

Université de Montréal

**Effet des changements du ratio alimentaire  
oméga-3/oméga-6 dans un modèle d'infarctus du  
myocarde reperfusé chez le rat**

par

Isabelle Rondeau

Département de pharmacologie

Faculté de médecine

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

juillet, 2010

© Isabelle Rondeau, 2010

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Effet des changements du ratio alimentaire oméga-3/oméga-6 dans un modèle d'infarctus  
du myocarde reperfusé chez le rat

Présentée par :  
Isabelle Rondeau

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Pierre S. Haddad, président-rapporteur  
Guy Rousseau, directeur de recherche  
Martin Sirois, membre du jury

## Résumé

Une mort cellulaire par apoptose impliquant un processus inflammatoire est observée dans le système limbique, suite à un infarctus du myocarde. Les oméga-3 et ses métabolites, en plus de leurs propriétés bénéfiques pour le système cardiovasculaire, réduisent l'inflammation, contrairement aux oméga-6 qui sont plus pro-inflammatoires. Comme le métabolisme de ces deux acides gras essentiels impliquent les mêmes enzymes, le ratio alimentaire oméga-3/6 aurait donc des impacts importants sur l'état inflammatoire et ainsi indirectement sur l'apoptose. Conséquemment, cette étude a pour but d'évaluer l'effet de différents ratios oméga-3/6 sur la taille de l'infarctus, l'inflammation et l'apoptose dans le système limbique suite à un infarctus du myocarde.

Des rats Sprague-Dawley ont été aléatoirement distribués dans trois groupes contenant des ratios 1:1, 1:5 et 5:1 oméga-3/6. Ils ont été nourris pendant 2 semaines, suivie d'une occlusion de l'artère coronaire gauche descendante pendant 40 minutes et d'une période de reperfusion (15 min et 24 h). De hauts ratios d'oméga-3 (5:1 et 1:1) diminuent significativement la taille de l'infarctus de 32 % et augmentent l'activité d'Akt, impliquée dans la voie cardioprotectrice RISK, comparativement au ratio 1:5. Ils diminuent aussi la concentration plasmatique de TNF- $\alpha$ . Dans le système limbique, l'activité de la caspase-3 est augmentée dans la région CA1, après 15 min, et dans les régions du CA1 et du gyrus dentelé (Gd), après 24 h, avec la diète 1:5 en comparaison aux diètes 1:1 et 5:1. L'activité enzymatique de la caspase-8 est augmentée dans le Gd, alors que dans le CA1, il y a une activité plus importante de la caspase-9 aux temps de reperfusion étudiés.

Conclusion: Les diètes élevées en oméga-3/oméga-6 réduisent la taille de l'infarctus, l'inflammation et diminuent l'apoptose dans le système limbique après un infarctus du myocarde.

**Mots-clés** : Ratio oméga 3/6, diète, infarctus du myocarde, apoptose, système limbique, inflammation

## **Abstract**

Apoptosis occurs in the limbic system by a mechanism involving inflammation after a myocardial infarction. Omega-3 are essential fatty acids known for their benefits in cardiovascular health and to reduce inflammation, whereas, omega-6 and their metabolites are more inflammatory. Since these two essential fatty acids are metabolized by the same group of enzymes, the resulting competition would affect the inflammation and thus indirectly the apoptosis. Therefore, the aim of this study is to evaluate the effect of different omega-3/6 ratios on the infarct size, inflammation and apoptosis in the limbic system after myocardial infarction.

Male Sprague-Dawley rats were divided randomly between three diet groups containing 1:5, 1:1 and 5:1 omega-3/6 ratios. Rats were fed for two weeks followed by a left anterior descending coronary occlusion for 40 min and by reperfusion time (15 min or 24 h). Infarct size was significantly reduced by 32% and Akt activity, implicated in RISK cardioprotection pathway, enhanced by the 5:1 and 1:1 in comparison to the 1:5 diet ratios. They also reduced TNF- $\alpha$  plasma concentration. In the limbic system, caspase-3 enzymatic activity was doubled in CA1 after 15 min and in CA1 and dentate gyrus (Dg), after 24 h, in the 1:5 compared to 1:1 and 5:1 groups. Caspase-8 enzymatic activity was increased in Dg and caspase-9 was enhanced in the CA1 at both reperfusion time in the 1:5 against the 1:1 and 5:1 groups.

**Conclusion:** High omega-3 dietary ratio helps to reduce infarct size, inflammation and to prevent apoptosis in the limbic system.

**Keywords :** Omega-3/6 ratio, Diet, Myocardial infarction, Apoptosis, Limbic system, Inflammation

## Table des matières

Introduction .....	12
Chapitre 1. Infarctus du myocarde .....	12
1.1. Ischémie .....	13
1.2. Reperfusion .....	15
1.2.1. Lésions de reperfusion .....	16
1.2.1.1. Inflammation .....	18
1.2.1.2. Apoptose .....	21
1.3. Cardioprotection.....	25
1.3.1. Voie de <i>Reperfusion Injury Kinase Signalling</i> (RISK).....	27
1.3.2. Voie de <i>Survivor Activating Factor Enhancement</i> (SAFE).....	28
Chapitre 2. Dépression post-infarctus du myocarde .....	29
2.1. L'étiologie de la dépression .....	31
2.2. Hypothèses .....	33
2.2.1. L'hypothèse impliquant les cytokines .....	33
2.2.2. L'hypothèse de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien.....	38
Chapitre 3. Acides gras essentiels .....	41
3.1. Structure et nomenclature .....	42
3.2. Métabolisme des oméga-3 et oméga-6.....	43
3.3. Ratio oméga-3/oméga-6 .....	48
3.4. Propriétés des oméga-3 et oméga-6 .....	49
3.4.1. Maladie cardiovasculaire .....	51
3.4.1.1. Infarctus du myocarde.....	53
3.2.2. Maladie neurodégénérative et dépression.....	54
3.2.2.1. Dépression post-infarctus du myocarde.....	55
Chapitre 4. Les hypothèses .....	56
Chapitre 5. Article.....	57
Chapitre 6. Discussion .....	83

## Liste des figures

Figure 1. Voie intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose

Figure 2. Les voies cardioprotectrices: *Reperfusion Injury Kinase Signalling* (RISK) et *Survivor Activating Factor Enhancement* (SAFE).

Figure 3. Structure et nomenclature des acides gras alpha-linolénique et linoléique

Figure 4. Synthèse des acides gras essentiels oméga-3, oméga-6 et non essentiels oméga-7 et oméga-9

## Liste des abréviations

AA : Acide arachidonique

ACE : Enzyme de conversion de l'angiotensine

AG : Acides gras

AGE : Acides gras essentiels

AIF : *Apoptosis Inducing Factor*

Akt: Protéine kinase B

ALA: Acide alpha-linolénique

ANR : Zone non à risque

AR : Zone à risque

ATP : Adénosine triphosphate

BDNF : *Brain-Derived Neurotrophic Factor*

BHE : Barrière hémato-encéphalique

COX : Cyclooxygénase

DART : *Diet and Reinfarction Trial*

DHA : Acide docosahexaénoïque

DR: *Death Receptor* ou récepteur associé aux activateurs pro-apoptotiques

ECG : Électrocardiogramme

EPA : Acide eicosapentaénoïque

Erk1/2: *Extracellular Signal-Regulated Kinase*

GISSI-prevenzione : *Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico*

Gd: Corps godronné ou gyrus dentelé

GSK-3: Glycogène synthase kinase 3

HPA : Axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

I : Zone nécrosée

IL : Interleukine

IM : Infarctus du myocarde

LA : Acide linoléique

LOX : Lipoxygénase

MAC : *Membrane Attacking Complex*

$\omega$ -3 : Oméga-3

$\omega$ -6 : Oméga-6

NF- $\kappa$ B : *Nuclear Factor-Kappa B*

P70SK6: *70kDa Protein S6 Kinase*

PG: Prostaglandine

PGE2: Prostaglandine E2

PPAR: *Peroxisome Proliferators-Activated Receptor*

PPRE: Élément de réponse à PPAR

RISK: *Reperfusion Injury Kinase Signalling*

ROS: Espèce réactive de l'oxygène

RXR: Récepteur de type rétinoïde X

SAFE: *Survivor Activating Factor Enhancement*

SREBP: *Sterol Regulatory Element Binding Proteins*

STAT-3: *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*

TLR: *Toll-like Receptor*



TNF- $\alpha$  : *Tumor Necrosis Factor alpha*

VLDL: Very Low Density Lipoprotein

*À mon amour, ma famille et mes amis,  
merci de votre soutien*

## Remerciements

Mes remerciements sincères vont à mon directeur de recherche Guy Rousseau qui m'a tout d'abord acceptée comme stagiaire dans son laboratoire et m'a permis de développer un intérêt grandissant pour la recherche. Je souhaite le remercier de sa présence, son soutien et pour cette incroyable formation scientifique offerte.

Je tiens également à remercier Thierno Madjou Bah et Sevan Kaloustian pour leurs précieux conseils, leur patience et le temps consacré à m'apprendre les techniques de laboratoire nécessaire à la réalisation de cette maîtrise. Je souhaite remercier particulièrement, Marc-André Déry pour son exemple de rigueur scientifique, de questionnement, en plus de son aide constante au laboratoire.

Toute ma gratitude va à mes deux stagiaires d'été Sandrine Picard et Louis Roy pour leur soutien, leur travail acharné m'aidant dans la réalisation de ce mémoire. Merci à Caroline Bouchard et Louis Chiochio du service de l'animalerie du Centre de recherche de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal pour leur expertise et leur soutien technique.

Une pensée spéciale va à Jessica Breard et Kim Gilbert. Vos excellentes questions sur mon projet de recherche et sur les techniques que je tentais de vous apprendre m'ont grandement aidée. Je vous souhaite toutes deux bonnes chances dans vos maîtrises. Pour terminer, je souhaite remercier l'aide financière du CRSNG et du FRSQ pour m'avoir accordé une bourse de recherche.

# Introduction

## Chapitre 1. Infarctus du myocarde

Selon la Fondation des maladies du cœur, le nombre de crises cardiaques survenant chaque année est estimé à 70 000 au Canada. Plus de 17 000 Canadiens et Canadiennes succombent chaque année à une crise cardiaque aussi appelée infarctus du myocarde (IM) [1]. D'un point de vue biologique, l'IM correspond à la mort des cardiomyocytes à la suite d'une ischémie, c'est-à-dire un déséquilibre entre l'apport et la demande en oxygène et en nutriment [2]. La cause la plus fréquente de l'IM est l'occlusion d'une artère coronarienne par un thrombus. Ce thrombus provient majoritairement de la rupture ou de l'érosion d'une plaque d'athérosclérose [3].

D'un point de vue clinique, le diagnostic de l'IM se base sur l'apparition de symptômes d'ischémie comme une modification de l'électrocardiogramme (ECG) et l'augmentation des niveaux plasmatiques de biomarqueurs, par exemple la troponine [2]. Les symptômes courants d'ischémie causés par un IM sont une douleur soudaine à la poitrine, à l'épigastre ou à la mâchoire et un inconfort au bras gauche [4]. Le diagnostic doit être fait le plus rapidement possible afin de réduire le temps d'intervention. En effet, plus les traitements sont prodigués rapidement, plus le pronostic en sera amélioré [5]. Parmi les traitements pharmacologiques de l'IM, on retrouve les nitrates, l'aspirine, les bêta-bloqueurs ainsi que les thérapies thrombolytiques. De plus, il est possible de limiter les dommages de l'ischémie, suite à un blocage d'une artère coronaire, en pratiquant une angioplastie coronaire transluminale percutanée. Le procédé dilate une artère coronaire obstruée à l'aide d'un ballonnet [6] et interrompt les dommages induits par l'ischémie en rétablissant la circulation sanguine.

La suite de ce chapitre se consacre aux déterminants de l'IM et ses conséquences cellulaires.

## 1.1. Ischémie

Dans des conditions aérobiques normales, le cœur soutire 60 à 80 % de son énergie par l'oxydation des acides gras (AG). L'énergie restante soit, de 20 à 40 %, est acquise par la glycolyse aérobie à partir du glucose. Après seulement 8 secondes d'ischémie, dans le cytoplasme, le manque d'oxygène entraîne une glycolyse anaérobie [7]. Entre 80 et 90 %, de l'énergie est alors obtenue par glycolyse anaérobie utilisant les granules de glycogène [8]. La cellule myocardique utilise également ses réserves de créatine phosphate pour pallier la forte demande énergétique. Après uniquement 30 secondes d'ischémie, les réserves de créatine phosphate sont épuisées à 90 %; après 3 minutes, elles le sont entièrement [9].

Dans les minutes suivantes, les concentrations cellulaires d'adénosine triphosphate (ATP) diminuent ce qui entraîne un ralentissement de la contraction des myofibrilles. La pompe sodium-potassium  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase ralentit et provoque une augmentation des concentrations cytoplasmiques de sodium et une diminution des concentrations de potassium [10, 11]. L'accumulation de sodium intracellulaire favorise l'entrée d'ions calciques par l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  [12] et modifie le potentiel membranaire. Les modifications du potentiel membranaire expliquent ainsi les changements caractéristiques sur un électrocardiogramme de l'IM [13]. Par ailleurs, l'ischémie induit une accumulation de lactate par la glycolyse anaérobie, de phosphates inorganiques ainsi que de créatine. En somme, un important gradient osmotique s'installe favorisant l'entrée d'eau dans la cellule [13]. Plus le temps en condition d'anoxie s'accroît, plus il y a une accumulation de lactates et de protons qui provoque la réduction du pH intracellulaire.

Après 15 minutes d'ischémie, les concentrations en ATP sont réduites de 35 % [14]. On observe des cardiomyocytes oedémateux avec de faibles concentrations intracellulaires de glycogène. Plus précisément, les myofibrilles sont relâchées, le noyau montre une faible condensation de la chromatine et la membrane du réticulum sarcoplasmique est intacte. Un oedème mitochondrial et une réduction des granules sont aussi présents sans toutefois

apercevoir de granules anormales [15]. Ces lésions sont appelées réversibles puisqu'à ce point aucune séquelle permanente n'est induite. Si la circulation sanguine est rétablie, les cardiomyocytes retrouveront leur état d'origine [16].

Après 20 à 25 minutes, les premières cellules meurent par nécrose [17]. La nécrose est un indicateur des lésions irréversibles. Le rétablissement de la circulation sanguine doit donc se faire avant les 20 à 25 premières minutes d'ischémie afin d'éviter tout dommage irréversible.

Les étapes menant à la mort des cardiomyocytes débutent par l'accumulation de déchets et la baisse du pH intracellulaire induisant une dysfonction mitochondriale. Des densités amorphes sont retrouvées dans la matrice mitochondriale, composées de lipides, de protéines dénaturées et de calcium [15]. L'atteinte s'étend également au noyau, car une margination de la chromatine est présente. Ultiment, l'accumulation de déchets intracellulaires mène aux bris de la membrane mitochondriale et de la membrane des lysosomes. Conjointement avec ce bris, l'augmentation de calcium permet l'activation des protéases qui altère les protéines contractiles suivie de l'activation de phospholipases. Pour conclure, le clivage des protéines incorporées dans la membrane mène à la mort cellulaire par lyse cellulaire [10, 18].

Après 40 minutes d'ischémie totale, plus de 90 % de l'ATP intracellulaire a été utilisé et environ 50 % des cellules sont atteintes de manière irréversible [17]. Le processus d'ischémie induit des atteintes au tissu myocardique de plus en plus importantes à travers le temps et vers la sixième heure d'ischémie, très peu de myocarde peut être sauvé [9]. En plus des atteintes myocardiques, une occlusion prolongée de 3 à 6 heures peut provoquer une atteinte aux vaisseaux et induire une hémorragie interstitielle [19].

D'après une perspective macroscopique, l'IM suit une trajectoire appelée « vague de front ». C'est-à-dire qu'il débute dans la région endocardique pour progresser vers la

région épocardique, jusqu'à l'obtention d'un infarctus transmural entre la troisième et sixième heure d'ischémie [19, 20].

Les connaissances sur le déroulement macroscopique, microscopique et moléculaire de l'IM sont issues d'études réalisées majoritairement chez le chien [14, 21, 22]. La particularité de ce modèle est qu'il comprend une importante circulation collatérale, tout comme l'homme adulte avec maladie athérosclérotique. La circulation collatérale désigne des vaisseaux, appelés anastomoses, interreliants des artères coronariennes entre elles. Les vaisseaux collatéraux sont issus d'un vaisseau de plus faible calibre qui lors d'une occlusion ou d'une sténose vont recevoir un apport sanguin, permettant d'irriguer une partie de la région ischémique [23]. Cette circulation, appelée collatérale, est un important déterminant de la taille de l'IM. Plus il y a de vaisseaux collatéraux, plus lors d'une occlusion le processus d'ischémie peut être prévenu par une circulation sanguine adéquate [24, 25]. De plus, la circulation collatérale est plus importante dans la région subépocardique qu'endocardique [26]. L'évolution de l'infarctus serait donc grandement influencée par la circulation collatérale [27].

D'autre part, la taille de l'IM peut être modulée par le niveau auquel l'occlusion se produit. En fait, il existe une relation linéaire entre la portion occluse appelée zone à risque et la zone infarctée [28]. Plus la région ischémique est grande, plus un nombre important de cardiomyocytes sera en ischémie, induisant alors de plus importants dommages. La zone à risque est donc un autre déterminant important de la taille de l'infarctus.

## **1.2. Reperfusion**

Le moyen le plus efficace pour réduire la taille de l'IM et de rétablir une fonction cardiaque acceptable est de reperfuser les régions ischémiques ou autrement dit permettre un retour sanguin dans les régions ischémiques [29]. L'évolution des lésions cellulaires réversibles à irréversibles permet de mieux comprendre l'importance critique de rétablir la

perfusion sanguine du myocarde ischémique le plus rapidement possible. L'efficacité du processus de reperfusion est donc inversement proportionnelle à la durée de l'ischémie. Comme l'IM tend à suivre une trajectoire de l'endocarde vers l'épicarde, les cellules en pourtour de la zone infarctée qui sont non-nécrosées bénéficieront du rétablissement sanguin [30].

La reperfusion permet aux déchets, tels que les lactates, d'être évacués par la circulation sanguine. Elle permet également de rétablir le pH, les concentrations d'eau, d'électrolytes et d'ATP intracellulaire [13].

### **1.2.1. Lésions de reperfusion**

Les effets bénéfiques du rétablissement de la circulation sanguine sont cependant contrebalancés par les lésions de reperfusion. Elles se définissent par un ensemble de phénomènes qui agressent les cardiomyocytes viables au moment de la reperfusion et qui précipitent leur mort. On estime que les lésions de reperfusion seraient responsables de près de 50 % de la taille de l'IM [29].

Le concept de lésions de reperfusion est un sujet contesté puisque certains prétendent que la reperfusion accentuerait uniquement l'apparition des changements morphologiques des lésions irréversibles [31, 32]. Il existe toutefois de nombreuses évidences concluantes de l'existence de ces lésions. Celles-ci proviennent d'études démontrant une réduction de l'IM lors d'administration de traitements pharmacologiques au moment de la reperfusion [29].

