale) peut aussi inhiber ce pore par la voie PKG-PKC- ϵ -canaux KATP mitochondriaux ou par la génération d'oxyde nitrique (NO), l'inhibition de la translocation de Bax à la mitochondrie ou via l'activation de l'hexokinase mitochondriale II. Les deux derniers peuvent agir de concert pour inhiber le pore [45]. Puis, l'activation de la voie PI3K peut réduire la prise de calcium par le réticulum sarcoplasmique et ainsi inhiber l'ouverture du mPTP. D'un autre côté, PKC- δ et rho-A peuvent au contraire contribuer à une augmentation de la taille d'un infarctus par une inhibition de la voie RISK [40].

Plusieurs composés pharmacologiques peuvent activer la voie RISK et ainsi contribuer à une cardioprotection. L'insuline administrée au moment de la reperfusion

s'avère cardioprotective, elle diminue l'apoptose. L'activation de la voie PI3K/Akt est impliquée dans cette cardioprotection. L'activation d'Akt conduit à la phosphorylation de p70s6K, de Bad ainsi que de eNOS ce qui contribue à l'effet protecteur. L'*insuline-like growth factor-1* diminue aussi la taille de l'infarctus lorsque surexprimé au moment de la reperfusion. Les mécanismes impliqués sont une activation de Akt, de ERK1/2, la stimulation de l'expression de Bcl-2, l'inhibition de Bax et l'inhibition de l'ouverture du pore mPTP. La cardiotrophine-1 inhibe la mort par apoptose des cardiomyocytes par l'activation des MAPK. Le *fibroblast growth factor-2* protège contre les lésions de reperfusion, la PKC est impliquée. L'érythropoïétine donnée au moment de la reperfusion est cardioprotectrice et implique la PKC et Akt [40]. La cardioprotection amenée par le *granulocyte colony-stimulating factor* implique Akt et eNOS. L'activation des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) par l'urocotine, l'adénosine et l'adrenomédulline s'avèrent aussi cardioprotectrice par les voies MAPK et PI3K/Akt. L'activation du récepteur A_{2A} de l'adénosine par un agoniste au moment de la reperfusion montre une diminution significative de la taille de l'infarctus. Le *glucagon-like peptide-1*, les peptides natriurétiques, l'estrogène, par la voie PI3K/Akt, le CGX-1051 (un peptide synthétique du venin du serpent Conus), impliquant ERK et le canal KATP mitochondrial, se sont tous montrés cardioprotecteurs lorsqu'administrés au moment de la reperfusion [46]. Le composé Carperitide (une forme recombinante humaine d'un peptide natriurétique) s'est montré efficace à réduire la taille d'un infarctus de 14.7% dans un groupe de 600 patients, l'activation de la voie RISK est possiblement impliquée [47].

1.3.2 Voie « Survivor Activating Factor Enhancement » (SAFE)

Tel que mentionné précédemment, TNF- α peut occasionner des lésions de reperfusion par son signallement via le TNFR1. Par contre, cette même cytokine serait aussi cardioprotectrice de par son récepteur TNFR2. Ces deux récepteurs sont présents au niveau des cardiomyocytes chez l'humain et chez le rat. L'expression de TNF- α est augmentée lors d'un IM en période d'ischémie et de reperfusion. Des souris KO pour les deux récepteurs

montrent une augmentation de la taille de l'infarctus, ce qui démontre un certain rôle protecteur de cette cytokine [48]. TNF- α serait donc impliqué dans une voie de cardioprotection de par l'activation de la voie JAK (janus kinase)/STAT-3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) [49].

L'inhibition de la phosphorylation de STAT-3 abolit l'effet protecteur. De plus, l'insuline a besoin de STAT-3 pour conférer une cardioprotection au moment de la reperfusion. STAT-3 est donc bénéfique au moment de la reperfusion. Une fois phosphorylé, STAT-3 va engendrer la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la survie et dans la prolifération cellulaire. STAT-3 augmente entre autres l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-Xl, Mcl-1 et Fas. De plus, STAT-3 diminue l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax ou encore il phosphoryle Bad pour le rendre inactif. Ces effets anti-apoptotiques font de lui un facteur impliqué dans la cardioprotection [49].

Chapitre 2 : Dépression post-infarctus

Les différents types de dépression qui sont répertoriés sont des psychopathologies qui font parties des troubles de l'humeur. Bien que les troubles dépressifs puissent survenir en épisode isolé ou récurrent, la fréquence et la gravité des symptômes sont les deux éléments qui les différencient. Selon le DSM IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*), pour qu'une dépression soit diagnostiquée, cinq des symptômes suivants doivent être présents pendant au moins une durée de deux semaines chez le patient :

1. humeur dépressive persistante remarquée par la personne même ou son entourage;
2. diminution de l'intérêt et du plaisir;
3. perte d'appétit et de poids significatives (au moins 5% par mois);
4. insomnie ou hypersomnie (bien que plus rare) persistante, observée presque tous les jours;
5. agitation ou retard au niveau psychomoteur;
6. fatigue ou perte d'énergie quotidienne;
7. sentiment de culpabilité ou manque d'estime et de valorisation de soi;
8. trouble de concentration;
9. pensées suicidaires et de morts récurrentes.

Ces symptômes ne doivent toutefois pas être causés par des substances exogènes tels que des drogues ou des médicaments, ni par des problèmes médicaux comme une dysfonction de la glande thyroïde et ne peuvent pas être expliqués par un deuil récent [50, 51].

2.1 Étiologie de la dépression

Les traitements pharmacologiques actuels se basent sur une hypothèse étiologique de la dépression : un dérèglement du système monoaminergique central dont la dopamine, la noradrénaline, l'adrénaline ainsi que la sérotonine [52]. Cette hypothèse a vu le jour avec

l'utilisation de la réserpine pour le traitement de l'hypertension. Ce médicament, utilisé à forte dose, diminue les réserves de monoamine et engendre par le fait même des symptômes de dépression chez les patients hypertendus [53]. Donc, le but des traitements pharmacologiques actuels est d'augmenter la concentration des neurotransmetteurs au niveau synaptique, soit en empêchant leur dégradation par une inhibition de la monoamine oxydase (enzyme de dégradation des monoamines) ou par l'inhibition de leur recapture. Il y a des inhibiteurs sélectifs pour la recapture de la sérotonine (SSRI), la norépinéphrine (NERI), ces deux derniers ensembles (SNRI) ou encore des triples inhibiteurs qui visent en plus la dopamine comme les antidépresseurs tricycliques [52, 54].

Chez les patients dépressifs, la quantité et la fonction de divers neurotransmetteurs comme la sérotonine, la norépinéphrine ainsi que la dopamine se voient altérées au niveau de différentes structures du système limbique [52]. Le système limbique a d'abord été décrit par Broca, Papez et MacLean. Il regroupe différentes structures cérébrales dont le corps godronné, l'amygdale, le thalamus, l'hypothalamus et l'hippocampe. Ces régions ont de multiples fonctions dont le contrôle des émotions ainsi que des commandes motrices et cognitives reliées à la mémoire et à la motivation. Une altération limbique peut causer diverses pathologies dont l'épilepsie, la dépression, des troubles d'humeurs et du sommeil [55]. Des symptômes dépressifs peuvent aussi apparaître chez des personnes ayant une sous alimentation en tryptophane, un précurseur de la sérotonine. Des études épidémiologiques montrent que plusieurs polymorphismes, altérant la fonction des monoamines, amènent une vulnérabilité génétique liée au développement d'une dépression [56]. Le nombre de neurones monoaminergiques est peu élevé au niveau du système nerveux central, donc une altération de celles-ci peut causer beaucoup de dommages. D'ailleurs, lors du début d'un traitement, quelques heures suffisent pour observer l'augmentation des neurotransmetteurs. Par contre, il faut plus de 14 jours pour voir un effet clinique, et 60 à 70% des patients peuvent être résistants aux antidépresseurs actuels [57]. Donc, cette hypothèse du

dysfonctionnement monoaminergique central n'est pas exclusive et n'explique pas à elle seule l'étiologie de la dépression.

Grâce à l'autopsie des patients dépressifs, plusieurs changements quant à la plasticité neuronale ont été observés. Une atrophie du cortex préfrontal et de l'hippocampe a été décelée [58]. Le bon fonctionnement des neurones dépend, entre autres, des facteurs neurotrophiques. Les neurotrophines jouent un rôle important dans la survie neuronale ainsi que dans la connectivité neuronale. Plus précisément, le *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) semble impliqué dans la dépression. Ce facteur se trouve normalement en grande quantité au niveau des régions atrophiées et celui-ci se voit diminué avec le stress et la dépression. Chez les patients dépressifs, une diminution de BDNF au niveau de l'hippocampe, du liquide céphalo-rachidien et du sérum a été démontrée ainsi qu'une diminution de l'activité de son récepteur tyrosine kinase B [59]. Un traitement chronique aux antidépresseurs stimule la relâche de ce même facteur chez l'humain et chez l'animal, ce qui pourrait expliquer l'effet tardif du traitement pharmacologique. Cette augmentation cause en parallèle un accroissement du volume de l'hippocampe. La plupart des antidépresseurs stimulent la neurogénèse dans l'hippocampe via, possiblement, l'activation de facteurs de transcription tel CREB (*cAMP response element-binding*), qui cause la relâche de facteurs de croissance [57]. Des souris KO pour le gène du BDNF présentent aussi des symptômes dépressifs [60]. Des polymorphismes pour le gène du BDNF ont été observés, ceux-ci pourraient être reliés à des comportements anxieux et de dépressifs [61].

Un déséquilibre dans les facteurs neurotrophiques peut conduire à l'apoptose. Effectivement, il semble y avoir un déséquilibre au niveau des facteurs impliqués dans la neurogénèse et ceux de la mort cellulaire chez les gens dépressifs. Dans trois modèles de dépression, des gènes impliqués dans la mort cellulaire par apoptose sont modifiés. Une panoplie de gènes est impliquée, mais tous les modèles de dépression convergent en une

modification des gènes impliquées dans l'apoptose, dans la différenciation neuronale ainsi que dans la régulation de la mort cellulaire programmée [62]. Chez l'humain, une étude post-mortem faite chez 15 patients avec dépression majeure montre chez 11 de ceux-ci de l'apoptose dans différentes régions de l'hippocampe : le cortex subiculum, le corps godronné, l'aire CA1 et CA4 [63]. Les antidépresseurs auraient donc un effet antiapoptotique en plus de leur effet neurotrophique. La venlafaxine (SNRI) s'est montrée efficace pour diminuer l'expression de facteurs apoptotiques dans l'hippocampe en plus d'améliorer le comportement dépressif [64].

En accord avec cette hypothèse, le modèle animal d'IM, utilisé dans ce mémoire, a montré la présence d'apoptose dans différentes régions cérébrales [27, 65]. Par ailleurs, toujours dans ce modèle, il a été montré qu'un antidépresseur, la sertraline (SSRI), diminuait l'expression des marqueurs apoptotiques au niveau du système limbique ainsi que du comportement dépressif [66].

Il existe également d'autres hypothèses pour expliquer la dépression dont une impliquant une augmentation de glucocorticoïdes en raison d'un dérèglement de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien (HPA) [67](expliqué dans la prochaine section) et une autre impliquant les cytokines. Les cytokines issues de l'activation du système immunitaire inné ou acquis ont un rôle important dans le contrôle de l'humeur. Comparativement aux patients non dépressifs, les patients dépressifs ont des niveaux circulants plus élevés de cytokines inflammatoires, de facteur chimioattractants, de molécules d'adhésions et de médiateurs inflammatoires telle la prostaglandine. La fatigue, les dysfonctions cognitives et les problèmes de sommeil sont reliés à des niveaux de marqueurs inflammatoires supérieurs. Les biomarqueurs qui semblent être reliés davantage à la dépression sont l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- α . Il y a plusieurs récepteurs des cytokines exprimés au niveau du système nerveux central et ceux-ci peuvent être activés par les

cytokines relâchées en périphérie [68]. Les cytokines pourraient interférer dans le système central de monoamine et jouer sur l'HPA [69], démontrant la non-exclusivité des hypothèses mentionnées.

D'autres hypothèses ont été émises pour expliquer la dépression mais nous nous limiterons à celles présentées jusqu'à maintenant parce qu'elles sont les plus probables par rapport au modèle utilisé dans ce mémoire.

2.2 Dépression post-infarctus

Il est bien connu et documenté que les patients souffrants de dépression sont plus à risque d'atteintes cardiovasculaires [70]. Par contre, l'inverse se voit aussi, car 65% des patients souffrants d'un IM vont développer des troubles dépressifs indépendamment du pronostic ou des effets de la pathologie cardiaque comme l'hospitalisation ou la douleur. Quinze à 30% en développeront même une dépression majeure. Une étude réalisée chez des patients ayant subi un IM démontre que 18% de ceux-ci vont développer une dépression majeure et que 27% auront des troubles dépressifs [71]. De plus, la dépression majeure suivant le trouble cardiaque augmente le risque de morbidité et de mortalité à six mois post-traumatique et engendre des coûts exorbitants à la société [72]. La surveillance de la dépression à la suite de l'IM est donc d'une importance cruciale. Deux hypothèses peuvent possiblement expliquer cette dépression post-IM, soit les cytokines pro-inflammatoires et un dérèglement dans l'HPA.

2.2.1 Cytokine-dépendante

Le groupe des cytokines comprend une variété de protéines régulatrices de faible poids moléculaire, inférieur à 30 kDa. Ces protéines sont séparées en quatre groupes, soit le groupe de cytokines hématopoïétines dont l'interleukine 2 (IL-2) et l'interleukine 4 (IL-4) qui favorisent la différenciation et la croissance des cellules hématopoïétiques; les

interférons dont l'interféron alpha (IFN- α), l'interféron-bêta (IFN- β) et l'interféron-gamma (IFN- γ); les chimiokines dont l'interleukine 8 (IL-8) impliquées dans la chimiotaxie; puis celles dites facteur de nécrose tumorale (TNF). Étant actuellement plus de 200, leurs effets sont multiples. Elles peuvent d'autant plus interagir ensemble par redondance, synergie, antagonisme, et peuvent induire l'expression d'autres cytokines. Elles sont sécrétées par différents types cellulaires, relâchées dans la circulation et peuvent agir de façon autocrine, paracrine ou endocrine pour se lier à leur récepteur et ainsi causer l'activation de la voie JAK-STAT. La liaison d'une cytokine à son récepteur entraîne l'oligomérisation de celui-ci, amenant une activation de la JAK associée au domaine cytoplasmique du récepteur et qui a une activité tyrosine kinase (quatre membres : JAK 1 à 3, tyk2). Deux JAK vont se transphosphoryler, et ainsi activer leur cible STAT se trouvant dans le cytoplasme sous une forme inactive (sept membres de répertoriés). L'activation de STAT, de par sa phosphorylation, entraîne une dimérisation. Puis, le complexe migre vers le noyau et agit comme facteur de transcription pour induire l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, dans la différenciation cellulaire, dans la migration et dans l'apoptose [68, 69]. L'affinité des cytokines pour leur récepteur est très élevée. Une réponse peut donc survenir avec une quantité très faible de cytokines, de l'ordre du picomolaire. La production de cytokines est régulée, toutefois celle-ci peut s'étendre sur plusieurs heures jusqu'à plusieurs jours. Dans ce mémoire, les cytokines seront divisées en deux groupes, soit pro-inflammatoires (l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12, l'IFN- γ , le TNF- α) et anti-inflammatoires (l'IL-4, l'IL-10, l'IL-13) [73].

La relâche de cytokines en périphérie peut affecter le système en entier, atteindre le cerveau et entraîner le développement de désordres neuropsychiatriques telle la dépression [69]. L'administration de LPS en périphérie entraîne une relâche de cytokines inflammatoires, dont l'IL-1 et le TNF- α , et celles-ci se voient également augmentées au

niveau cérébral [74]. La façon dont les cytokines peuvent atteindre le cerveau est par contre plutôt nébuleuse, bien que plusieurs hypothèses soient émises.

D'abord, celles-ci pourraient traverser directement la barrière hémato-encéphalique (BHE) là où elle serait plus mince et permettrait le passage direct de ces molécules. La BHE est essentiellement faite de cellules endothéliales non fenêtrées et connectées ensemble par des jonctions serrées. Le poids des cytokines (13-15 kDa) et leur propriété hydrophile les empêchent de passer de façon paracellulaire, mais le passage transcellulaire par diffusion serait possible. Il pourrait de plus y avoir un transport actif des cytokines via des transporteurs à influx saturables. Un tel transport a déjà été décrit pour l'IL-1 α , l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α . De plus, la BHE est incomplète dans certaines régions nommées organes circumventriculaires. Puisque la perméabilité y est beaucoup plus grande, le passage des cytokines pourrait s'y faire directement. D'une autre façon, les cytokines pourraient augmenter la perméabilité de la BHE. Il a été montré que l'IFN- γ et le TNF- α peuvent augmenter la perméabilité entre les cellules en changeant la conformation des protéines des jonctions serrées. D'un autre côté, l'activation des cellules endothéliales ou de d'autres types cellulaires pourrait stimuler la vasculature cérébrale à produire des cytokines et médiateurs inflammatoires [68]. L'activation de la microglie cérébrale peut conduire à une production de cytokines. Puis, les cytokines peuvent lier leurs récepteurs associés aux fibres nerveuses en périphérie, comme le nerf vague, et causer la relâche de certains signaux ou de cytokines dans les structures cérébrales. Chez la souris, où une vagotomie a été effectuée, le comportement dépressif, associé à l'injection de lipopolysaccharide (LPS) ou d'IL-1 et évalué par la prise de nourriture, est atténué. L'inflammation qu'entraîne l'IM pourrait stimuler le nerf afférent cardiaque sympathique et causer l'activation d'un signal cérébral pour augmenter l'expression des cytokines dans le système limbique. De plus, le facteur NF- κ B serait un médiateur important à l'interface sang-cerveau dans la communication des signaux inflammatoires de la périphérie au système nerveux central

[75]. Une inactivation de cette signalisation vient diminuer le comportement dépressif à la suite de la prise d'IL-1 [76].

L'expression accrue de cytokines au niveau cérébral peut avoir plusieurs effets. Les patients recevant un traitement d'IFN- α ont une incidence plus élevée de troubles dépressifs. D'ailleurs 30 à 50% d'entre eux développent une dépression majeure et on voit chez ceux-ci un impact sur le système monoaminergique, particulièrement sur la noradrénaline, la sérotonine et la dopamine [77]. Les voies de signalisation induites par les cytokines dans le tissu cérébral influence la synthèse, la relâche et le recaptage de divers neurotransmetteurs. L'IL-2 diminue les niveaux de dopamine dans le noyau accumbens, une région du système limbique [78]. L'IFN- α diminue aussi les niveaux de dopamine et de noradrénaline dans le cortex cérébral, l'hypothalamus et la médulla [79].

Les cytokines sont des activateurs de l'indoleamine 2,3 dioxygénase (IDO). Cette enzyme vient briser le tryptophane, le précurseur de la sérotonine, en kynurénine. Une activation de l'IDO entraîne une diminution de tryptophane, une augmentation plasmatique de kynurénine et une diminution de sérotonine. Ces effets ont été observés chez les patients dépressifs sous traitement d'IL-2 ou d'IFN- α [80]. Chez la souris, une stimulation immunitaire chronique vient affecter les niveaux circulants d'IFN- γ et de TNF- α , ce qui cause en parallèle une augmentation de l'activation de l'IDO associée à des symptômes de dépression. De plus, les métabolites de la kynurénine sont des agonistes du récepteur NMDA, activation qui peut être toxique pour les astrocytes [81]. Puis, l'injection d'IFN- α chez le rat diminue les concentrations cérébrales de tétrahydrobiopterine (BH₄), un cofacteur nécessaire à l'enzyme métabolisant la dopamine. Le BH₄ est aussi utilisé dans la synthèse du NO où une augmentation de la production de NO induite par les cytokines vient diminuer la disponibilité de l'enzyme pour la synthèse de la dopamine. Un impact sur le recaptage des monoamines s'observe aussi avec une sécrétion active de cytokines. L'IL-

1 et le TNF- α viennent augmenter le recaptage de la sérotonine par une activité amplifiée de ses transporteurs dans le cerveau via l'activation de la voie MAPK par p38 [82]. Donc, il s'agit d'une double action via les cytokines inflammatoires sur la biodisponibilité des monoamines de par une inhibition de la synthèse et l'augmentation du recaptage.

Puis, un autre effet des cytokines s'observe sur la plasticité neuronale. En condition physiologique, les cytokines assurent un support pour les neurones, stimulent la neurogénèse et contribuent aux fonctions cognitives ainsi qu'à la mémoire. En condition pathologique, où elles sont exprimées de façon excessive et prolongée, elles causent, au niveau du système nerveux central, plusieurs anomalies comme la diminution des supports neurotrophiques, la diminution de la neurogénèse, l'augmentation de l'activation glutamanergique, l'augmentation du stress oxydatif, une induction de l'apoptose dans plusieurs types cellulaires tels que les astrocytes et les oligodendrocytes ainsi qu'une dérégulation de la microglie, de l'interaction neuronale et des fonctions cognitives. Effectivement, les cytokines, dont le TNF- α et l'IL-1, peuvent activer les cellules de la microglie causant ainsi une augmentation de leurs activités comme la phagocytose, la sécrétion de cytokines puis l'induction de la eNOS, ce qui pourra entraîner des lésions neuronales et ultimement conduire à l'apoptose. Les cytokines ont un effet sur la neurogénèse médiée par l'activation de NF- κ B. Les neurones progénitrices de l'hippocampe expriment le récepteur de l'IL-1, et son activation diminue la prolifération cellulaire par la voie de NF- κ B. Les médiateurs inflammatoires augmentent aussi la relâche de glutamate et diminuent son nombre de transporteurs, donc augmentent sa biodisponibilité. La relâche du glutamate par les astrocytes amène une surstimulation des récepteurs NMDA ce qui conduit à une excitotoxicité et à une diminution de la production du BDNF [83]. Chez les patients dépressifs, une perte de la densité gliale ainsi que neuronale s'observe dans l'amygdale [84] et dans le cortex préfrontal [85]. Une diminution de BDNF et de son récepteur tyrosine

kinase B s'observe avec l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires et une diminution de la neurogénèse hippocampique s'ensuit [68].

Les cytokines inflammatoires peuvent aussi induire l'expression de substances neuroactives comme la prostaglandine E₂ (PGE₂) et la corticolibérine (CRH). L'IL-1 augmente l'expression de NF-κB et de la cyclo-oxygénase 2 par les cellules endothéliales de la BHE. La cyclo-oxygénase 2 est une enzyme limitante dans le métabolisme des phospholipides membranaires en PGE₂. Puisqu'elle est liposoluble, elle pourra traverser la BHE et à son tour activer l'HPA par une libération de CRH dans l'hypothalamus [86] (expliqué dans la section suivante).

Dans les modèles animaux, l'administration de cytokines ou d'inducteur de cytokines est associée à des symptômes dépressifs (une diminution de l'activité physique et sociale ou l'anhédonie). Inversement, l'administration de cytokines anti-inflammatoires tel l'IGF-1 (*insulin growth factor*) ou l'IL-10 antagonise l'effet d'un inducteur et régule à la baisse les symptômes de dépression [87]. Les patients qui souffrent de dépression ont des niveaux circulants de cytokines inflammatoires plus élevés, dont l'IL-1, l'IL-6 et le TNF-α, ainsi qu'une diminution de cytokines anti-inflammatoires. Malgré la petite quantité de cytokines pro-inflammatoires émise en périphérie et qui se rendent au cerveau, ceci paraît suffisant pour causer les symptômes de dépression. La balance entre les facteurs pro- et anti-inflammatoires semble être au centre de la pathophysiologie de la dépression en présence d'inflammation, tel que causé par l'IM. Outre les antidépresseurs, l'administration d'Infliximab (un inhibiteur de TNF-α) chez les patients souffrants du syndrome de Cushing diminue les symptômes de dépression avant même d'améliorer les effets liés à la maladie [88].

L'IM entraîne la synthèse de cytokines dans les zones cardiaques endommagées, dans les régions saines, mais aussi au niveau plasmatique. L'hypoxie dans les cardiomyocytes implique la relâche d'IL-6 et l'ischémie-reperfusion amène une production d'IL-1, d'IL-8, de TNF- α et du *transforming growth factor 1*. De plus, à la suite de l'IM, l'expression des cytokines inflammatoires se voit également au niveau du cerveau. Trente minutes d'ischémie sont suffisantes pour voir apparaître des niveaux plus élevés de TNF- α dans l'hypothalamus [89]. La présence d'apoptose a en parallèle été observée dans différentes structures du système limbique dont l'amygdale et l'hippocampe à la suite d'un IM dans le modèle expérimental du présent mémoire [27]. Le TNF- α est un joueur qui participe à l'apoptose dans le système limbique après l'IM via l'activation des récepteurs de mort et de la voie extrinsèque d'apoptose [35]. Un récepteur soluble du TNFR1 humanisé (un bloqueur du TNF- α) renverse ce phénomène et diminue l'apoptose après 15 minutes et 72 heures de reperfusion dans l'hippocampe et l'amygdale [90]. Un inhibiteur de la synthèse des cytokines, la pentoxifylline, diminue aussi l'apoptose dans l'amygdale [27]. Les niveaux de BDNF ont également été montrés diminués dans l'amygdale à la suite de l'IM [65]. À la suite d'une ischémie myocardique, une diminution de l'apoptose s'observe lors de l'activation du récepteur A_{2a} de l'adénosine impliquant une augmentation des facteurs anti-apoptotiques tel Bcl-2 [91]. Par ailleurs, la relâche de cytokines dans la circulation à la suite d'un IM peut induire la cyclo-oxygénase 2 et augmenter l'expression des prostaglandines. L'apoptose peut aussi être déclenchée indirectement par la PGE₂ qui peut activer la caspase-3 au niveau cérébral, principalement dans l'amygdale et l'hippocampe où ses récepteurs y sont nombreux. Il a été montré qu'en inhibant la cyclo-oxygénase 2 (l'enzyme limitante dans la production de PGE₂) au moment de la reperfusion, il y a diminution de l'apoptose dans l'amygdale [92].

Vraisemblablement, l'apoptose cérébrale survient à la suite d'un IM dans le système limbique, et les cytokines pourraient l'engendrer via l'activation de la voie extrinsèque.

D'un autre côté, l'ischémie qui provoque l'IM peut activer la voie intrinsèque de l'apoptose par l'activation du mPTP et conduire à une mort cellulaire au niveau cérébral. Les résultats de notre laboratoire démontrent une activation de cette voie dans la région CA1 de l'hippocampe, la région cérébrale la plus sensible à l'hypoxie [93]. L'apoptose activée par les cytokines et l'hypoxie au niveau du système limbique à la suite d'un IM pourrait conduire à des symptômes de dépression. Notre modèle expérimental montre en plus de l'apoptose dans le système limbique, un dérèglement comportemental pouvant se rapporter à la dépression post-IM observée chez l'humain [94].

2.2.2 Axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien dépendante

Tel que mentionné précédemment, des modifications dans l'HPA se voient dans la pathophysiologie de la dépression. La régulation de cet axe a un rôle essentiel dans l'homéostasie du métabolisme, mais une suractivation de celle-ci ainsi que le stress s'observent chez les patients dépressifs, ce qui peut causer des effets délétères au cerveau [67].

Le stress engendre d'abord la sécrétion d'une hormone hypophysiotrope, la CRH par les neurones hypothalamiques. Cette hormone permet la relâche de corticotrophine (ACTH) par l'hypophyse. L'ACTH est sécrétée par les cellules basophiles localisées dans la portion antéro-médiale de l'hypophyse. L'ACTH ira lier ses récepteurs situés sur les glandes surrénales pour induire la relâche de glucocorticoïde (GC), majoritairement le cortisol chez l'homme et le corticostérone chez les rongeurs. La boucle de rétroaction négative de cet axe se fait d'abord par l'ACTH puis majoritairement par les GC via leur liaison avec leur récepteur, ce qui inhibera la relâche de CRH par l'hypothalamus et d'ACTH de l'hypophyse [95].

Les GC sont des ligands des récepteurs nucléaires minéralocorticoïde (MR) et glucocorticoïde (GR) se situant au cytosol sous leur forme inactive liée à un complexe de

protéines chaperonnes, les protéines de choc thermique. La liaison des GC avec leurs récepteurs déloge ce complexe de protéine et initie sa translocation vers le noyau. La transcription des gènes peut également se produire par l'interaction du ligand couplé au récepteur avec un élément de réponse aux glucocorticoïdes (GRE), une séquence se situant sur un site promoteur. Le MR a une plus grande affinité pour le cortisol (GC endogène) que le GR et est aussi une cible de l'aldostérone. Le GR présente moins d'affinité pour les GC endogènes, mais une grande affinité pour le dexaméthasone (GC de synthèse). Il semblerait davantage impliqué dans la dépression. Ces récepteurs se retrouvent dans l'hypothalamus et l'hypophyse, permettant ainsi la régulation négative de l'HPA, mais aussi au niveau de l'hippocampe, de l'amygdale et du cortex préfrontal [67, 95].

Une forte activation de l'HPA est observée chez le patient dépressif. Il s'agit d'une hyperactivité semblable à une réponse soutenue face à un stress, mais sans événement stressant. De fortes concentrations de cortisol plasmatique, urinaire et au niveau du liquide céphalo-rachidien sont répertoriées chez les patients dépressifs. De plus, une dépréciation de la régulation négative de l'axe se présente tout comme une hyperplasie des glandes surrénales et de l'hypophyse [67]. Ces mêmes observations ont été confirmées chez des victimes dépressives s'étant donné la mort. Beaucoup d'études montrent chez les patients dépressifs une non suppression de la sécrétion de cortisol à la suite de l'administration de dexaméthasone (test de suppression à la dexaméthasone). Ce GC exogène devrait réguler de façon négative l'HPA de par son interaction avec GR, entre autres au niveau de l'hypophyse. Une diminution de GR a aussi été observée dans le cerveau humain post-mortem. Ces observations démontrent un défaut dans la boucle de rétroaction négative de l'HPA médié par les récepteurs GR [67].

Avec un traitement antidépresseur efficace, 75% des patients étant non réceptifs au test de suppression à la dexaméthasone le deviennent, tandis que ceux demeurant non

réceptifs subissent souvent une rechute. Les hypothèses émises pour expliquer l'effet des antidépresseurs sur l'HPA sont qu'un tel traitement pourrait augmenter l'expression de GR, augmenter sa fonction et promouvoir sa translocation nucléaire. Aucun effet des antidépresseurs n'a été remarqué sur les MR. Les antidépresseurs tricycliques ou SSRI ont montré une augmentation de l'ARNm de GR dans différents tissus et neurones. La desipramine (antidépresseur tricyclique) a montré une augmentation de la fonction et de la translocation nucléaire de GR. Les antidépresseurs imipramine (tricyclique) et fluoxétine (SSRI) ont montré une inhibition du promoteur du gène du CRH. Les médicaments antipsychotiques inhibent l'expression des gènes induits par la corticostérone chez le rongeur [67, 95]. Des patients résistants au traitement à la clomipramine (tricyclique) n'ont pas non plus montré de réponse sur l'HPA [67, 95].

Une hyperactivité de l'HPA conduirait à la dépression puisque les GC peuvent influencer différentes régions cérébrales. L'activation de GR par la dexaméthasone induit la mort par apoptose des neurones, tandis que l'activation de MR aurait plutôt tendance à induire la survie neuronale [96]. Chez l'adulte, la neurogénèse continue d'avoir lieu au niveau du système nerveux central à partir de neurones progénitrices. De fortes concentrations de GC peuvent nuire à la survie des neurones immatures, diminuant ainsi la neurogénèse dans le corps godronné [97]. Une exposition élevée au GC peut s'avérer toxique pour les neurones et compromettre leur survie lors d'exposition aux agents toxiques ou à l'hypoxie. Une hyperactivité de l'HPA peut aussi venir diminuer directement l'expression de BDNF ou de son activité. Une hyperactivité de l'HPA a montré une diminution de BDNF au niveau de l'hippocampe, ce qui pourrait y causer des dommages et altérer la régulation négative de l'axe, contribuant à une suractivation, ainsi qu'à un cercle vicieux [98].

Le système immunitaire peut de plus venir influencer l'HPA. Les cytokines pro-inflammatoires pourraient contribuer à une résistance aux GC (le cortisol incapable d'induire la boucle de rétroaction négative) de par une diminution de la fonction de GR ou une diminution de la sensibilité aux GC. L'IL-1 α inhibe la translocation de GR au noyau et diminue la transcription de gènes induits par les GR. Les cytokines produites lors d'un phénomène inflammatoire viennent donc favoriser l'hyperactivité de l'HPA. Différentes voies peuvent contribuer à la résistance aux GC à la suite d'une exposition aux cytokines. La voie des MAPK peut être impliquée dans la dérégulation de GR. Il a été montré qu'ERK et JNK inhibent la fonction de GR en le phosphorylant directement ou indirectement par l'intermédiaire de cofacteurs. Le facteur NF- κ B pourrait aussi être impliqué. Il peut interagir directement avec GR au niveau du noyau ou peut diminuer sa fonction indirectement en compétitionnant pour de mêmes coactivateurs. La voie JAK-STAT, activée par les cytokines, peut aussi diminuer la fonction de GR de par une interaction directe protéine-protéine, comme montré entre GR et STAT-5 [99].

En conclusion, plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer la dépression post-IM, particulièrement celles impliquant les cytokines, l'apoptose et l'HPA.

Chapitre 3 : Acide Gras Polyinsaturé Oméga-3

Les acides gras (AG) sont des acides carboxyliques à chaîne aliphatique hydrophobe. Ils sont dits insaturés ou saturés dépendamment s'ils contiennent une liaison double ou pas. De plus, ils sont polyinsaturés s'ils en possèdent plusieurs, ou monoinsaturés s'il n'en possède qu'une seule. Les AG diffèrent par le nombre de carbone qui les constitue ainsi que par la structure conférée par les liaisons doubles [100]. Les AG oméga-3 (ω -3), oméga-6 (ω -6), oméga-7 (ω -7) et oméga-9 (ω -9) sont des acides gras polyinsaturés. Seuls les deux premiers sont dits essentiels; ils ne sont pas synthétisés par les mammifères, ils sont donc requis dans l'alimentation [101].

L'apport alimentaire principal d' ω -3 s'obtient à travers le poisson. Les poissons se nourrissent de phytoplanctons, principales sources d' ω -3. Le maquereau, le hareng, les anchois, le saumon, le thon rouge ou blanc, la sardine ou la truite [102] sont des sources importantes d'AG ω -3. Les sources végétales principales d' ω -3 sont les huiles de lin et de canola, les noix de grenoble, les graines de lin, de chia ou de chanvre ainsi que certains légumes verts. Les ω -6, eux, s'obtiennent à partir des céréales, des œufs, des graisses animales, des huiles végétales, de tournesol et de sésame. Enfin, les ω -7 et ω -9 proviennent de l'huile de palme et de l'huile d'olive respectivement. Ils ne sont toutefois pas essentiels, car ils sont synthétisés à partir d'acétylCoA, un produit émanant du métabolisme des glucides, lipides et acides aminés [103].

3.1 Structure et nomenclature

La structure des AG est une longue chaîne de carbone, dont la plupart possèdent un nombre pair d'atomes. Ils sont généralement synthétisés par enchaînement de deux molécules de carbones. Les AG diffèrent entre eux par le nombre d'atomes de carbone les constituants : les AG dits volatils en ont de deux à quatre, ceux portant une chaîne courte de

six à dix, avec une chaîne moyenne de 12 à 14, puis ceux avec une chaîne longue ont plus de 16 atomes de carbone [100]. De plus, selon leur orientation spatiale, ils sont dits cis ou trans. Le premier signifie que les atomes d'hydrogène de la double liaison sont du même côté, tandis que pour le second ils sont de part et d'autre de celle-ci [104].

Selon la nomenclature nationale normalisée, une fois le total d'atomes de carbone de la molécule dénombré, le premier carbone est identifié à partir du groupement carboxyle (carbone 1), puis les autres sont identifiés dans l'ordre (2,3...). Les AG sont notés **n:m**, où **n** représente le nombre total de carbone, **m** le nombre de liaison double, et entre parenthèse on y retrouve les numéros du ou des carbones portant l'insaturation. Une autre méthode, plus couramment utilisée par les nutritionnistes, est la nomenclature oméga où le dernier carbone de la chaîne, celui du groupe méthyle (CH₃), est le premier carbone et nommé oméga (ω). Depuis celui-ci, les autres carbones sont numérotés, et celui portant l'insaturation détermine le type d'AG ω -() [100, 104]. Cette méthode est utilisée dans le présent mémoire.

Les AG ω -3 ont donc une première liaison double entre le 3^e et le 4^e carbone, tandis que les AG ω -6 regroupent ceux ayant une première liaison double entre le 6^e et le 7^e carbone à partir du méthyle terminale. Les composés les plus simples des familles ω -3 et ω -6 sont respectivement l'acide alpha-linolénique (ALA) ainsi que l'acide linoléique (LA). Ils sont obtenus à travers les sources végétales et sont représentés à la figure 2 [101].

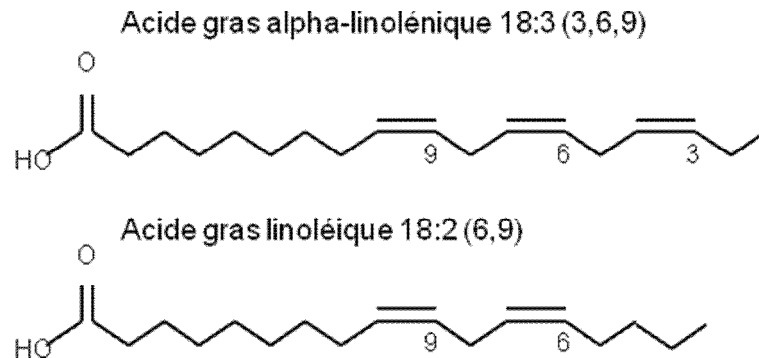


Figure 2. Structure et nomenclature des AG alpha-linolénique (ALA) et linoléique (LA). La première liaison double rencontrée à partir du carbone en méthyle terminale détermine le type d'AG oméga.

3.2 Métabolisme des oméga-3 et oméga-6

Une fois ingérés, les AG sont dégradés par β -oxydation afin d'en libérer de l'énergie ou sont stockés dans les graisses selon les besoins. L'oxydation des AG est un procédé fortement exergonique qui assure la formation de nombreux ATP. À chaque tour de β -oxydation, une molécule de NADH, une de FADH₂ ainsi qu'une d'acétylCoA sont obtenues. Puis, l'oxydation de l'acétyl-CoA, via le cycle de l'acide nitrique, forme d'autres FADH₂ et NADH qui sont à leur tour réoxydés par des phosphorylations oxydatives pour donner de l'ATP. À poids égaux, les AG fournissent deux fois plus d'énergie que le métabolisme des glucides et protéines [104]. Sinon, ils sont constituants des membranes, et sont emmagasinés dans les graisses où ils sont nécessaires pour le fonctionnement de divers organes. Les ω -6 sont indispensables au maintien de la perméabilité de la peau. Une déficience nutritive en cet AG aboutie à des maladies de peau ou à une perte d'eau excessive par l'épiderme [105]. Les ω -3 sont une partie importante de régions cérébrales, car ils participent à la maturation de la rétine ainsi qu'au développement du système

nerveux central [106]. Finalement, les ω -3 et ω -6 sont précurseurs des eicosanoïdes prostaglandines et leucotriènes

Une fois acquis par la diète, LA précurseur des ω -6 et ALA des ω -3 seront pris par la Δ 6 désaturase qui leur ajoutera une liaison double. Cette étape, essentielle au début de la réaction, est aussi celle limitante. Celle-ci permettra d'aboutir à la formation de l'acide dihomog- γ -linoléinique (18 :3) membre des ω -6 et à la molécule 18 :4 pour les ω -3. Puis, l'élongase leur ajoute deux atomes de carbone chaque. Une autre désaturase, la Δ 5, vient compléter la molécule en y ajoutant une seconde liaison double afin d'obtenir pour les ω -6 l'acide arachidonique (AA) 20 :4 et pour les ω -3 l'acide eicosapentaénoïque 20 :5 (EPA). Pour la série d' ω -3, une étape d'élongase (24 :5), une avec la Δ 6-désaturase (24 :6) ainsi qu'une β -oxydation se succèdent pour obtenir l'acide docosahexaénoïque 22 :6 (DHA) [101].

Les AG provenant de l'alimentation ou obtenus par la voie des élongases/désaturases seront incorporés aux membranes en position sn-2 des phospholipides membranaires par estérification [104]. À la suite de divers stimuli comme l'inflammation, la famille des enzymes phospholipase A₂ relâche les AG ω -3 et ω -6 des membranes. Ces enzymes hydrolysent le lien ester sn-2 des phospholipides libérant ainsi les AG à 20 carbones (AA et EPA), permettant leur conversion en eicosanoïdes (eicosa venant du Grec qui veut dire 20, pour dérivé d'AG à 20 carbones). Les phospholipases n'ont pas d'affinité plus grande pour l'une ou l'autre des molécules à 20 carbones. Puis, les eicosanoïdes seront à leur tour métabolisés pour former les prostaglandines et leucotriènes [107].

La synthèse d'EPA à partir d'ALA obtenu par la diète via les sources végétales est plutôt faible chez l'humain. Effectivement, l'organisme humain ne peut que synthétiser une

petite quantité d'EPA ainsi que de DHA à partir d'ALA [102, 103]. Il est donc avantageux de consommer directement de l'EPA et du DHA produits par les phytoplanctons et acquis par l'homme dans la diète par le poisson. De plus, le corps utilise préférentiellement ces derniers. Lorsqu'ils sont ingérés, il y a inhibition des élongases et désaturases [108].

3.2.1 Voie des prostaglandines

D'abord, la voie des prostaglandines débute par l'action de la cyclo-oxygénase. La première étape consiste en la production de PGH par la PGH synthase ou communément appelé cyclo-oxygénase, à partir de l'AA et de l'EPA. Deux isoformes de cyclo-oxygénase se présentent : la cyclo-oxygénase 1 (COX-1) et la cyclo-oxygénase 2 (COX-2). Les deux cyclo-oxygénases catalysent deux réactions : la première catalyse l'addition de molécules d'oxygène à l'AA ou l'EPA, la convertissant en intermédiaire endoperoxyde PGG (activité cyclooxygénase). La seconde réalise la conversion de PGG en PGH (activité peroxydase) [103, 109]. Pour que les réactions suivantes se fassent, l'hydroperoxyde est nécessaire pour activer les cyclo-oxygénases. La COX-1 est exprimée de façon constitutive et est responsable de la production basale d'eicosanoïdes, tandis que la COX-2 est induite, lors d'inflammation par exemple. Ces enzymes sont insérées dans les membranes du réticulum endoplasmique et nucléaire, la poche liant le substrat est orientée de façon à prendre l'AA ou l'EPA. La structure des deux isoformes est similaire. La séquence d'acide aminé diffère au niveau de la poche d'interaction, tout comme il y a une différence dans le domaine liant la membrane, de façon à ce que la COX-2 ait une ouverture plus grande pour le substrat, donc plus accommodant et flexible. De plus, le substrat préférentiel aux deux cyclo-oxygénases est l'AA. Il faut par contre dix fois plus d'hydroperoxyde pour activer la COX-1 que la COX-2. L'EPA a une affinité semblable pour les deux, mais la COX-2 peut oxygéner l'EPA sans source importante d'hydroperoxyde contrairement à la COX-1 qui en nécessite une grande quantité [110].

De la PGH à la formation des autres prostaglandines, les enzymes de synthèse (synthases) impliquées sont spécifiques aux cellules ou tissus. Les prostaglandines de série-2 seront obtenues à partir de l'AA : la thromboxane A₂ (TXA₂), la prostacycline (PGI₂), la prostaglandine D₂ (PGD₂), la prostaglandine F_{2α} (PGF_{2α}) et la prostaglandine E₂ (PGE₂), tandis que la série-3 sera obtenue à partir de l'EPA : thromboxane A₃ (TXA₃), prostaglandine I₃ (PGI₃), prostaglandine D₃ (PGD₃), prostaglandine F_{3α} (PGF_{3α}) et la prostaglandine E₃ (PGE₃) [109].

La TXA₂, produite majoritairement par les plaquettes, stimule l'agrégation plaquettaire ainsi que la constriction des muscles lisses. La TXA₃, au contraire, diminue la réactivité plaquettaire, mais semblerait moins puissante que la TXA₂. Le récepteur des thromboxanes (TP) est couplé à la protéine G_{αq} et cause l'activation de la phospholipase C, ce qui entraîne une augmentation de calcium intracellulaire. Ce récepteur peut aussi entraîner une diminution de l'AMPc via la G_{αi}. Les PGI₂ et PGI₃ inhibent de façon importante l'agrégation plaquettaire et causent une vasodilatation de par l'interaction avec leur récepteur (IP) couplé à la protéine G_{αs} qui augmente l'AMPc. La PGD₂ a une action davantage pro-inflammatoire et stimule la production de cytokines. Elle contribue aussi à la migration des neutrophiles à travers les cellules endothéliales, tandis que la PGD₃ inhibe cette action de par une compétition pour les mêmes récepteurs (DP1 et DP2). Le DP1, couplé à la protéine G_{αs}, augmente les concentrations d'AMPc tandis que le DP2, couplé à G_{αi}, diminue l'AMPc ou stimule la phospholipase C. La PGF_{2α} produit une bronchoconstriction ainsi qu'une constriction des muscles lisses. Elle cause des contractions utérines à la parturition et entraîne la régression du corpus luteum. Les prostaglandines F interagissent avec leur récepteur (FP) couplé à G_{αq} qui augmente les concentrations de calcium par l'activation de la phospholipase C. Finalement, les prostaglandines E entraînent une panoplie d'effets expliqués de par leur interaction avec quatre récepteurs distincts (EP 1 à 4). Ces récepteurs diffèrent en raison de leur propriété à lier le ligand, de la distribution

tissulaire et de leur puissance. Ils sont aussi couplés à différents second messagers : l'EP1 est couplé à la protéine G α q causant l'activation de la phospholipase C et une augmentation de calcium. Les EP2 et EP4 sont couplés à la protéine G α s, ce qui augmente les concentrations d'AMPc. Le EP3, qui est le plus abondant, est couplé à une protéine G α i, ce qui diminue les concentrations d'AMPc ou peut activer la phospholipase C. La PGE₂ est davantage mitogénique et pro-inflammatoire que la PGE₃ [107, 109].

En plus des récepteurs nommés précédemment, les eicosanoïdes pourraient interagir avec des récepteurs nucléaires. Le candidat retenu jusqu'à présent est le *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPAR). Cette famille de récepteur est de type facteur de transcription; elle régule l'expression de gènes associés au métabolisme lipidique ou encore sur la production de cytokines. L'activation de ces récepteurs par certaines prostaglandines a permis de constater une diminution de la production de cytokine [111].

Les prostaglandines ne sont pas stockées, elles sont synthétisées *de novo* à partir d'AG à 20 carbones relâchés des membranes lors d'un stimulus tel un trauma mécanique, les cytokines, des facteurs de croissance ou autres (collagène et adenosine diphosphate des plaquettes, bradykinine et thrombine des cellules endothéliales). Ces stimuli activent soit la phospholipase et /ou les cyclo-oxygénases. De plus, contrairement aux hormones qui agissent de façon systémique, les prostaglandines agissent de façon autocrine et paracrine, leur demi-vie est très courte [107].