La première hypothèse pouvant expliquer les lésions de reperfusion implique l'oxygène. En condition physiologique, la respiration cellulaire produit une faible quantité de radicaux libres qui est neutralisée rapidement par les antioxydants cellulaires de nature enzymatique et non-enzymatique. Au cours de la reperfusion, une augmentation importante



de radicaux libres sous forme d'espèces réactives de l'oxygène est observée [33]. Parmi ceux-ci on retrouve l'anion superoxyde  $O_2^-$ , le radical hydroxyde  $OH^-$  et le peroxyde d'hydrogène,  $H_2O_2$ . À l'exception du  $H_2O_2$ , ils possèdent un électron non-pairé qui rend la molécule instable et très réactive. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) peuvent induire des dommages aux membranes lipidiques, aux protéines et également à l'ADN [34]. Il semble que cette surproduction induit un dommage cellulaire lors de la reperfusion puisque l'administration d'antioxydant au moment de la reperfusion permet de réduire la taille de l'IM [35, 36]. Les radicaux libres influenceraient le myocarde ischémié dans les premières minutes de la reperfusion et ne seraient pas impliqués dans la suite des événements. Toutefois, l'implication des radicaux libres dans les lésions de reperfusion restent très controversés, car plusieurs études n'ont démontré aucun effet protecteur des piègeurs des radicaux libres dans l'IM [7, 37, 38].

La seconde hypothèse pouvant expliquer en partie les lésions de reperfusion implique le calcium. Lors de la reperfusion, il se produit un changement rapide de la distribution des électrolytes dont une augmentation du  $Ca^{++}$  intracellulaire [39]. Ceci est le résultat du transporteur  $Na^+/H^+$  qui réduit les concentrations de  $H^+$  intracellulaire, augmentées par l'ischémie, en important des ions  $Na^+$ . Pour contrer l'augmentation de  $Na^+$ , l'échangeur  $Ca^{++}/Na^+$  favorise l'entrée de  $Ca^{++}$ . Le calcium peut induire des lésions en provoquant la contraction soutenue des myofibrilles ce qui fragilise le cytosquelette et peut causer la rupture de la membrane cytoplasmique [40]. Le calcium, en combinaison avec les ROS, peuvent induire l'ouverture de pores non spécifiques dans la membrane mitochondriale (mPTP). La brèche prolongée abolit la chaîne respiratoire et induit l'affaissement de la membrane mitochondriale [41]. L'ouverture de ces pores déclenche le processus d'apoptose, processus qui sera discuté dans les sections suivantes. Pour terminer, l'ajout d'antagoniste des canaux calciques au moment de la reperfusion permet de réduire la taille de l'IM sous-entendant un rôle du calcium dans les lésions de reperfusion [42].

### 1.2.1.1. Inflammation

L'inflammation observée au moment de la reperfusion pourrait être un autre protagoniste dans la survenue des lésions de reperfusion [29]. Lors de la reperfusion, les cellules lésées libèrent des substances ou débris qui provoquent une réponse inflammatoire. Les *Toll Like Receptors* (TLR) qui sont présents dans les cellules du tissu myocardique et des vaisseaux sanguins seraient impliqués. Ces récepteurs reconnaissent les motifs ou modèles moléculaires associés aux agents pathogènes par la liaison à leurs ligands. Par exemple, les débris cellulaires et molécules libérées lors de lésions telles que les HSP (*Heat Shock Protein*) et la fibronectine sont des signaux de danger et activent les TLR. Une fois activés, ils induisent la production de cytokines pro-inflammatoires et activent les cellules inflammatoires [43]. Confirmant l'implication des TLR dans les lésions de reperfusion, une déficience en TLR4 réduit la taille de l'IM dans un modèle d'ischémie-reperfusion [44].

En parallèle, les débris cellulaires activent les protéines du complément induisant une réponse inflammatoire innée. Le système du complément est composé de protéines sous forme de précurseurs de zymogènes appelés C1 à C9. Elles circulent dans le sang sous forme inactive. L'activation de ce système se déroule dans le myocarde par la voie classique. La liaison de C1 avec un débris cellulaire ou un anticorps induit l'activation de C4, C2 et C3. La protéine C3 active ensuite les molécules effectrices du système du complément, C5 à C9. Celles-ci forment un complexe appelé MAC (*Membrane Attacking Complex*). Le complexe s'insère dans les membranes et perturbe la perméabilité membranaire en formant un pore. Une perméabilité augmentée peut induire la lyse cellulaire. Par ailleurs, les portions clivées des protéines du complément sont des anaphylatoxines. Elles comprennent le C3a, le C4a et le C5a qui sont de puissants chimioattractants [45]. L'inhibition de l'activation du complément soit par l'administration d'anticorps contre C5a ou de récepteurs solubles du complément humain de type 1 (sCR1) s'est montrée efficace pour réduire la taille de l'IM [46-48].

La voie des TLR, la cascade du complément ainsi que la présence de ROS déclenchent l'inflammation post-IM par l'activation du système NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription nucléaire qui régule l'expression de nombreux gènes pro-inflammatoires dont ceux des cytokines. NF- $\kappa$ B est inactif sous forme de dimère dans le cytosol et associé avec les protéines inhibitrices de  $\kappa$ B (I $\kappa$ B). Son activation ce produit lorsque l'enzyme I $\kappa$ B kinase phosphoryle I $\kappa$ B dissociant NF- $\kappa$ B des protéines inhibitrices I $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B transloque au noyau et lie le promoteur de plusieurs gènes ce qui amorce leur transcription [43]. De plus, l'administration d'inhibiteur d'I $\kappa$ B par adénovirus pendant la reperfusion réduit la taille de l'IM [49].

Le processus inflammatoire se déroulant dans le myocarde ischémiq ue libère une pléiade de cytokines pro-inflammatoires par la voie NF- $\kappa$ B dont l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, l'IL-8 et le TNF- $\alpha$  [50]. L'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  ont un effet ionotrope négatif. L'IL-6 joue un rôle dans le développement de l'hypertrophie cardiaque [51] alors que l'IL-8 est chimioattractante et favorise la migration des leucocytes vers la zone infarctée [52]. Ces cytokines peuvent induire la mort cellulaire par le phénomène d'apoptose. L'implication des cytokines dans l'apoptose sera expliquée en détail dans la section suivante. Il semble cependant qu'elles ne seraient pas impliquées dans les lésions de reperfusion. Effectivement, l'inhibition de la cytokine TNF- $\alpha$  ne réduit pas la taille de l'IM dans notre modèle chez le rat [53]. De plus, l'administration de pentoxifylline, un inhibiteur de la synthèse des cytokines, n'induit aucun changement dans la taille d'infarctus sous-entendant que les cytokines ont peu d'effet dans l'IM reperfusé [54].

Les cytokines en combinaison avec les protéines du complément sont des substances chimioattractantes dirigeant les cellules immunitaires vers le centre ischémiq ue. En outre, elles augmentent l'expression des molécules d'adhésion VCAM, ICAM, E-sélectine et P-sélectine sur les cellules endothéliales et les leucocytes permettant l'extravasation du sang vers le stroma [55]. Les neutrophiles dirigés par les substances chimioattractantes roule tout d'abord sur la paroi endothéliale par l'interaction de P-

sélectine et d' E-sélectine provenant de l'endothélium avec PSGL-1 et ESL-1 sur les neutrophiles. Par la suite, les molécules d'adhésions ICAM-1 de l'endothélium se lient à CD11/CD18 sur les neutrophiles. Au niveau des jonctions endothéliales, PECAM-1 permet l'extravasation des neutrophiles vers le tissu myocardique [52]. L'accumulation de neutrophiles dans la zone infarctée est très rapide et se déroule dans les premières minutes de reperfusion. Une seconde phase débute après 24 heures de reperfusion [41, 56]. Les neutrophiles se localisent principalement au pourtour de l'IM avant de migrer vers les régions centrales de l'infarctus [57, 58]. Ils sont de 2 à 6 fois plus présents dans le myocarde ischémique en comparaison avec le myocarde non-ischémique [59].

Dès leur arrivée, les neutrophiles libèrent des enzymes protéolytiques, des radicaux libres dérivés de l'oxygène et des métabolites de l'acide arachidonique (AA) ce qui les rend délétères pour le tissu myocardique [60-61]. Des effets néfastes des neutrophiles peuvent être également induits par la réduction de la circulation sanguine et leur accumulation dans les vaisseaux [58, 62]. Il existe une controverse entourant le rôle des neutrophiles dans les lésions de reperfusion. L'utilisation d'anticorps dirigés contre des molécules d'adhésion s'est montrée efficace dans certains cas pour réduire la taille de l'IM [63, 64]; alors que cette intervention n'avait aucun effet dans d'autres études [65]. Toutefois, dans des conditions expérimentales permettant une intervention positive sur les lésions de reperfusion, l'induction d'une leucopénie a permis la réduction de la taille de l'IM démontrant le rôle potentiel des neutrophiles dans les lésions de reperfusion [66, 67].

Il faut néanmoins se rappeler que l'inflammation est un processus nécessaire pour la guérison. L'inhibition trop importante du processus inflammatoire peut mener jusqu'à un retardement dans la cicatrisation [68]. La cicatrisation débute par une phase inflammatoire, décrite précédemment, qui permet l'arrivée des leucocytes au site de l'infarctus. Ils ingèrent, ensuite, les débris cellulaires et laissent la place au processus de l'angiogenèse. De nouveaux vaisseaux sont formés dans la région cicatricielle ce qui favorise l'arrivée de nutriments et de cellules [69]. Les fibroblastes et les cellules endothéliales prolifèrent afin

que les fibroblastes produisent du collagène remplaçant le myocarde nécrotique par du tissu cicatriciel [43].

### **1.2.1.2. Apoptose**

La mort par nécrose est souvent mentionnée dans le processus d'IM, mais il implique également un phénomène de mort cellulaire par apoptose. En fait, il est estimé que 86 % des cardiomyocytes meurent par apoptose et que seulement 14 % meurent par nécrose après un infarctus [70]. La nécrose peut être causée par un stress mécanique ou chimique. Elle se décrit par la mort cellulaire par lyse. Les organelles de la cellule nécrotique gonflent suite à l'augmentation de la perméabilité membranaire et à la difficulté de contrôler les échanges ioniques de la membrane cellulaire. La cellule libère alors son contenu cellulaire, ce qui provoque un important processus inflammatoire [71].

En opposition, l'apoptose se définit par une mort cellulaire programmée. D'un point de vue morphologique, une cellule en processus d'apoptose subit une condensation du noyau, un repliement sur elle-même, un bourgeonnement membranaire, pour se terminer par la fragmentation cellulaire en plusieurs compartiments appelés corps apoptotiques. Ces corps apoptotiques sont ensuite phagocytés. Elle nécessite la présence d'ATP et la synthèse protéinique [72]. Il existe principalement deux voies d'activation de l'apoptose : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque.

Tout d'abord, la voie intrinsèque peut-être activée par de nombreux facteurs dont l'hypoxie, le stress oxydatif ou un manque de facteurs de croissance. Cette voie est régulée par les protéines de la famille Bcl-2. Cette famille de protéines est divisée en trois classes; les protéines anti-apoptotiques dont Bcl-2 et Bcl-XL, les protéines pro-apoptotiques dont BAX et BAK, et les protéines BH-3 dont BIM et BID. Le domaine d'homologie des Bcl-2 (BH) permet de distinguer ces trois classes protéiniques [73]. Les protéines de la famille Bcl-2 possèdent un domaine transmembranaire leur permettant de s'incorporer dans la

membrane mitochondriale. Les protéines pro-apoptotiques BAX et BAK ont la capacité de former un pore intracellulaire qui peut être inhibé par les protéines anti-apoptotiques [74].

À la suite d'un stimulus activant la voie intrinsèque de l'apoptose, les protéines BH-3 seraient activées. Ces protéines peuvent, selon une première hypothèse, aller directement activer les protéines pro-apoptotiques cytosoliques pour permettre leur insertion dans la membrane mitochondriale augmentant ainsi sa perméabilité. Le second mécanisme proposé implique une liaison entre les protéines BH-3 et les protéines anti-apoptotiques, cette fois-ci les protéines pro-apoptotiques sont ancrées dans la membrane mitochondriale. La liaison des protéines anti-apoptotiques aux protéines BH-3 libère les protéines pro-apoptotiques permettant alors la formation d'un pore dans la membrane mitochondriale [75].

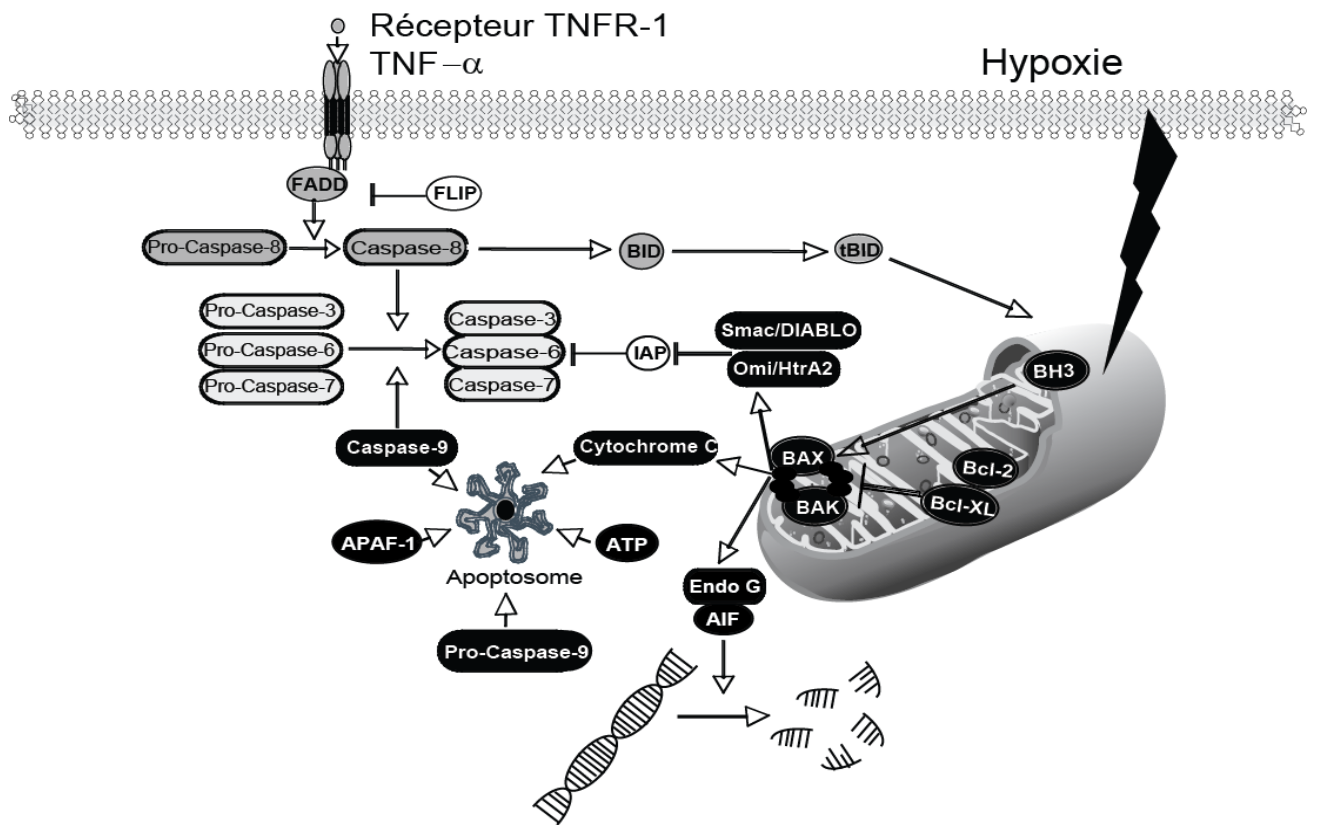
L'augmentation de la perméabilité membranaire mitochondriale est un élément déclencheur de la voie intrinsèque, car cela permet la libération du cytochrome c [76]. Le cytochrome c déclenche l'activation de la voie des caspases lors de la formation de l'apoptosome composé du cytochrome c, d'APAF-1, d'ATP et de la caspase-9 [77]. La caspase-9 fait partie de la famille des protéases cystéines spécifiques à l'aspartate. Les caspases existent sous forme de zymogène, c'est-à-dire de proforme inactive. La caspase-9 fait partie des caspases initiatrices qui possèdent un long prodomaine leur permettant de s'associer à leur activateur spécifique et à d'autres caspases. La caspase-9, recrutée dans l'apoptosome, se dimérise et par changement conformationnel s'active. Par la suite, la caspase-9 clive les caspases effectrices 3, 6 et 7. Celles-ci dégradent les composantes cellulaires et activent d'autres caspases culminant à la dégradation complète de la cellule et la formation de corps apoptotiques [78, 79].

En plus du cytochrome c, l'augmentation de la perméabilité mitochondriale libère Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, EndoG et AIF. En condition physiologique, les inhibiteurs de l'apoptose (IAP), séquestrent les caspases activées pour empêcher le déclenchement de

l'apoptose. Cependant lorsque la voie intrinsèque est activée et que la perméabilité mitochondriale est suffisamment réduite pour libérer un ensemble de protéines, Smac/DIABLO se lie alors à IAP, levant l'inhibition des caspases déjà actives [80]. Omi/HtrA2 en plus d'inhiber également les IAPs, peut les dégrader. Ajoutons que EndoG et AIF favorisent la fragmentation de l'ADN [81] et induisent l'apoptose par une voie indépendante des caspases [82].

Parallèlement, la voie extrinsèque peut provoquer l'apoptose par la liaison des cytokines pro-inflammatoires tel que le TNF- $\alpha$  à son récepteur. La superfamille des récepteurs associés aux activateurs pro-apoptotiques ou *death receptors* (DR) comprennent Fas, TNFR-1 et DR (3-6). Ils sont situés à la surface de la cellule et peuvent être activés par les ligands, TNF- $\alpha$ , LT $\alpha$ , Fas-ligand, Apo3-ligand et TRAIL. L'interaction du récepteur-ligand recrute les protéines adaptatrices FADD et TRADD. Le récepteur de mort, la protéine adaptatrice, la pro-caspase-8 et la pro-caspase-3 forment le complexe DISC (*death inducing domain*) qui permet l'auto-activation de la caspase-8 par changement conformationnel [83, 84]. Cette caspase initiateur clive et active les caspases effectrices 3, 6 et 7. Le processus apoptotique enclenché par l'activation des caspases effectrices ne peut être interrompu [78].

La caspase-8, de plus, clive BID qui est une protéine pro-apoptotique de la famille de Bcl-2. Une fois clivée, tBID devient active et entraîne la libération du cytochrome c. La protéine tBID forme alors le lien entre la voie extrinsèque et intrinsèque [85]. La régulation de l'apoptose peut se faire directement sur le DR. Il existe des protéines capables de lier la portion intracellulaire des DR empêchant la signalisation nécessaire à l'activation des caspases. En plus des IAP qui inhibent les caspases, la protéine FLIP possède la capacité de lier le DISC ce qui empêche l'activation de la caspase-8 [86].