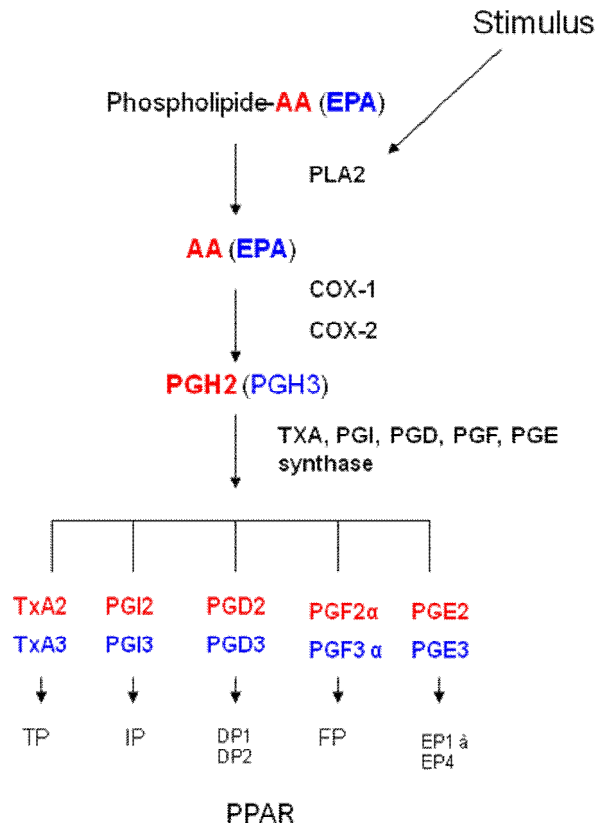


Figure 3. Synthèse des prostaglandines à partir des AG essentiels ω -3 (voie en bleu) et ω -6 (voie en rouge). Les AG AA et EPA sont relâchés des membranes par les phospholipases (PLA2) activées par différents stimuli. Puis, les cyclo-oxygénases 1 et 2 conduisent à la formation de l'intermédiaire PGH. Finalement, via les différentes synthases, les prostaglandines de série 2 et 3 pour l'AA et l'EPA respectivement seront générées et iront lier leurs récepteurs respectifs pour induire leur réponse.

3.2.2 Voie des leucotriènes

D'un autre côté, les leucotriènes sont générés par les lipoxygénases 5, 12 ou 15, principalement par les cellules inflammatoires telles que les leucocytes polymorphonucléaires, les macrophages ou les mastocytes. Une activation cellulaire par le complexe immunitaire, des peptides bactériens ou d'autres stimuli causent l'activation des phospholipases, mais aussi de la 5-lipoxygénase (5-LOX). La 5-LOX se retrouve dans le cytosol ou dans le noyau, dépendamment du type cellulaire. Son activation cause sa translocation aux membranes [107]. Une fois relâchée par les phospholipases, l'AA est convertie en série 4 de leucotriène par l'action de lipoxygénases : leucotriène B₄ (LTB₄),

leucotriène C₄ (LTC₄), leucotriène D₄ (LTD₄) et leucotriène E₄ (LTE₄), tandis que l'EPA dessert la série 5 de leucotriènes, dont la leucotriène B₅ (LTB₅), leucotriène C₅ (LTC₅) et leucotriène E₅ (LTCE₅) [102, 103].

Dans un premier temps, 5-LOX transforme l'AA en intermédiaire 5-HPETE, puis en LTA₄ avec l'action conjointe de FLAP (*5-lipoxygenase-activating-protein*). LTA₄ est ensuite orientée dans différentes voies : hydrolyse, conjugaison aux glutathions ou au métabolisme transcellulaire. Des eicosanoïdes bioactifs sont alors générés. L'attaque hydrolytique de LTA₄ par la leucotriène A₄ hydrolase conduit au LTB₄, un chimioattractant des neutrophiles qui stimule aussi l'adhésion leucocytaire aux cellules endothéliales, la production de cytokines et la sécrétion de mucus [112]. La conjugaison de LTA₄ au glutathion forme le LTC₄. Cette action est catalysée par la LTC₄ synthase. LTC₄ stimule aussi la production de cytokines, la synthèse de collagène et la contraction des muscles lisses dans plusieurs tissus. LTC₄ peut être transporté en dehors de la cellule par un transporteur (tel MDR1 : *multidrug resistance-associated protein*) ce qui régule la migration des cellules dendritiques aux ganglions lymphatiques. LTC₄ peut enfin être transformé par un métabolisme extracellulaire en LTD₄ et LTE₄ qui causent une contraction lente et soutenue du muscle lisse [107].

Les leucotriènes agissent via des RCPG, quatre d'entre eux sont décrits. Le récepteur B-LT₁ à haute affinité lie le LTB₄ à de faibles concentrations, le B-LT₂ lie aussi le LTB₄ mais avec des concentrations plus élevées. Deux récepteurs de type cystényl leucotriène CysLT₁ et CysLT₂ médient l'action de LTC₄, LTD₄ et LTE₄. CysLT₁ se retrouve sur les muscles lisses respiratoires et sur les cellules endothéliales vasculaires promouvant la bronchoconstriction et la régulation positive des molécules d'adhésion cellulaire. CysLT₂ se situe au niveau des veines pulmonaires, de la rate, des fibres de Purkinje cardiaques et sur les surrénales. Le rôle des leucotriènes de série 4, obtenues à

partir de l'AA, est essentiellement d'augmenter la perméabilité des capillaires et via des propriétés chimiotactiques, d'attirer les neutrophiles et sont prolifératifs [107].

D'un autre côté, à partir des lipoxygénases 12 ou 15 (12-LOX et 15-LOX) ainsi que de l'AA, des lipoxines (LXA₄ et LXB₄) sont formées et conduisent à des métabolites anti-inflammatoires [113]. Ils participent entre autres à la résolution de l'inflammation en régulant de façon négative l'infiltration leucocytaire, en diminuant la production de cytokines pro-inflammatoires et en encourageant la phagocytose. L'interaction de LXA₄ avec son RCPG ALX médie l'action protectrice de cette lipoxine en inhibant l'activation de NF-κB, en bloquant la biosynthèse des leucotriènes, en antagonisant le récepteur CysLT1 des leucotriènes, et en régulant la chémotaxie leucocytaire [114].

La série-5 de leucotriènes obtenue à partir des ω-3 (EPA) antagonise l'effet de la série-4 des ω-6. Le LTC₅ utilise le même transporteur que LTC₄, donc diminue son exportation et ainsi son activité via le métabolisme extracellulaire. Bien que LTB₅ soit beaucoup moins puissant que LTB₄, LTC₅ a une puissance comparable à LTC₄, et peut donc antagoniser son activité [112]. Des suppléments d'huile de poisson ont d'ailleurs montré une diminution de la production de cytokines inflammatoires stimulée par la série 4 de leucotriènes [115].

De façon plus récente, les résolvines et protectines dérivées des ω-3 EPA et DHA ont été démontrées comme ayant un rôle important dans la résolution de l'inflammation. À partir de l'EPA, de DHA, de la COX-2 acétylé par l'aspirine suivie de la 5-LOX, les résolvines sont obtenues. La résolvine E1 (RvE1) obtenue à partir de l'EPA interagit via un RCPG ChemR23 couplé à la voie PI3K/Akt. Le récepteur est exprimé fortement sur les cellules dendritiques ainsi que sur les monocytes et stimulent entre autres la phagocytose. La RvE1 interagit aussi avec d'autres récepteurs. Il participe à une diminution de

l'infiltration leucocytaire, de la production de cytokines inflammatoires et il antagonise l'induction de cytokines par LTB₄. D'une autre part, la résolvine E2 (RvE2) réalise des fonctions similaires, mais elle agirait via des récepteurs distincts. La série D de résolvine est obtenue par les DHA (RvD). Les RvD réduisent l'expression des molécules d'adhésion, donc régulent l'interaction leucocyte/endothélium. Elles réduisent aussi l'infiltration excessive et l'activation des neutrophiles en plus de promouvoir la phagocytose ainsi que la clairance des cellules apoptotiques et des microbes. RvD1 signale via son RCPG GPR32, mais aussi via ALX, surtout au niveau des cellules endothéliales. RvD2 diminue la production de cytokines pro-inflammatoires et est exprimée fortement par les cellules dendritiques. Les RvD3 à 6 sont répertoriées, elles ont des actions similaires [114, 116].

3.3 Ratio oméga3/oméga6

Les AG essentiels utilisent les mêmes enzymes afin d'aboutir aux ω -3 et ω -6 à longues chaînes EPA-DHA et AA, respectivement. Puis, les cyclo-oxygénases et lipoxygénases conduisent à la formation d'eicosanoïdes prostaglandines et de leucotriènes, et sont aussi partagés tout comme les synthases. Le ratio d'AG acquis par la diète est donc à tenir en considération [117].

En premier, la série d'élongases et de désaturases permet d'obtenir l'EPA-DHA et l'AA à partir de l'ALA ou de LA. Certaines études montrent une inhibition de la formation d'AA avec des suppléments en ALA et/ou avec de l'huile de poisson [118]. L'aboutissement à l'EPA et DHA serait plutôt obtenu selon la quantité ingérée d'ALA et non pas selon le ratio ALA/LA consommé. Le DHA doit utiliser à deux reprises la Δ 6-désaturase, ce qui peut expliquer que la quantité influence sa synthèse plutôt que le ratio. De plus, une quantité faible d'EPA-DHA est obtenue à partir d'ALA, l'efficacité des élongases et désaturases chez l'homme est moindre, il est donc plus efficace d'en consommer directement [119]. Lorsque les AG à longues chaînes sont consommées par la

diète, leur synthèse à partir d'ALA et LA est inhibée. L'effet de compétition à ce niveau n'est donc pas considérable [108].

Deuxièmement, la formation des prostaglandines se fait en fonction du ratio d' ω -3/ ω -6 présent. Pour aboutir à la formation des prostaglandines, la première étape consiste en la libération des AG à longues chaînes par les phospholipases. Celles-ci n'ont pas de préférence pour l'un ou l'autre des AG. La compétition se fait au niveau des cyclo-oxygénases. Le substrat favorisé est l'AA, toutefois l'EPA utilise aussi la COX-1 et la COX-2 à plus faible niveau, et peut inhiber la formation de prostaglandines à partir de l'AA par la COX-1 [110]. Un ratio plus élevé ω -3/ ω -6 diminue la formation des prostaglandines de série 2 au profit de la série 3. De même manière, ce ratio inhibe la formation de leucotriènes de type 4 pour avantager celle de la série-5 par compétition pour les lipoxygénases. Finalement, les différentes synthases pourraient aussi avoir une affinité plus ou moins grande pour l'une ou l'autre des voies comme discutés précédemment. L'impact n'est toutefois pas majeur.

Actuellement et depuis l'industrialisation, le ratio ω -3/ ω -6 consommé par les Nord-américains est passé de 1/1 à 1/15-20 en quelques décennies seulement [120], ce qui pourrait possiblement expliquer la progression de maladies inflammatoires dans nos sociétés.

3.4 Propriétés des Oméga 3 et Oméga-6

Les membranes forment la barrière des cellules et des organelles qui leur confèrent une perméabilité sélective. Elles sont constituées en majeure partie de lipides et de protéines ainsi qu'en plus faible mesure de glucides sous forme de glycoprotéine ou de glycolipide. Les acides gras polyinsaturés consommés à travers la diète jouent sur la composition membranaire, ils sont rapidement intégrés à son contenu. Ils ont la propriété de

diminuer le point de fusion et d'augmenter la fluidité membranaire. Les AG ω -3 et ω -6 influencent la conformation des protéines membranaires en facilitant leur déplacement et leur arrangement en microdomaine, conduisant ainsi à un équilibre conformationnel. Un changement au niveau des protéines membranaires a un impact important sur le signalement cellulaire et le trafic membranaire. En favorisant l'équilibre, les AG polyinsaturés contribuent au fonctionnement optimal de la cellule. Le DHA, l'AG ayant le plus grand nombre d'insaturation, a un rôle essentiel dans la fluidité membranaire, modulant la structure et la fonction des membranes et jouant un rôle important au niveau cérébral [121]. Une déficience membranaire de DHA altère les fonctions mentales et l'acuité visuelle [122]. Les AG contenus dans la membrane des mitochondries ont un rôle important dans divers processus mitochondriaux, dont le contrôle de l'homéostasie du calcium, de l'expression de gènes, de la chaîne respiratoire, de la production de ROS ainsi que sur l'apoptose mitochondriale [123].

Une fois intégrés aux membranes, les dérivés eicosanoïdes de l'EPA, DHA et AA ont un rôle important dans le contrôle et le maintien d'une réponse inflammatoire. Les dérivés eicosanoïdes de l'AA sont associés à un état davantage pro-inflammatoire, toutefois ce n'est pas le cas pour tous ces médiateurs. Rappelons que les lipoxines générées à partir de l'AA via les enzymes LOX ont une action anti-inflammatoire et prérésolution de l'inflammation. Les dérivés des ω -3 EPA et DHA participent à une action anti-inflammatoire en inhibant la production de médiateurs inflammatoires issus des ω -6 par compétition enzymatique, mais aussi par d'autres médiateurs. Les résolvines E et D ainsi que les protectines en découlant ont une action anti-inflammatoire et prérésolution de l'inflammation [113, 116]. De plus, certains des métabolites issus des ω -3 ont une action pro-inflammatoire, mais moindre que ceux obtenus des ω -6, donc sont souvent sans conséquences à ce niveau. Pour citer un exemple, le LTB₅ obtenu des ω -3 est un agent chimioattractant plus faible que le LTB₄ issu des ω -6. Une diète riche en ω -3 au détriment

des ω -6 montre une diminution des cytokines et marqueurs pro inflammatoires IL-1 β , IL-6, TNF- α et de la protéine C réactive ainsi que des molécules d'adhésion [124]. Donc, les ω -3 ont des propriétés anti-inflammatoires et prérésolution de la phase inflammatoire.

Finalement, les AG jouent un rôle sur l'expression génique via leur action sur des récepteurs nucléaires. Les ω -3 et ω -6 s'avèrent des ligands des récepteurs de la famille PPAR, soit directement ou par les eicosanoïdes en dérivant. Les AG à longues chaînes s'y lient plus facilement. Quatre isoformes de PPAR sont actuellement décrits : alpha, beta, delta et gamma. La liaison du ligand au récepteur cause une dimérisation avec le *retinoid X receptor* (RXR). Cette dimérisation va réguler des gènes possédant un élément de réponse à PPAR dont ceux impliqués dans le métabolisme des lipides et de l'inflammation. Le rôle de la liaison des AG aux PPAR dépend du type cellulaire. La liaison à PPAR α encourage la β -oxydation, les ω -3 semblent plus efficace à l'induire. D'une autre part, les AG peuvent aussi lier PPAR γ , réduisant ainsi l'expression de gènes inflammatoires, tout comme ils peuvent inhiber ceux induits par NF- κ B codant pour des cytokines inflammatoires, molécules d'adhésion ou chémokines [124, 125]. Les ω -3 ont montré une diminution dans la phosphorylation de l'inhibiteur κ B du NF- κ B, le gardant ainsi inactif [126].

3.4.1 Maladies Cardiovasculaires

Un regard s'est porté sur les ω -3 en raison de l'observation du peu d'incidences de maladies cardiovasculaires chez les populations du Grand Nord. Les Inuits qui ont une alimentation riche en animaux marins ont une faible incidence de maladies cardiovasculaires. De plus, des études épidémiologiques arrivent à la conclusion qu'un apport important en fruit de mer ou poisson à haut niveau d' ω -3 diminue l'incidence de souffrir de pathologies cardiovasculaires. Donc, la conclusion à ce niveau est qu'un apport élevé en ω -3 confère un ratio élevé ω -3/ ω -6, et une diminution d'atteintes cardiovasculaires, contrairement aux Nord-américains qui présentent un ratio qui tourne autour de 1/15 à 20 [127]. De nombreuses études ont démontré qu'une consommation

élevée de poisson ou d'huile de poisson diminue les chances d'être atteint de plusieurs maladies cardiovasculaires : IM, mort subite cardiaque, maladies coronariennes, fibrillation auriculaire et défaillance cardiaque. Ceci est dû aux effets bénéfiques que procurent les ω -3, plus précisément les longues chaînes EPA/DHA sur le plan cardiovasculaire impliquant une action hypotriglycéridémique, hypotensive, anti-inflammatoire, anti-athérosclérotique et anti-arythmique [128].

En premier lieu, des concentrations élevées sanguines de triglycérides sont liées à un risque accru de maladies cardiovasculaires. Toutefois, il est intéressant de noter que les ω -3, obtenus via une consommation maritime plus que végétale, diminuent les niveaux de triglycérides sanguins. D'une part, les AG ω -3 diminuent la synthèse de particules *very low density lipoprotein* (VLDL) qui transportent les triglycérides vers le foie, augmentent la clairance des triglycérides associés aux VLDL et aux chilomicrons via l'action possible d'enzymes telle la lipoprotéine lipase. Ceci contribue à une diminution des triglycérides sanguins. D'une autre part, les AG et eicosanoïdes dérivant des ω -3 sont des ligands des récepteurs PPAR, ce qui contribue à une augmentation de la β -oxydation des AG et à une diminution de la lipogenèse hépatique. Puis, le *sterol-regulatory-element-binding-proteins* (SREBP) régulé de façon négative par les ω -3 diminue l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des AG [129]. Donc, via ces actions, les ω -3 collaborent à la diminution des triglycérides sanguins, ils s'avèrent efficace chez des patients hypertriglycéridémiques. Une dose de trois à quatre grammes par jour permet de réduire les niveaux de triglycérides de 30 à 45% [130].

Dans un deuxième temps, l'hypertension artérielle entraîne un risque accru d'atteintes cardiovasculaires. Il est estimé que 20% de la population mondiale adulte souffrent d'hypertension, la prévalence augmentant avec l'âge. Les ω -3 peuvent moduler la pression sanguine. Ils se sont d'ailleurs montrés efficaces dans bons nombres de modèles

expérimentaux [131] ainsi que chez des patients hypertendus. Des protéines issues des ω -3 pourraient être responsables de cette baisse de la pression artérielle. Les mécanismes d'actions proposés pour cette action antihypertensive des ω -3 sont une inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, une augmentation de la biodisponibilité du NO, une diminution de la production de vasoconstricteurs et l'action de prostanoïdes vasoactives. De plus, les ω -3 activent le système nerveux parasympathique, produisant une vasodilatation [132].

Troisièmement, l'effet anti-inflammatoire des ω -3 décrit précédemment peut contribuer à une incidence plus faible de maladies cardiovasculaires. De par cette action, ces AG peuvent stabiliser les plaques athéromateuses, l'inflammation étant un processus important contribuant à l'athérosclérose [133]. Une étude conduite sur une période de deux ans montre qu'un supplément d'huile de poisson (EPA et DHA), chez des patients avec antécédents de maladies coronariennes, diminue la progression des plaques athéromateuses et encourage même leur régression. Celle-ci a été observée par une augmentation du diamètre du vaisseau. De plus, les ω -3 s'incorporent aux plaques athéromateuses lorsque consommés, ce qui les stabilisent, contrairement aux ω -6 [134]. Ceci peut s'expliquer par une diminution de l'agrégation plaquettaire encouragée par les ω -3. Rappelons que les eicosanoïdes dérivés des ω -3 antagonisent ceux obtenus des ω -6. De ce fait, la TXA_3 issue des ω -3 antagonise l'effet pro-agrégant de la TXA_2 .

Dans un quatrième temps, les ω -3 ont un effet anti-arythmique, mais celui-ci dépendrait de l'état pathologique cardiaque et des mécanismes à la cause de l'arythmie, celle-ci étant caractérisée par une activité irrégulière du tissu cardiaque. Ces AG modulent les canaux ioniques, principalement les canaux sodiques dépendants du voltage, les canaux calciques de type L et les canaux potassiques sortants, encourageant une action anti-arythmique [135].

En somme, les ω -3 contribuent à la santé cardiovasculaire, et peuvent diminuer la mortalité y étant reliée tout en étant bénéfiques en prévention secondaire.

3.4.1.1 Infarctus du myocarde

Les ω -3 ne semblent pas avoir d'effet sur la survenue d'un premier IM [136]. Toutefois, ils diminuent l'incidence de mort cardiaque soudaine et s'avèrent ainsi bénéfiques en prévention secondaire pour l'IM. Deux études ont été réalisées chez un bon nombre de patients survivants d'un IM : l'étude GISSI-prevenzione où des patients ont eu des suppléments d' ω -3 sous forme végétale et marine à une dose d'un gramme par jour sur une période de trois à cinq ans ainsi que l'étude DART où les patients ont ajouté à leur alimentation deux portions de poisson par semaine pendant une période de deux ans. Ces études ont démontré une diminution de la mortalité toute cause et celles reliées au système cardiovasculaire [137]. De plus, un bas niveau d'EPA est un prédicateur de mortalité chez les patients ayant subi un IM.

D'un autre côté, une prise d' ω -3 via l'huile de poisson avant l'apparition d'un IM diminue la taille de l'infarctus évaluée par la créatinine phosphate et l'activité du lactate déshydrogénase chez les patients [138]. Chez le rat, des ω -3 consommés via une source végétale et animale montrent une augmentation de leur présence dans le plasma, dans les membranes, dans les mitochondries cardiaques et corrélent avec une diminution de la taille d'un infarctus [139]. Au même titre que chez le lapin, une infusion d' ω -3 diminue la taille de l'infarctus via possiblement une régulation positive de la protéine de choc thermique 72, une protéine impliquée dans le cardioprotection, et montre des lésions oxydatives en période ischémique moindre. Chez le cochon, une infusion péricardique de DHA montre aussi une diminution de la taille de l'infarctus ainsi que d'arythmie ventriculaire responsable de nombreuses mortalités chez des patients à la suite d'un IM [140]. La diminution dans la taille de l'infarctus par une diète élevée en ω -3 pourrait s'expliquer par

un rythme cardiaque plus lent en période ischémique diminuant ainsi la demande en oxygène ou par une diminution de l'inflammation, de l'agrégation plaquettaire ou encore par une inhibition du procédé apoptotique [133]. Plus précisément, des travaux réalisés dans notre laboratoire montrent dans notre modèle expérimental d'IM une diminution de la taille de l'infarctus ainsi qu'une activation d'Akt. Possiblement que la voie RISK serait impliquée dans la cardioprotection que confère ces AG à la suite d'un IM [93].

Finalement, les ω -3 en plus d'être bénéfiques en prévention primaire en raison d'une diminution dans la taille d'un infarctus, s'avèrent hautement importants en prévention secondaire. Ils diminuent l'incidence d'épisodes récurrents ainsi que de la mortalité. Il est d'ailleurs recommandé aux patients post-IM d'en consommer sur une base régulière [141].

3.4.2 Dysfonctionnement cérébral

Les ω -3 (DHA, EPA) sont essentiels au développement pré et post natal du cerveau, sont parties importantes de la rétine, donc des fonctions visuelles. Ces AG ont aussi un rôle important dans le contrôle du comportement ainsi que des émotions. Ces deux AG conduisent à la formation de neuroprotectines. Celles-ci s'avèrent bénéfiques dans de multiples pathologies : déficit de l'attention/hyperactivité, autisme, dyslexie, dysphasie, même au niveau des troubles dépressifs et de la bipolarité. De faibles niveaux d'EPA et de DHA sont associés à des déficits cognitifs, et se retrouvent aussi chez des patients souffrants de dépression. En ce sens, les AG DHA pourraient prévenir l'apparition de perturbations dans les fonctions cérébrales associées au vieillissement. Dans une population saine, un ratio élevé AA/EPA-DHA, donc une diète riche en ω -6 et plus faible en ω -3, est associé à une incidence plus élevée de symptômes dépressifs [142].