**Figure 1. Voie intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.** La voie extrinsèque (gris) implique l'activation de la caspase-8 via la liaison d'un ligand au DR tel que TNF- $\alpha$  à son récepteur TNFR-1. La voie intrinsèque (noir) permet la libération du cytochrome c sous la régulation des protéines de la famille Bcl-2. La formation de l'apoptosome constituée du cytochrome c, d'APAF-1, d'ATP et de la pro-caspase-9 active la caspase-9. Les deux voies activent les caspases effectrices 3, 6 et 7 et sont régulés par des inhibiteurs de l'apoptose (blanc).

Lors d'un IM, une longue période de reperfusion est associée avec l'augmentation du nombre de cellules apoptotiques. Une période d'ischémie prolongée est plutôt associée à une augmentation du processus de mort par nécrose [87]. Ces deux types de mort cellulaire diffèrent également par leur distribution dans le myocarde ischémique. En bordure de la



région hypoperfusée, il est possible d'observer davantage un phénomène d'apoptose alors que la nécrose est observée dans la région centrale [88]. C'est uniquement lors de la reperfusion qu'on peut noter l'apoptose suggérant son implication dans les lésions de reperfusion [89].

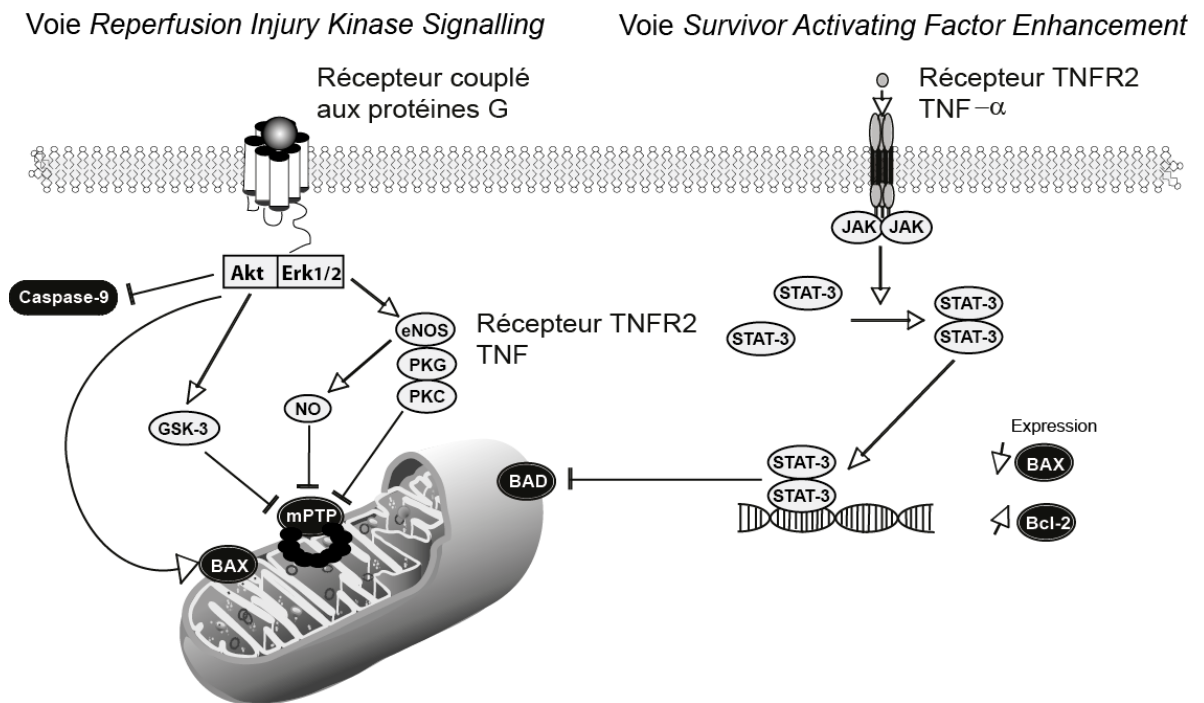
Plusieurs traitements dirigés contre l'apoptose se sont montrés efficaces pour réduire la taille de l'IM et améliorer la fonction cardiaque dont l'ajout d'inhibiteur de caspases [90, 91] et la modulation de la voie mitochondriale par la surexpression de Bcl-2 [92, 93].

### **1.3. Cardioprotection**

Murry et coll. furent les premiers à décrire que de légères occlusions induites avant la reperfusion réduisait la taille de l'IM, phénomène que l'on appelle pré-conditionnement. Plus précisément, l'occlusion successive à quatre reprises pendant seulement 10 minutes interrompue par 20 minutes de reperfusion n'induit pas d'effet délétère cumulatif au tissu cardiaque. Au contraire, cela atténue la baisse d'ATP en comparaison avec une seule occlusion [94-95]. Le pré-conditionnement est la méthode expérimentale de choix pour induire une réduction spectaculaire de la taille de l'IM. Toutefois, son application est limitée en clinique puisqu'elle nécessite la connaissance du moment exact où le patient va faire un IM. Il ne peut alors être utilisé que lors de traitements spécifiques tels que la greffe d'une artère coronarienne par chirurgie [96].

Parallèlement au pré-conditionnement qui s'instaure avant l'ischémie prolongée, la présence de brèves périodes d'ischémie au début de la reperfusion permet de réduire significativement la taille de l'IM. Cette réduction, bien que moins spectaculaire que celle induite par le pré-conditionnement, atténue également la dysfonction endothéliale et l'œdème tissulaire. Dans ce cas-ci, il est possible d'appliquer ce genre de protocole chez les patients, bien que certaines contraintes éthiques subsistent. Le post-conditionnement peut

également impliquer une intervention pharmacologique qui débute au moment de la reperfusion [97] et qui peut induire une diminution de la taille de l'IM par l'activation de voies de cardioprotection très bien décrites dans la littérature, comme la voie de la *Reperfusion Injury Kinase Signalling (RISK)* [98] ou une seconde voie indépendante de RISK la *Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE)* [99], voir figure 2.



**Figure 2. Les voies cardioprotectrices: *Reperfusion Injury Kinase Signalling (RISK)* et *Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE)*.** L'activation des kinases Akt et Erk1/2 dans la voie RISK par des récepteurs couplés aux protéines G influencent l'activité apoptotique lors d'un IM en inhibant la voie intrinsèque (noir) de l'apoptose. Également la liaison de TNF- $\alpha$  à son récepteur TNFR-2 activant la voie SAFE induit la dimérisation de STAT-3 modifiant l'expression des protéines apoptotiques BAD, BAX et anti-apoptotique Bcl-2.

### 1.3.1. Voie de *Reperfusion Injury Kinase Signalling* (RISK)

De nombreux traitements induisent une cardioprotection par la voie de RISK dont l'administration d'*insuline like growth factor* IGF-1 [100], d'opioïde [101], de statine [102] et de pioglitazone [103]. Ils ont tous en commun l'activation d'un groupe de kinases pro-survies soit les kinases Akt et Erk1/2. Lorsqu'activées au moment de la reperfusion, ces kinases confèrent une puissante cardioprotection, figure 2 [104, 105]. Originellement, la voie RISK n'impliquait qu'Akt et Erk1/2. Toutefois, actuellement, les kinases PKG, PKC et GSK-3 seraient activées par cette même voie cardioprotectrice [106] et auraient un rôle à jouer dans cette cardioprotection.

L'activation d'Akt et d'Erk1/2 serait causée par une libération de ligands endogènes suivant l'ischémie dont l'adénosine, les opioïdes et la bradykinine et par la liaison respective de ces ligands à leurs récepteurs couplés aux protéines G [107]. L'effet cardioprotecteur de la voie RISK est associé, du moins en partie, à ses activités anti-apoptotiques. En effet, la voie RISK phosphoryle et inhibe les protéines pro-apoptotiques BAX et BAD. Plus précisément, la kinase Akt inhibe le changement conformationnel de BAX empêchant son insertion dans la membrane mitochondriale [108]. Elle peut également inhiber BAD par phosphorylation soit directement [109] ou indirectement par p70S6k [110]. La protéine kinase Akt peut aussi phosphoryler la pro-caspase-9 ce qui l'inactive [111]. De plus, la voie RISK a été associée à l'inhibition de l'activité de la caspase-3 et à l'augmentation de l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 [112].

Par ailleurs, la voie RISK modulerait l'ouverture du pore interne de la membrane mitochondriale (mPTP). L'ouverture du mPTP a été observée dans la période de reperfusion [113]. Elle serait enclenchée par une augmentation du pH intracellulaire et du  $Ca^{++}$  caractéristique de l'ischémie-reperfusion. L'ouverture du mPTP provoquerait la libération du cytochrome c, déclencheur de la voie intrinsèque de l'apoptose [114, 115]. Le déroulement exact de l'inhibition du pore demeure inconnu bien que de nombreuses

hypothèses aient été émises. Par exemple, une cible cellulaire en aval de la voie RISK, la glycogène synthase kinase 3 (GSK-3), a été liée à l'inhibition de la perméabilité du pore mitochondrial [116]. Également, Akt en phosphorylant eNOS, accroît la production du monoxyde d'azote (NO) qui, à son tour, inhibe l'ouverture du mPTP [117]. Pour terminer, la voie RISK, via PKG, activerait l'isoforme epsilon de PKC qui a la capacité d'empêcher l'ouverture du mPTP [118]. Ainsi, la voie RISK semble pouvoir affecter l'ouverture du mPTP de nombreuses manières.

### **1.3.2. Voie de *Survivor Activating Factor Enhancement* (SAFE)**

La voie cardioprotectrice SAFE implique l'interaction du TNF- $\alpha$  avec son second récepteur TNFR-2, figure 2. Paradoxalement à l'effet pro-apoptotique du TNF- $\alpha$  liant le récepteur TNFR-1 [119], une faible concentration en TNF- $\alpha$  induit une cardioprotection qui, selon Lecour et collaborateurs, impliquerait le facteur de transcription STAT-3 [99, 120, 121]. Ce dernier est activé après transphosphorylation de deux Janus kinases juxtaposés suivant la liaison d'un ligand au récepteur [122]. Ainsi, la liaison de TNF- $\alpha$  sur son récepteur TNFR-2 permet la dimérisation de STAT-3 et sa translocation au noyau. Appuyant l'effet de STAT-3 dans la cardioprotection, celui-ci est activé pendant l'ischémie-reperfusion et l'inhibition de la voie JAK/STAT augmente les dommages lors d'un IM [123].

La cardioprotection induite par STAT-3 serait subséquente à une réduction de l'apoptose. D'ailleurs, ce facteur peut moduler Bcl-2, Bcl-XL et Fas [99]. Il inactive BAD par phosphorylation [120], augmente l'expression de Bcl-2, anti-apoptotique, et diminue l'expression de BAX, pro-apoptotique [124]. Il améliore, en plus, le potentiel membranaire interne et la respiration mitochondriale [120]. La description de la voie SAFE est récente et de nombreuses études seront nécessaires afin de mieux comprendre le processus de cardioprotection qu'elle entraîne [99, 119, 121].

## Chapitre 2. Dépression post-infarctus du myocarde

Selon l'Organisation mondiale de la santé, un épisode dépressif est caractérisé par une baisse de moral, d'énergie et d'activité. La capacité d'amusement, les intérêts et la concentration du patient sont réduits. L'individu ressent une fatigue marquée lors d'effort minime. Le sommeil est habituellement troublé et l'appétit réduit. La sévérité de l'épisode varie selon le nombre de symptômes [125]. Une dépression est décrite comme majeure lorsqu'un épisode dépressif de forte gravité survient une ou plusieurs fois de suite. Elle est d'une durée minimale de deux semaines et se définit par une humeur dépressive et ou une perte d'intérêt, de plaisir dans les activités quotidiennes [126]. Au Canada, environ 11 % des Canadiens souffriront d'une dépression majeure dans leur vie alors que chaque année, environ 4 % des Canadiens en sont atteints [126]. Le suicide est la principale cause de mortalité suivant une dépression majeure et environ 15 % des dépressifs majeurs y succombent [127].

Les symptômes de la dépression semblent être associés à une prévalence accrue des maladies cardiovasculaires. En effet, selon les résultats de l'étude longitudinale du *National Health Examination Follow-up Study* chez 2 832 Américains, la dépression accroît les risques des maladies cardiovasculaires ischémiques fatales et non-fatales [128]. La prédisposition des individus dépressifs aux maladies coronariennes a été appuyée par les résultats de nombreuses études [129-131]. De plus, le risque relatif de développer une maladie coronarienne chez les patients dépressifs est proportionnel à la sévérité de la dépression et indépendant des facteurs de risques tels que le tabagisme, l'obésité, l'hypercholestérolémie et bien d'autres [132]. Il est possible d'ajouter que la dépression accroît les risques de mortalité attribués aux maladies coronariennes à la fois chez des individus avec ou sans diagnostic de maladie cardiovasculaire. Chez ces mêmes sujets, la dépression majeure augmentait de 2 fois le risque de mortalité cardiovasculaire par rapport à une dépression mineure [133]. En somme, la dépression amplifie le risque d'être atteint et de succomber à une maladie cardiovasculaire [134].

Inversement, les individus avec une maladie cardiovasculaire sont plus à risque d'éprouver une période de dépression. En fait, à la suite d'un IM, environ 60 % des patients vont présenter des symptômes de dépression. Parmi ces derniers, 15 à 22 % développeront une dépression majeure [135]. Ces épisodes de dépression influenceront négativement la qualité de vie de l'individu et sa compliance aux thérapies médicales et à la réhabilitation [136]. Il est important de souligner que la dépression majeure post-IM accroît le risque de mortalité pendant les 6 à 18 mois suivants l'IM [137, 138]. Plus spécifiquement, ce risque est augmenté de 3 à 4 fois dans les 6 mois suivants l'IM [138]. L'association entre la dépression majeure et l'apparition de mortalité cardiovasculaire reste observable 10 ans suivant l'IM [139].

Afin de mieux comprendre l'interaction entre la dépression et l'IM, des traitements psychologiques et pharmacologiques ont été effectués chez les patients atteints de dépression. En premier lieu, l'amélioration du support social post-IM permet de renverser le risque élevé de mortalité chez les individus dépressifs [140]. D'un autre côté, les traitements pharmacologiques, dont la prise d'antidépresseurs tels que la sertraline réduit les risques de mortalité cardiovasculaire et les risques de subir un nouvel IM [141]. Également, la prise d'antidépresseurs comme la fluoxétine et la nortriptyline, pendant 12 semaines, dans les 6 premiers mois suivants l'IM, augmente la survie dans les 9 ans après l'incident ischémique chez des patients [142]. Toutefois, une récente étude avec l'antidépresseur sertraline nommée *Sertraline Antidepressant Heart Attack Randomized Trial* (SADHART) réfute le bénéfice de l'administration d'antidépresseurs en ne démontrant aucune corrélation entre la prise de sertraline chez les patients post-IM avec une dépression majeure et la réduction de mortalité [143].

La problématique entourant la dépression post-IM est liée à son diagnostic [144]. Ceci pourrait être provoqué par la difficulté de reconnaître les symptômes de dépression [138, 144]. Également, il a été suggéré que les médecins peuvent être réticents à l'idée de traiter la dépression, car elle est considérée par plusieurs comme une phase normale et

transitoire provoquée par la peur de mourir et l'hospitalisation [145]. Ajoutons que le risque d'interaction médicamenteuse et les effets secondaires affectant le système cardiovasculaire reliés à la prise d'antidépresseurs tricycliques compliquent le tout [146, 147]. Ainsi malgré le fait que plusieurs études appuient les bienfaits des traitements psychologiques ou pharmacologiques après l'IM [139, 141-143], peu de patients les reçoivent.

## 2.1. L'étiologie de la dépression

Dans le but de mieux comprendre la relation entre la dépression et les maladies coronariennes telles que l'IM, une description de l'étiologie de la dépression est requise. Il faut tout d'abord spécifier que de nombreux points d'interrogation subsistent dans ce domaine et que plusieurs hypothèses semblent apporter une partie de la réponse [148].

La première hypothèse appelée monoaminergique se base sur l'effet des antidépresseurs à moduler les concentrations de neurotransmetteurs [149]. En aigu, c'est-à-dire quelques heures après l'administration d'antidépresseurs, on observe une augmentation de la disponibilité de dopamine et/ou de sérotonine par inhibition du recaptage ou libération accrue de neurotransmetteurs. Toutefois, l'effet antidépresseur c'est-à-dire la réponse clinique n'est observé qu'après plusieurs jours, voire même semaines, de traitements. En fait, l'effet thérapeutique maximal est atteint après 6 à 8 semaines et chaque drogue est efficace chez 60 à 70 % des patients [150]. Conséquemment, l'hypothèse monoaminergique ne semble pas expliquer totalement l'étiologie de la dépression.

Par la suite, la seconde hypothèse suggère que des altérations dans la plasticité neuronale seraient impliquées dans la dépression. Celle-ci est appuyée par l'observation de modifications structurelles et moléculaires chez les patients dépressifs [151]. D'ailleurs, des études post-mortem chez des patients souffrants de dépressions majeurs ont démontré un rétrécissement des régions du cortex préfrontal et de l'hippocampe [152-155]. De plus, les modifications dans la densité et la forme des neurones et des cellules gliales dans le cortex

préfrontal ont été observées chez ces mêmes patients [156]. Ces changements peuvent être en partie causés par un déséquilibre entre la neurogénèse et la mort cellulaire [157]. Ainsi, le manque de facteurs neurotrophiques diminuant la neurogénèse pourrait y contribuer.

En lien avec la réduction du volume de régions cérébrales, cette même seconde hypothèse propose qu'un manque de facteurs neurotrophiques serait responsable de ces changements. Dans ce sens, nombreuses études se sont intéressées au facteur neurotrophique *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), car celui-ci est exprimé de manière abondante dans les régions affectées par la dépression [148]. Ils ont observé que les concentrations sériques et cérébrales de BDNF, dans l'hippocampe, sont réduites chez les patients dépressifs [158] et dans des modèles de dépression animale [159]. De plus, plusieurs classes d'antidépresseurs augmentent les concentrations cérébrales de BDNF [160-162].

Les neurones nécessitent l'interaction entre un facteur neurotrophique et son récepteur afin de proliférer, migrer, se différencier, mais aussi pour maintenir le fonctionnement et l'intégrité neuronale à l'âge adulte. Un manque de facteurs neurotrophiques mène ultimement à l'apoptose neuronale [163]. L'apoptose semble effectivement être impliquée dans la dépression, car dans différents modèles de dépression, au moins 10 gènes impliqués dans la mort cellulaire par apoptose sont modifiés [164]. De plus, une étude clinique post-mortem chez des patients dépressifs majeurs a rapporté la présence d'apoptose et de fragmentation d'ADN, chez 11 des 15 patients, dans les régions de l'hippocampe, du subiculum, du corps godronné (Gd), du CA1 et du CA4 [165].

En accord avec ces observations, dans le modèle d'IM chez le rat utilisé dans le présent mémoire, la présence d'apoptose a été observée dans diverses régions cérébrales [54, 166-168]. Dans ce même modèle, des symptômes de dépression accompagnés d'une augmentation des marqueurs apoptotiques, plus précisément dans le système limbique, ont



été constatés [168]. Le système limbique regroupe un ensemble de régions cérébrales dont le gyrus cingulaire, l'amygdale, le thalamus, l'hypothalamus et l'hippocampe. Cet ensemble de régions joue un rôle dans les émotions, les réponses autonomiques, motrices et cognitives liées à la mémoire et à la motivation [169] appuyant le rôle des modifications de la plasticité neuronale dans la dépression.

Soulignons davantage l'implication de l'apoptose dans la dépression en mentionnant que de nombreux antidépresseurs ont des propriétés anti-apoptotiques [170]. D'ailleurs, dans notre modèle d'IM, nous avons démontré que l'administration de l'antidépresseur sertraline, en plus de réduire les symptômes de dépression, réduisait l'apoptose dans les régions du système limbique [168].

## **2.2. Hypothèses**

L'interrelation entre le cœur et le cerveau émergeant du cerveau vers le cœur est depuis longtemps connue et bien étudiée [171]. La dépression post-IM sous-entend une nouvelle relation partant cette fois du cœur vers le cerveau. Bien que les modifications des monoamines, de la plasticité cérébrale et de l'apoptose sont soulevées comme pouvant être impliquée dans la dépression, la cause de ces modifications reste nébuleuse [148]. Deux principales hypothèses seront discutées dans la section suivante afin d'expliquer la relation entre l'IM et la dépression soit l'hypothèse impliquant les cytokines et l'hypothèse de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA).

### **2.2.1. L'hypothèse impliquant les cytokines**

Les cytokines sont des protéines produites en réponse à un antigène étranger ou à une atteinte cellulaire. Ces molécules de signalisation intercellulaire régulent le mouvement, la prolifération, la différenciation des cellules immunitaires, dont les lymphocytes [172]. Les cytokines peuvent être classées en trois catégories. La première

inclut les cytokines pro-inflammatoires qui aident au déclenchement de la réponse immunitaire : l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$ . Le second englobe les cytokines IL-4, IL-10, IL-3, qui bloquent ou tempèrent la réponse immunitaire, catégorie dite anti-inflammatoire. Finalement, les cytokines hématopoïétiques incluant l'IL-3, l'IL-5, G-CSF sont impliquées dans la stimulation et la différenciation des cellules progénitrices et constituent le troisième groupe [173].

Les cytokines sont des molécules hydrophiles avec un poids moléculaire d'environ 13 à 15 kDa. Elles passent difficilement la barrière hématoencéphalique (BHE) par diffusion transépithéliale [174]. La BHE a d'ailleurs pour rôle de réguler les échanges entre le sang périphérique et le cerveau. Elle est constituée de cellules épithéliales cérébrales fortement rattachées les unes aux autres par des jonctions serrées et des jonctions adhérentes. Seules les molécules lipophiles avec un poids moléculaire inférieur à 400 Da peuvent traverser librement la BHE par diffusion [175]. Par conséquent, il a été surprenant d'observer qu'une infusion avec des lipopolysaccharides provoquant une réponse inflammatoire périphérique induit une augmentation des cytokines cérébrales ainsi que des effets comportementaux similaires à la dépression [176-178].

Plusieurs mécanismes ont été proposés afin d'expliquer comment les cytokines atteignent le système nerveux central produisant les effets comportementaux notés. Tout d'abord, en similitude avec le passage des nutriments, les cytokines périphériques pourraient traverser la BHE à l'aide de transporteurs à influx saturable [173]. Ce mécanisme a d'ailleurs été démontré pour les cytokines pro-inflammatoires IL-1  $\alpha/\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$  [179]. Par la suite, étant donné que la BHE est incomplète près de certaines régions cérébrales circum-ventriculaires, les cytokines pourraient y traverser librement. Parallèlement, une augmentation de la perméabilité de la BHE permettrait le passage des cytokines [173]. Dans ce sens, certaines cytokines dont l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  peuvent augmenter la perméabilité paracellulaire, c'est-à-dire entre les cellules épithéliales microvasculaires, impliquant un mécanisme de redistribution des protéines formant les

jonctions serrées [180]. Finalement, il est proposé qu'une liaison des cytokines avec leurs récepteurs associés à des nerfs afférents, par exemple le nerf vague, puisse transmettre un influx nerveux au cerveau [181]. D'ailleurs, chez la souris, une vagotomie réduit les symptômes dépressifs provoqué par l'IL-1 $\beta$  [182]. Ce mécanisme n'expliquerait cependant pas entièrement les effets des cytokines sur le système nerveux central, car la vagotomie abolit qu'une portion des réponses médiée par l'IL-1 $\beta$  et le LPS [183]. En somme, les cytokines emprunteraient vraisemblablement de nombreuses voies pour traverser la BHE dont une voie rapide impliquant des nerfs afférents ou une voie lente humorale [184].

Appuyant l'hypothèse que les cytokines seraient responsables des symptômes dépressifs, l'altération des niveaux de cytokines chez les patients dépressifs ont été observées. Dans les faits, les cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$ , sont augmentées chez les patients dépressifs majeurs [185, 186], alors que les cytokines anti-inflammatoires sont réduites chez ceux-ci [187]. Bien que quantitativement faible, les niveaux de cytokines mesurés dans le système nerveux central sont reconnus pour être suffisants et être une cause probable des symptômes de dépression [188].

De plus, il est intéressant de remarquer que dans divers modèles animaux, l'administration de cytokines pro-inflammatoires et d'inducteurs de ces cytokines provoque des symptômes associés à la dépression. Par exemple, ces animaux traités démontrent des activités physique et sociale réduites ainsi que de l'anhédonie [189, 190]. Il est intéressant de noter que dans ces mêmes modèles les cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 ou l'IGF-1 semblent réguler l'intensité et la durée de ces symptômes dépressifs [191-193]. Ces études soulignent l'importance de la balance entre les cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires dans la dépression. Parallèlement, on observe chez l'homme des modifications neuropsychiatriques dont la dépression majeure avec l'administration des cytokines IL-2 et IFN- $\alpha$ 2 [194, 195]. Les symptômes dépressifs peuvent être présents chez environ 50 % des patients traités à l'IFN- $\alpha$ 2 [196]. Chez ceux-ci le traitement aux antidépresseurs tels que la paroxétine est efficace pour prévenir la dépression [197, 198].

Outre les antidépresseurs, il est possible de réduire les symptômes dépressifs en inhibant directement les cytokines. Par exemple, l'infliximab, inhibiteur de TNF- $\alpha$  administré chez des patients atteints du syndrome de Cushing réduit les symptômes de dépression avant même l'amélioration de la maladie [199].

L'un des mécanismes pouvant expliquer les effets comportementaux causés par l'administration de cytokines serait une modification des concentrations de neurotransmetteurs. D'ailleurs, l'IL-1 active le système noradrénergique en augmentant les catabolites de la noradrénaline [200]. L'augmentation des catabolites de la noradrénaline est également observée chez les patients dépressifs, appuyant cette hypothèse [201]. En ce qui attrait à l'IL-2, elle diminue les concentrations de dopamine dans le noyau accumbens qui, rappelons-le, fait partie du système limbique [202]. L'IFN- $\alpha$  réduit les concentrations de dopamine et de noradrénaline dans le cortex, l'hypothalamus et la médulla [203]. Également, l'IFN- $\alpha$  et l'IL-2 activent l'enzyme indoleamine 2,3-dioxygénase dégradant le tryptophane précurseur de la sérotonine [204]. Pour terminer, l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  modulent le système sérotoninergique [205]. En somme, les cytokines influencent les concentrations cérébrales de noradrénaline, de dopamine et de sérotonine pouvant ainsi expliquer en partie les modifications des neurotransmetteurs associées aux symptômes dépressifs.

Par la suite, l'augmentation des prostaglandines cérébrales pourrait être un second mécanisme impliqué dans les effets comportementaux dépendants des cytokines [206]. Les cytokines pro-inflammatoires peuvent déclencher la transcription de différents gènes dans les cellules de la BHE. Plus spécifiquement, l'IL-1 $\beta$  accroît la transcription de NF- $\kappa$ B et de COX-2. Cette dernière est l'enzyme limitante pour le métabolisme des phospholipides membranaires en PGE2 [207]. Puisque la PGE2 est liposoluble, elle est capable de diffuser à travers la BHE et d'activer la voie HPA (discuté dans la section suivante) [174, 208]. Par ailleurs, la PGE2 peut induire de manière dose-dépendante la mort cellulaire par apoptose à travers l'activation des caspases dans les cellules du cortex cérébral de rats [209]. Ainsi,

l'augmentation de l'expression de COX-2 par les cytokines pourrait augmenter les concentrations de PGE2 induisant l'apoptose, phénomène relié à la dépression.

L'IM implique un important processus inflammatoire. Il se produit d'ailleurs au site de lésion une libération de cytokines diffusant dans la périphérie, mais également dans l'hypothalamus [50, 210]. Les cytokines augmentent dès les trente premières minutes après l'IM par un mécanisme impliquant des nerfs afférents en provenance du cœur [210]. Comme ces cytokines influencent le système cérébral et peuvent induire l'apoptose, il est possible d'émettre l'hypothèse que les cytokines soient à l'origine de l'apoptose observée dans le système limbique dans notre modèle d'IM chez le rat [53, 168].

De manière directe, les cytokines sont connues pour induire l'apoptose via l'activation de DR déclenchant la voie extrinsèque de l'apoptose [83]. Également, de manière indirecte, les cytokines le peuvent via l'augmentation de PGE2. D'ailleurs, des résultats antérieurs de notre laboratoire ont démontré une augmentation de l'apoptose après l'IM dans les régions de l'amygdale et de l'hippocampe [54], correspondant à des régions où la proportion des récepteurs de PGE2 sont élevés [211]. De plus, le fait d'inhiber COX-2, l'enzyme limitante dans la production de PGE2, dans notre modèle d'IM prévient l'apoptose dans l'amygdale [212].

Les cytokines pro-inflammatoires seraient vraisemblablement impliquées dans le mécanisme d'apoptose suivant un IM étant donné que l'administration de pentoxifylline, un inhibiteur de la synthèse des cytokines, réduit l'apoptose dans le système limbique 3 jours après l'IM [54]. Ajoutons que l'administration du récepteur soluble TNFR1 humanisé, bloquant la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$ , réduit l'apoptose après 15 min et 72 heures de reperfusion dans les régions de l'hippocampe et de l'amygdale [53]. En plus des médicaments avec des propriétés anti-inflammatoires, l'antidépresseur (Sertraline) ou l'agoniste des récepteurs à l'adénosine A2A (CGS 21680) réduisent l'apoptose dans le système limbique [168, 213]. Ainsi, plusieurs classes de médicaments peuvent moduler

l'apoptose observée dans le système limbique après un IM dans notre modèle d'IM chez le rat.

Pour conclure, les cytokines semblent avoir un rôle à jouer dans la dépression post-IM. Cependant, l'implication directe de cette voie reste à être déterminée sachant que les cytokines modulent l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien discuté dans la section suivante [208].

### **2.2.2. L'hypothèse de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien**

La réponse physiologique du corps face à un stress de nature diverse débute par l'activation de zones corticales et associatives du système limbique cérébral. Un influx nerveux est alors envoyé aux neurones de l'hypothalamus déclenchant l'activation de l'axe HPA. La corticolibérine (CRH) est ensuite synthétisée par les neurones du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus et relâchée dans le système sanguin appelé porte faisant le lien vers l'hypophyse. Ainsi, une fois arrivée à l'hypophyse, l'hormone CRH conjointement avec la vasopressine déclenche la libération de l'hormone corticotrope (ACTH) par les cellules endocrines de l'hypophyse. L'ACTH se retrouve libérée dans la circulation sanguine où elle est amenée à se lier aux récepteurs situés dans la région corticale de la surrénale. L'interaction ACTH-récepteur induit la synthèse de glucocorticoïdes dont le principal chez l'homme est le cortisol [214-217]. Les glucocorticoïdes agissent sur de nombreux tissus et organes par des récepteurs nucléaires qui sont les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR) et les récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR) [218]. Lorsque les concentrations de glucocorticoïdes sont élevées, l'axe HPA est régulé par une boucle de rétroaction négative. En fait, la liaison glucocorticoïdes-GR inhibe la production de CRH de l'hypothalamus et d'ACTH des cellules endocrines de l'hypophyse [215, 216].

La réponse physiologique du corps face au stress permet au corps de se préparer à réagir face au stimulus. Lorsque l'axe HPA est bien régulé, ce phénomène permet de maintenir l'homéostasie. Cependant, une activation prolongée ou mal régulée de l'axe HPA peut avoir des conséquences dommageables ou même létales [215]. D'ailleurs, une forte activation de l'axe HPA par des événements stressants est bien connue comme l'un des déclencheurs les plus efficaces de la dépression [219]. À la suite d'événements douloureux subis à bas âge, des modifications de l'axe HPA surviennent, se répercutant à l'âge adulte. Plus précisément, les niveaux de cortisol sont anormalement élevés après un test à la dexaméthasone (agoniste des récepteurs GR) et CRH, signifiant une hyperactivité de l'axe HPA chez ces adultes [220, 221]. Ajoutons que l'hyperactivité de l'axe HPA présent chez les patients atteints du syndrome de Cushing, adénome de l'hypophyse provoquant une hypersécrétion d'ACTH et de cortisol en réponse à la glande surrénale, se traduit très fréquemment par des symptômes de dépression [222, 223]. Ces observations soulignent que l'hyperactivité de l'axe HPA pourrait être l'un des facteurs déclencheurs de la dépression.

En plus de précéder l'épisode dépressif, l'hyperactivité de l'axe HPA est fréquemment observée chez les patients atteints de dépression. Les concentrations de cortisol sont anormalement élevées dans le sang et l'urine de ces patients [224, 225]. De plus, la boucle de rétroaction négative semble être inefficace chez plusieurs patients dépressifs [226, 227] et la sensibilité aux glucocorticoïdes est réduite [228]. De manière intéressante, le dérèglement de l'axe HPA chez les dépressifs peut être rétabli par les antidépresseurs efficaces [229].

Il est proposé que l'hyperactivité de l'axe HPA serait impliquée dans la dépression et ceci par le fait que les glucocorticoïdes influencent certaines régions cérébrales [230]. En effet, à de fortes concentrations, les glucocorticoïdes intensifient la sensibilité de la région CA1 de l'hippocampe aux agents neurotoxiques tels que le glutamate ou l'anoxie [231, 232]. Parallèlement, dans la région CA3 de l'hippocampe, des concentrations de glucocorticoïdes élevées causent une atrophie des dendrites apicales des cellules

pyramidales. Ainsi, les neurones reçoivent une portion restreinte de l'information rentrante [233]. Par la suite, la région Gd est aussi modulée par les glucocorticoïdes. Celle-ci avec la région périventriculaire est une source de nouveaux neurones dans le cerveau adulte. Une portion de ceux-ci peut s'incorporer dans la région CA3 [234]. Par ailleurs, de fortes concentrations de glucocorticoïdes diminue la survie des neurones immatures de la région Gd et réduit, en plus, la capacité des neurones immatures à exprimer le phénotype mature [235]. Ainsi, l'hypersecretion de glucocorticoïdes induirait des dommages cérébraux. Ceux-ci pourraient être une cause de la dépression, car l'inhibition de GR chez des patients dépressifs majeurs psychotiques permet de réduire les symptômes [236].

Plusieurs hypothèses ont été soulevées afin d'expliquer l'hyperactivité de la voie HPA présente chez les dépressifs. En premier lieu, les événements stressants survenus en bas âge pourraient affecter de manière permanente le fonctionnement de l'axe HPA [220, 221]. Par la suite, un dérèglement dans la fonction des GR pourrait en être la cause. Ce dernier peut être causé par les cytokines, car elles influencent la translocation des GR à la membrane. Elles modulent aussi l'interaction récepteur-glucocorticoïdes et la liaison du GR à l'élément de réponse situé sur l'ADN [237]. D'autre part, la prédisposition héréditaire pourrait jouer un rôle dans la dépression. Ainsi, des polymorphismes dans le GR ont été corrélés à la survenue de la dépression majeure [238].

Dans la dépression post-IM, une sensibilité accrue aux glucocorticoïdes a été associée à la présence de symptômes dépressifs. Selon les auteurs, puisque les glucocorticoïdes sont de puissants inhibiteurs de la réponse inflammatoire, l'augmentation de sensibilité pourrait expliquer les infections latentes chez les patients dépressifs post-IM [239]. Cependant, dans une seconde étude, la personnalité de type D (détresse) chez des patients post-IM étant plus à risques de comorbidités, était corrélée avec une mauvaise régulation de l'axe HPA [240]. Des études subséquentes seront nécessaires pour évaluer l'implication des dérégulations de l'axe HPA dans la dépression post-IM.



## Chapitre 3. Acides gras essentiels

Les acides gras (AG) font partie de la famille des lipides et sont des molécules organiques constituées d'acides carboxyliques à chaîne aliphatique hydrophobe saturée ou insaturée. Un AG insaturé possède au moins une double liaison dans sa chaîne carbonée. On parle d'AG monoinsaturé ou polyinsaturé, lorsque celui-ci contient respectivement une ou plusieurs doubles liaisons [241]. Il existe quatre sous-familles d'AG polyinsaturés; les oméga-3 ( $\omega$ -3), les oméga-6 ( $\omega$ -6), les oméga-7 ( $\omega$ -7) et les oméga-9 ( $\omega$ -9). Dans l'ensemble, uniquement les AG polyinsaturés de type  $\omega$ -3 et  $\omega$ -6 sont essentiels, car ils ne peuvent être synthétisés par les mammifères. Ils doivent ainsi se retrouver obligatoirement dans l'alimentation [242].

La principale source d'oméga-3 provient du phytoplancton présent à la surface des océans et qui, par photosynthèse, fixe l'énergie sous forme de chaîne carbonée insaturée  $\omega$ -3. De ce fait, comme il est le principal nutriment des poissons, ces derniers deviennent une excellente source d' $\omega$ -3 [243]. Toutefois, la proportion d'acides gras essentiels (AGE)  $\omega$ -3 retrouvée dans les poissons varie selon leur habitat. Par exemple, les poissons d'eau salée contiennent davantage d' $\omega$ -3 que les poissons d'eau douce ou ceux dans les étangs artificiels nourris au maïs [244].

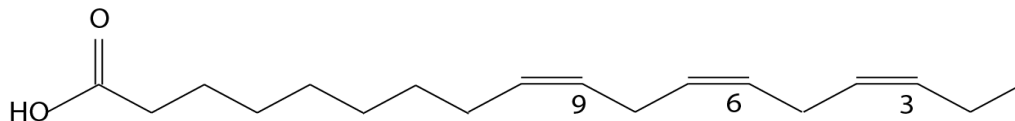
On retrouve également des sources d' $\omega$ -3 d'origine végétale telles que les graines et l'huile de lin, l'huile de canola et les légumes verts à feuilles. En ce qui a trait aux  $\omega$ -6, l'apport alimentaire de ces AGE provient en majorité des céréales, des œufs, des graisses animales, des huiles végétales de tournesol et de sésame. Finalement, l'apport alimentaire en  $\omega$ -7 et  $\omega$ -9 origine respectivement des huiles d'olive et de palme [243]. Rappelons que ces AG sont non essentiels et peuvent être synthétisés à partir de l'acétylCoA produit commun du métabolisme des glucides, lipides et acides aminés [243, 245, 246].