L'effet d'une monothérapie aux ω -3 chez des patients avec dysfonction cognitive ou Alzheimer s'est montrée efficace à améliorer les fonctions cognitives, tout comme des

suppléments de DHA et d'EPA ont montré une amélioration des symptômes chez des patients dépressifs [143]. Le groupe montréalais de *Lesperance et al* ont montré, avec un traitement de huit semaines avec une dose de 1,05 g d'EPA combiné à 150 mg de DHA versus de l'huile de tournesol, une tendance à améliorer le comportement dépressif avec les ω -3 mais un effet significatif est apparu chez les patients dépressifs avec trouble anxieux [144]. Ajoutons qu'un traitement de huit semaines à la fluoxétine ou aux ω -3 a eu un effet antidépresseur, mais qu'une combinaison des deux agents s'est avérée davantage efficace [145]. L'ajout d' ω -3 chez les patients dépressifs permettrait de diminuer les doses d'antidépresseur données, diminuant ainsi les effets secondaires et étant bénéfique chez les patients résistants aux traitements pharmacologiques actuels. Toutefois, une combinaison avec la sertraline n'ajoute pas de bénéfice supplémentaire [146].

3.4.2.1 Mécanismes à l'origine de l'effet antidépresseur des oméga-3

Plusieurs mécanismes ressortent quant à l'explication de l'effet bénéfique des ω -3 sur les maladies neurodégénératives ainsi que sur la dépression. D'abord, un premier effet s'observe avec les ω -3 sur la régulation de l'HPA. Chez le rat recevant une diète riche en ω -3 précédant l'induction d'un stress, l'anxiété, le comportement dépressif et les niveaux de corticostérone (l'équivalent au cortisol chez l'humain) sont moindres que chez le groupe témoin [147]. Ceci pourrait expliquer les cas où l'effet antidépresseur est plus prononcé chez les patients avec anxiété.

Un autre effet des ω -3 pourrait se faire au niveau des neurotransmetteurs. Chez des patients sains recevant des suppléments d'EPA et de DHA, sous forme de capsule d'huile de poisson, une diminution des niveaux d'adrénaline et de noradrénaline plasmatique a été observée. De plus, une déficience en DHA est associée à une altération dans la stabilité des membranes neuronales, dans la transmission sérotoninergique (augmentation de 5-HT₂ et du métabolite de la sérotonine dans le liquide céphalorachidien), noradrénergique et

dopaminergique (diminution des récepteurs dans le cortex frontal ainsi que du stockage), pouvant expliquer l'effet émotionnel et cognitif associé à la dépression [148].

Encore une fois, l'effet anti-inflammatoire que procurent les ω -3 est bénéfique autant pour la dépression que pour d'autres troubles neurodégénératifs tel l'Alzheimer. L'EPA, en s'incorporant aux membranes, inhibe celle de l'AA ainsi que celle des dérivés qui en découlent. De par cette action, l'EPA prévient et diminue les manifestations plutôt somatiques (faiblesse généralisée, malaise, fatigue, douleur aux muscles et jointures, perte d'intérêt, perte d'appétit, incapacité à se concentrer) reliées à la dépression ainsi que la comorbidité y étant associée. Une déficience en EPA peut contribuer aux symptômes dépressifs reliés aux cytokines inflammatoires [148]. L'action anti-inflammatoire serait aussi bénéfique dans le cadre de l'Alzheimer, tout comme la diminution du cholestérol qu'amènent les ω -3.

Finalement, les ω -3 amènent une neuroprotection de par un effet anti-apoptotique. Le DHA est présent de façon importante au niveau du cerveau, et aboutit à la formation de la neuroprotectine D1. Celle-ci augmente l'expression de protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 tout en diminuant celles étant pro-apoptotiques [149]. Une activation d'Akt active la voie PI3K. Les ω -3 facilitent sa translocation membranaire de par une augmentation de la phosphatidylsérine, un phospholipide membranaire [150]. Rappelons que les ω -3 sont des ligands de PPAR, qui se dimérise avec RXR, et contrôlent ainsi l'expression de gènes impliqués dans la différenciation, la prolifération et l'apoptose. De ce fait, l'expression de gènes induite par les ω -3 de façon directe ou indirecte au niveau cérébral peut s'avérer bénéfique dans la dépression ou dans des pathologies neurodégénérative tel l'Alzheimer.

3.4.2.2 Dépression post Infarctus du Myocarde

Les ω -3 pourraient aussi s'avérer bénéfiques dans la dépression à la suite d'un IM. Les patients possédant des antécédents de maladies coronariennes montrent une relation inversement proportionnelle entre les concentrations plasmatiques ainsi que membranaires, au niveau des érythrocytes, d' ω -3 et la présence de dépression. De ce fait, un faible ratio ω -3/ ω -6 associé à une consommation plus élevée d' ω -6 est relié à un risque accru de dépression chez les patients avec maladies coronariennes, tout comme de faible niveau d' ω -3 est remarqué chez les patients dépressifs à la suite d'un IM [151]. Il est à noter la présence d'apoptose dans le modèle expérimental utilisé dans ce présent mémoire au niveau du système limbique à la suite de l'IM [27, 65]. Les ω -3 se sont avérés efficaces à diminuer l'expression de marqueurs apoptotiques dans la région CA1 (activation de la voie intrinsèque : l'hypoxie) et du corps godronné (activé par la voie extrinsèque : inflammation) de l'hippocampe lorsque consommés avant l'occlusion [93].

Une déficience en ω -3 est reliée d'une part à la dépression et d'autre part aux maladies cardiovasculaires. Un traitement combinant l'EPA et DHA pourrait être bénéfique en diminuant l'incidence de ces pathologies, mais aussi efficace afin de contrer la mortalité cardiovasculaire observée chez les patients dépressifs. Inversement, celui-ci pourrait diminuer l'apparition de symptômes dépressifs chez les patients subissant un IM, diminuant ainsi la mortalité.

Chapitre 4 : Les probiotiques

Bien que dans l'ancien testament, Abraham appropriait sa longévité à sa consommation de lait aigre, les premiers concepts de probiotiques viennent du récipiendaire d'un prix Nobel, Eli Metchnikoff. Il affirmait, en 1908, que la longue vie menée par les paysans bulgares venait de leur consommation de lait fermenté. Le terme probiotique a été utilisé pour une première fois en 1965 par Lilly et Stillwell. Ceux-ci le définissaient comme étant une substance sécrétée par un microorganisme stimulant la croissance d'un autre. Par la suite, la définition fût reprise et modifiée à maintes reprises pour arriver à la conclusion que les probiotiques ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte et peuvent être utilisés dans différentes maladies gastro-intestinales. L'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) tout comme l'Organisation mondiale de la santé (OMS) définissent les probiotiques comme étant des micro-organismes vivants, majoritairement bactéries et levures, qui lorsque administrés en quantité suffisante, par la consommation de différents produits, confèrent un effet bénéfique sur la santé de l'hôte [152, 153].

Les plus communs sont les bactéries de fermentation lactique (*Lactobacillus*) retrouvées surtout au niveau du petit intestin, les bifidobactéries (*Bifidobacterium*) qui colonisent le côlon depuis la naissance ainsi que les levures.

Les effets principaux des probiotiques peuvent se regrouper en trois grandes catégories, soit l'immunomodulation, le renforcement de la barrière intestinale et une clairance des microbes pathogènes par compétition. Par contre, pour avoir ces effets, les probiotiques doivent tout d'abord résister à l'acidité du tractus gastro-intestinal pour ensuite coloniser leur milieu de vie respectif.

4.1 Probiotiques et physiologie intestinale

L'intestin a comme rôle l'absorption et la digestion des aliments. Quant à lui, le microbiote intestinal représente l'ensemble des bactéries y vivant. On en dénombre plus de 400 espèces et souches différentes par individu. Étant donné que la taille des cellules bactériennes est beaucoup plus petite que celle des cellules humaines, on dénombre 10 fois plus de bactéries que de cellules (10^{15} vs 10^{14}) au niveau du corps humain. La présence de cette flore joue un rôle essentiel dans le maintien de la santé de l'hôte [153].

L'intestin permet un échange entre le milieu extérieur et intérieur; il doit donc assurer un rôle de barrière afin d'empêcher l'entrée de composés toxiques. Les sécrétions intestinales, le péristaltisme, le renouvellement rapide de l'épithélium ainsi qu'un système immunitaire local confèrent une protection contre les bactéries pathogènes au niveau du tractus gastro-intestinal. De plus, de par la production d'un environnement physiologique restreint avec un pH réduit, un potentiel redox et la production de sulfide d'hydrogène, la flore intestinale résiste à la colonisation par les bactéries pathogènes. Le rôle de barrière intestinale peut se diviser en deux catégories. La première composante de cette barrière est physique et est composée d'une structure épithéliale, alors que la seconde fonctionnelle implique une abondance de cellules immunitaires tapissant les parois intestinales [153].

4.1.1 Barrière intestinale

La barrière intestinale est constituée essentiellement de cellules épithéliales spécialisées dans le transport vectoriel des nutriments. La membrane intestinale est recouverte d'un glycocalyx composé de filaments transmembranaires de glycoprotéines. La membrane plasmique des cellules épithéliales intestinales est imperméable aux substances hydrophiles. L'espace paracellulaire est tapissé de jonctions serrées et de jonctions adhérentes liant les cellules entre elles, contrôlant et restreignant ainsi la perméabilité et le passage de substances. En plus de leur rôle de barrière, les jonctions serrées sont

importantes pour le contrôle de la polarité cellulaire, la différenciation et la maturation. Une altération dans la perméabilité intestinale est présente dans plusieurs maladies gastro-intestinales incluant les infections intestinales, la maladie de Crohn, la maladie cœliaque, les intolérances alimentaires et l'entéropathie induite par la prise d'anti inflammatoire non stéroïdien [152]. Par ailleurs, une altération de l'intégrité intestinale s'observe après l'IM [154].

Toutefois, la flore commensale module la fonction de barrière. Chez le rat, une colonisation avec les bactéries *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Streptococcus viridan* augmente la perméabilité intestinale, tandis que le contraire s'observe avec *Lactobacillus brevis* [155]. Au contraire, l'adhérence d'une souche pathogène d'*E. Coli in vitro* perturbe les jonctions serrées, ce qui altère l'intégrité intestinale [156]. Une autre lignée d'*Escherichia coli* 1917, non pathogène, augmente l'expression et change la distribution des protéines zonula occludens 1 et 2, ce qui contribue à la préservation des jonctions serrées, donc au renforcement de la barrière intestinale. Ce *modus operandi* a d'ailleurs été montré *in vivo* chez la souris avec la prise de ce probiotique [157]. D'un autre côté, des protéines issues de *Lactobacillus rhamnosus* promeuvent la survie et la croissance épithéliale intestinale en diminuant des effecteurs apoptotiques de par l'activation d'Akt et via la diminution de l'expression de TNF- α [158].

La surface luminale du tractus gastro-intestinal est recouverte d'un mucus viscoélastique qui agit comme une barrière protectrice. Les bactéries pathogènes doivent traverser la couche de mucus pour pouvoir coloniser et adhérer aux cellules épithéliales. Un changement dans le contenu et la structure du mucus vient donc compromettre cette barrière de défense [153]. Les probiotiques peuvent s'attacher à cette muqueuse et ainsi inhiber le passage des pathogènes à travers cette couche. Quarante-cinq pour cent des *Lactobacillus GG* et 30% de *Bifidobacterium lactis* donnés oralement à l'homme se sont

retrouvés adhérant au mucus des échantillons fécales [159]. De plus, les probiotiques peuvent inhiber l'attachement des pathogènes aux muqueuses. Les mucines sont constituantes du mucus. Les mucines, tout comme l'immunoglobuline A et les lysozymes interagissent avec les microbes et toxines, les empêchant d'atteindre la surface épithéliale. *Helicobacter pylori* supprime l'expression des gènes MUC1 et MUC5a des mucines, tandis que les probiotiques augmentent leur expression ainsi que celle de MUC3. En augmentant l'expression des mucines et du mucus, les probiotiques inhibent l'adhérence des bactéries pathogènes à l'épithélium intestinal [152].

De plus, les probiotiques inhibent la colonisation des pathogènes par une compétition pour l'épithélium intestinale et pourraient même les déplacer s'ils y sont déjà attachés. Ils compétitionnent pour les sites de liaison à la lectine, situés sur les récepteurs glycoconjugués au niveau de la bordure en brosse intestinale, et pour les nutriments essentiels [160].

D'autres parts, un système immunitaire localisé au niveau de l'intestin est important afin d'empêcher l'invasion de pathogène. Le tissu lymphoïde intestinal est d'ailleurs l'un des plus importants : 70% de la réponse immunitaire de l'organisme provient de l'intestin [161]. Ce système lymphoïde est surnommé GALT (issu de l'anglais *gut-associated-lymphoid-tissue*).

Les probiotiques ont plusieurs effets au niveau de l'immunité intestinale. D'abord, les probiotiques augmentent la sécrétion d'immunoglobuline, principalement l'immunoglobuline A. Celle-ci est sécrétée de façon active par l'intestin et joue un rôle important dans la réponse immunitaire locale, créant une barrière contre les bactéries et virus infectieux. Des souris traitées par lactation aux bactéries *Bifidobacterium lactis* ont montré des niveaux fécaux plus élevés d'immunoglobuline A comparativement au groupe

témoin [161]. Chez les enfants souffrants de la maladie de Crohn et traités avec *Lactobacillus casei*, les niveaux d'immunoglobulines ont aussi augmentés [162]. Les probiotiques promeuvent ainsi la différenciation des cellules B, induisant leur sécrétion d'immunoglobulines.

La réponse immunitaire innée est la première ligne de défense et comprend l'action des macrophages, des cellules dendritiques et des cellules épithéliales. Cette réponse n'est pas complètement non spécifique; elle distingue le soi du non soi ainsi que les bactéries pathogènes des inoffensives via des récepteurs spécifiques. Les TLR ainsi que ceux de type NOD (*nucleotide-binding oligomerization domains*) sont exprimés au niveau intestinal et lient des molécules de type PAMP (*pathogen associated molecule pattern*) [152]. L'activation des TLR résulte en un changement de l'apoptose, de la prolifération cellulaire, de la perméabilité paracellulaire, de la sécrétion de cytokine, de l'internalisation ainsi que de la translocation des bactéries [73]. Les probiotiques activent entre autres les TLR-2 et -4. Ils peuvent ainsi moduler la perméabilité intestinale à la baisse et le processus inflammatoire via leur interaction avec le TLR-2, impliquant la PKC et la protéine zonula occludens 1 associée aux jonctions serrées. L'activation des NOD induit les cytokines inflammatoires, des gènes antimicrobiens via les voies NF- κ B et MAPK [152, 161].

D'un autre côté, les probiotiques encouragent davantage une réponse anti-inflammatoire. Ils peuvent moduler la production de cytokines intestinales. Le modèle de souris déficiente en IL-10 développe de façon spontanée des colites et a des niveaux augmentés de TNF- α et d'IFN- γ en condition basale ainsi que lors d'une stimulation au LPS. Avec un traitement aux probiotiques, souche commerciale VSL#3, les sécrétions de ces cytokines par la muqueuse intestinale sont diminuées de façon significative, d'environ 50%, autant en condition basale qu'en stimulation. Certaines des propriétés anti-inflammatoires peuvent être conséquences de l'inhibition de la voie NF- κ B par les

probiotiques. Cette inhibition peut se faire par le blocage de la dégradation de κB via l'inhibition de l'ubiquitination, par l'inhibition des protéasomes ou par la régulation du déplacement nucléo-cytoplasmique de RelA dépendant de la voie PPAR- γ [161]. *Lactobacillus rhamnosus GG* s'est montré efficace à prévenir l'induction de l'apoptose par les cytokines via l'activation d'Akt (anti apoptotique) et l'inhibition de p38/MAPK (pro apoptotique) [163].

Les effets entraînés par les probiotiques peuvent être multiples. Ils sont spécifiques à chaque espèce et peuvent s'avérer utiles afin de contrer plusieurs maladies.

4.2 Probiotiques et stress

Plusieurs preuves montrent que les probiotiques ont un effet bénéfique sur l'inflammation et sur la prévention de l'attachement des bactéries pathogènes à la muqueuse intestinale. Toutefois, il reste à voir si ces effets peuvent s'observer lorsque la barrière intestinale est altérée par des désordres autres que gastro-intestinaux, tel le stress.

L'impact du stress sur la microflore intestinale est le sujet de nombreuses études réalisées chez les animaux et chez l'humain. Un événement stressant prédispose aux désordres intestinaux. D'ailleurs, 30% des patients souffrants de dépression majeure développent le syndrome du côlon irritable. Chez l'animal, de nombreuses études démontrent qu'un stress environnemental ou émotionnel (la séparation maternelle) perturbe la microflore de par une diminution importante des Lactobacilles et Bifidobactéries. Cette réduction crée un changement dans la motilité intestinale, dans l'acidité ou au niveau neurochimique sur, la norépinéphrine, par exemple. Il en est de même chez l'humain, où un stress engendre une diminution des bactéries *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* [164, 165]. Les patients avec la maladie de Crohn souffrent souvent de symptômes dépressifs et de

déficit cognitif. La microflore de ces patients se caractérise aussi par une diminution de Lactobacilles [166].

L'intestin contient plus de 100 millions de neurones, réalisant un point de rencontre aux nerfs, aux microorganismes et aux cellules immunes. Les microorganismes peuvent activer des voies neuronales et influencer l'environnement neuroendocrine comme la sécrétion de sérotonine, de GABA ou de divers peptides bioactifs [165]. Des études récentes attribuent le rôle du stress à l'origine d'une inflammation gastro-intestinale de par l'altération de l'interaction entre les muqueuses et les bactéries, mais aussi par des changements dans l'HPA. Chez des patients avec le syndrome du côlon irritable, une suractivation de l'HPA ainsi qu'une production plus importante de cytokines inflammatoires ont été décelées, pouvant expliquer le lien entre l'intestin et le cerveau [167].

Les probiotiques peuvent influencer l'humeur via leur effet sur la production de cytokines. L'effet sur les cytokines n'est pas que local, un effet systémique s'observe aussi. Plusieurs souches de probiotiques ont montré une diminution d'IL-1 β , de TNF- α , d'IL-6 et d'IFN- γ au niveau des muqueuses, mais aussi en périphérie [168]. Une prise orale de probiotiques atténue l'inflammation des jointures chez des rats souffrants d'arthrite, leur suggérant un rôle possible contre la partie inflammatoire reliée au stress et à la dépression [169]. De plus, les probiotiques ont une action antioxydante puissante, particulièrement en prévenant la peroxydation lipidique, ce qui peut aussi avoir une influence positive chez les patients dépressifs [170].

Une combinaison de probiotiques (*Lactobacillus acidophilus* et *Bifidobacterium longum*) s'est avérée efficace pour traiter deux symptômes gastro-intestinaux reliés au stress, soit la douleur abdominale et les nausées/vomissements [171]. De plus, des résultats

de notre laboratoire ont montré, avec ces mêmes souches bactériennes données sept jours précédents l'IM puis sept jours après, une amélioration du comportement dépressif mesuré par trois tests comportementales distincts utilisés chez les modèles animaux de dépression (test d'interaction sociale, test de nage forcée, test d'évitement passif) ainsi que de l'intégrité intestinale à la suite d'un IM [172]. L'IM semble donc causer des dommages au niveau de la barrière intestinale et possiblement ainsi augmenter la réponse inflammatoire.

4.3 Probiotiques et oméga-3

Le changement crucial dans la diète au niveau des ω -3 peut influencer de façon significative la microflore intestinale, tout comme la microflore pourrait influencer les niveaux d' ω -3.

Une étude réalisée chez la souris montre qu'un supplément en huile de poisson augmente les niveaux de Bifidobactéries. Inversement, des études faites *in vitro* montrent que des ω -6 inhibent de façon spécifique la croissance des Bifidobactéries [173]. Une diète riche en huile de poisson ou en huile de lin peut augmenter les niveaux de bactéries lactiques, particulièrement de type *Lactobacillus*. Les AG polyinsaturés semblent avoir un effet sur l'adhésion des probiotiques aux cellules intestinales. L'AA diminue l'adhérence, tandis que l'EPA s'est montré efficace afin d'augmenter l'adhésion de *Lactobacillus paracasei* de 12% au niveau intestinal [174].

Cette relation entre les ω -3 et les probiotiques semble bi-directionnelle. Des recherches montrent chez des enfants qu'une prise de Bifidobacteries augmente les quantités plasmatiques d'ALA [175].

Finalement, la prévalence en dépression et désordre affectif saisonnier sont plus bas chez les Japonais que les Canadiens. Le nombre de bactéries de type Lactobacilles et

Bifidobactéries est supérieur chez l'adulte japonais, tout comme la prise alimentaire d' ω -3 [165]. Le tout suggère le rôle important qu'auraient les probiotiques à accompagner une diète riche en ω -3 dans le traitement de la dépression, tout comme dans des pathologies inflammatoires altérant l'intégrité intestinal et pouvant occasionner des symptômes dépressifs, comme l'IM.

Chapitre 5 : Hypothèses

L'ischémie-reperfusion déclenche une relâche de cytokines inflammatoires dans la circulation sanguine, mais aussi au niveau cérébral, dans le système limbique [89]. Les cytokines inflammatoires peuvent enclencher la mort cellulaire par apoptose en interagissant avec les récepteurs de mort [30] et ainsi favoriser l'apparition de symptômes de dépression.

Afin de prévenir l'apparition de ces symptômes après un IM, nous avons émis l'hypothèse que la prise d' ω -3, via une diète élevée en ω -3, de probiotiques ou d'une combinaison des deux pourrait s'avérer efficace, et ceci même si le traitement débutait après l'IM. Ce sont des additifs alimentaires avec des propriétés anti-inflammatoires. Nous pensons donc qu'ils pourraient contribuer à une diminution de l'apoptose engendrée par l'inflammation dans le système limbique, et ainsi à une amélioration de la détresse comportementale observée chez l'animal à la suite d'un IM et qui s'apparente à la dépression chez l'humain.

Chapitre 6: Article

Attenuation of post-myocardial infarction depression by nutritional interventions starting after the onset of reperfusion

Kim Gilbert^{1,2}, Jessica A.-Bréard^{1,2}, Fabio Flores Monaco¹, Alexanne Beaudoin¹, Thierno Madjou Bah^{1,3}, Thomas A. Tompkins⁴, Roger Godbout^{1,3}, Guy Rousseau^{1,2}

¹Centre de biomédecine, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal

²Département de pharmacologie, Université de Montréal

³Département de psychiatrie, Université de Montréal

⁴Institut Rosell-Lallemand inc.

Abstract

Proinflammatory cytokines play a central role in depressive-like behavior and apoptosis in the limbic system after myocardial infarction (MI). Polyunsaturated fatty acids (PUFA) omega-3 diet or the combination of *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 probiotics, when given before ischemic period, reduce circulating proinflammatory cytokines as well as apoptosis in the limbic system. This study was designed to determine if the same nutritional interventions maintain their beneficial effects when started after the onset of the reperfusion period and attenuate depressive-like behavior.

MI was induced by the occlusion of the left anterior descending coronary artery for 40 minutes in rats. After the onset of reperfusion, animals were fed with a high or low PUFA omega-3 diet, combined or not with 1 billion live bacteria of *L. helveticus* R0052 and *B. longum* R0175. At 3 days post-MI, caspase-3 enzymatic activities and terminal dUTP nick-end labelling (TUNEL)-positive cells were decreased in the CA1, dentate gyrus and amygdala with the high PUFA omega-3 diet as compared to the other diet. Probiotics attenuated caspase-3 activity and TUNEL-positive cells in the dentate gyrus and the medial amygdala. At 2 weeks post-MI, depressive-like behaviour, evaluated by 3 behavioural tests (social interaction, passive avoidance and forced swim test), was observed in the low PUFA omega-3 diet without probiotics and this behavior was attenuated with the high PUFA omega-3 diet or/and probiotics. Probiotics increased interleukin-4 plasmatic concentrations while high PUFA omega-3 diet decreased monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1). These results indicate that a high PUFA omega-3 diet or the administration of probiotics, starting after the onset of reperfusion, are beneficial to attenuate post-MI depression and apoptosis in the limbic system.

Introduction

Depressive mood is common after myocardial infarction (1) and around 20% of these patients will develop a major depression (2). The consequence of depression is important since the mortality rate is increased by 3 to 4 times as compared to non-depressive patients (3). It is thus critical to attenuate the depression without interfering with the healing of the cardiac tissue.

Depression can be caused by different mechanisms and our previous works indicated that proinflammatory cytokines, present in the limbic system after myocardial infarction and in the circulation, must be a key factor to explain depressive-like behaviour (4,5). Indeed, injection of proinflammatory cytokines may engender depressive-like behavior (6) accompanied with an alteration of neuropeptides (such as cortisol and adrenocorticotrophic hormone) (7). Moreover, the presence of proinflammatory cytokines is related to apoptosis observed in the hippocampus and the amygdala after the onset of reperfusion, peaking 3 days post-ischemia and this can be prevented by pentoxifylline, a non-specific inhibitor of the synthesis of cytokines or with PEG-TNFR1, a blocker of TNF α (4,5).

To prevent the elevation of proinflammatory cytokines, different approaches could be used, especially using dietary interventions. For example, high polyunsaturated fatty acid (PUFA) omega-3 diets reduce the circulating level of TNF α after myocardial infarction as compared to a low PUFA omega-3 diets (8). Also, high PUFA omega-3 diet reduce the level of Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), a chemokine that contributes to

inflammatory state (9,10). In parallel, it has been observed that *L. helveticus* R0052 reduces proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 but not significantly TNF- α (11) whereas *B. longum* R0175 can reduce IL-8 and TNF- α (12). In addition, it has been shown that a combination of probiotics including *L. helveticus* R0052 can elevate the concentrations of antiinflammatory cytokines IL-4 (11), modifying the balance between pro- and antiinflammatory cytokines.

Both nutritional interventions have been shown also to reduce apoptosis in the limbic system, suggesting a potential antidepressive-like effect. Thus our objective in this study is to determine if these nutritional interventions, combined or alone, could be beneficial to attenuate post-MI depressive-like behavior in our model. Moreover, although previous studies (8,13) start these nutritional interventions before the ischemic period, in the present study the nutritional interventions were started after the onset of the reperfusion period which is more clinically relevant.

Methods

Experimental design

Seventy two randomized male 3-month-old Sprague-Dawley rats weighing between 325 and 350 g (Charles River Canada, St-Constant, QC, Canada) were included in the study. Two rats in group high PUFA omega-3 diet with vehicle died, two in group high PUFA omega-3 diet with probiotics, three in group low PUFA omega-3 diet with vehicle and one

in low PUFA omega-3 diet with probiotics died during the surgical procedure. Therefore, the final analysis included data from 16 animals in each group. Animals were handled in compliance with recommendations of the local Animal Care Committee, and the investigation conformed fully to *Canadian Council on Animal Care* guidelines. The rats were housed individually under constant conditions (temperature of 21-22°C and humidity of 40-50%). The animals were maintained on a 12-h dark-light cycle, which began at 08:00 am. Chow pellets and tap water were available *ad libitum* throughout the study. An acclimatisation period of 3 days after delivery by the supplier was allowed before the rats were randomly distributed in one of the four groups, a low or high omega-3 PUFA diet in combination or not with probiotics (*L. helveticus* R0052 and *B. longum* R0175). Each group underwent a 40min occlusion of the left anterior descending coronary artery. Six rats by group (a total of 24) were sacrificed after 3 days of reperfusion for biochemical analysis and 10 rats by group (a total of 40) were sacrificed after 18 days of reperfusion for behavioural tests.

Diets

Chow pellets rich in lipid (22% protein, 42.9% carbohydrate, 20.3% fat, by weight) were supplied by Harlan Teklad (Madison, WI, USA). The respective composition in fatty acids is presented in table 1.

Probiotics

The commercial probiotics given was a combination of two genus; *L. helveticus* R0052 and *B. longum* R0175 (Probio'Stick™ provided by Institut Rosell Inc., Montreal, Que., Canada). The probiotics were administered by dissolving the freeze-dried culture or the vehicle only (maltodextrin) in 200 mL of drinking tap water. Each rat in the probiotics group received a daily dose of 10^9 colony forming units. The drinking solution was newly prepared every second day for the time of experiment. Water intake was monitored throughout the entire investigation to ensure sufficient bacteria were administered. The body weight of each rat was also monitored every day.

Surgical procedure

Animals underwent anaesthesia following a ketamine/xylazine (50 and 5mg/kg, respectively) intramuscular injection. Subsequently, the rats were intubated and anaesthesia was maintained using isoflurane (1.2%) ventilation. Electrocardiogram and heart rate were monitored throughout the procedure using electrodes placed on their paws. A left thoracotomy was carried out at the fifth intercostal space permitting the occlusion of the left anterior descending coronary artery using a 4-0 silk suture (Syneture; Covidien, Mansfield, MA, USA) and plastic snare. Ischaemia was confirmed by alterations of the ST segment and the presence of the ventricular subepicardial cyanosis. After 40min of ischaemia, the thread was removed permitting reperfusion of the myocardial tissue. Then, the thorax was sutured by means of a 2-0 silk suture (Syneture; Covidien), and the animals were given an

antibiotic intramuscular injection (15 000 IU penicillin G; Duplocillin LA, Intervet Canada Ltd, Whitby, Ont., Canada) as well as an analgesic subcutaneous injection (2mg/kg buprenorphine) before being returned to their respective cages. The animals received a second analgesic injection (0.05 mg/Kg buprenorphine) the day 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 12 days after surgery. Social interaction was evaluated on day 12, the forced swimming test was performed on days 15 and 16, and the passive avoidance step-down test on day 17. The three tests are commonly used to evaluate behaviora despair and effect of antidepressant drugs on the behavior of laboratory animals. All animals were sacrificed on day 18.

Social interaction test

One pair of rats 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 duration and number of interactions (smelling and touching) with the other rat has been measured. A decreased in interaction is associated with one of the characteristics of depressive-like behavior.

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. 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 rats were returned to their cages after each essay for at least 30 seconds. The test was started between 1:00 and 3:00 p.m. The number of trials needed to reach the test criterion and the time needed to learn the test were noted. Step-down latency is a parameter of learning and memory performance. Rats were tested 1 day before they were sacrificed.

Decapitation measurements, the area at risk of the heart, myocardial infarct size and brain dissection

After the reperfusion period (3 days or 18 days), the animals were restrained in a cone bag and rapidly sacrificed by decapitation. Decapitation was preferred as the killing method to avoid any alteration of biochemical pathways that could arise ensuing anaesthesia or CO₂ exposure. The brain and heart were rapidly removed and placed in a dish kept on crushed ice. The dentate gyrus (DG), CA1, CA3 areas of the hippocampus as well as the lateral (LA) and medial amygdala (MA) were excised from the limbic system, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until needed. In parallel, the hearts were removed and washed with saline by retrograde perfusion into aorta. The left anterior descending coronary artery was occluded at the same site to establish the area at risk (AR) with infusion of Evans blue (0.5%). The hearts were frozen (-80°C for 5 min), sliced into 4 transverse sections of 2 mm and placed in 2,3,5-triphenyltetrazolium (1%, pH 7.4) at 37°C for 10 min to better distinguish the area of necrosis (I) from AR. MI was expressed as a percentage of necrosis (I) of the AR ((I/AR) x 100). Additionally, AR was expressed as a percentage of left ventricle area (LV) ((AR/LV) x 100).

Biochemical analysis

Caspase-3 activity

Caspase-3 activity was measured according to the caspase-3 protocol described previously (14). Tissues were homogenised by sonification in lysis buffer and incubated for 30 min on

ice. The tissue homogenates were centrifuged at 4°C for 10 min. Enzymatic reactions were undertaken in reaction buffer with 25 mg of protein (attested by the Bradford method) and fluorescent substrate (Ac-DEVD-AMC) (40 mM). Reactions were studied after incubation in the dark for 3 h at 37°C and stopped with the addition of 0.4 M NaOH and 0.4 M glycine buffer. Fluorescence was quantified by spectrofluorometry (Photon Technology International, Lawrenceville, NJ, USA) at an excitation wavelength of 365 nm and emission wavelength of 465 nm.

Terminal dUTP nick-end labelling (TUNEL)-positive cells

TUNEL was undertaken according to the protocol provided by the manufacturer (Oncogene Science Inc., Uniondale, NY) and according to the TUNEL protocol described previously [90]. In summary, cryostat sections were fixed in paraformaldehyde (4%) and rinsed, then permeabilized and, after washing, the labelling reaction was performed for 1 h at 37°C. The reaction was stopped, and all nuclei were stained with propidium iodide (1 µM). The sample was viewed in a Leica epiillumination microscope with a filter for DAPI (330-380 nm). All sections were photographed at the same magnification (400x) with a Nikon Coolpix 995 camera. A total of 20-25 pictures were taken of each sample, with quantitation of positive cells on total number.

Rat Cytokines / Chemokines assay

Cytokine/Chemokine assay was performed according to the protocol provided by the manufacturer (Millipore Canada, Rat Cytokine/Chemokine Magnetic Bead 96-Well Plate). Rapidly, plasma was diluted five-fold and 200 L of assay buffer was added into each well of the plate, mixed for 10 min at room temperature and decanted. Diluted samples were incubated overnight at 4°C in the reaction mix in presence of beads and the next morning, the plates were washed and incubated 2 hours at room temperature with detection antibodies. After that, streptavidin-phycoerythrin solution was added to the wells for 30 minutes followed by the addition of sheath fluid. Plates were run on a Bio-Plex 200 system with high-throughout fluidics (Bio-Rad, Mississauga, Canada). The Median Fluorescent intensity (MFI) was analyzed to determine the plasmatic concentrations of MCP-1 and IL-4.

Statistical analysis

The data are reported as mean (\pm standard error of the mean). Two-way factorial ANOVA was performed on data between groups using diet and probiotics as factors. If interaction between diet and probiotics was significant, an analyze of simple effect was done, according to Field [176]. Myocardial infarct size and area at risk were compared using a Student T-test. Number of trials in the passive avoidance test has been evaluated using a Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$) followed by a Mann-Whitney test using a correction of Bonferroni to adjust for the number of comparisons. TUNEL staining data were evaluated

by χ^2 statistical testing, followed by portioning according to Siegel and Castellan [177], $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Food, water consumption and weight gain were similar between groups throughout the experiments (data not shown), indicating that the different diets had no influence.

Infarct size

Following 40 min of ischemia and 72 h of reperfusion, the myocardial infarct size, expressed as a percentage of the area at risk (I/AR) was similar between groups (figure 1A; $p > 0.05$). There was no significant difference observed in AR that represented approximately 60% of the LV (figure 5A). Similarly, after 18 days of reperfusion, I/AR (approximately 35%) was also equivalent among groups indicating that treatment started after MI had no protective effect on the ischemic myocardium (figure 5B; $p > 0.05$). AR/LV was also similar between groups which again represented around 60% of the LV (figure 5B).

Apoptosis in the limbic system

After 72 h of reperfusion, no significant interaction was observed for the caspase-3 activity among the five regions tested. Main effect analysis indicated that caspase-3 activity was

significant higher in the low omega-3 PUFA diet compared to the high omega-3 PUFA diet (diet factor) in the CA1 [F(1,16) = 24.04; p < 0.05], DG [F(1,19) = 11.27; p < 0.05] and in the LA [F(1,15) = 11.77; p < 0.05]. Caspase-3 activities were similar in the CA3 and MA for the diet factor (figure 6). Analysis of the probiotic factor indicates a significant reduction in the Caspase-3 activity in the DG [F(1,19) = 4.68; p < 0.05] and in the MA [F(1,15) = 5.63; p < 0.05]. No significant difference was observed in the CA1, CA3 and in the LA for the probiotic factor (p>0.05) (figure 6).

Similarly after 72 h of reperfusion, a significant increase in the number of TUNEL-positive cells was detected in the low omega-3 PUFA diet compared to the high omega-3 PUFA diet in the CA1, DG, LA and MA regions. Probiotics group show a decrease in the TUNEL-positive cells in the DG and MA regions versus the placebo group (p<0.05) (table 2). No other difference was observed.

Behavioral tests

Analyses of the results obtained in the social interaction time indicated a significant interaction between diet and probiotics [F(1,28)=5.34; p < 0.05]. Analysis of simple effects revealed lower values in the low omega-3 PUFA diet without probiotics as compared to the low omega-3 PUFA with probiotics [F(1,29)=7.40; p < 0.05], indicating the beneficial effect of probiotics in the presence of the low omega-3 PUFA diet (figure 7).

Results of the forced swim test (figure 8) indicate a significant interaction between diet and probiotics for the immobility parameter [F(1,33)=4.55; p < 0.05]. Analysis of the simple

effect show that probiotics reduced the time of immobility in the low omega-3 PUFA diet [F(1,34)=7.36; p <0.05] as compared to the low-omega-3 PUFA diet without probiotics group. Significant main effect of the diet was also observed in the escape parameter [F(1,33) = 6.44; p < 0.05], indicating that the low omega-3 PUFA diet rats pass less time to escape in this test. No difference was observed for the swimming time parameter.

In the passive avoidance step-down test, no significant interaction was observed but main effect of the diet [F(1,27)=5.65; p < 0.05] and probiotics [F(1,25)=5.33; p < 0.05] were detected indicating that the high omega-3 PUFA diet and the probiotics rats succeeded more rapidly at the test (figure 9). Number of trials indicate a significant difference between groups (chi-square=7.89, dl=3, p <0.05). The results indicate that the low omega-3 PUFA diet without probiotics group took more attempts to succeed the test as compared to the low omega-3 PUFA diet with probiotics (p = 0.029)

Cytokine/Chemokine essay

Analysis of the IL-4 plasmatic concentrations indicated that the main effect probiotics was significant higher in the probiotic group compared to vehicle [F(1,24)=6,65; p<0.05]. No other significant difference was observed between groups for IL-4. Low PUFA omega-3 diet showed a significant higher MCP-1 plasma concentrations compared to the high-PUFA omega-3 diet [F(1,30)=4,74; p<0.05]. No other significant difference was observed for MCP-1 plasma concentrations (figure 10).

Discussion

The data obtained in the present study show that after the period of ischemia, intake of high omega-3 PUFA diet for two weeks reduces depressive-like behavior observed after myocardial infarction. Similarly, the intake of probiotics *L. helveticus* R0052 and *B. longum* R0175, in combination, had a positive effect on depressive-like behavior in presence of a low omega-3 PUFA diet. The addition of probiotics to the high omega-3 PUFA diet has no additional effect on behavior after myocardial ischemia suggesting a common pathway of action between omega-3 and probiotics.

Both nutritional interventions (omega-3 and probiotics) have no significant effect on infarct size, as we expected. Indeed, it has been previously established that interventions must be started at the onset of reperfusion or soon after the procedure to be beneficial for the myocardium (17). For example, we observed that the administration of an A_{2A} adenosine receptor agonist, CGS21680, given 5 minutes before the reperfusion period induces a reduction of infarct size whereas the administration of the same compound, 5 minutes after the onset of reperfusion has no protective effect on infarct size (17). In the present study, diet or probiotics were given after the awakening of the animal following the surgical procedures, i.e. few hours after the onset of reperfusion and thus the effect on the myocardium should be minimal.

However in spite of absence of any effect of the omega-3 diet or probiotics on infarct size, we have observed that these interventions have positive effects on depressive-like behavior after myocardial infarction. Converging evidence obtained with three behavioral tests

indicate that the high omega-3 PUFA diet has positive effects on the performance of the myocardial infarction rat, as compared to the low omega-3 PUFA diet. In this condition, the addition of probiotics did not afford additional significant effect although in some tests, we observe a beneficial trend suggesting that a plateau was reached with the diet. Meanwhile, probiotics have beneficial effect on depressive behaviour in presence of the low omega-3 diet suggesting that omega-3 PUFA and probiotics may act on a common pathway since no additional effect was observed with the combination.

In an attempt to explain the beneficial effects on depressive-like behavior, we measure the apoptosis in the limbic system mainly in the hippocampus and amygdala (18). Apoptosis is difficult to document since the apoptotic cells could be phagocytosed by their neighbourhood cells. For this reason we use two different techniques to document apoptosis, caspase-3 activation and TUNEL positive cells. The results are similar in most of the regions studied for both techniques except for the medial amygdala. However since the activation of the caspase-3 is an early event compared to the presence of TUNEL positive cells, it may be possible that the difference observed in the medial amygdala is due to a delay between cell death.

In previous studies, we documented the presence of apoptosis in the amygdala and hippocampus following myocardial infarction, with a peak around the third day of reperfusion (18,19). Interestingly, pharmacological interventions with antidepressant (sertraline (18)) or others (probiotics (13)) has been shown to reduce apoptosis and also to attenuate the depressive-like behaviour when giving before myocardial infarction. The

increase of cells dying perturbs the homeostasis of the limbic system and can be responsible of the depressive-like behavior. Indeed it has been shown that neurons which have neither electrical activity nor trophic support die by apoptosis (20) and could explain the development of depression.

According to our previous work, proinflammatory cytokines could be partly responsible for apoptosis in the limbic system. In presence of pentoxifylline (5) or PEG-TNFR1 (4), apoptosis in the limbic system is attenuated after MI as compared to untreated animals, suggesting a role of proinflammatory cytokines in apoptosis. The binding of these cytokines, such as TNF α , with their receptors activate caspase-8 and ultimately the caspase-3. Probiotics and omega-3 diets (8, 21), without any significant on infarct size, decrease circulating proinflammatory cytokines which can explain the reduction of apoptosis.

Probiotics could reduce proinflammatory cytokines by different mechanisms in our experimental model of post-myocardial infarction depression like behavior. One of the potential mechanism has been pointed out in a recent study (21,22). Indeed, it has been observed that the same probiotics as the ones use in the present study improve the integrity of the intestinal barrier, which could reduce the translocation of bacterial component in the circulation and the inflammation. There is no hypothesis to explain the elevation of antiinflammatory cytokines IL-4 observed with probiotics, such as in the present study, although this elevation has been reported with other probiotics (23,24).

Similarly, we have observed that in presence of the high PUFA omega-3 diet, the plasma concentrations of MCP-1 were reduced compared to the low omega-3 diet. This reduction could be explained by the documented reduction of TNF α that we have previously observed in presence of the same high PUFA omega-3 diet (8). According to the results obtained by Diaz Encarnacion et al. (9), high PUFA omega-3 diet can reduce the TNF α stimulated transcription of the MCP-1 gene through interaction of signalling pathways involving ERK and NF- κ B. A decrease in MCP-1 could be part of the antiinflammatory and antidepressive action of omega-3.

The rapidity of the effect of the omega-3 on the apoptosis observed in the limbic system may suggest other mechanisms than the incorporation in the membrane. It has been observed that metabolites of the omega-3, such as resolvins may interact with G-protein coupled receptors such as CHEM-R23 (25) or GPR-32 (26) to induce an intracellular signal that could interrupt the inflammation by a downregulate NF- κ B factor leading to a diminution on inflammatory genes expression such as TNF α (27). The mechanism of this downregulation is not well understood, but it could be due to a decrease of the phosphorylation of I κ b factor which inhibits NF- κ B (28). Another potential explanation for the anti-apoptotic properties of omega-3 PUFA is that docosahaexanoic acid (DHA) is a precursor of neuroprotectin D, a substance that induces pro-survival signals down-regulating apoptosis (29). Systemic DHA administration, after middle cerebral artery

occlusion, helps in neuroprotectin D production (30) and may, thus, reduce apoptosis by altering the intrinsic pathway.

The difference in the omega diets is mainly due to the presence of EPA and DHA (long chain PUFA) in the high omega-3 PUFA diets and their absence in the low omega-3 PUFA diet. It is well known that the EPA and DHA may be beneficial for the heart and the brain and could explain some beneficial effects observed (31). Meanwhile it has been observed that the elongation of the alpha linolenic acid, although limited (32,33), can be possible in rats to produce DHA and EPA but can be insufficient to induce beneficial effects or the delay for the transformation is too long to have positive effect.

Interestingly, we observed that the inhibition of the apoptosis by the omega-3 or the probiotics is common for the dentate gyrus and the medial amygdala whereas reduction of the apoptosis has been observed in the CA1 and the lateral amygdala only in the omega-3 diet. These results suggest that dentate gyrus and medial amygdala play a pivotal role in the post-MI depression and their integrity are important to attenuate post-MI depression behavior.

Limitations:

One limitation of our study is that no sham groups have been included. However, the aim of the present study was to determine if a change in nutrition (PUFA omega-3 or probiotics) after the myocardial infarction could attenuate the depressive-like behaviour.

We have previously published that no change was observed in sham groups independently

of the interventions [66, 178] and that reduction of the depressive-like behaviour observed after MI with probiotics presents similar performance in the behavioural tests as the rats in the sham groups. For these reasons, no sham group has been performed in this study.

Conclusion

In conclusion, our data indicate that a high omega-3 PUFA diet or addition of *L. helveticus* R0052 and *B. longum* R0175 is beneficial after myocardial infarction to reduce apoptosis in the limbic system and to attenuate depressive-like behavior.

Acknowledgements

This work was supported by *La Fondation des Maladies du Coeur du Québec*. Conflict of interest: None declared. The authors want to thank Institut Rosell Lallemand to provide us the probiotics (*L. helveticus* R0052 and *B. longum* R0175) and the vehicle.

References

1. Guck TP, Kavan MG, Elsasser GN, Barone EJ (2001) Assessment and treatment of depression following myocardial infarction. *Am Fam Physician* 64: 641-648.
2. Meneses R, Almeida MC, Abecasis J, Arroja I, Carvalho A, et al. (2007) Depression in patients with myocardial infarction. *Rev Port Cardiol* 26: 1143-1165.
3. Frasure-Smith N, Lespérance F, Talajic M (1993) Depression following myocardial infarction. Impact on 6-month survival. *JAMA* 270: 1819-1825.
4. Kaloustian S, Bah TM, Rondeau I, Mathieu S, Lada-Moldovan L, et al. (2009) Tumor necrosis factor-alpha participates in apoptosis in the limbic system after myocardial infarction. *Apoptosis* 14: 1308-1316.
5. Wann BP, Boucher M, Kaloustian S, Nim S, Godbout R, et al. (2006) Apoptosis detected in the amygdala following myocardial infarction in the rat. *Biol Psychiatry* 59: 430-433.
6. Raison CL, Capuron L, Miller AH (2006) Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol* 27: 24-31.
7. Hayley S, Brebner K, Lacosta S, Merali Z, Anisman H (1999) Sensitization to the effects of tumor necrosis factor- α : neuroendocrine, central monoamine and behavioral variations. *J Neurosci* 19: 5654-5665.
8. Rondeau I, Picard S, Bah TM, Roy L, Godbout R, et al. (2011) Effects of different dietary omega-6/3 polyunsaturated fatty acids ratios on infarct size and the limbic system after myocardial infarction. *Can J Physiol Pharmacol* 89: 169-176.
9. Diaz Encarnacion MM, Warner GM, Cheng J, Gray CE, Nath KA, et al. (2011) n-3 Fatty acids block TNF-alpha-stimulated MCP-1 expression in rat mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 300: F1142-1151.
10. Wang S, Wu D, Matthan NR, Lamon-Fava S, Lecker JL, et al. (2009) Reduction in dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids: eicosapentaenoic acid plus docosahexaenoic acid ratio minimizes atherosclerotic lesion formation and inflammatory response in the LDL receptor null mouse. *Atherosclerosis* 204: 147-155.
11. Cazzola M, Tompkins TA, Matera MG (2010) Immunomodulatory impact of a synbiotic in T(h)1 and T(h)2 models of infection. *Ther Adv Respir Dis* 4: 259-270.
12. Wagar LE, Champagne CP, Buckley ND, Raymond Y, Green-Johnson JM (2009) Immunomodulatory properties of fermented soy and dairy milks prepared with lactic acid bacteria. *J Food Sci* 74: M423-430.
13. Girard SA, Bah TM, Kaloustian S, Lada-Moldovan L, Rondeau I, et al. (2009) *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* 102: 1420-1425.