### 3.1. Structure et nomenclature

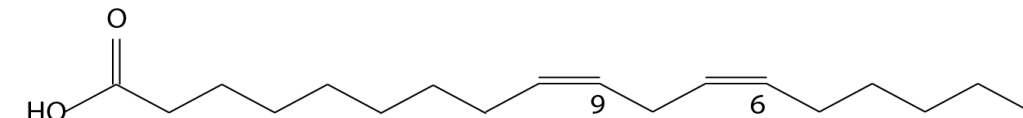
La structure des AG est constituée de chaînes droites sans ramification formées de nombre impair d'atomes de carbone avec ou sans double liaison séparée par un carbone [247]. Les AG diffèrent entre eux non seulement par leur nombre de carbone, mais également par l'orientation spatiale des doubles liaisons (cis ou trans). La conformation cis signifie que la chaîne carbonée est d'un même côté de la double liaison. Alors que dans la conformation trans, elle est de part et d'autre [241, 246, 247].

Les AG peuvent tout d'abord être classifiés selon la longueur de leurs chaînes carboxyliques. Par exemple, les AG avec une chaîne de 2, 3 ou 4 atomes de carbone sont dits volatiles. Ceux à chaîne courte possèdent entre 6 à 10 atomes de carbones. Les AG à chaîne moyenne ont entre 12 et 14 carbones, alors que les AG à chaîne longue en contiennent 16 ou plus. De manière plus précise, la notation biochimique des AG se fait comme suit; **n : m** (endroit de la double insaturation) où **n** est le nombre de carbones de la chaîne carboxylique et **m** le nombre d'insaturation ou double liaison. Entre parenthèse on retrouve la position du carbone ou des carbones sur lesquels on retrouve l'insaturation. La

Acide gras alpha-linolénique 18:3 (3,6,9)



Acide gras linoléique 18:2 (6,9)



position est déterminée en relation au méthyle terminal [241].

**Figure 3. Structure et nomenclature des acides gras alpha-linolénique (ALA) et linoléique (LA).** À partir du méthyle terminal la première double liaison ou insaturation rencontrée détermine le type d'acide gras oméga.

Une seconde nomenclature sera utilisée dans ce mémoire; la nomenclature oméga ( $\omega$ ). Il faut tout d'abord noté que l'extrémité du méthyle terminal est appelée le carbone oméga ( $\omega$ ). À partir de celui-ci, les carbones sont numérotés. L'apparition de la première insaturation détermine le type d'AG  $\omega$ - ( ) également représenté par n-( ) [241, 245]. Ainsi, les AG  $\omega$ -3 possèdent une première insaturation entre le 3<sup>e</sup> et le 4<sup>e</sup> carbone à partir du méthyle terminal. Parallèlement, les AG  $\omega$ -6 comprennent l'ensemble des AG avec une première insaturation entre le 6<sup>e</sup> et le 7<sup>e</sup> carbone à partir du méthyle terminal [241, 248]. On peut d'ailleurs observer les composés les plus simples des deux familles  $\omega$ -3 et  $\omega$ -6, c'est-à-dire avec la plus courte chaîne carbonée, dans la figure 2, qui sont respectivement l'acide alpha-linolénique (ALA) et l'acide linoléique (LA) .

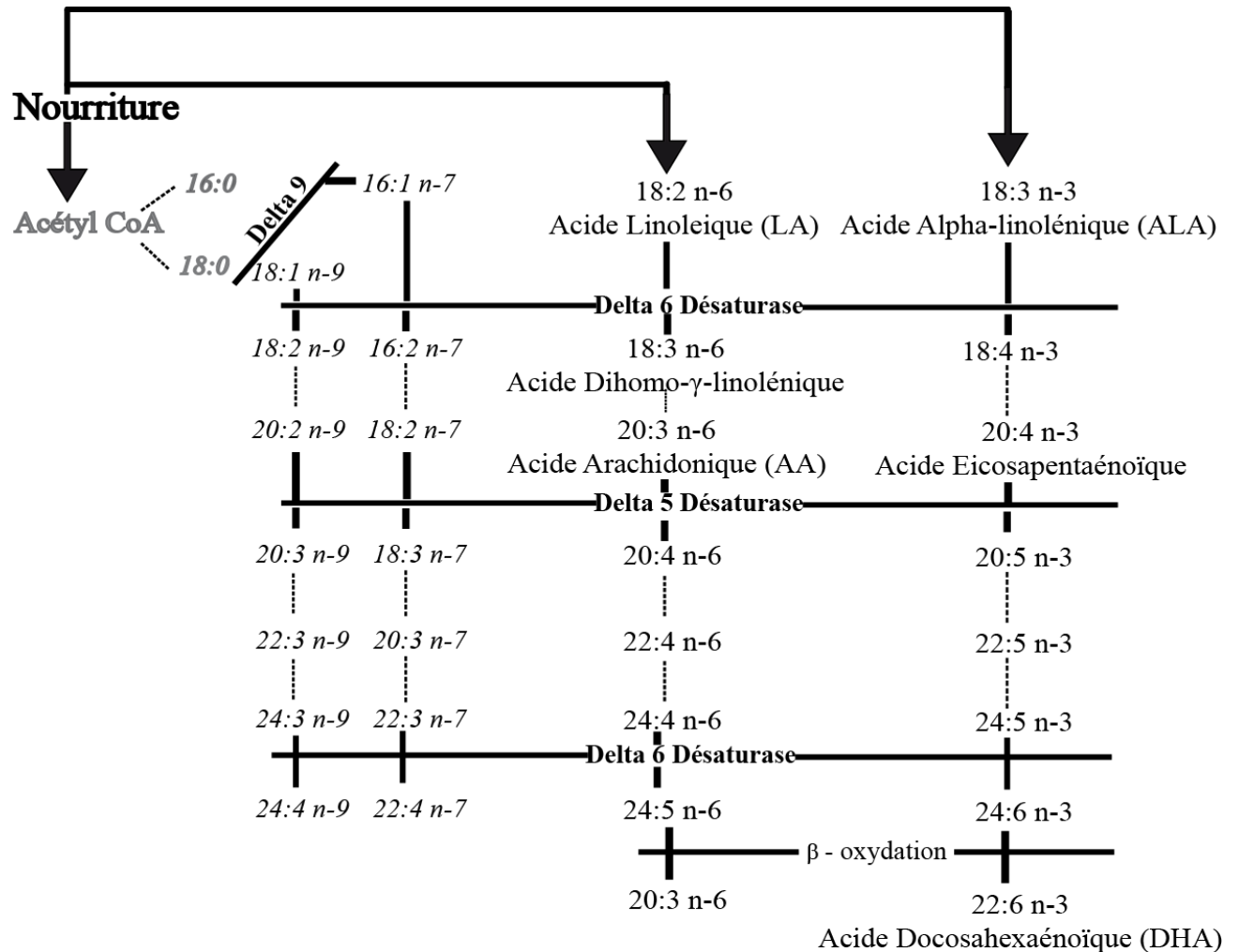
### **3.2. Métabolisme des oméga-3 et oméga-6**

Une fois ingérés, les AG vont soit être dégradés par  $\beta$ -oxydation pour libérer de l'énergie ou être stockés dans les graisses selon les besoins énergétiques. La  $\beta$ -oxydation permet la formation d'ATP via la formation de NADH, FADH<sub>2</sub> et d'acétylCoA c'est-à-dire 2 carbones reliés au coenzyme A. En comparaison avec les glucides et les protéines, le métabolisme des AG fournit deux fois plus d'énergie à poids égal [245]. En plus d'être une forme de stockage, certains AG sont nécessaires pour le bon fonctionnement de divers organes. Mentionnons ici la nécessité des AG  $\omega$ -6 pour maintenir la perméabilité de la peau dans la couche épidermique [249]. Les  $\omega$ -3 à longues chaînes sont également indispensables dans diverses régions cérébrales et dans la rétine de l'œil afin de permettre le bon fonctionnement et la maturation [250, 251]. Les  $\omega$ -3 et  $\omega$ -6 à longues chaînes sont aussi nécessaires en tant que précurseur des prostaglandines et leucotriènes, comme nous le verrons plus loin [244].

Lorsque ces AG à longue chaîne ne sont pas retrouvés dans l'alimentation, il est nécessaire de les synthétiser. Le corps utilise cependant toujours en premier lieu les AG facilement accessibles c'est-à-dire ceux qui proviennent directement de l'alimentation avant d'en synthétiser de nouveaux. Ce principe est assuré par l'inhibition des enzymes de la biosynthèse des AG, les élongases et les désaturases en présence d'AG essentiels [252].

Tout d'abord, à partir de l'acétylCoA, produit commun de la dégradation des glucides, des AG et des acides aminés, le corps peut uniquement synthétiser des AG non-essentiels  $\omega$ -7 et  $\omega$ -9 (figure 3) [243, 245]. L'enzyme élongase ajoute deux carbones à la fois (le malonylCoA) sur l'acétylCoA pour former les AG saturés 16:0 et 18:0. Par la suite, l'enzyme  $\Delta$ 9 désaturase enlève les hydrogènes au niveau du 9<sup>ième</sup> carbone à partir du groupement carboxyle. Ce processus ajoute ainsi une insaturation cis en position  $\omega$ -9 et  $\omega$ -7 formant les AG monoinsaturés 16:1 et 18:1. Les mammifères possèdent également les désaturases  $\Delta$ 5 et  $\Delta$ 6 [253]. Conséquemment, ils peuvent insérer une double liaison cis additionnelle dans la chaîne carbonée à condition qu'elle ne soit pas plus éloignée de 9 carbones de l'extrémité carboxyle. Cette incapacité explique pourquoi il nous est impossible de synthétiser le plus simple composé des AG  $\omega$ -3 l'acide alpha-linolénique (ALA) et celui des  $\omega$ -6, l'acide linoléique (LA) parce qu'ils ont des doubles liaisons sur le 12<sup>e</sup> carbone et le 15<sup>e</sup> carbone (figure 2) [247].

En opposition, la synthèse des AG polyinsaturés  $\omega$ -3 et  $\omega$ -6 nécessite l'apport alimentaire d'ALA et LA (figure 3). L'enzyme  $\Delta$ 6 désaturase est l'enzyme limitante de cette réaction, car elle seule peut débiter la synthèse [254]. Après cette étape clé, une succession d'élongation et de désaturation, par les élongases et désaturases  $\Delta$ 5 et  $\Delta$ 6, forme ultimement les AG polyinsaturés à longues chaînes de la famille des  $\omega$ -3 : l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA). Aussi, ces mêmes enzymes synthétisent les AG polyinsaturés à longues chaînes de la famille des  $\omega$ -6 soit l'acide dihomo- $\gamma$ -linoléique (DGLA) et l'AA [243, 255].



**Figure 4. Synthèse des acides gras essentiels oméga-3, oméga-6 et non essentiels oméga-7 et oméga-9.** À partir de l'Acétyl CoA, seuls les AG non essentiels ω-7 et ω-9 insaturés (gris) peuvent être synthétisés. Une succession d'élongation (---) et de désaturation (*voie en italique*) forment ensuite les ω-7 et ω-9 polyinsaturés. La présence dans l'alimentation de LA et d'ALA est nécessaire pour la synthèse des acides gras essentiels ω-3, ω-6 polyinsaturés. L'enzyme élongase et les désaturases Δ-5 et Δ-6 sont communs pour la formation des acides gras essentiels et non-essentiels.

Les AG directement obtenus par l'alimentation ou synthétisés à partir des précurseurs seront incorporés dans les membranes par estérification du groupement carboxyle puis sont ajoutés au groupement hydroxyle en position sn-2 du glycérol des phospholipides membranaires [245]. À la suite de stimuli variés, ces AG polyinsaturés membranaires peuvent être relâchés par les enzymes de la superfamille des phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). Elles ont la capacité d'hydrolyser spécifiquement le lien esther sn-2 des phospholipides libérant les AG à 20 carbones ω-3 ou ω-6 nommés les eicosanoïdes [256]. Ensuite, les eicosanoïdes seront métabolisés et entreront dans la formation des prostaglandines ou des leucotriènes.

La voie des prostaglandines est enclenchée par l'enzyme prostaglandine endopéroxyde synthase (PGH synthase) mieux connu sous le nom de cyclooxygénase (COX) due à son activité cyclo-oxygénase qui forme le composé intermédiaire endopéroxyde (PGG) et son activité peroxydase qui finalise la réaction en formant le PGH [257-259]. Il existe deux principales isoformes de l'enzyme COX appelés COX-1 et COX-2. COX-1 est exprimé constitutivement, alors que COX-2 est induite par des stimuli inflammatoires tels que les cytokines et les facteurs de croissance [260]. Ces enzymes catalysent la formation des prostaglandines de type 2 (PG<sub>2</sub>) et de type 3 (PG<sub>3</sub>) à partir de l'AA et de l'EPA [243]. Les enzymes COX-1 et COX-2 requièrent une certaine concentration d'hydroperoxyde pour effectuer la réaction. COX-1 nécessite près de 10 fois plus d'hydroperoxyde pour s'activer que la COX-2 [261, 262]. Lors du métabolisme de l'AA, la réaction produit en elle-même suffisamment d'hydroperoxyde pour le fonctionnement des deux COX. Bien que le métabolisme de l'EPA par COX-1 et COX-2 puisse atteindre les mêmes concentrations maximales en métabolite qu'avec l'AA, la vitesse de réaction n'atteint que 10 % pour COX-1 et 35 % pour COX-2 de celle avec l'AA [263]. La faible production d'hydroperoxyde lors du métabolisme de l'EPA en serait responsable. De plus, la molécule d'EPA entre difficilement en contact avec le site actif de COX-1 [264].

Par la suite, les prostaglandines produites par les COX pourront être métabolisées par les enzymes de synthèse terminale des prostaglandines. Ainsi la thromboxane synthase (TxS), la prostacycline synthase (PGIs), la prostaglandine D synthase (PGDs) et la prostaglandine E synthase (PGEs) produisent respectivement le thromboxane A<sub>2</sub> (2 ou 3), le PGI<sub>2</sub> (2 ou 3), le PGD<sub>2</sub> (2 ou 3) et le PGE<sub>2</sub> (2 ou 3) [257]. Ces enzymes sont exprimées spécifiquement dans divers tissus et cellules selon leurs propriétés. Par exemple, la TxA<sub>2</sub> formée par les plaquettes induit l'agrégation plaquettaire et la constriction des vaisseaux sanguins. Inversement, la PGI<sub>2</sub> synthétisée par les cellules vasculaires inhibe l'agrégation plaquettaire et cause une vasodilatation [245, 257]. La PGD<sub>2</sub> est produite par les mastocytes et provoque une vasodilatation lors d'allergie et d'inflammation [265]. La PGE<sub>2</sub> agit quant à elle sur plusieurs organes, dont les os pour la formation osseuse, dans le système reproducteur mâle et femelle et même au cerveau dans l'induction de la fièvre [259, 266].

D'un autre côté, les eicosanoïdes libérés par la PLA<sub>2</sub> peuvent être métabolisés par les enzymes lipoxigénase 5, 12 ou 15 (5-LOX, 12-LOX ou 15-LOX). La 5-LOX débute la formation des leucotriènes par le leucotriène A<sub>4</sub>. Le leucotriène A<sub>4</sub> peut ensuite être hydrolysé pour donner le leucotriène B (LTB<sub>4</sub>) ou suivant plusieurs réactions biochimiques pour donner les leucotriènes C (LTC<sub>4</sub>), leucotriènes D (LTD<sub>4</sub>) et leucotriènes E (LTE<sub>4</sub>) [245, 267]. L'ensemble de ces molécules bioactives a une fonction pro-inflammatoire via l'activation du système immunitaire [267]. En opposition, les lipoxines sont formées par les enzymes 12-LOX et 15-LOX et forment des métabolites anti-inflammatoires [268]. Dernièrement, les résolvines et les protectines, de nouveaux métabolites hautement anti-inflammatoires, provenant de l'EPA ou du DHA métabolisé par l'enzyme COX-2 acétylé par l'aspirine suivie des enzymes LOX, ont été découverts [269]. Finalement, tout comme la voie des prostaglandines, la formation des leucotriènes et des lipoxines sera de divers types selon l'AG de départ. À partir de l'AA, les enzymes 5-LOX, 12-LOX et 15-LOX synthétiseront respectivement les leucotriènes et les lipoxines de type 4. Si ces mêmes enzymes utilisent l'EPA, elles synthétiseront les leucotriènes et les lipoxines de type 5 [243, 270, 271].

### 3.3. Ratio oméga-3/oméga-6

Au cours du métabolisme des AG, les mêmes enzymes sont utilisées tout d'abord pour la synthèse des AG à longues chaînes, puis pour la formation des prostaglandines et leucotriènes. De ce fait, il existe une compétition entre les  $\omega$ -3 et les  $\omega$ -6 pour leur métabolisme respectif [255, 272]. Une première compétition s'effectuerait au niveau des élongases et des désaturases. D'ailleurs, la synthèse des  $\omega$ -3 à longues chaînes (EPA) ainsi que celle des  $\omega$ -6 (AA) est influencée par le ratio  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 [273-276]. Il semblerait toutefois que le métabolisme des  $\omega$ -3 en DHA serait davantage influencé par l'apport quantitatif que par le ratio [277]; ceci pouvant s'expliquer par la double action de la  $\Delta$ -6 désaturase pour son métabolisme [278]. Cependant, cette compétition bien que présente aurait de faibles effets biologiques, car l'efficacité des enzymes de synthèse des AG chez l'homme serait minime [279] et qu'une alimentation variée fournit les  $\omega$ -3 et  $\omega$ -6 à longues chaînes tout en inhibant leur synthèse [252].

Ainsi, la compétition entre les  $\omega$ -3 et les  $\omega$ -6 se situerait davantage au niveau de l'incorporation et de la libération des AG membranaires, du métabolisme par les COX, LOX et des enzymes terminales des prostaglandines [255, 280]. Rappelons que l'EPA est difficilement métabolisé par la COX-1 et en moindre mesure par la COX-2 par rapport à l'AA. Un ratio plus élevé en  $\omega$ -3/ $\omega$ -6, par conséquent, réduit la formation des dérivés de l'AA, c'est-à-dire des prostaglandines de type 2 et des leucotriènes de type 4, par simple compétition, en plus de nuire à la vitesse de réaction des COX [262].

Actuellement, la diète Nord-américaine est débalancée vers l' $\omega$ -6 avec un ratio de 1:15-20  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 contrairement au ratio originel de 1:1 ( $\omega$ -3/ $\omega$ -6) chez les animaux et vraisemblablement l'homme [248, 281, 282]. Un intérêt grandissant est porté au ratio  $\omega$ -3/ $\omega$ -6, d'autant plus que les dérivés des  $\omega$ -3 (EPA, DHA) en comparaison à ceux des  $\omega$ -6



(AA) ont des propriétés physiologiques différentes et influencent de nombreux systèmes physiologiques [248, 283-286].