14. Boucher M, Wann BP, Kaloustian S, Cardinal R, Godbout R, et al. (2006) Reduction of apoptosis in the amygdala by an A2A adenosine receptor agonist following myocardial infarction. *Apoptosis* 11: 1067-1074.
15. Fields A (2009) *Discovering statistics using SPSS*. London: SAGE Publications Ltd. 822 p.
16. Siegel S, Castellan NJJ (1988) *Nonparametric statistics*. Boston, Mass: McGraw-Hill.
17. Boucher M, Pesant S, Falcao S, de Montigny C, Schampaert E, et al. (2004) Post-ischemic cardioprotection by A2A adenosine receptors: dependent of phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 43: 416-422.
18. Wann BP, Bah TM, Kaloustian S, Boucher M, Dufort AM, et al. (2009) Behavioural signs of depression and apoptosis in the limbic system following myocardial infarction: effects of sertraline. *J Psychopharmacol* 23: 451-459.
19. Kaloustian S, Wann BP, Bah TM, Girard SA, Apostolakis A, et al. (2008) Apoptosis time course in the limbic system after myocardial infarction in the rat. *Brain Res* 1216: 87-91.
20. Jacobson MD, Weil M, Raff MC (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell* 88: 347-354.
21. Arseneault-Breard J, Rondeau I, Gilbert K, Girard SA, Tompkins TA, et al. (2011) Combination of *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 reduces post-myocardial infarction depression symptoms and restores intestinal permeability in a rat model. *Br J Nutr*: 1-7.
22. Arseneault-Breard J, Rondeau I, Gilbert K, Girard SA, Godbout R, et al. (2010) Probiotics inhibit behavioural signs of depression after a myocardial infarction in a rat model. *The New York Academy of Sciences*.
23. Bahrami B, Macfarlane S, Macfarlane GT (2011) Induction of cytokine formation by human intestinal bacteria in gut epithelial cell lines. *J Appl Microbiol* 110: 353-363.
24. Hoppu U, Isolauri E, Laakso P, Matomaki J, Laitinen K (2011) Probiotics and dietary counselling targeting maternal dietary fat intake modifies breast milk fatty acids and cytokines. *Eur J Nutr*.
25. Arita M, Ohira T, Sun YP, Elangovan S, Chiang N, et al. (2007) Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation. *J Immunol* 178: 3912-3917.
26. Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N, Yacoubian S, Lee CH, et al. (2010) Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 1660-1665.
27. Adkins Y, Kelley DS (2010) Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J Nutr Biochem* 21: 781-792.

28. Ross JA, Maingay JP, Fearon KC, Sangster K, Powell JJ (2003) Eicosapentaenoic acid perturbs signalling via the NFkappaB transcriptional pathway in pancreatic tumour cells. *Int J Oncol* 23: 1733-1738.
29. Mukherjee PK, Marcheselli VL, Barreiro S, Hu J, Bok D, et al. (2007) Neurotrophins enhance retinal pigment epithelial cell survival through neuroprotectin D1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 13152-13157.
30. Belayev L, Khoutorova L, Atkins KD, Bazan NG (2009) Robust docosahexaenoic acid-mediated neuroprotection in a rat model of transient, focal cerebral ischemia. *Stroke* 40: 3121-3126.
31. Zhu BQ, Sievers RE, Sun YP, Morse-Fisher N, Parmley WW, et al. (1994) Is the reduction of myocardial infarct size by dietary fish oil the result of altered platelet function? *Am Heart J* 127: 744-755.
32. Heller A, Stehr S, Koch T (2006) Omega 3 fatty acids in clinical nutrition. New York: Nova Science Publishers, Inc.
33. Lands WEM (2005) Fish, Omega-3 and human health. Champaign, Illinois: American Oil Chemists' Society Press.
34. Bah TM, Benderdour M, Kaloustian S, Karam R, Rousseau G, et al. (2011) Escitalopram reduces circulating pro-inflammatory cytokines and improves depressive behavior without affecting sleep in a rat model of post-cardiac infarct depression. *Behav Brain Res* 225: 243-251.

Figure legends



Figure 4. TTC stains are shown. The darkest blue colored section stained with evans' blue, represents the no-risk zone with no ischemia present. The black colored section represents the live tissue within the risk zone, normally stained with TTC red. Lastly, the white colored section within the risk zone represents the infarct which has not been colored by the TTC-red stain.

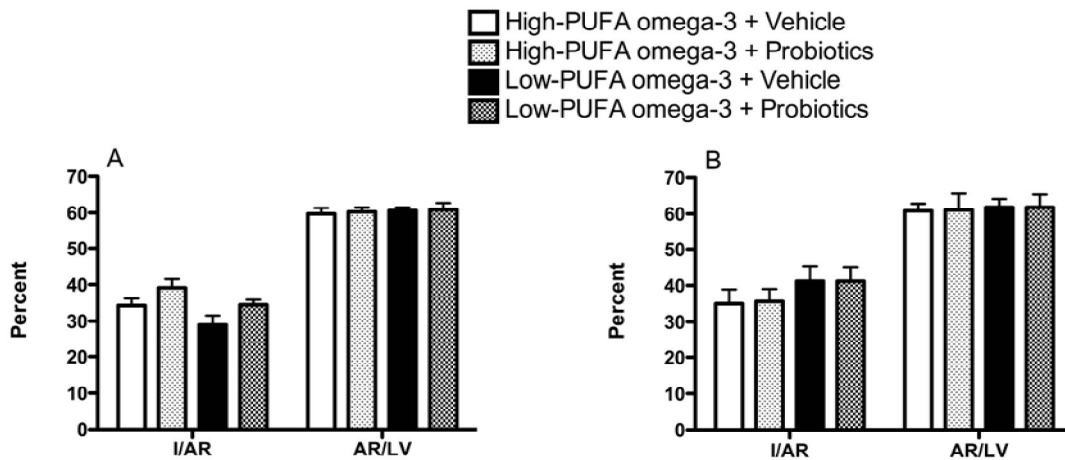


Figure 5A. Infarct size, assigned by necrosis area (I) expressed as a percentage of the area at risk (AR) is similar between groups high omega-3 PUFA diet with vehicle, high omega-3 PUFA diet with probiotics, low omega-3 PUFA diet with vehicle and low omega-3 PUFA diet with probiotics. There is also no difference in AR, expressed as a percentage of the left ventricle (LV) between groups at 72 h of reperfusion (n = 6 in each group). **B:** After 18 days of reperfusion, there is no difference among the groups in infarct size-area at risk ratio (I/AR) neither in area at risk on left ventricle (AR/LV) (n=9-10 in each group).

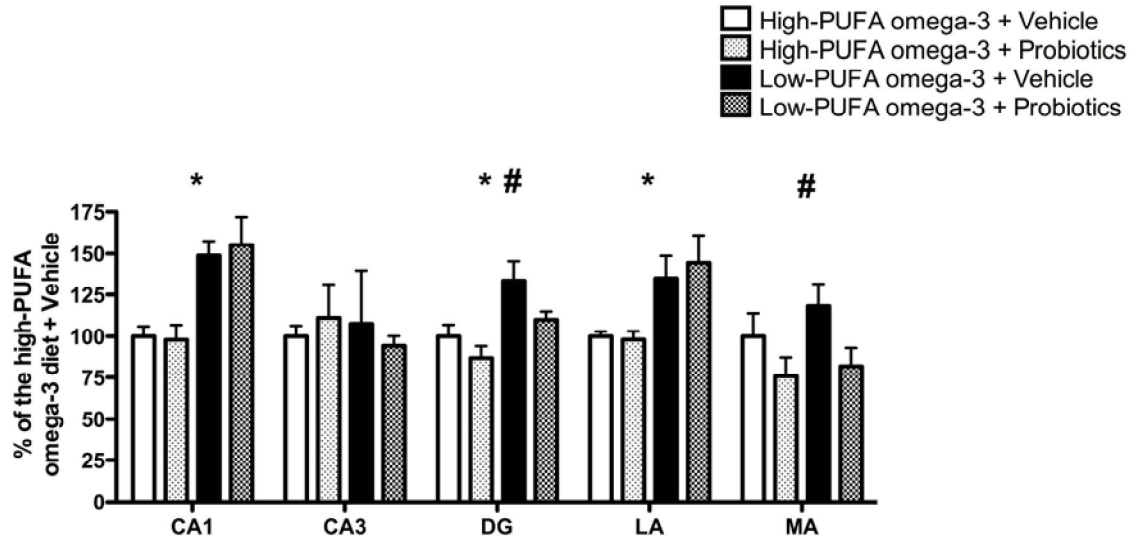


Figure 6. Caspase-3 activity, expressed as a percent of the high omega-3 PUFA diet + vehicle, in different limbic regions assessed by *in vitro* spectrofluorescence after 72 h of reperfusion. *CA1* hippocampal CA1; *CA3* hippocampal CA3, *DG* dentate gyrus; *LA* lateral amygdala; *MA* medial amygdala. n=4-6/group. * indicates a significant difference ($p < 0.05$) for the diet factor; # indicates a significant difference ($p < 0.05$) for the probiotic factor.

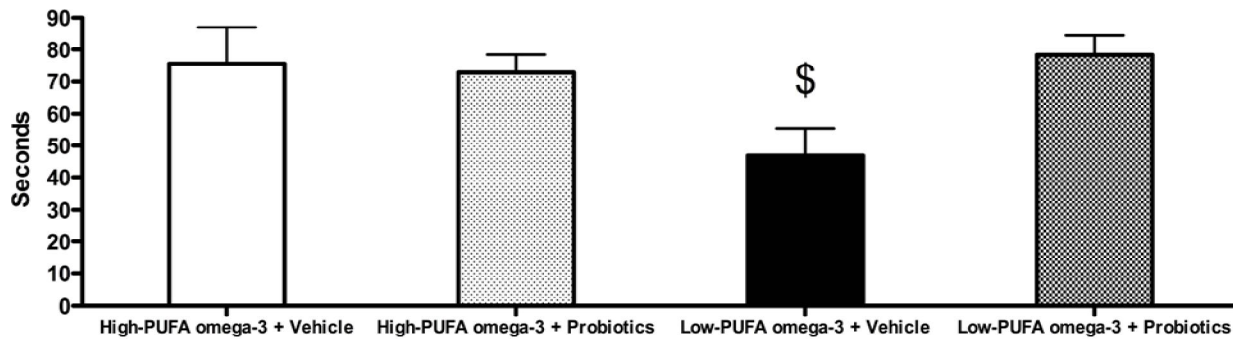


Figure 7. Results of social interaction test proceed on the 12th day of reperfusion in seconds. n=8-10/groups. \$ indicates a significant interaction ($p < 0.05$).

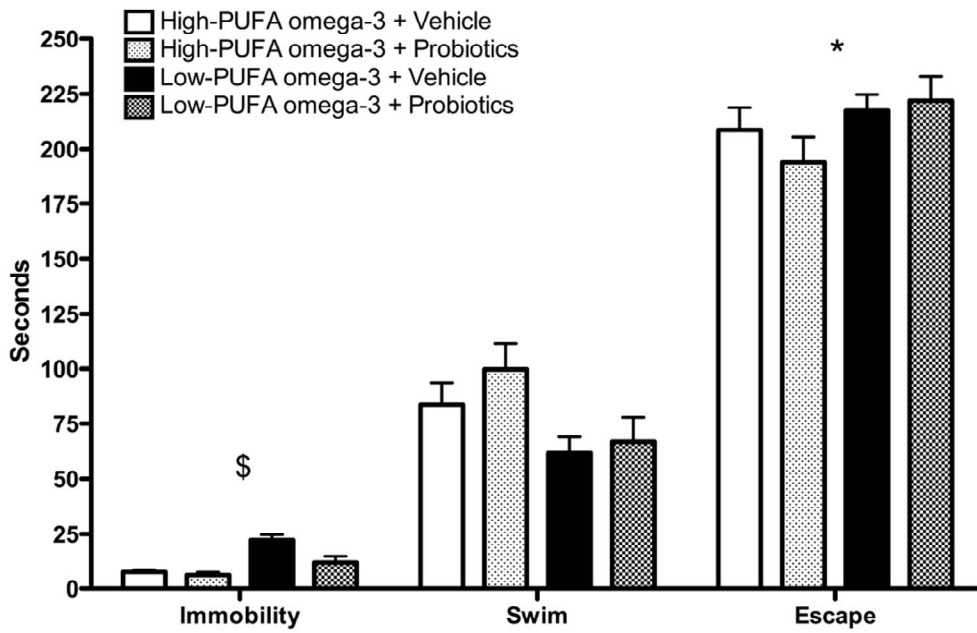


Figure 8. Results of the forced swim test proceed on the 16th day of reperfusion. n=9-10/group. In immobility time, \$ indicates a significant interaction ($p < 0.05$). * indicates a significant difference ($p < 0.05$) for the diet factor.

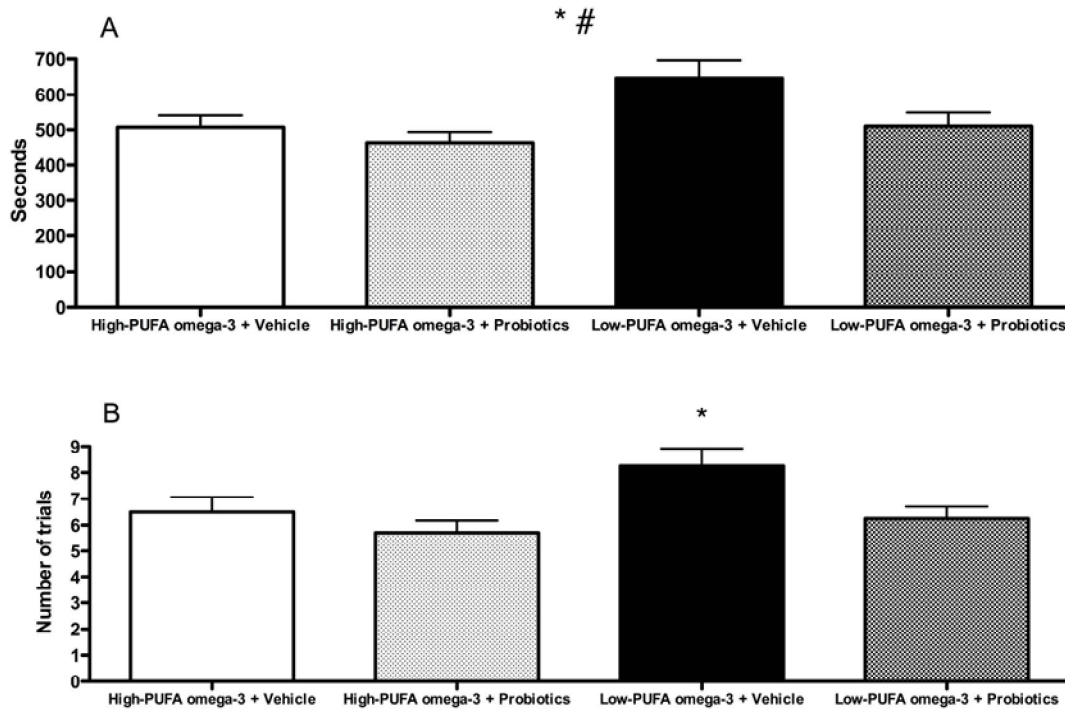


Figure 9. Results of the passive avoidance test proceed on the 17th day of reperfusion. **A.** Time to succeed in seconds; n= 8-10/groups. * indicates a significant difference ($p < 0.05$) for the diet factor; # indicates a significant difference ($p < 0.05$) for the probiotic factor **B.** Number of trials * indicates a significant difference ($p < 0.05$) between low omega-3 PUFA diet + vehicle as compared to the other groups.

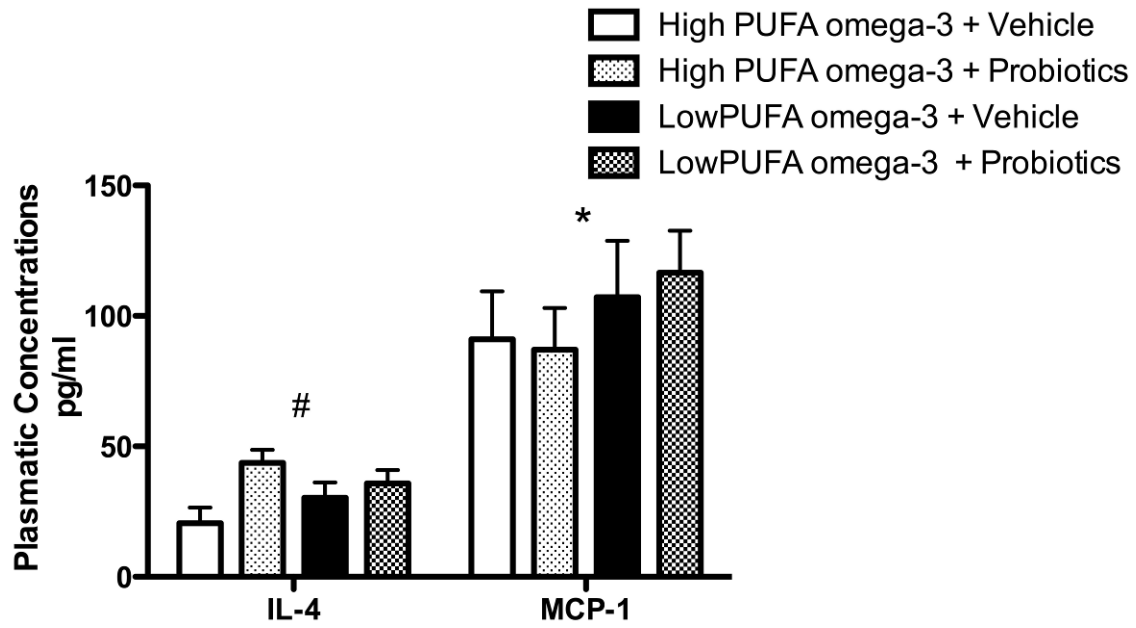


Figure 10. Plasma concentrations of IL-4 and MCP-1; n= 8-10/groups; # indicates a significant difference ($p < 0.05$) for the probiotic factor, * indicates a significant difference ($p < 0.05$) for the diet factor.

Table legends:

Table I. Composition in polyunsaturated fatty acids of the different diets used (g/Kg)

	Diets	
	High	Low
Total fat	202.5	202.5
Saturated fat	78.1	71.6
Monounsaturated fat	33.7	34.8
Polyunsaturated fat	83.2	92.5
Omega-6 PUFA		
18:2 ω -6 (LA)	38.9	76.7
20:4 ω -6 (AA)	1.3	0
Omega-3 PUFA		
18:3 ω -3(ALA)	22	15.6
20:5 ω -3 (EPA)	9.3	0
22:5 ω -3 (DPA)	2.3	0
22:6 ω -3 (DHA)	6.3	0

LA: Linoleic acid; AA: Arachidonic acid; ALA: alpha-Linolenic acid;
EPA: Eicosapentaenoic acid; DPA: Docosapentaenoic acid; DHA:
Docosahexaenoic acid

Table II. Percent of TUNEL-positive cells on total cell count in different limbic regions analyzed at 72 h after reperfusion. *CA1* hippocampal CA1; *CA3* hippocampal CA3, *DG* dentate gyrus; *LA* lateral amygdala; *MA* medial amygdala

	High-PUFA omega-3 diet		Low-PUFA omega-3 diet		Diets	Probiotics
	Without probiotics	With probiotics	Without probiotics	With probiotics		
CA1	1.40	1.23	2.52	1.84	p<0.05	NS
CA3	0.58	0.26	0.38	0.36	NS	NS
DG	1.45	1.05	2.74	1.44	p<0.05	p<0.05
LA	0.98	0.92	2.74	2.28	p<0.05	NS
MA	1.87	1.11	2.19	1.43	p<0.05	p<0.05

CA1: hippocampal CA1; CA3: hippocampal CA3; DG: dentate gyrus; LA: lateral amygdala; MA: medial amygdala

Chapitre 7 : Discussion

Les résultats obtenus dans cette étude montrent qu'une diète élevée en ω -3 ou la prise de probiotiques, malgré une diète pauvre en ω -3, module l'apoptose dans le système limbique et atténue le comportement dépressif indépendamment de la taille de l'infarctus.

Nous avons choisi les diètes en fonction des résultats que nous avons obtenus dans une étude précédente [93]. En effet, les résultats obtenus nous démontrent qu'une diète davantage élevée en ω -3, plus que celle que nous avons utilisée, n'avait aucun effet bénéfique sur le tissu cardiaque ou cérébral suggérant un effet plateau des ω -3. L'utilisation excessive d'oméga-3 pourrait causer des problèmes de saignement, mais les doses devraient être très grandes, davantage supérieures que celles utilisées dans cette étude. Selon les données disponibles dans la littérature, il semble qu'un ratio ω -3/ ω -6 de 1 :4 serait optimal pour le tissu cérébral. Dans notre étude nous avons utilisé l'équivalent d'un ratio de 1:5 (diète faible en oméga-3), ce qui est très proche de celui reconnu comme optimal, mais qui n'était pas aussi efficace que la diète élevée en ω -3 (ratio 1 :1). Toutefois, il reste à éclaircir si l'augmentation supérieure d' ω -6, au détriment des ω -3, pourrait avoir des effets encore plus néfastes et engendrer des symptômes de dépression plus importants.

Pour les probiotiques, ce sont les mêmes deux souches (*Lactobacillus acidophilus* et *Bifidobacterium longum*) qui ont montré un impact sur l'apoptose et le comportement dépressif lorsqu'administré avant l'occlusion coronarienne [172, 179]. Ce sont aussi celles utilisées dans plusieurs études sur le stress ou en présence de divers troubles neurologiques. C'est pourquoi le ratio 1 :1 ω -3/ ω -6 (diète élevée en oméga-3) combiné aux genres de probiotiques *L. acidophilus* et *B. longum* a été utilisé et comparé à la diète faible en ω -3 (ratio 1:5 ω -3/ ω -6).

Tout d'abord, aucune différence dans la taille de l'infarctus n'a été détectée entre les groupes. Plusieurs études démontrent une cardioprotection en présence de supplément ou

d'une diète élevée en ω -3 [138, 140]. Toutefois, cette protection se présente s'ils sont consommés avant que survienne l'événement ischémique, au contraire de cette étude où les rats ont reçu leur diète respective à la suite de l'IM. Il était donc attendu que la taille de l'infarctus ne serait pas influencée par une diète élevée en ω -3 consommée après l'occlusion, contrairement aux études dont la prise débutait au moins une semaine avant l'occlusion coronarienne [93]. Bien que les probiotiques montrent certains effets bénéfiques sur le plan cardiovasculaire, ils ne montrent pas de cardioprotection même lorsqu'ils sont consommés avant l'occlusion coronarienne [172]. En accord avec ces observations, aucune différence n'est décelée sur la taille de l'infarctus lorsque les diètes sont débutées à la suite de l'IM.

Dans notre modèle expérimental, des marqueurs apoptotiques et une détresse comportementale ont été observés à la suite d'un IM et pouvant s'apparenter à la dépression répertoriée chez les humains post-IM. D'abord, concernant l'apoptose qui survient dans le système limbique et détectable à 3 jours post-IM, deux hypothèses sont émises pour l'expliquer. D'un côté, l'hypoxie générée par le myocarde sous occlusion coronarienne peut activer la voie intrinsèque des caspases, par la caspase-9, et ainsi engendrer la mort par apoptose de la cellule [180]. La région CA1 de l'hippocampe est celle étant la plus sensible à l'hypoxie [181]. Une diète élevée en ω -3, donnée un minimum de deux semaines en prévention primaire, montre une diminution de l'activation de la caspase-9 dans la région CA1 qui se corrèle avec une diminution de la taille de l'infarctus [93]. Avec une prise de probiotiques ou des ω -3 suivant l'événement coronarien, aucune différence dans la taille de l'infarctus n'a été observée, donc aucune différence dans l'activation de la caspase-9 et la voie intrinsèque de l'apoptose n'est attendue. D'un autre côté, l'apoptose peut être induite par les cytokines pro-inflammatoires qui, en liant les récepteurs de mort, activent la caspase-8 puis conduisent à l'apoptose [182]. Les cytokines pro-inflammatoires relâchées en périphérie peuvent se rendre au cerveau par des transporteurs, via l'activation des nerfs myocardiques périphériques ou encore par l'organe circumventriculaire [75]. Un inhibiteur

de cytokines, la pentoxifylline [27] ou un bloqueur du TNFR1 [26] ont montré une diminution de l'apoptose dans le système limbique, au niveau de l'amygdale et de l'hippocampe (régions CA1, corps godronné et CA3). Ceci confirme le rôle important des cytokines dans l'induction de l'apoptose. Dans cette étude, une diminution de l'activation de l'apoptose s'observe également dans l'amygdale (latérale et médiane) et l'hippocampe (CA1, CG et CA3), où les cytokines pourraient possiblement y être la cause.

Avec une diète faible en ω -3 et riche en ω -6, les cellules inflammatoires auront incorporés davantage d'AA à leur membrane, et relâcheront ainsi des niveaux élevés de prostaglandines de série-2 et des leucotriènes de série-4 lors d'une pathologie inflammatoire. Des médiateurs inflammatoires seront ainsi relâchés en grande quantité. La consommation d'huile de poisson remplace l'AA dans les membranes cellulaires au profit de l'EPA et du DHA, réduisant de la sorte la relâche de médiateurs inflammatoires [183]. Une étude *in vitro* a démontré la capacité de l'EPA et du DHA à inhiber la production d'IL-1 β et de TNF- α par des monocytes humains [184]. Des patients sains consommant des suppléments d' ω -3 ont montré une diminution des niveaux plasmatiques de l'IL-1 β , de l'IL-1 α et du TNF en présence d'un stimulus inflammatoire [185]. Cet effet anti-inflammatoire pourrait aussi être causé par une régulation négative de NF- κ B par les ω -3. Il faut se rappeler que ce facteur encourage l'expression de gènes inflammatoires. Les ω -3 diminuent la phosphorylation du facteur *ikb*, ce qui inhibe NF- κ B et la transcription des gènes pro-inflammatoires en découlant [186].

De plus, le métabolisme des ω -3 aboutit à la formation de résolvines. Celles-ci sont des médiateurs anti-inflammatoires et ont un rôle important dans la résolution de la phase inflammatoire [114]. L'EPA conduit à la formation de la série-E de résolvine. Les résolvines lient les RCPG de type ChemR23. Des cellules transfectées avec ChemR23 et la RvE1 montrent une inhibition dans la production de TNF- α et une diminution de l'activation de NF- κ B [187]. De même manière, une diète élevée en ω -3 (ratio 1 :1) a

montré des taux plasmatiques diminués en TNF- α après un IM [93]. Aussi, il a été montré dans cette étude qu'une diète élevée en ω -3 diminuait l'expression de MCP-1. Le groupe de Encarnacion et al ont montré qu'une diète élevée en ω -3 diminuait l'expression de TNF- α ce qui diminue la transcription de MCP-1, cytokine pro-inflammatoire, via ERK et NF- κ B [188]. De plus, les DHA, conduisent à la série-D de résolvines qui agissent de façon intracellulaire via le RCPG GPR32. Cette activation diminue la production de cytokines et limite l'infiltration des cellules inflammatoires [114]. La neuroprotectine D est aussi obtenue par les DHA, elle inhibe la réponse inflammatoire et augmente l'expression de protéines anti-apoptotiques. L'administration de DHA dans un modèle d'ischémie cérébrale confère une neuroprotection [189]. Par l'action des résolvines, les ω -3 diminuent la production de cytokines, l'activation de NF- κ B et l'infiltration cellulaire lors d'un procédé inflammatoire.

Dans cette étude, les ω -3 ont montré une diminution de l'activation de la caspase-3 et du nombre de cellules TUNEL positives dans les régions CA1 et du corps godronné de l'hippocampe ainsi que dans l'amygdale latérale et médiane. L'effet anti-inflammatoire conféré par les ω -3 diminue l'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose. Un autre mécanisme possible est que les cytokines peuvent augmenter la transcription de COX-2 via le facteur NF- κ B, ce qui augmente le métabolisme des prostaglandines et plus particulièrement celui de la PGE₂ [190]. La PGE₂ peut induire directement l'apoptose [191]. Les ω -3 peuvent bloquer l'activité de la COX-2 en inhibant NF- κ B ou encore diminuer la biodisponibilité de la PGE₂ par compétition avec les dérivés ω -6. La diminution de PGE₂ peut être une autre façon qu'on les ω -3 de diminuer l'apoptose, où encore le facteur NF- κ B pourrait être impliqué. Le célécoxib, un inhibiteur de la COX-2, a d'ailleurs montré une diminution de l'apoptose dans l'amygdale [92] suggérant que les métabolites de l'AA pourraient avoir des effets négatifs dans notre modèle.

Beaucoup d'études montrent une relation entre le cerveau et l'intestin. Il est bien connu que le cerveau peut affecter les fonctions intestinales, mais l'inverse est également possible. L'administration de LPS à des patients augmentent les niveaux circulants de cytokines pro-inflammatoires, et montrent également chez ceux-ci des symptômes dépressifs et d'anxiété [192]. Les probiotiques peuvent inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires tels que le TNF- α et l'IL-8 [193]. La consommation de bactéries peut aussi augmenter la production de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 [194]. Des études récentes ont montré une altération de la barrière intestinale à la suite d'un IM [154]. Cette observation a été confirmée dans notre modèle d'IM. Les surfaces et muqueuses intestinales sont un site crucial dans la régulation de la réponse immunitaire innée et adaptative. Une altération dans la perméabilité permet l'adhésion et le passage vers la circulation de pathogènes. Ceci encourage une réponse inflammatoire, dont une augmentation de la concentration circulante de cytokines pro-inflammatoires, ce qui peut contribuer à l'activation de l'apoptose au niveau cérébral par la voie extrinsèque.

Dans cette étude, les probiotiques atténuent l'activation de l'apoptose, observée par une diminution de l'expression de la caspase-3 et du nombre de cellules TUNEL positives, dans le corps godronné de l'hippocampe et dans l'amygdale médiane. Les mêmes souches, données avant l'IM, ont montré une diminution des marqueurs apoptotiques dans ces mêmes régions [179]. Les probiotiques améliorent la fonction de la barrière intestinale. Il a été montré que l'altération de la barrière est renversée par la prise de probiotiques précédent l'IM. Les probiotiques ont montré un effet sur la barrière intestinale par l'inhibition de la voie NF- κ B et via la signalisation par la voie MAPK par ERK $\frac{1}{2}$ [195]. Un renforcement de la barrière diminue la réponse inflammatoire systémique. Encore une fois, l'implication du facteur NF- κ B semble se présenter dans l'apoptose activé par l'inflammation dans le système limbique. De plus, telle que répertoriée dans la littérature, les probiotiques peuvent augmenter les cytokines anti-inflammatoires et contribuer à une diminution de la réponse

inflammatoire. Une augmentation de l'IL-4, cytokine anti-inflammatoire, a été observée dans cette étude avec la prise de probiotiques.

Certaines bactéries, dont celles utilisées dans ce mémoire, sont des ligands des TLR-2, exprimés sur plusieurs types cellulaires intestinaux [73]. La liaison des bactéries, plus précisément des peptidoglycanes, à ce récepteur induit la production d'IL-10 (anti-inflammatoire) qui diminue la réponse inflammatoire chronique [196]. L'activation des TLR-2 améliore de plus l'intégrité de la barrière intestinale en jouant sur les protéines des jonctions serrées et le médiateur MYD88 [197], le tout contribuant à une amélioration de la fonction de la barrière intestinale, diminuant la relâche de médiateurs inflammatoires vers la périphérie. Néanmoins il nous est impossible de savoir, avec les résultats que nous avons obtenus, si les souches de probiotiques utilisées dans ce mémoire ont cet effet. Des études supplémentaires seront nécessaires afin de confirmer cette hypothèse.

Plusieurs études ont montré une relation entre la prise de probiotiques et de suppléments en ω -3, où chacun augmente la biodisponibilité de l'autre [175]. Toutefois, dans cette étude, aucun effet additif entre ces deux suppléments alimentaires n'a été montré. Les deux composés ont un effet positif sur l'apoptose, il n'y a toutefois pas d'effet supplémentaire à les utiliser en combinaison suggérant un mécanisme d'action similaire. Néanmoins afin de déterminer si la biodisponibilité est modifiée, une mesure des ω -3 dans les membranes des érythrocytes ou la quantification des deux souches de probiotiques utilisées auraient été utiles.

Le système limbique est une région cérébrale impliquée dans le contrôle des émotions et de l'apprentissage [198]. Une diminution de leur volume a été répertoriée chez des patients dépressifs [58], suggérant que l'apoptose pourrait être l'une des causes de cette atrophie. Chez le rat, une détresse comportementale s'observe par une augmentation du temps d'immobilité dans le test de nage (test de Porsolt), par une diminution du temps

d'interaction et par une augmentation du temps pour réaliser le test d'évitement passif. Dans un modèle commun de dépression, où une bulbectomie olfactive a été effectuée, le temps d'immobilité, le temps d'interaction et la performance dans le test d'évitement passif sont aussi altérés [199, 200]. Il en est de même dans un modèle où des symptômes dépressifs et d'anxiété apparaissent à la suite d'un stress (des sons, une privation en nourriture ou d'eau, des cages souillées) [201, 202]. La détresse comportementale observée dans cette étude est donc représentative des symptômes dépressifs observés chez l'animal, et s'apparente à la dépression observée chez les patients post-IM. Les tests comportementaux ont été effectués 14 jours à la suite de l'IM puisque c'est à cet intervalle qu'avait été détecté la détresse comportementale dans notre modèle [66]. C'est aussi dans cet ordre que les tests avaient été effectués et à ces différents temps de reperfusion, c'est pourquoi ces temps ont été choisis. Puis c'est aussi un intervalle de temps communément utilisé chez l'animal dans l'étude des neurosciences [199, 202]. Une diète élevée en ω -3, donnée après l'induction de l'IM, améliore l'immobilité, le temps d'interaction et le temps d'exécution au test d'évitement passif comparée à la diète faible en ω -3. Les ω -3 préviennent donc l'apparition de la détresse comportementale. Les probiotiques améliorent également la performance à ces tests en renversant l'effet de la diète faible en oméga-3. L'ajout de probiotiques à la diète élevée en oméga-3 montre une tendance à améliorer davantage la performance aux tests, toutefois l'effet n'est pas significatif, suggérant encore un mécanisme similaire et l'atteinte d'un effet plateau.

Les probiotiques et les ω -3 montrent une diminution commune de l'apoptose au niveau du corps godronné de l'hippocampe ainsi que de l'amygdale médiane, suggérant un rôle important de ces deux régions dans la dépression post-IM.

Bien que le lien entre l'apoptose dans le système limbique et l'apparition d'un comportement dépressif semble probable, nous ne pouvons confirmer à ce point la relation entre les deux. Les résultats de cette étude montrent qu'une diminution de l'apoptose dans

le système limbique est suivie d'une amélioration de la détresse comportementale chez l'animal. Toutefois, les cytokines, une fois rendues au cerveau, peuvent également causer un dérèglement monoaminergique qui peut aussi être à l'origine de la détresse comportementale. Il faut se rappeler que l'IL-2 [78] et l'IFN- α [79] diminuent les niveaux de dopamine dans le noyau accumbens et l'hypothalamus, deux régions du système limbique. Le TNF- α , augmenté à la suite d'un IM, diminue les niveaux de sérotonine et augmente son recaptage, diminuant ainsi sa biodisponibilité [82]. Cette diminution de sérotonine est d'ailleurs associée à des symptômes dépressifs [81]. Puis, les cytokines ont un impact sur l'axe HPA. Ces médiateurs inflammatoires entraînent une diminution de la fonction du récepteur des glucocorticoïdes et une diminution de la sensibilité aux glucocorticoïdes, ce qui peut également occasionner des symptômes dépressifs [203]. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer l'apparition des symptômes dépressifs à la suite d'un phénomène inflammatoire. Afin de relier l'apoptose et la dépression, il faudrait regarder l'effet direct de l'un sur l'autre. Pour y arriver, il faudrait regarder ce qui advient de la détresse comportementale lorsqu'on ajoute, par exemple, un bloqueur de la caspase-3.

Limitations

Une limitation dans cette étude est le fait que nous n'avons pas de groupe témoin, c'est-à-dire sans ischémie. Ce groupe nous aurait permis de vérifier si la présence d'un infarctus, malgré une intervention nutritionnelle, avait des effets qui n'auraient pas été complètement renversés. Néanmoins, nos études antérieures ont démontré que les antidépresseurs [66, 94] pouvaient améliorer les performances des rats dans les tests comportementaux à des niveaux similaires aux groupes témoins, suggérant que la moindre amélioration permet de renverser les effets de l'IM.

Une autre limitation est que les AG polyinsaturés ω -3 et ω -6 sont absolument requis dans la diète, donc peu importe la diète utilisée, le ratio présent pourra toujours influencer les résultats obtenus. Toutefois, la diète faible en ω -3 est similaire à celle de la population nord-américaine avec un apport lipidique de 20% et une absence d'huile de poisson. Les ω -3 sont consommés seulement sous leur forme végétale par l'huile de lin dans cette diète.

Il serait possible de s'imaginer que la procédure chirurgicale effectuée influence la performance des animaux aux tests comportementaux nécessitant un effort physique, comme le test de nage forcée. Ceci a été réfuté dans une étude où des rats avec un IM, traités (avec un antidépresseur) ou pas, ont démontré une performance similaire, au test de la piscine de Morris, que les rats n'ayant pas subi de thoracotomie [94]. Ce test évalue la performance motrice et spatiale de l'animal [204]. Donc, la détresse comportementale observée est conséquence de l'IM et les effets bénéfiques observés sont le résultat des suppléments administrés, soit les probiotiques ou les ω -3 et non d'un effet sur la performance cardiaque. De plus, nous avons les résultats de deux autres tests comportementaux qui ne nécessitaient pas d'effort physique, le test de socialisation et de l'évitement passif et dont les résultats vont dans le même sens.

Finalement, l'analyse des cytokines a été effectuées, mais seulement à 14 jours à la suite de l'IM. Une augmentation d'une cytokine anti-inflammatoires par les probiotiques et une diminution d'une cytokine pro-inflammatoire par les oméga-3 montrent leur rôle bénéfique dans l'inflammation. Toutefois, pour démontrer la relation cytokine pro-inflammatoire et apoptose, davantage de mécanismes devront être élucidés 3 jours à la suite de l'IM où l'apoptose se présente.

Perspectives

Plusieurs études découlant des résultats obtenus dans ce travail pourront voir le jour. Ainsi, dans un premier temps, nous pourrions déterminer si les voies de signalisation telle que NF- κ B sont affectées dans les différents tissus ciblés en fonction des différentes interventions. Nous pourrions également déterminer si les récepteurs comme CHemR23 ou GPR32 sont impliqués dans les effets bénéfiques en utilisant des antagonistes de ces récepteurs ou des si-ARN. Finalement, une étude clinique pourrait être également possible car les traitements avec des ω -3 ou des probiotiques sont facilement envisageables.

Conclusion

Pour conclure, une diète riche en ω -3 ou la prise de probiotiques en présence d'une diète faible en oméga-3, débutant après l'IM, atténue l'apoptose dans le système limbique et le comportement dépressif. Ces résultats démontrent qu'une intervention nutritionnelle peut s'avérer bénéfique après un IM et pourrait devenir une thérapie adéquate pour l'humain.

Bibliographie

1. Statistiques. 2009 [cited 2010 2 septembre]; Available from: <http://www.fmcoeur.com/site/c.ntJXJ8MMIqE/b.3562179/k.9FCD/Statistiques.htm>.
2. Gérald J. Tortora, B.D., ed. *Principe d'anatomie et de physiologie*. 2e ed. 2007. 1246.
3. Thygesen, K., J.S. Alpert, and H.D. White, *Universal definition of myocardial infarction*. Eur Heart J, 2007. 28(20): p. 2525-38.
4. 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.
5. Reimer, K.A., et al., *The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs*. Circulation, 1977. 56(5): p. 786-94.
6. Levin, D.C., *Pathways and functional significance of the coronary collateral circulation*. Circulation, 1974. 50(4): p. 831-7.
7. D. Voet, J.G.V., ed. *Biochimie*. 2e ed., ed. d. Boeck2005. 1583.
8. Carmeliet, E., *Myocardial ischemia: reversible and irreversible changes*. Circulation, 1984. 70(1): p. 149-51.
9. Vogt, A.M., et al., *Lactate accumulation rather than ATP depletion predicts ischemic myocardial necrosis: implications for the development of lethal myocardial injury*. Biochim Biophys Acta, 2002. 1586(2): p. 219-26.
10. Buja, L.M., *Myocardial ischemia and reperfusion injury*. Cardiovasc Pathol, 2005. 14(4): p. 170-5.
11. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial reperfusion injury*. N Engl J Med, 2007. 357(11): p. 1121-35.
12. Jennings, R.B., et al., *Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog*. Arch Pathol, 1960. 70: p. 68-78.

13. Monassier, J.P., *Reperfusion injury in acute myocardial infarction. From bench to cath lab. Part I: Basic considerations.* Arch Cardiovasc Dis, 2008. 101(7-8): p. 491-500.
14. Seshadri, G., et al., *The delivery of superoxide dismutase encapsulated in polyketal microparticles to rat myocardium and protection from myocardial ischemia-reperfusion injury.* Biomaterials, 2010. 31(6): p. 1372-9.
15. Chen, J.K. and S.E. Chow, *Antioxidants and myocardial ischemia: reperfusion injuries.* Chang Gung Med J, 2005. 28(6): p. 369-77.
16. Segawa, D., et al., *Calcium antagonist protects the myocardium from reperfusion injury by interfering with mechanisms directly related to reperfusion: an experimental study with the ultrashort-acting calcium antagonist clevidipine.* J Cardiovasc Pharmacol, 2000. 36(3): p. 338-43.
17. Liou, Y.M., et al., *Green tea extract given before regional myocardial ischemia-reperfusion in rats improves myocardial contractility by attenuating calcium overload.* Pflugers Arch, 2010. 460(6): p. 1003-14.
18. 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.
19. Weisman, H.F., et al., *Soluble human complement receptor type 1: in vivo inhibitor of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis.* Science, 1990. 249(4965): p. 146-51.
20. Frangogiannis, N.G., *The immune system and cardiac repair.* Pharmacol Res, 2008. 58(2): p. 88-111.
21. Moss, N.C., et al., *IKKbeta inhibition attenuates myocardial injury and dysfunction following acute ischemia-reperfusion injury.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. 293(4): p. H2248-53.
22. Misra, A., et al., *Nuclear factor-kappaB protects the adult cardiac myocyte against ischemia-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction.* Circulation, 2003. 108(25): p. 3075-8.
23. Herskowitz, A., et al., *Cytokine mRNA expression in postischemic/reperfused myocardium.* Am J Pathol, 1995. 146(2): p. 419-28.

24. Monden, Y., et al., *Tumor necrosis factor-alpha is toxic via receptor 1 and protective via receptor 2 in a murine model of myocardial infarction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. 293(1): p. H743-53.
25. Frangogiannis, N.G., C.W. Smith, and M.L. Entman, *The inflammatory response in myocardial infarction*. Cardiovasc Res, 2002. 53(1): p. 31-47.
26. Kaloustian, S., et al., *Tumor necrosis factor-alpha participates in apoptosis in the limbic system after myocardial infarction*. Apoptosis, 2009.
27. Wann, B.P., et al., *Apoptosis detected in the amygdala following myocardial infarction in the rat*. Biol Psychiatry, 2006. 59(5): p. 430-3.
28. Vinten-Johansen, J., *Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 2004. 61(3): p. 481-97.
29. Savateev, A.V. and T.N. Savateeva-Liubimova, *[Apoptosis--universal mechanisms of cell death and survival in ischemia and reperfusion: ways to pharmacological control]*. Eksperimental'naia i klinicheskaia farmakologija, 2010. 73(12): p. 44-9.
30. Saikumar, P., et al., *Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease*. Am J Med, 1999. 107(5): p. 489-506.
31. Chowdhury, I., B. Tharakan, and G.K. Bhat, *Caspases - an update*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2008. 151(1): p. 10-27.
32. Youle, R.J. and A. Strasser, *The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. 9(1): p. 47-59.
33. Antonsson, B., et al., *Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2*. Science, 1997. 277(5324): p. 370-2.
34. Shiozaki, E.N. and Y. Shi, *Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology*. Trends Biochem Sci, 2004. 29(9): p. 486-94.
35. Rossi, D. and G. Gaidano, *Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease*. Haematologica, 2003. 88(2): p. 212-8.
36. 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.
37. Anversa, P., et al., *Apoptosis and myocardial infarction*. Basic Res Cardiol, 1998. 93 Suppl 3: p. 8-12.

38. 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.
39. 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.
40. Andreadou, I., et al., *Pharmacological pre- and post- conditioning agents: reperfusion-injury of the heart revisited*. Mini Rev Med Chem, 2008. 8(9): p. 952-9.
41. Hausenloy, D.J., A. Tsang, and D.M. Yellon, *The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning*. Trends Cardiovasc Med, 2005. 15(2): p. 69-75.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. Halestrap, A.P., S.J. Clarke, and S.A. Javadov, *Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection*. Cardiovasc Res, 2004. 61(3): p. 372-85.
46. Andreadou, I., et al., *Alternative pharmacological interventions that limit myocardial infarction*. Current medicinal chemistry, 2008. 15(30): p. 3204-13.
47. Asakura, M., et al., *Rationale and design of a large-scale trial using atrial natriuretic peptide (ANP) as an adjunct to percutaneous coronary intervention for ST-segment elevation acute myocardial infarction: Japan-Working groups of acute myocardial infarction for the reduction of Necrotic Damage by ANP (J-WIND-ANP)*. Circ J, 2004. 68(2): p. 95-100.
48. Kurrelmeyer, K.M., et al., *Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. 97(10): p. 5456-61.