### **3.4. Propriétés des oméga-3 et oméga-6**

Tout d'abord, on reconnaît aux AGE, compte tenu de leurs nombreuses insaturations, la propriété d'accroître la fluidité membranaire en réduisant le point de fusion [247, 287]. Il est proposé que la fluidité membranaire augmentée facilite le déplacement des protéines dans la bicouche lipidique et le rassemblement fonctionnel des protéines en microdomaine [288, 289]. Les microdomaines ont pour rôle de faciliter les processus biologiques tels que la signalisation cellulaire, l'adhésion cellulaire et le trafic membranaire [290]. Conséquemment, l'incorporation membranaire des  $\omega$ -3 et  $\omega$ -6 pourrait moduler ces processus biologiques. D'ailleurs, le DHA, l'AG avec le plus grand nombre d'insaturations, semble être l'AG qui induit les changements les plus marqués des propriétés membranaires et joue un rôle important au niveau cérébral [291]. Plusieurs études complémentaires seront néanmoins nécessaires pour bien comprendre l'effet des AGE sur les processus biologiques associés aux fonctions membranaires [289].

Par la suite, une fois intégrés dans les membranes, les AGE métabolisés en dérivé eicosanoïde ont la propriété de moduler l'intensité et la durée de la réponse inflammatoire [271]. D'une part, les  $\omega$ -6 et plus particulièrement l'AA, sont associés à un état pro-inflammatoire. Il faut cependant mentionner que la PGE<sub>2</sub>, métabolite des  $\omega$ -6, possède des propriétés pro-inflammatoire et anti-inflammatoire. Aussi certains métabolites des  $\omega$ -6 sont anti-inflammatoires dont le LTB<sub>4</sub> [292]. Bien qu'ils ne soient pas impliqués uniquement dans les processus pro-inflammatoires, les  $\omega$ -6 en comparaison avec les  $\omega$ -3 semblent l'être davantage. D'ailleurs, nombreuses études observent une réduction des marqueurs pro-inflammatoires tels que les cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$  en augmentant les  $\omega$ -3 par

rapport au  $\omega$ -6 [293-295]. Ainsi, les  $\omega$ -3 ont la propriété de réduire l'inflammation. Il est suggéré que cet effet serait subséquent à la faible efficacité de ses métabolites pro-inflammatoires contrairement à ceux des  $\omega$ -6. Par exemple, le LTB<sub>5</sub>, issu des  $\omega$ -3, est un agent chimioattractant moins actif que le LTB<sub>4</sub>, issu des  $\omega$ -6 [296]. De plus, la découverte récente des résolvines et protectines fortement anti-inflammatoires, étant strictement des métabolites des  $\omega$ -3, appuie le rôle anti-inflammatoire attribué à ceux-ci [297].

Finalement, les AGE ont la propriété de moduler l'expression génique via l'interaction avec des récepteurs nucléaires [255, 298, 299]. Parmi ces récepteurs, il y a la famille des *Peroxisome proliferators-activated receptors* (PPAR) qui a pour ligand les  $\omega$ -3 et les  $\omega$ -6. Le tandem PPAR - ligand provoque la formation d'un dimère avec le récepteur de type rétinol X (RXR) et régule de nombreux gènes possédant un élément de réponse à PPAR (PPRE) dont ceux impliqués dans le métabolisme lipidique et l'inflammation [300]. L'activation de PPAR $\alpha$  par les AGE favorisent l'oxydation lipidique [301]. Par contre, en interagissant avec PPAR $\gamma$ , ils réduisent l'inflammation via un blocage de NF- $\kappa$ B [292]. Les  $\omega$ -3 peuvent aussi inhiber NF- $\kappa$ B directement en prévenant la dégradation de I $\kappa$ B (l'inhibiteur de NF- $\kappa$ B) [302]. Par conséquent, ils ont la propriété d'empêcher le facteur de transcription NF- $\kappa$ B d'induire l'expression génique de plusieurs cytokines, chemokines et molécules d'adhésion [303]. Pour terminer, les AGE modifient l'expression de gènes du métabolisme des triglycérides, des acides gras et du cholestérol en modulant l'activité du *Sterol regulatory element binding proteins* (SREBP). Des études supplémentaires seront toutefois nécessaires pour en déterminer le mécanisme [304].

### 3.4.1. Maladie cardiovasculaire

L'hypothèse proposant un effet bénéfique des  $\omega$ -3 dans les maladies cardiovasculaires a vu le jour avec les premières études épidémiologiques chez les Inuits [305]. Malgré plusieurs facteurs de risque, ces peuples ont un taux anormalement bas de mortalité cardiovasculaire. Il a été proposé que ces bénéfices seraient attribuables à l'alimentation des Inuits qui est majoritairement constituée d'animaux marins et contient donc un ratio élevé en  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 contrairement aux autres Nord-Américains [306, 307]. Par la suite, il existe une corrélation inverse entre la mortalité associée à des maladies cardiovasculaires et la consommation de poisson ou de supplément d' $\omega$ -3 chez les Nord-Américains [308-310]. Subséquemment, un ensemble d'effets bénéfiques des  $\omega$ -3 reliés à la santé cardiovasculaire a été découvert dont des effets hypotriglycéridémiant, hypotenseur, anti-inflammatoire, anti-athérosclérotique et même anti-arythmique [311].

En premier lieu, une concentration sérique de triglycérides élevée est un facteur de risque pour les maladies cardiovasculaires. Il est intéressant d'observer que les  $\omega$ -3 permettent de diminuer les niveaux de triglycérides chez l'homme sain ou avec une hypertriglycémie [312, 313]. Ceci serait attribuable aux propriétés de l'EPA et du DHA à réduire la synthèse et la sécrétion des *very low density lipoprotein* (VLDL) associée aux triglycérides et à augmenter la clairance des triglycérides hépatiques. Aussi, puisqu'ils réduisent la lipogenèse hépatique, augmentent la  $\beta$ -oxydation des AG et accroissent l'activité des lipoprotéines lipases, ils peuvent abaisser les niveaux de triglycérides sanguins [314]. Le mécanisme sous-jacent impliquerait la modulation de l'expression génique des protéines contrôlant la formation des VLDL (transportant les triglycérides au foie) et celles contrôlant le métabolisme lipidique par les voies PPAR et SREBP [315, 316].

Poursuivons avec un second facteur de risque des maladies cardiovasculaires, l'hypertension, qui peut aussi être modulée par les  $\omega$ -3. En fait, il a été rapporté que les  $\omega$ -3 ont un effet hypotenseur autant chez l'homme [317-322] que dans divers modèles d'hypertension animale [323-327]. Les protéines de poissons contribueraient aussi à cette baisse [323]. Car certaines protéines peuvent inhiber l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE). Elles peuvent donc induire une réduction de la production d'angiotensine II, un vasoconstricteur, et accroître le métabolisme de la rénine, vasodilatatrice [328]. Finalement, les protéines du poisson contiennent une quantité d'arginine importante. Celui-ci est l'acide aminé à partir duquel le NO, un vasodilatateur jouant un rôle central dans l'hypertension, est métabolisé [329].

L'effet anti-inflammatoire des  $\omega$ -3, décrit précédemment, peut également contribuer aux bienfaits dans les maladies cardiovasculaires [330]. Cette propriété serait impliquée dans l'effet anti-athérosclérotique des  $\omega$ -3 puisque l'inflammation joue un rôle prépondérant dans l'évolution de la pathologie [331]. Dans ce sens, un supplément d' $\omega$ -3 permet effectivement de diminuer la propagation et même d'accroître la régression de cette maladie après 2 ans [332]. De plus, les  $\omega$ -3 ont la capacité de stabiliser la plaque athéromateuse [333]. Le mécanisme impliquerait la réduction de l'agrégation plaquettaire par les  $\omega$ -3 [334].

En dernier lieu, l'effet anti-arythmique des  $\omega$ -3 dépendrait de l'état pathologique cardiovasculaire, car les  $\omega$ -3 peuvent également être pro-arythmique [335]. Il est supposé que l'effet anti ou pro-arythmique des  $\omega$ -3 serait causé par la modulation des canaux ioniques dont les canaux sodiques dépendant du voltage, les canaux potassiques sortants et les canaux calciques de type L [336]. En somme, les  $\omega$ -3 contribuent de nombreuses façons à améliorer la santé cardiovasculaire permettant globalement à réduire la mortalité cardiovasculaire.

### 3.4.1.1. Infarctus du myocarde

Dans l'IM, les  $\omega$ -3 n'ont aucun effet sur l'incidence [337], mais selon plusieurs études, ils réduisent la survenue d'un second IM et la mort de cause cardiovasculaire chez les patients avec ou sans IM [338-341]. Deux grandes études, la GISSI-prevenzione et l'étude DART, ont évalué l'effet respectif de supplément quotidien ou de deux portions de poissons par semaine chez des patients avec un IM après de 3 à 5 ans ou 2 ans suivant l'IM. Ils ont toutes deux démontré une diminution de la mortalité de toutes causes et de la mortalité cardiovasculaire en relation avec la prise des  $\omega$ -3 [339, 340]. Appuyant ces résultats, la mort toutes causes confondues peut être prédite chez les patients avec un IM par les concentrations sanguines d'EPA et de DHA [342].

En plus de réduire les risques de mortalité après l'IM, un supplément d' $\omega$ -3 avant la survenue de l'IM semblent diminuer la taille de l'IM chez l'homme estimée par la créatine phosphate et le lactate déshydrogénase [343, 344]. De plus, plusieurs voies d'administration dont l'infusion veineuse d' $\omega$ -3 [345], l'infusion péricardique [346] ou l'augmentation de l'apport alimentaire d' $\omega$ -3 avant l'IM permet de réduire efficacement la taille de l'IM dans divers modèles expérimentaux [347-349]. Le mécanisme sous-jacent impliquerait une augmentation des HSP 72 qui est associée à la cardioprotection et possiblement, suite à l'incorporation membranaire des  $\omega$ -3 modifiés par l'oxydation lors de l'ischémie-reperfusion [345]. Une seconde étude propose qu'un mécanisme commun entre le préconditionnement et les  $\omega$ -3 serait responsable de la diminution de la taille d'infarctus sans toutefois préciser le mécanisme [348]. Pour conclure, les  $\omega$ -3 sont incontestablement bénéfiques dans les maladies cardiovasculaires et plus précisément dans l'IM. Un supplément d' $\omega$ -3 est d'ailleurs recommandé aux patients après la survenue d'un IM [350].

### 3.2.2. Maladie neurodégénérative et dépression

Les AG  $\omega$ -3 à longues chaînes sont retrouvés en grande majorité dans les membranes rétiniennes et neuronales. L'absence de concentration adéquate d' $\omega$ -3 et plus particulièrement de DHA, lors du développement cérébral, chez le nouveau-né, entraîne des déficits du développement et des fonctions cognitives [351]. En plus d'être indispensables pendant la période périnatale et natale, l'altération des concentrations membranaires des  $\omega$ -3 a été observée dans plusieurs maladies neurodégénératives et psychiatriques à l'âge adulte. En effet, de faibles concentrations sériques ont été rapportées chez les patients souffrant d'Alzheimer [352] et chez les dépressifs [353]. De plus, dans la population saine, un ratio  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 plasmatique faible est associé à davantage de symptômes dépressifs [354].

Il semblerait que l'altération des niveaux d' $\omega$ -3 membranaire serait plus qu'une observation coïncidant avec la pathologie, car le supplément d' $\omega$ -3 améliore l'état clinique des patients souffrant d'Alzheimer ainsi que les symptômes des patients dépressifs [355]. D'ailleurs, une étude récente de Lespérance et coll. a évalué l'effet de suppléments de 1,05 g d'EPA et de 150 mg de DHA par jour pendant 8 semaines par rapport à un placebo d'huile de tournesol chez des patients atteints d'épisode de dépression majeure. Ils ont observé une tendance générale à l'amélioration des symptômes avec les suppléments d' $\omega$ -3 et un bénéfice significatif chez les dépressifs majeurs sans désordres d'anxiété [356]. Plus particulièrement dans la dépression, les  $\omega$ -3 auraient une efficacité significative en tant qu'antidépresseur [357]. Une étude mentionne un effet similaire des  $\omega$ -3 à celui de la fluoxétine. Les  $\omega$ -3 permettraient aussi de réduire de manière cumulative la dépression, lorsque combinés avec la fluoxétine [358]. Cependant, aucun effet cumulatif n'a pas été observé avec les  $\omega$ -3 et la sertraline [359].

Nombreux mécanismes ont été proposés afin d'expliquer l'influence des  $\omega$ -3 dans les pathologies neurodégénératives et psychiatriques. Une première hypothèse soulève les propriétés anti-inflammatoires de ceux-ci, sachant que les cytokines peuvent induire la dépression et que l'inflammation est fortement présente dans l'Alzheimer [360, 361]. Une seconde hypothèse propose une modulation de la neurotransmission monoaminergique [362] car, selon des études de déplétion en  $\omega$ -3, l'absence de ces AG peuvent diminuer la présence des récepteurs dopaminergiques D2 et augmenter la présence des récepteurs sérotoninergiques 5HT2 dans le cortex frontal [363]. Pour continuer, les  $\omega$ -3 pourraient améliorer ces pathologies par un mécanisme de neuroprotection possiblement anti-apoptotique. En fait, le DHA facilite l'activation et la translocation d'Akt, une protéine anti-apoptotique en maintenant les concentrations de phosphatidyles sérines membranaires [364, 365]. Par ailleurs, la neuroprotectine D, métabolite du DHA, en plus d'inhiber la réponse inflammatoire, accroît les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 [366, 367]. Il faut ajouter que les métabolites des  $\omega$ -3, DHA et EPA, sont des ligands de PPAR [368] qui régulent l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Les  $\omega$ -3 pourraient alors influencer l'expression génique au niveau cérébral de manière directe ou indirecte pour produire les effets bénéfiques observés dans les maladies neurodégénératives et dans la dépression.

### **3.2.2.1. Dépression post-infarctus du myocarde**

Dans la dépression post-IM, les  $\omega$ -3 auraient aussi un impact puisque chez les patients dépressifs avec un syndrome coronarien aigu, les concentrations plasmatiques et membranaires des érythrocytes sont significativement plus basses en  $\omega$ -3 que chez les patients non dépressifs [369-371]. Également, les patients post-IM ont un ratio plus faible des AG à longues chaînes  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 dans le sérum que chez les dépressifs [372]. Bien que peu d'études se soient intéressées aux  $\omega$ -3 dans la dépression post-IM, les bénéfices des  $\omega$ -

3 dans l'IM et dans la dépression soulignent le potentiel pharmacologique d'un supplément dans la pathologie et la nécessité d'études subséquentes [373].

## Chapitre 4. Les hypothèses

L'IM implique un important processus inflammatoire. L'ischémie-reperfusion provoque la libération de cytokines pro-inflammatoires dans la circulation sanguine [50], mais également au niveau cérébral, notamment dans le système limbique [210]. Ces cytokines, lorsqu'elles interagissent avec les DR, peuvent induire la mort cellulaire par apoptose [72]. Réduire l'inflammation, soit en inhibant la synthèse des cytokines par la pentoxifylline ou par le blocage de la cytokine TNF- $\alpha$  diminue significativement les marqueurs d'apoptose dans le système limbique après un IM [53, 54]. Ainsi, l'inflammation serait un mécanisme probable expliquant l'apoptose dans le système limbique.

Les  $\omega$ -3, en plus d'avoir plusieurs effets bénéfiques cardiovasculaires dont la capacité de réduire la taille de l'IM, ont la propriété d'être anti-inflammatoire en opposition aux  $\omega$ -6 [330]. Puisqu'une compétition existe entre les deux AGE  $\omega$ -3 et  $\omega$ -6 pour la synthèse et la formation des métabolites [255], la modification du ratio  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 va influencer la disponibilité de chacun et donc l'effet cardiovasculaire et inflammatoire des  $\omega$ -3. Ainsi, le but de cette étude est d'évaluer l'effet de différents ratios  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 (5:1, 1:1 et 1:5) sur la taille de l'IM, l'inflammation et l'apoptose dans le système limbique dans un modèle d'ischémie-reperfusion chez le rat. Nous supposons que la compétition entre les  $\omega$ -3 et les  $\omega$ -6 va faire en sorte que les ratios élevés en  $\omega$ -3 vont réduire davantage la taille de l'IM et l'inflammation. De ce fait, nous proposons que les ratios élevés en  $\omega$ -3 doivent également réduire la présence d'apoptose dans le système limbique après un IM.



## Chapitre 5. Article

Due Date: 2011-01-05

Dear Dr. Guy Rousseau :

Your manuscript entitled: Effects of different dietary omega-3/6 ratios on infarct size and the limbic system after myocardial infarction has been evaluated for publication in the Canadian Journal of Physiology and Pharmacology by one or more referees in your area of research and members of the Editorial Board. Your paper is being considered for conditional acceptance pending the outcome of Major Revisions. The referees have identified several significant concerns with the manuscript in its current form. Should you decide to address the reviewers comments and conduct a major revision of this paper, we are willing to continue the evaluation process.

We look forward to receiving submission of your revised manuscript by the due date at the top of this message. (Note: In order to meet publishing schedules, papers for Special Issues may have adjusted due dates from those posted in our Instructions to Authors). You will find the comments of the Editorial Board below this letter.

Final acceptance of your paper is pending the editorial board's assertion that you have satisfactorily made the required changes. Please see full instructions for submitting your revision, following this letter. The submission of a revision requires:

a cover letter, the revised manuscript, plus a separate document outlining the point by point responses to all comments from reviewers and editors, as well as their precise disposition in the revised version.

Additional Documents:

\* LICENCE TO PUBLISH--All co-authors of accepted manuscripts are required to submit a signed copyright transfer form (LICENCE TO PUBLISH). For co-authors who may be difficult to contact we suggest that Licence to Publish forms be sought early. The form will also appear on Osprey during the submission process of your revised manuscript.

\* PERMISSIONS--to reproduce previously published non-NRC tables, figures, charts or illustrations not your own, must be secured before publication can take place. Permission to Reproduce form: <http://pubs.nrc-cnrc.gc.ca/eng/forms/index.html#publish>

Please note it is the responsibility of the Corresponding Author to communicate the status of the manuscript to all co-authors. Should you decide not to complete and submit revisions to CJPP and instead wish to withdraw your paper, please contact the editorial office. Thank you for submitting this paper to the Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.

Sincerely,

Drs. Grant Pierce and Donald Smyth

Editors

The Canadian Journal of Physiology and Pharmacology

Editorial Office

RL-008 - 351 Tache Avenue

Winnipeg, Manitoba, Canada R2H 2A6

Phone: (204) 237-2581

Fax: (204) 237-4883

**Effects of different dietary omega-3/6 ratios on infarct size and the limbic system after myocardial infarction**

Isabelle Rondeau<sup>1,2</sup>, Sandrine Picard<sup>1</sup>, Thierno Madjou Bah<sup>1</sup>, Louis Roy<sup>1</sup>, Roger Godbout<sup>1,3</sup>, Guy Rousseau<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centre de biomédecine, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal

<sup>2</sup>Département de pharmacologie, Université de Montréal

<sup>3</sup>Département de psychiatrie, Université de Montréal

**Address for correspondence and reprints:**

Guy Rousseau, Ph.D.