49. Lacerda, L., et al., *Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway*. Cardiovascular research, 2009. 84(2): p. 201-8.
50. Association, A.P., ed. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder*. 4e ed., ed. T. Revision2000.
51. Barlow D-H, D.V.-M., ed. *Psychopathologie, une perspective multidimensionnelle*. 2e ed., ed. d. boeck.
52. Chang, T. and M. Fava, *The future of psychopharmacology of depression*. The Journal of clinical psychiatry, 2010. 71(8): p. 971-5.
53. Freis, E.D., *Mental depression in hypertensive patients treated for long periods with large doses of reserpine*. N Engl J Med, 1954. 251(25): p. 1006-8.
54. Katzung, B.G., et al., ed. *Basic & clinical pharmacology*. 11e ed. 2009.
55. 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.
56. Lopez-Leon, S., et al., *Meta-analyses of genetic studies on major depressive disorder*. Mol Psychiatry, 2008. 13(8): p. 772-85.
57. Lanni, C., et al., *Depression and antidepressants: molecular and cellular aspects*. Cell Mol Life Sci, 2009. 66(18): p. 2985-3008.
58. Bremner, J.D., et al., *Hippocampal volume reduction in major depression*. Am J Psychiatry, 2000. 157(1): p. 115-8.
59. Karege, F., et al., *Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs*. Brain Res Mol Brain Res, 2005. 136(1-2): p. 29-37.
60. Gardier, A.M., et al., *Interest of using genetically manipulated mice as models of depression to evaluate antidepressant drugs activity: a review*. Fundamental & clinical pharmacology, 2009. 23(1): p. 23-42.
61. Yulug, B., E. Ozan, and E. Kilic, *Brain-derived neurotrophic factor polymorphism as a genetic risk for depression? A short review of the literature*. J Neuropsychiatry Clin Neurosci, 2010. 22(1): p. 123 E5-6.
62. Uriguen, L., et al., *Gene expression patterns in brain cortex of three different animal models of depression*. Genes Brain Behav, 2008. 7(6): p. 649-58.

63. 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.
64. Wang, Y., et al., *Venlafaxine modulates depression-induced behaviour and the expression of Bax mRNA and Bcl-xl mRNA in both hippocampus and myocardium*. *Human psychopharmacology*, 2011.
65. Kaloustian, S., et al., *Apoptosis time course in the limbic system after myocardial infarction in the rat*. *Brain Res*, 2008. 1216: p. 87-91.
66. 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.
67. Pariante, C.M. and S.L. Lightman, *The HPA axis in major depression: classical theories and new developments*. *Trends in neurosciences*, 2008. 31(9): p. 464-8.
68. 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.
69. Loftis, J.M., M. Huckans, and B.J. Morasco, *Neuroimmune mechanisms of cytokine-induced depression: current theories and novel treatment strategies*. *Neurobiol Dis*, 2010. 37(3): p. 519-33.
70. Win, S., et al., *Depressive symptoms, physical inactivity and risk of cardiovascular mortality in older adults: the Cardiovascular Health Study*. *Heart*, 2011. 97(6): p. 500-5.
71. Frasure-Smith, N., F. Lesperance, and M. Talajic, *Depression and 18-month prognosis after myocardial infarction*. *Circulation*, 1995. 91(4): p. 999-1005.
72. Frasure-Smith, N., F. Lesperance, and M. Talajic, *Depression following myocardial infarction. Impact on 6-month survival*. *JAMA*, 1993. 270(15): p. 1819-25.
73. Kindt T.J, G.R.A., Osborne B.A, ed. *Immunologie Le cours de Janis Kuby avec questions de révision*. 6e ed. 2008. 684.
74. Ban, E., F. Haour, and R. Lenstra, *Brain interleukin 1 gene expression induced by peripheral lipopolysaccharide administration*. *Cytokine*, 1992. 4(1): p. 48-54.
75. Quan, N. and W.A. Banks, *Brain-immune communication pathways*. *Brain Behav Immun*, 2007. 21(6): p. 727-35.

76. 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.
77. Gupta, R.K., R. Kumar, and M. Bassett, *Interferon-induced depressive illness in hep C patients responds to SSRI antidepressant treatments*. Neuropsychiatric disease and treatment, 2006. 2(3): p. 355-8.
78. Anisman, H., L. Kokkinidis, and Z. Merali, *Interleukin-2 decreases accumbal dopamine efflux and responding for rewarding lateral hypothalamic stimulation*. Brain Res, 1996. 731(1-2): p. 1-11.
79. Kumai, T., et al., *Effect of interferon-alpha on tyrosine hydroxylase and catecholamine levels in the brain of rats*. Life Sci, 2000. 67(6): p. 663-9.
80. Capuron, L., et al., *Association between decreased serum tryptophan concentrations and depressive symptoms in cancer patients undergoing cytokine therapy*. Mol Psychiatry, 2002. 7(5): p. 468-73.
81. O'Connor, J.C., et al., *Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice*. Molecular psychiatry, 2009. 14(5): p. 511-22.
82. Zhu, C.B., R.D. Blakely, and W.A. Hewlett, *The proinflammatory cytokines interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha activate serotonin transporters*. Neuropsychopharmacology, 2006. 31(10): p. 2121-31.
83. 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.
84. Hamidi, M., W.C. Drevets, and J.L. Price, *Glial reduction in amygdala in major depressive disorder is due to oligodendrocytes*. Biol Psychiatry, 2004. 55(6): p. 563-9.
85. Ongur, D., W.C. Drevets, and J.L. Price, *Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(22): p. 13290-5.
86. Zhang, J. and S. Rivest, *Is survival possible without arachidonate metabolites in the brain during systemic infection?* News Physiol Sci, 2003. 18: p. 137-42.
87. Dunn, A.J., A.H. Swiergiel, and R. de Beaurepaire, *Cytokines as mediators of depression: what can we learn from animal studies?* Neurosci Biobehav Rev, 2005. 29(4-5): p. 891-909.

88. Lichtenstein, G.R., et al., *Infliximab improves quality of life in patients with Crohn's disease*. *Inflamm Bowel Dis*, 2002. 8(4): p. 237-43.
89. Francis, J., et al., *Acute myocardial infarction induces hypothalamic cytokine synthesis*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. 286(6): p. H2264-71.
90. 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.
91. 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.
92. Kaloustian, S., et al., *Celecoxib after the onset of reperfusion reduces apoptosis in the amygdala*. *Apoptosis*, 2007. 12(11): p. 1945-51.
93. Rondeau, I., et al., *Effects of different dietary omega-6/3 polyunsaturated fatty acids ratios on infarct size and the limbic system after myocardial infarction*. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 2011. 89(3): p. 169-76.
94. 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.
95. Bao, A.M., G. Meynen, and D.F. Swaab, *The stress system in depression and neurodegeneration: focus on the human hypothalamus*. *Brain research reviews*, 2008. 57(2): p. 531-53.
96. Crochemore, C., et al., *Direct targeting of hippocampal neurons for apoptosis by glucocorticoids is reversible by mineralocorticoid receptor activation*. *Mol Psychiatry*, 2005. 10(8): p. 790-8.
97. 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.
98. Kunugi, H., et al., *Interface between hypothalamic-pituitary-adrenal axis and brain-derived neurotrophic factor in depression*. *Psychiatry Clin Neurosci*, 2010. 64(5): p. 447-59.
99. 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.

100. Culiver, C., *Acides gras : nomenclature et sources alimentaires*. Ann Med Vet, 2004. 148: p. 133-140.
101. Das, U.N., *Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology*. Biotechnol J, 2006. 1(4): p. 420-39.
102. Heller, A.R., Stehr S.N, Koch T, ed. *Omega-3 Fatty Acids in Clinical nutrition*. 2005. 108.
103. Lands, W.E., ed. *Fish, omega-3 and human health*. 2e ed. 2005. 220.
104. Voet D, V.J.G., ed. *Biochimie*. 2e ed., ed. d. boeck2005. 1583.
105. Ziboh, V.A., et al., *Biological significance of essential fatty acids/prostanoids/lipoxygenase-derived monohydroxy fatty acids in the skin*. Arch Pharm Res, 2002. 25(6): p. 747-58.
106. Uauy, R., et al., *Essential fatty acids in visual and brain development*. Lipids, 2001. 36(9): p. 885-95.
107. Funk, C.D., *Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology*. Science, 2001. 294(5548): p. 1871-5.
108. Nakamura, M.T. and T.Y. Nara, *Essential fatty acid synthesis and its regulation in mammals*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2003. 68(2): p. 145-50.
109. Miller, S.B., *Prostaglandins in health and disease: an overview*. Semin Arthritis Rheum, 2006. 36(1): p. 37-49.
110. Smith, W.L., *Cyclooxygenases, peroxide tone and the allure of fish oil*. Curr Opin Cell Biol, 2005. 17(2): p. 174-82.
111. Crofford, L.J., *Prostaglandin biology*. Gastroenterol Clin North Am, 2001. 30(4): p. 863-76.
112. Denzlinger, C., *Biology and pathophysiology of leukotrienes*. Crit Rev Oncol Hematol, 1996. 23(3): p. 167-223.
113. McMahon, B. and C. Godson, *Lipoxins: endogenous regulators of inflammation*. Am J Physiol Renal Physiol, 2004. 286(2): p. F189-201.
114. Spite, M. and C.N. Serhan, *Novel lipid mediators promote resolution of acute inflammation: impact of aspirin and statins*. Circ Res, 2010. 107(10): p. 1170-84.

115. Fetterman, J.W., Jr. and M.M. Zdanowicz, *Therapeutic potential of n-3 polyunsaturated fatty acids in disease*. American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists, 2009. 66(13): p. 1169-79.
116. Serhan, C.N., *Novel chemical mediators in the resolution of inflammation: resolvins and protectins*. Anesthesiol Clin, 2006. 24(2): p. 341-64.
117. Schmitz, G. and J. Ecker, *The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids*. Prog Lipid Res, 2008. 47(2): p. 147-55.
118. Liou, Y.A., et al., *Decreasing linoleic acid with constant alpha-linolenic acid in dietary fats increases (n-3) eicosapentaenoic acid in plasma phospholipids in healthy men*. The Journal of nutrition, 2007. 137(4): p. 945-52.
119. Plourde, M. and S.C. Cunnane, *Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements*. Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme, 2007. 32(4): p. 619-34.
120. Simopoulos, A.P., *Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases*. Biomed Pharmacother, 2006. 60(9): p. 502-7.
121. Carrillo-Tripp, M. and S.E. Feller, *Evidence for a mechanism by which omega-3 polyunsaturated lipids may affect membrane protein function*. Biochemistry, 2005. 44(30): p. 10164-9.
122. Moriguchi, T. and N. Salem, Jr., *Recovery of brain docosahexaenoate leads to recovery of spatial task performance*. J Neurochem, 2003. 87(2): p. 297-309.
123. Rohrbach, S., *Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on mitochondria*. Current pharmaceutical design, 2009. 15(36): p. 4103-16.
124. Calder, P.C., *Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: new twists in an old tale*. Biochimie, 2009.
125. Berger, J. and D.E. Moller, *The mechanisms of action of PPARs*. Annual review of medicine, 2002. 53: p. 409-35.
126. Novak, T.E., et al., *NF-kappa B inhibition by omega -3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF-alpha transcription*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003. 284(1): p. L84-9.

127. Bjerregaard, P., G. Mulvad, and H.S. Pedersen, *Cardiovascular risk factors in Inuit of Greenland*. *Int J Epidemiol*, 1997. 26(6): p. 1182-90.
128. Skulas-Ray, A.C., et al., *Dose-response effects of omega-3 fatty acids on triglycerides, inflammation, and endothelial function in healthy persons with moderate hypertriglyceridemia*. *The American journal of clinical nutrition*, 2011. 93(2): p. 243-52.
129. Bays, H.E., et al., *Prescription omega-3 fatty acids and their lipid effects: physiologic mechanisms of action and clinical implications*. *Expert review of cardiovascular therapy*, 2008. 6(3): p. 391-409.
130. Lavie, C.J., et al., *Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases*. *J Am Coll Cardiol*, 2009. 54(7): p. 585-94.
131. Ait-Yahia, D., et al., *Dietary fish protein lowers blood pressure and alters tissue polyunsaturated fatty acid composition in spontaneously hypertensive rats*. *Nutrition*, 2003. 19(4): p. 342-6.
132. Das, U.N., *Long-chain polyunsaturated fatty acids interact with nitric oxide, superoxide anion, and transforming growth factor-beta to prevent human essential hypertension*. *European journal of clinical nutrition*, 2004. 58(2): p. 195-203.
133. Adkins, Y. and D.S. Kelley, *Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids*. *The Journal of nutritional biochemistry*, 2010. 21(9): p. 781-92.
134. Thies, F., et al., *Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial*. *Lancet*, 2003. 361(9356): p. 477-85.
135. Anand, R.G., et al., *The role of fish oil in arrhythmia prevention*. *Journal of cardiopulmonary rehabilitation and prevention*, 2008. 28(2): p. 92-8.
136. Sheard, N.F., *Fish consumption and risk of sudden cardiac death*. *Nutrition reviews*, 1998. 56(6): p. 177-9.
137. Aalbers, J., *Omega-3 intake in patients with coronary artery disease: focus on recent studies*. *Cardiovasc J Afr*, 2010. 21(1): p. 50.
138. Landmark, K., et al., *Use of fish oils appears to reduce infarct size as estimated from peak creatine kinase and lactate dehydrogenase activities*. *Cardiology*, 1998. 89(2): p. 94-102.

139. Zeghichi-Hamri, S., et al., *Protective effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on myocardial resistance to ischemia-reperfusion injury in rats*. Nutrition research, 2010. 30(12): p. 849-57.
140. McGuinness, J., et al., *Myocardial protection using an omega-3 fatty acid infusion: quantification and mechanism of action*. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, 2006. 132(1): p. 72-9.
141. Patel, J.V., et al., *Omega-3 polyunsaturated fatty acids: a necessity for a comprehensive secondary prevention strategy*. Vascular health and risk management, 2009. 5: p. 801-10.
142. Conklin, S.M., et al., *High omega-6 and low omega-3 fatty acids are associated with depressive symptoms and neuroticism*. Psychosomatic medicine, 2007. 69(9): p. 932-4.
143. Tajalizadekhoob, Y., et al., *The effect of low-dose omega 3 fatty acids on the treatment of mild to moderate depression in the elderly: a double-blind, randomized, placebo-controlled study*. European archives of psychiatry and clinical neuroscience, 2011.
144. Lesperance, F., et al., *The efficacy of omega-3 supplementation for major depression: a randomized controlled trial*. The Journal of clinical psychiatry, 2010.
145. Jazayeri, S., et al., *Comparison of therapeutic effects of omega-3 fatty acid eicosapentaenoic acid and fluoxetine, separately and in combination, in major depressive disorder*. The Australian and New Zealand journal of psychiatry, 2008. 42(3): p. 192-8.
146. Carney, R.M., et al., *Omega-3 augmentation of sertraline in treatment of depression in patients with coronary heart disease: a randomized controlled trial*. JAMA : the journal of the American Medical Association, 2009. 302(15): p. 1651-7.
147. Ferraz, A.C., et al., *Chronic omega-3 fatty acids supplementation promotes beneficial effects on anxiety, cognitive and depressive-like behaviors in rats subjected to a restraint stress protocol*. Behavioural brain research, 2011. 219(1): p. 116-22.
148. Su, K.P., *Biological mechanism of antidepressant effect of omega-3 fatty acids: how does fish oil act as a 'mind-body interface'?* Neuro-Signals, 2009. 17(2): p. 144-52.
149. Bazan, N.G., *Cellular and molecular events mediated by docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 signaling in photoreceptor cell survival and brain*

- protection*. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids, 2009. 81(2-3): p. 205-11.
150. Akbar, M., et al., *Docosahexaenoic acid: a positive modulator of Akt signaling in neuronal survival*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. 102(31): p. 10858-63.
 151. Schins, A., et al., *Altered omega-3 polyunsaturated fatty acid status in depressed post-myocardial infarction patients*. Acta psychiatrica Scandinavica, 2007. 115(1): p. 35-40.
 152. Floch M.H, K.A.S., ed. *Probiotics A clinical guide*. ed. S. Incorporated 2010. 343.
 153. Fioramonti, J., V. Theodorou, and L. Bueno, *Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology? Best practice & research*. Clinical gastroenterology, 2003. 17(5): p. 711-24.
 154. Mao, Y., et al., *Intestinal barrier function in patients with acute myocardial infarction and the therapeutic effect of glutamine*. International journal of cardiology, 2011. 146(3): p. 432-3.
 155. 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.
 156. Spitz, J., et al., *Enteropathogenic Escherichia coli adherence to intestinal epithelial monolayers diminishes barrier function*. The American journal of physiology, 1995. 268(2 Pt 1): p. G374-9.
 157. Ukena, S.N., et al., *Probiotic Escherichia coli Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity*. PLoS One, 2007. 2(12): p. e1308.
 158. Yan, F., et al., *Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth*. Gastroenterology, 2007. 132(2): p. 562-75.
 159. Kirjavainen, P.V., et al., *The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus*. FEMS microbiology letters, 1998. 167(2): p. 185-9.
 160. Collado, M.C., J. Meriluoto, and S. Salminen, *Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus*. Letters in applied microbiology, 2007. 45(4): p. 454-60.
 161. D, C., *Immunological effects of probiotics and their significance to human health*. Prebiotics and Probiotics Science and Technology, 2009. 2: p. 901-948

162. Malin, M., et al., *Promotion of IgA immune response in patients with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with Lactobacillus GG*. Ann Nutr Metab, 1996. 40(3): p. 137-45.
163. Yan, F. and D.B. Polk, *Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells*. The Journal of biological chemistry, 2002. 277(52): p. 50959-65.
164. Mayer, E.A., *The neurobiology of stress and gastrointestinal disease*. Gut, 2000. 47(6): p. 861-9.
165. Logan, A.C. and M. Katzman, *Major depressive disorder: probiotics may be an adjuvant therapy*. Med Hypotheses, 2005. 64(3): p. 533-8.
166. Ott, S.J., et al., *Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease*. Gut, 2004. 53(5): p. 685-93.
167. 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.
168. Ghosh, S., D. van Heel, and R.J. Playford, *Probiotics in inflammatory bowel disease: is it all gut flora modulation?* Gut, 2004. 53(5): p. 620-2.
169. Baharav, E., et al., *Lactobacillus GG bacteria ameliorate arthritis in Lewis rats*. The Journal of nutrition, 2004. 134(8): p. 1964-9.
170. Lin, M.Y. and C.L. Yen, *Inhibition of lipid peroxidation by Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium longum*. Journal of agricultural and food chemistry, 1999. 47(9): p. 3661-4.
171. Diop, L., S. Guillou, and H. Durand, *Probiotic food supplement reduces stress-induced gastrointestinal symptoms in volunteers: a double-blind, placebo-controlled, randomized trial*. Nutrition research, 2008. 28(1): p. 1-5.
172. Arseneault-Breard, J., et al., *Combination of Lactobacillus helveticus R0052 and Bifidobacterium longum R0175 reduces post-myocardial infarction depression symptoms and restores intestinal permeability in a rat model*. The British journal of nutrition, 2011: p. 1-7.
173. Thompson, L. and R.C. Spiller, *Impact of polyunsaturated fatty acids on human colonic bacterial metabolism: an in vitro and in vivo study*. The British journal of nutrition, 1995. 74(5): p. 733-41.

174. Bomba, A., et al., *The influence of omega-3 polyunsaturated fatty acids (omega-3 pufa) on lactobacilli adhesion to the intestinal mucosa and on immunity in gnotobiotic piglets*. Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift, 2003. 116(7-8): p. 312-6.
175. Kankaanpaa, P.E., et al., *Influence of probiotic supplemented infant formula on composition of plasma lipids in atopic infants*. The Journal of nutritional biochemistry, 2002. 13(6): p. 364-369.
176. Fields, A., *Discovering statistics using SPSS*. Third ed2009, London: SAGE Publications Ltd. 822.
177. Siegel, S. and N.J.J. Castellan, *Nonparametric statistics*. 2nd ed1988, Boston, Mass: Mcgraw-Hill.
178. Bah, T.M., et al., *Escitalopram reduces circulating pro-inflammatory cytokines and improves depressive behavior without affecting sleep in a rat model of post-cardiac infarct depression*. Behav Brain Res, 2011. 225(1): p. 243-51.
179. 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.
180. Spiro, I.J., et al., *Cell killing, radiosensitization and cell cycle redistribution induced by chronic hypoxia*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1984. 10(8): p. 1275-80.
181. Sugawara, T., et al., *Mitochondrial release of cytochrome c corresponds to the selective vulnerability of hippocampal CA1 neurons in rats after transient global cerebral ischemia*. J Neurosci, 1999. 19(22): p. RC39.
182. Thorburn, A., *Death receptor-induced cell killing*. Cell Signal, 2004. 16(2): p. 139-44.
183. Gibney, M.J. and B. Hunter, *The effects of short- and long-term supplementation with fish oil on the incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids into cells of the immune system in healthy volunteers*. Eur J Clin Nutr, 1993. 47(4): p. 255-9.
184. Baldie, G., D. Kaimakamis, and D. Rotondo, *Fatty acid modulation of cytokine release from human monocytic cells*. Biochim Biophys Acta, 1993. 1179(2): p. 125-33.
185. Endres, S., et al., *The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells*. N Engl J Med, 1989. 320(5): p. 265-71.

186. Ross, J.A., A.G. Moses, and K.C. Fearon, *The anti-catabolic effects of n-3 fatty acids*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 1999. 2(3): p. 219-26.
187. Arita, M., et al., *Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1*. *J Exp Med*, 2005. 201(5): p. 713-22.
188. Diaz Encarnacion, M.M., et al., *n-3 Fatty acids block TNF-alpha-stimulated MCP-1 expression in rat mesangial cells*. *American journal of physiology. Renal physiology*, 2011. 300(5): p. F1142-51.
189. Belayev, L., et al., *Robust docosahexaenoic acid-mediated neuroprotection in a rat model of transient, focal cerebral ischemia*. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 2009. 40(9): p. 3121-6.
190. Navarra, P., et al., *Interleukin-1 beta and interleukin-6 specifically increase the release of prostaglandin E2 from rat hypothalamic explants in vitro*. *Neuroendocrinology*, 1992. 56(1): p. 61-8.
191. Laflamme, N., S. Lacroix, and S. Rivest, *An essential role of interleukin-1beta in mediating NF-kappaB activity and COX-2 transcription in cells of the blood-brain barrier in response to a systemic and localized inflammation but not during endotoxemia*. *J Neurosci*, 1999. 19(24): p. 10923-30.
192. 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.
193. Bai, A.P., et al., *Probiotics modulate inflammatory cytokine secretion from inflamed mucosa in active ulcerative colitis*. *Int J Clin Pract*, 2006. 60(3): p. 284-8.
194. O'Mahony, L., et al., *Lactobacillus and bifidobacterium in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles*. *Gastroenterology*, 2005. 128(3): p. 541-51.
195. Donato, K.A., et al., *Lactobacillus rhamnosus GG attenuates interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha-induced barrier dysfunction and pro-inflammatory signalling*. *Microbiology*, 2010. 156(Pt 11): p. 3288-97.
196. Cario, E., *Barrier-protective function of intestinal epithelial Toll-like receptor 2*. *Mucosal immunology*, 2008. 1 Suppl 1: p. S62-6.

197. 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.
198. Nieuwenhuys, R., *The greater limbic system, the emotional motor system and the brain*. *Prog Brain Res*, 1996. 107: p. 551-80.
199. Jaako-Movits, K. and A. Zharkovsky, *Impaired fear memory and decreased hippocampal neurogenesis following olfactory bulbectomy in rats*. *Eur J Neurosci*, 2005. 22(11): p. 2871-8.
200. Dang, H., et al., *Preventive action of Kai Xin San aqueous extract on depressive-like symptoms and cognition deficit induced by chronic mild stress*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2009. 234(7): p. 785-93.
201. Ashkenazy, T., H. Einat, and N. Kronfeld-Schor, *We are in the dark here: induction of depression- and anxiety-like behaviours in the diurnal fat sand rat, by short daylight or melatonin injections*. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2009. 12(1): p. 83-93.
202. Xiang, H., et al., *The antidepressant effects and mechanism of action of total saponins from the caudexes and leaves of Panax notoginseng in animal models of depression*. *Phytomedicine*, 2011.
203. Miller, A.H., C.M. Pariante, and B.D. Pearce, *Effects of cytokines on glucocorticoid receptor expression and function. Glucocorticoid resistance and relevance to depression*. *Adv Exp Med Biol*, 1999. 461: p. 107-16.
204. Morris, R., *Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat*. *Journal of neuroscience methods*, 1984. 11(1): p. 47-60.