Centre de biomédecine

Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal

5400 boul. Gouin Ouest

Montréal (Québec) Canada H4J 1C5

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

Fax: +1-514-338-2694

Total Words: 4698

**Abstract**

**Aims** Changes in dietary omega-3/6 ratios affect anti/pro-inflammatory equilibrium. As reperfused myocardial infarction (MI) is an inflammatory pathology that alters cell integrity in different tissues, such as the hippocampus and amygdala, we hypothesized that adjustment of dietary omega-3/6 ratios may have a significant impact on these modifications. This study was designed to investigate the effects of 3 dietary omega-3/6 ratios (5:1, 1:1 and 1:5) on infarct size, cardio-protective mechanisms, inflammation and apoptosis in the limbic system of a reperfused MI model.

**Methods and Results** Male Sprague-Dawley rats were fed on 1 of 3 diets containing different omega-3/6 ratios for 2 weeks. Then, myocardial ischemia was induced by left anterior descending coronary artery occlusion for 40 min, followed by reperfusion. Cardio-protective mechanisms were studied in the myocardium at 15 min of reperfusion along with myocardial infarct size after 24 h of reperfusion. Apoptosis was evaluated in the hippocampus.

Infarct size was significantly reduced by 32% in groups 5:1 and 1:1 vs. group 1:5. Akt activity was higher in groups 5:1 and 1:1 compared to group 1:5. Caspase-3 enzymatic activity doubled in area CA1 and the dentate gyrus (DG) in group 1:5 compared to groups 1:1 and 5:1. Also, caspase-8 enzymatic activity was increased in the DG at 24 h, and caspase-9 was enhanced in CA1 at 24 h in group 1:5 vs. groups 1:1 and 5:1.

**Conclusion** These results suggest that high omega-3/6 ratios reduce infarct size and help to inhibit apoptosis in the limbic system after MI.

## 1. Introduction

In recent decades, diets in industrialized countries have changed considerably, causing significant increases in cardiovascular pathologies. The most significant nutritional modification that has contributed to this situation is increased fat intake, which is now twice that of our ancestors (40 vs 20% of total calories) [1]. Although cholesterol has been implicated as a major player in cardiovascular diseases, various populations, such as Alaskan Eskimos, present consistently high serum cholesterol but with an almost total absence of cardiovascular diseases [2]. Examination of these populations indicates that the consumption of omega-3 fatty acids is elevated in comparison to other populations with higher rates of coronary heart disease [3]. Reduced dietary omega-3 intake in non-Inuit populations and its role in anti-inflammatory signaling point to certain molecules as potential candidates for increased cardiovascular disorders. In contrast to omega-3, pro-inflammatory omega-6 consumption has grown, resulting in a shift of the omega-3/6 ratio from 1:1.5 to 1:16 in the average North American diet over the last 200 years [1, 4]. Both omega-3 and omega-6 are metabolized by the same desaturation/elongation pathway, and thus competition for metabolic enzymes between these 2 families of fatty acids has significant consequences for health [5, 6]. The shift in this ratio toward pro-inflammatory diets can lead to additional myocardial damage in response to other pro-inflammatory insults.

Reperused myocardial infarction (MI) provokes an inflammatory response, which may amplify cardiovascular damage. To attenuate it, 2 signalling pathways are evoked to induce cardio-protection at the onset of reperfusion: the reperfusion injury salvage kinase (RISK)

pathway and the survivor-activating factor enhancement (SAFE) pathway. The RISK pathway represents a series of protein kinases, such as Akt, which converge on mitochondrial permeability transition pores (mPTPs), whereas the SAFE pathway involves the activation of STAT-3 and gene transcription, independently of Akt [7-9]. The activation of these pathways at the onset of reperfusion is recognized to afford protection to the myocardium after ischemia.

Recently, we observed that MI may also alter the integrity of cells present in the limbic system due, in part, to the release of pro-inflammatory cytokines and invoking increased apoptosis in these regions [10]. Although it is not clearly established, some evidence indicates that apoptosis in the limbic system may contribute to post-MI depression [11], a condition that reduces quality of life and survival [12].

Therefore, because changes in dietary omega-3/6 ratios may modulate the balance between pro- and anti-inflammatory mechanisms, this study was designed to investigate the effects of 3 dietary omega-3/6 ratios (5:1, 1:1 and 1:5) on infarct size, cardio-protective mechanisms, inflammation and apoptosis in the limbic system after MI.

## 2. Methods

### 2.1. Experimental design

Male 3-month-old Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, St-Constant, QC, Canada) 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 animals were housed individually under constant conditions (temperature of 21-22°C and humidity of 40-50%). They were maintained under a 12-h dark-light cycle which began at 8:00 h. Chow pellets and tap water were available *ad libitum*. After 3 days of acclimatisation, the animals were randomly distributed in 3 diet groups giving 5:1, 1:1 or 1:5 omega-3/6 ratios for 2 weeks before MI induction. Fifty percent of the animals in each diet group were sacrificed after 15 min of reperfusion, and the remaining 50%, after 24 h of reperfusion.

### 2.2. 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 diets varied only in soybean oil, flaxseed oil and fish oil content respectively of 0 g/kg, 100 g/kg and 50 g/kg for group 1:5 (TD.06035), 63 g/kg, 58 g/kg and 29 g/kg for group 1:1 (TD.08484) and 142 g/kg, 0 g/kg and 8 g/kg for group 5:1 (TD.06034).

### 2.3. Surgical procedure

Anesthesia, induced by ketamine-xylazine (50 mg/kg and 5 mg/kg i.m., respectively), was maintained with isoflurane (1%). The animals were intubated and placed under a respirator. ECG and heart rates were monitored with electrodes placed on their paws. A left thoracotomy was undertaken, and the left anterior descending coronary artery was occluded with a 4.0 silk suture and plastic snare. Ischemia was assessed by ST segment alterations and ventricular subepicardial (Epi) cyanosis. After 40 min of ischemia, the thread was removed to permit reperfusion. The thorax was closed, and the rats were then injected with antibiotic (15,000 IU penicillin G) and analgesic (2 mg/kg of butorphanol) [13].

After the reperfusion period, the animals were sacrificed by decapitation to prevent modification of the biochemical pathways by anesthesia. The brain and heart were rapidly removed and placed in a dish kept on crushed ice. The dentate gyrus (DG), areas CA1 and CA3 as well as the lateral and medial amygdala were excised from the limbic system, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C. Plasma, extracted by centrifugation (3,000g for 15 min at 4°C) from blood samples, was kept at -80°C for analysis of plasma tumour necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) concentrations.

#### Infarct size and heart dissection

Infarct size and area at risk (AR) were measured in the 24-h reperfusion time group, as described previously [13, 14]. Briefly, after sacrifice, the hearts were removed, and the left anterior descending coronary artery was occluded at the same site. The hearts were then washed with saline by retrograde perfusion. Evans blue (0.5%) was injected in the aorta by



canulation to measure the AR. The hearts were frozen (-80°C for 5 min), sliced into 4 transverse sections of 2 mm and placed in 2,3,5-triphenyltetrazolium at 37°C for 10 min. The area of necrosis (I) was expressed as a percentage of the AR (I/AR). AR was represented as a percentage of the left ventricular (LV) area (AR/LV).

Fifty percent of the animals in each diet group were sacrificed after 15 min of reperfusion. Their heart tissues were not stained, to avoid alteration of enzymatic activity under biochemical analysis. Instead, the ischemic area (AR) was separated from the non-ischemic area of the myocardium (area not at risk, ANR). Each region was divided into Epi and subendocardial (Endo) areas, defined as the upper and lower part of the myocardium. Heart tissues were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

#### 2.4. Biochemical analysis

Western blotting: Akt, STAT-3 and caspase-9

Western blot analysis was performed as described previously [13]. Briefly, tissues were homogenized by sonification in lysis buffer (1% Triton X-100, 0.32 M Sucrose, 10 mM Tris (pH 8.0), 5 mM EDTA, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 µg/mL Leupeptin, 10 µg/mL Pepstatin A, 10 µg/mL Aprotinin). The tissue homogenates were incubated for 30 min at 4°C and centrifuged at 10,000g for 15 min. Protein concentrations of the supernatant were quantified by the Lowry method. Aliquots of 100 µg protein were loaded into polyacrylamide gels (10-15%), and migrated at 150 V for 75 min in a mini-gel apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Proteins were transferred to Protran nitrocellulose membranes (Mandel, Montreal, Quebec, Canada) with a Trans-Blot semi-dry

transfer cell (Bio-Rad Laboratories). Non-specific sites were blocked by 1-h incubation in 5% dry milk powder into TBS-T (10 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl and 0.05% Tween 20). The membranes were incubated overnight with primary antibody (1/1,000 phospho-Akt, caspase-9, STAT-3 or 1/5,000 Akt diluted in 5% dry milk powder TBS-T). After TBS-T washing, the membranes were incubated for 45 min with secondary antibody (1/5,000 anti-rabbit IgG horseradish peroxidase). A chemiluminescent reagent was added prior to exposure on scientific imaging film (PerkinElmer Life Sciences, Mississauga, Ontario, Canada). Band intensities were analysed with Kodak 1D v.3.5.5 Scientific imaging software. The same membranes were stripped in stripping buffer (0.1 M glycine, 1% SDS, pH 2.0, 1 h at room temperature) and re-used with primary antibody for ratio determination.

#### Caspase-3 and -8 activities

Caspase-3 and -8 activities were measured according to the caspase-3 protocol described previously [13]. Briefly, 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 and attested by the Bradford method and fluorescent substrate (Ac-DEVD-AMC or Ac-IETD-AMC, respectively for caspase-3 and -8) (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 for caspase-3 or 430 nm for caspase-8.

### Plasma TNF- $\alpha$ concentrations

Plasma TNF- $\alpha$  levels were analysed with DuoSet ELISA development kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA, rat TNF- $\alpha$ /TNFSF1A, Catalogue No. DY510) according to the manufacturer's specifications.

### 2.5. Statistical analysis

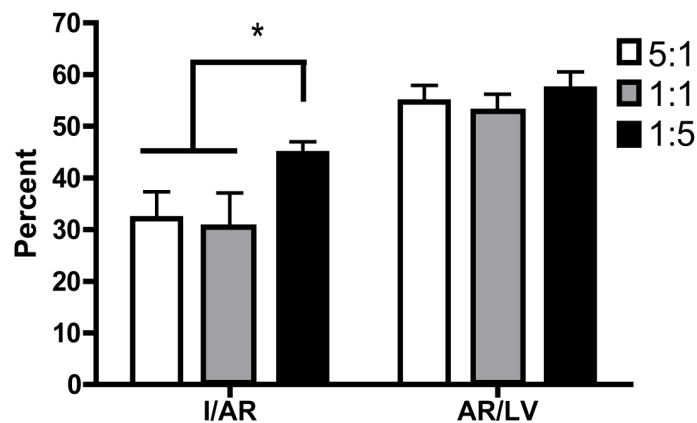
The data are reported as mean ( $\pm$  standard error of the mean). One-way ANOVA was performed on data with predefined constraints: first comparison: 1:1 vs. 5:1; second comparison: 1:1 and 5:1 vs. 1:5.  $p < 0.05$  was considered as significant.

### 3. Results

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

#### 3.1 Infarct size

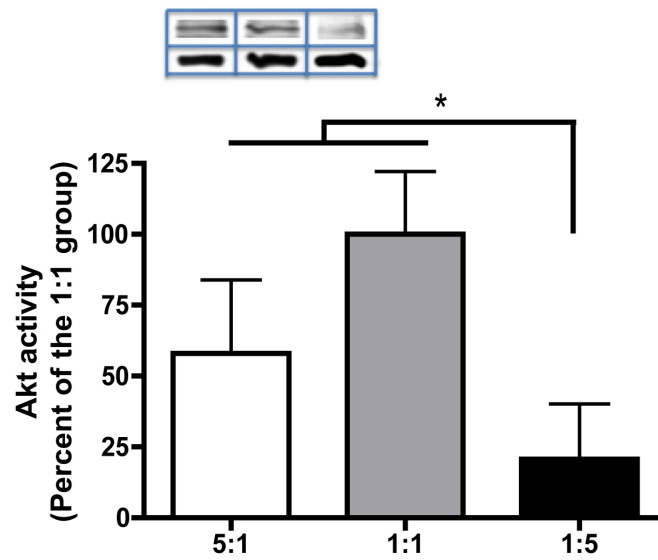
Infarct size, expressed as a percentage of the AR, was significantly reduced by approximately 30% in the high omega-3 diet groups (groups 5:1 and 1:1) compared to group 1:5. No significant difference was observed in infarct size between groups 5:1 and 1:1. The AR, expressed as a percentage of the LV (Figure 1), was similar among groups.



**Figure 1:** Infarct size, assessed by necrosis area (I) expressed as a percentage of the area at risk (AR), is significantly reduced in groups 1:1 and 5:1 vs group 1:5. No difference is observed between groups 5:1 and 1:1. AR, expressed as a percentage of the left ventricle (LV), is similar between groups (n = 8-9 in each group; \*  $F(1,23) = 4,83$ ;  $p = 0.038$  vs. group 1:5).

### 3.2 Cardio-protective pathways

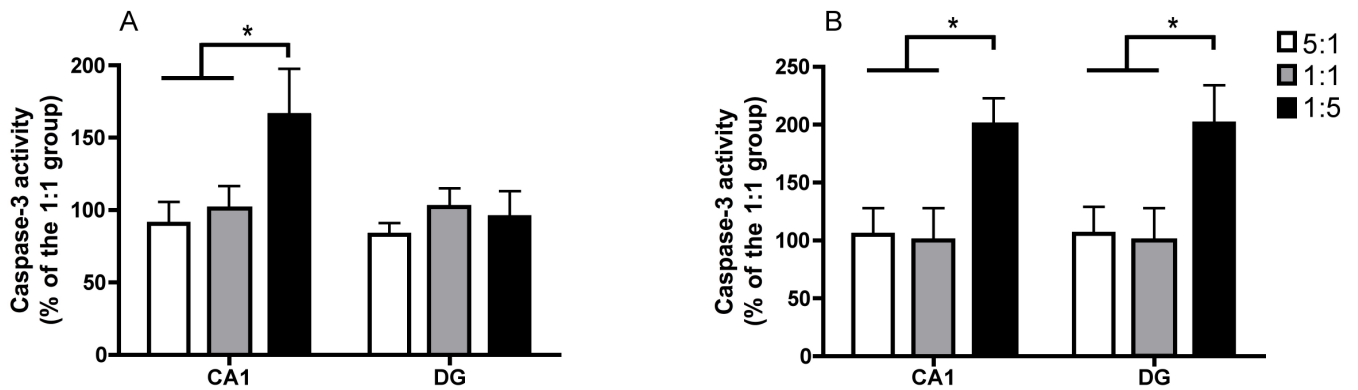
The RISK pathway was evaluated by Akt activity. Assessed by Western blotting, Akt activity was similar in groups 5:1 and 1:1, but significantly enhanced in both of these groups compared to group 1:5 in the Endo region (Figure 2). No significant difference was apparent in Akt activity in the Epi region between groups as well as in STAT-3 activity (SAFE pathway) in both regions.



**Figure 2:** Akt activity at 15 min of reperfusion in the subendocardium expressed as a ratio of the ischemic area (AR) over the non-ischemic area (ANR) assessed by Western blotting. Activity is significantly enhanced in groups 1:1 and 5:1 vs. group 1:5 (n = 5-6 in each group; Endo: \*  $F(1,14) = 10,21$ ;  $p = 0.007$  vs. group 1:5). Inset: Representative Western blot results on phospho-Akt (pAkt;top) and Akt (bottom) in the subendocardium of the area at risk (AR).

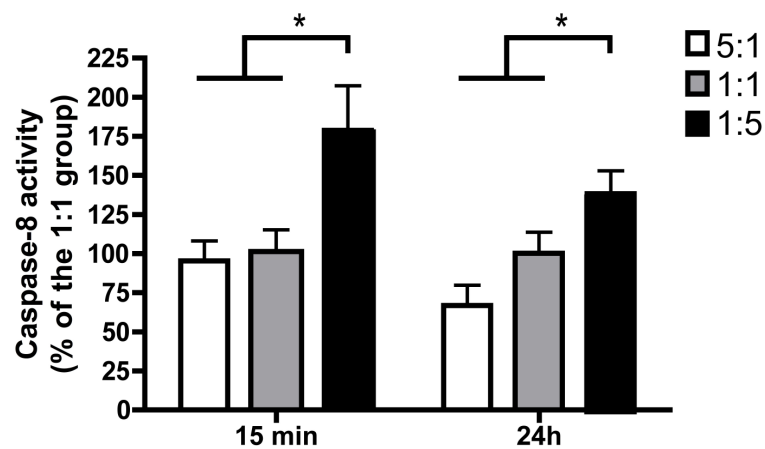
### 3.3 Limbic system apoptosis

After 15 min of reperfusion, caspase-3 activity was significantly reduced in CA1 in the high omega-3 diet groups (5:1 and 1:1) vs. low omega-3 group 1:5 (Figure 3A). After 24 h of reperfusion, caspase-3 activity in both CA1 and the DG was attenuated in groups 5:1 and 1:1 vs group 1:5 (Figure 3B). No difference was seen in CA3 and the amygdala (data not shown).

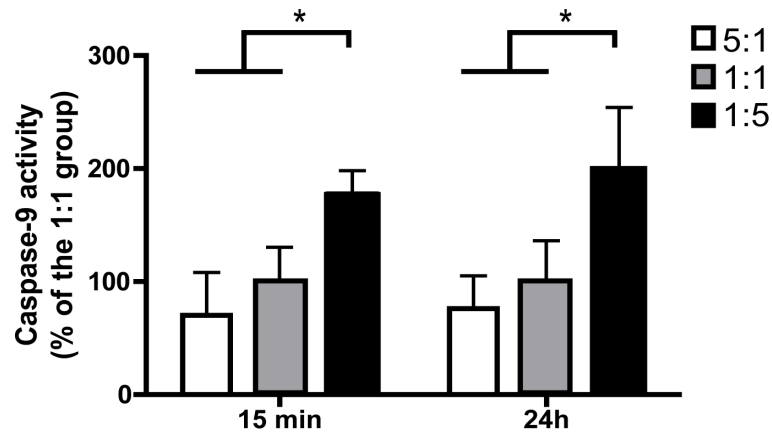


**Figure 3A:** After 15 min of reperfusion, caspase-3 activity, assessed *in vitro*, is significantly reduced in CA1 of groups 5:1 and 1:1 vs. group 1:5 (n = 5-7 in each group; \*  $F(1,15) = 6,12$ ;  $p = 0.026$  vs. group 1:5). No difference is detected in the dentate gyrus (DG). **B:** After 24 h of reperfusion, caspase-3 activity, assessed *in vitro*, is significantly reduced in CA1 and the DG in groups 5:1 and 1:1 vs. group 1:5 (n = 5-8 in each group; CA1: \*  $F(1,15) = 6,81$ ;  $p = 0.02$  vs. group 1:5, DG: \*  $F(1,16) = 7,60$ ;  $p = 0.014$  vs. group 1:5).

Because significant results were obtained for caspase-3 activity in CA1 and the DG, further analysis of caspase-8 (Figure 4) and caspase-9 activities was conducted (Figure 5). After 15 min and 24 h of reperfusion, high omega-3 groups 5:1 and 1:1 vs. low omega-3 group 1:5 showed significant caspase-8 activity reduction in the DG (Figure 4). Similarly, after 15 min and 24 h of reperfusion, caspase-9 activity in CA1 was significantly decreased in high omega-3 groups 5:1 and 1:1 vs. low omega-3 group 1:5 (Figure 5).



**Figure 4:** After 15 min and 24 h of reperfusion, caspase-8 activity, assessed by *in vitro* spectrofluorescence, is significantly reduced in the dentate gyrus in groups 5:1 and 1:1 vs. group 1:5 (n = 4-7 in each group; 15 min: \*  $F(1,16) = 10,12$ ;  $p = 0.006$  vs. group 1:5, 24 h: \*  $F(1,16) = 12,29$ ;  $p = 0.003$  vs. Group 1:5).

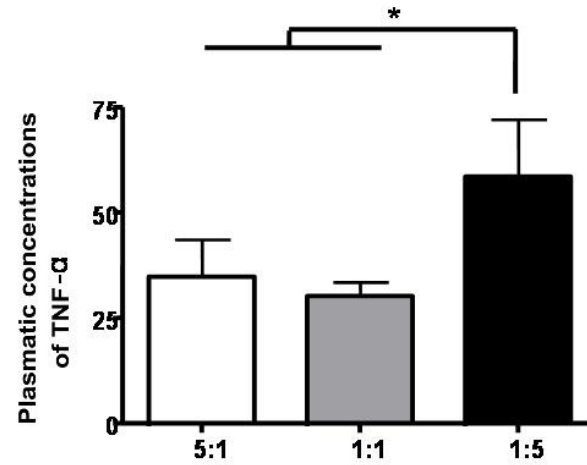


**Figure 5:** After 15 min and 24 h of reperfusion, caspase-9 activity is significantly reduced in CA1 in groups 5:1 and 1:1 vs. group 1:5 ( $n = 5$  in each group; CA1 at 15 min: \*  $F(1,12) = 6,17$ ;  $p = 0.029$  vs. group 1:5; CA1 at 24 h: \*  $F(1,11) = 5,31$ ;  $p = 0.042$  vs. group 1:5).

#### 3.4 Plasma TNF- $\alpha$ concentrations

Plasma TNF- $\alpha$  concentrations were significantly increased after 24 h of reperfusion in group 1:5 compared to the other groups (Figure 6). No significant difference was noted between groups after 15 min of reperfusion, indicating that plasma TNF- $\alpha$  elevation was delayed in comparison to reperfusion onset (data not shown).





**Figure 6:** After 24 h of reperfusion, plasma TNF- $\alpha$  concentrations are significantly elevated in group 1:5 vs. groups 1:1 and 5:1 (n = 8 in each group,  $F(1,21) = 4,88$ ;  $p = 0.038$  vs group 1:5).

#### 4. Discussion

The novel finding of this study is that consumption of high omega-3/6 ratios reduces infarct size, inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  levels and helps to attenuate apoptosis in the limbic system after MI.

Both omega-3 and omega-6 are metabolized by the same desaturation/elongation pathway, and thus competition for metabolic enzymes between these 2 families of fatty acids has significant consequences for health [5, 6]. The initial conversion of  $\alpha$ -linolenic acid to 18:4 $\omega$ -3 by the action of  $\Delta$ 6-desaturase is the rate-limiting reaction of the pathway [6, 15]. The affinity of  $\Delta$ 6-desaturase for  $\alpha$ -linolenic acid is greater than for linoleic acid, but the greater cellular pools of linoleic than  $\alpha$ -linolenic in industrialized countries result in greater conversion to omega-6 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) [16]. For this reason, it is important to consider dietary omega-3/6 ratios rather than simple omega-3 supplementation to assess their effects on cardiovascular diseases [17]. Another aspect that we have taken into account is to select a total lipid content which represent 20% of the diet and 40% of calories per day, reflecting lipid levels of Western diets.

The data obtained in the present experiments demonstrate that high omega-3/6 ratios reduce myocardial infarct size by 30% compared to the 1:5 ratio. The present results are difficult to reconcile with those of previous studies since we are using omega-3/6 ratios instead of omega-3 addition. Meanwhile, it is not surprising that our higher omega-3/6 ratios had a better influence on infarct size since omega-3 is known to be cardio-protective. For example, Abdukeyum *et al.* reported 35% infarct size diminution after MI in rats fed a 10%

lipid diet containing 7% fish oil and 3% olive oil in comparison to diets high in PUFAs (5% sunflower oil, 5% olive oil) and omega-6 (7% beef tallow, 3% olive oil) [18]. Also, in a rat MI model, Zhu *et al.* observed a 15% decrease in infarct size after 8 weeks on a diet containing 12% fish oil. However, no significant differences were detected after 1 week of feeding [19]. In the present investigation, rats were fed with the diets for 2 weeks, and we detected significant differences, interring that minimal dietary duration could be around 2 weeks.

Two different cardio-protective pathways have been evoked to explain the reduction of reperfused MI. First, the RISK pathway involves Akt activation through phosphatidylinositol 3-kinase. Activation of the RISK pathway is associated with the recruitment of anti-apoptotic signaling systems, such as phosphorylation and inhibition of the pro-apoptotic proteins BAX and BAD [20-24], suppression of caspase-3 [25] and increased levels of the anti-apoptotic protein Bcl-2 [25]. Also, it has been reported that the RISK pathway contributes to cardio-protection by mPTP inhibition[26]. Although the mechanism by which the RISK pathway suppresses mPTP opening is unclear, it has been proposed that GSK-3 $\beta$  phosphorylation dampens mPTP opening and, thus, interferes with the influx of small molecules into the mitochondria which ultimately release pro-apoptotic components, such as cytochrome C [25, 28]. In some circumstances, although the RISK pathway is inhibited or not active, cardio-protection is still apparent [7-9] and involves STAT-3, a determinant of SAFE cardio-protection [7]. In our model, RISK pathway activity, assessed by Akt activity, is elevated on the higher omega-3 diets compared to the 1:5 omega-3/6 diet, whereas no difference is observed in the SAFE pathway. To our

knowledge, we are the first to show directly that omega-3 dietary enrichment reduces infarct size coincidentally with RISK pathway activation. However, a previous study suggests a common cardio-protective mechanism between omega-3 and ischemic pre-conditioning, and thus the RISK pathway, since the combination of both interventions does not afford additional protection compared to pre-conditioning alone [18]. The intracellular signalling pathway that leads to Akt activation after omega-3 ingestion needs further investigation.

According to the literature, omega-3 has many other properties, such as anti-inflammatory effects, that may account for the infarct size reduction [29]. To test the influence of higher omega-3 consumption on inflammation, we measured the plasma levels of TNF- $\alpha$ , a pro-inflammatory cytokine that is released after MI. Diminution of TNF- $\alpha$  with the higher omega-3 diets has also been reported by other investigators [17, 30], but is not observed universally [31]. Two hypotheses could explain this plasma TNF- $\alpha$  reduction: a decrease in infarct size or alteration of TNF- $\alpha$  release/synthesis. However, the design of our study did not allow us to distinguish between these possibilities.

We have previously reported the occurrence of apoptosis in the limbic system after MI. Two pathways have been proposed to explain this programmed cell death: the first involves cerebral blood flow reduction resulting in intrinsic pathway activation whereas in the second, production of pro-inflammatory cytokines may be responsible for extrinsic pathways activation [32]. Previous studies in our laboratory revealed that inhibiting cytokine synthesis with pentoxifylline reduces apoptosis in the limbic system 3 days post-MI [14]. Also, pharmacological treatment with an anti-depressant (sertraline) or an A<sub>2A</sub> agonist decreases apoptosis in the limbic system [11, 13]. Consistently with the present

report, blocking the Tumor-Necrosis-Factor-Receptor I (TNFR1) in our rat myocardial model also diminishes markers of apoptosis in the limbic system [10]. These findings indicate a possible link between reduced plasma TNF- $\alpha$  concentrations and apoptosis inhibition seen in the limbic system.

In CA1, a region in the hippocampus that is sensitive to hypoxia [33], intrinsic apoptosis pathway activity is diminished with high-ratio omega-3/6 diets, which could be explained by the decrease in infarct size in these groups. Indeed, the early increase in caspase-9 activity in CA1 indicates rapid activation of this pathway after MI in the region.

Another potential explanation for the anti-apoptotic properties of omega-3 is that docosahaexanoic acid (DHA) is a precursor of neuroprotectin D, a substance that induces pro-survival signals down-regulating apoptosis [34]. Systemic DHA administration, after middle cerebral artery occlusion, helps in neuroprotectin D production [35] and may, thus, reduce apoptosis by altering the intrinsic pathway.

In the DG, caspase-8 activity was enhanced after 15 min of reperfusion in the higher dietary omega-3 groups whereas no change in caspase-3 activity was detected. Since caspase-3 is downstream in the extrinsic pathway compared to caspase-8, this result indicates that extrinsic pathway activation is at the beginning of the apoptosis cascade. These data are similar to those reported earlier [10].

In the amygdala, no differences between the different diets were observed, suggesting that the apoptosis usually detected in these regions is not sensitive to omega-3 modulation. Further analysis is needed to understand this apparent discrepancy. Since apoptosis was not encountered on the first day after reperfusion onset in CA3, it was not surprising that no

difference was noted in the different diet groups. Whether the diminution of apoptosis may attenuate depressive behaviour after MI needs further study.

No additional benefits were observed in infarct size, plasma TNF- $\alpha$  concentrations and apoptosis markers with the higher omega-3/6 ratio (5:1) compared to 1:1. As proposed by Simopoulos [17], our data indicate that the original 1:1 ratio seems to be ideal; no additional benefits accrue with the 5:1 diet. However, it remains to be determined if lower omega-3/6 diets have effects on myocardial infarct size or post-MI apoptosis in the limbic system. Also, it is still unclear if omega-3 supplementation, without any change in EFA dietary ratio, may have the same outcome.

## 5. Funding

This work was supported by *La Fondation des Maladies du Coeur du Québec*. I.R. holds a studentship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and T.M.B. from *Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ)*.

Conflict of interest: None declared.

## 6. References

- [1] Simopoulos AP, Robinson J, de Lorgeril M, Salen P. Le régime oméga-3. Grenoble: EDP Sciences, 2004.
- [2] Wilber CG, Levine VE. Fat metabolism in Alaskan eskimos. *Exp Med Surg* 1950;**8**:422-425.
- [3] Denke MA. Diet, lifestyle, and nonstatin trials: review of time to benefit. *Am J Cardiol* 2005;**96**:3F-10F.
- [4] Schwalfenberg G. Omega-3 fatty acids: their beneficial role in cardiovascular health. *Can Fam Physician* 2006;**52**:734-740.
- [5] Burdge GC, Calder PC. Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod Nutr Dev* 2005;**45**:581-597.
- [6] Lands WEM. Fish, Omega-3 and human health. Champaign, Illinois: AOCS Press, 2005.
- [7] Lecour S. Multiple protective pathways against reperfusion injury: a SAFE path without Aktion? *J Mol Cell Cardiol* 2009;**46**:607-609.
- [8] Lecour S, Suleman N, Deuchar GA, Somers S, Lacerda L, Huisamen B, *et al.* Pharmacological preconditioning with tumor necrosis factor-alpha activates signal transducer and activator of transcription-3 at reperfusion without involving classic prosurvival kinases (Akt and extracellular signal-regulated kinase). *Circulation* 2005;**112**:3911-3918.

- [9] Skyschally A, van Caster P, Boengler K, Gres P, Musiolik J, Schilawa D, *et al.* Ischemic postconditioning in pigs: no causal role for RISK activation. *Circ Res* 2009;**104**:15-18.
- [10] Kaloustian S, Bah TM, Rondeau I, Mathieu S, Lada-Moldovan L, Ryvlin P, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha participates in apoptosis in the limbic system after myocardial infarction. *Apoptosis* 2009;**14**:1308-1316.
- [11] Wann BP, Bah TM, Kaloustian S, Boucher M, Dufort AM, Le Marec N, *et al.* Behavioural signs of depression and apoptosis in the limbic system following myocardial infarction: effects of sertraline. *J Psychopharmacol* 2009;**23**:451-459.
- [12] Lesperance F, Frasere-Smith N. Depression and heart disease. *Cleve Clin J Med* 2007;**74 Suppl 1**:S63-66.
- [13] Boucher M, Wann BP, Kaloustian S, Cardinal R, Godbout R, Rousseau G. Reduction of apoptosis in the amygdala by an A2A adenosine receptor agonist following myocardial infarction. *Apoptosis* 2006;**11**:1067-1074.
- [14] Wann BP, Boucher M, Kaloustian S, Nim S, Godbout R, Rousseau G. Apoptosis detected in the amygdala following myocardial infarction in the rat. *Biol Psychiatry* 2006;**59**:430-433.
- [15] Heller A, Stehr S, Koch T. Omega 3 fatty acids in clinical nutrition. New York: Nova Science Publishers, Inc, 2006.
- [16] Mills SC, Windsor AC, Knight SC. The potential interactions between polyunsaturated fatty acids and colonic inflammatory processes. *Clin Exp Immunol* 2005;**142**:216-228.
- [17] Simopoulos AP. The omega-6/omega-3 fatty acid ratio, genetic variation, and cardiovascular disease. *Asia Pac J Clin Nutr* 2008;**17 Suppl 1**:131-134.
- [18] Abdukeyum GG, Owen AJ, McLennan PL. Dietary (n-3) long-chain polyunsaturated fatty acids inhibit ischemia and reperfusion arrhythmias and infarction in rat heart not enhanced by ischemic preconditioning. *J Nutr* 2008;**138**:1902-1909.



- [19] Zhu BQ, Sievers RE, Sun YP, Morse-Fisher N, Parmley WW, Wolfe CL. Is the reduction of myocardial infarct size by dietary fish oil the result of altered platelet function? *Am Heart J* 1994;**127**:744-755.
- [20] Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, *et al.* Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997;**91**:231-241.
- [21] Kang YC, Kim KM, Lee KS, Namkoong S, Lee SJ, Han JA, *et al.* Serum bioactive lysophospholipids prevent TRAIL-induced apoptosis via PI3K/Akt-dependent cFLIP expression and Bad phosphorylation. *Cell Death Differ* 2004;**11**:1287-1298.
- [22] Kuwahara K, Saito Y, Kishimoto I, Miyamoto Y, Harada M, Ogawa E, *et al.* Cardiotrophin-1 phosphorylates akt and BAD, and prolongs cell survival via a PI3K-dependent pathway in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2000;**32**:1385-1394.
- [23] Hausenloy DJ, Maddock HL, Baxter GF, Yellon DM. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovasc Res* 2002;**55**:534-543.
- [24] Zhao ZQ, Budde JM, Morris C, Wang NP, Velez DA, Muraki S, *et al.* Adenosine attenuates reperfusion-induced apoptotic cell death by modulating expression of Bcl-2 and Bax proteins. *J Mol Cell Cardiol* 2001;**33**:57-68.
- [25] Boucher M, Pesant S, Falcao S, de Montigny C, Schampaert E, Cardinal R, *et al.* Post-ischemic cardioprotection by A2A adenosine receptors: dependent of phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;**43**:416-422.
- [26] Hausenloy D, Wynne A, Duchon M, Yellon D. Transient mitochondrial permeability transition pore opening mediates preconditioning-induced protection. *Circulation* 2004;**109**:1714-1717.
- [27] Miura T, Miki T. GSK-3beta, a therapeutic target for cardiomyocyte protection. *Circ J* 2009;**73**:1184-1192.
- [28] Nishihara M, Miura T, Miki T, Tanno M, Yano T, Naitoh K, *et al.* Modulation of the mitochondrial permeability transition pore complex in GSK-3beta-mediated myocardial protection. *J Mol Cell Cardiol* 2007;**43**:564-570.

- [29] von Schacky C. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004;**7**:131-136.
- [30] Bhattacharya A, Sun D, Rahman M, Fernandes G. Different ratios of eicosapentaenoic and docosahexaenoic omega-3 fatty acids in commercial fish oils differentially alter pro-inflammatory cytokines in peritoneal macrophages from C57BL/6 female mice. *J Nutr Biochem* 2007;**18**:23-30.
- [31] LeBlanc CJ, Horohov DW, Bauer JE, Hosgood G, Mauldin GE. Effects of dietary supplementation with fish oil on in vivo production of inflammatory mediators in clinically normal dogs. *Am J Vet Res* 2008;**69**:486-493.
- [32] Thorburn A. Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal* 2004;**16**:139-144.
- [33] Sugawara T, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Kawase M, Chan PH. 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**:RC39.
- [34] Mukherjee PK, Marcheselli VL, Barreiro S, Hu J, Bok D, Bazan NG. Neurotrophins enhance retinal pigment epithelial cell survival through neuroprotectin D1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;**104**:13152-13157.
- [35] Belayev L, Khoutorova L, Atkins KD, Bazan NG. Robust docosahexaenoic acid-mediated neuroprotection in a rat model of transient, focal cerebral ischemia. *Stroke* 2009;**40**:3121-3126.

## Chapitre 6. Discussion

Cette étude dévoile qu'une diète alimentaire comprenant des ratios  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 de 5:1 ou 1:1 en comparaison avec un ratio de 1:5 réduit la taille de l'infarctus, l'inflammation et aide à prévenir l'apoptose dans le système limbique après un IM dans un modèle d'ischémie-reperfusion chez le rat. À la différence des études précédentes qui ont évalué l'effet de suppléments d'huile de poisson ou d' $\omega$ -3 à la diète [347, 374, 375], nous avons conservé l'apport calorique total en  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 stable dans chacune des diètes pour déterminer le ratio d' $\omega$ -3/ $\omega$ -6 optimal. Puisqu'il existe une compétition entre les AGE  $\omega$ -3 et  $\omega$ -6, l'ajout d'un supplément d'huile de poisson n'aura pas le même impact selon la présence des  $\omega$ -6 dans l'alimentation [255]. Pour un même supplément d' $\omega$ -3, la proportion d' $\omega$ -6 influence son intégration membranaire et certainement son métabolisme ayant ainsi un impact physiologique. De ce fait, l'utilisation de diètes avec un ratio  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 alimentaire déterminé tient compte du métabolisme et caractérise mieux la réelle proportion. Le choix des ratios employés se base sur l'hypothèse que le ratio idéal serait de 1:1 chez l'homme selon les études anthropologiques et épidémiologiques [282]. De plus, afin de mieux représenter la teneur en lipide de la diète nord-américaine une diète riche en lipides a été utilisée, c'est-à-dire contenant 20 % de lipides soit 40 % des calories ingérées [376].

Nous avons, tout d'abord, observé une diminution significative de 32 % de la taille de l'IM avec les ratios élevés en  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 (5:1 et 1:1) en comparaison à la diète plus élevée en  $\omega$ -6 (1:5). Nos résultats sont en accord avec la littérature démontrant une réduction de la taille d'infarctus avec des diètes riches en  $\omega$ -3 [348, 377]. Ces résultats peuvent cependant soulever une question sachant que la diète nord-américaine contient un ratio de 1:15  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 et que nous avons utilisé un ratio de 1:5 à titre comparatif. Comme la diète riche en  $\omega$ -6 1:5 correspond déjà à une augmentation de la consommation des  $\omega$ -3 par rapport à la

diète nord-américaine, pourrait-il déjà y avoir une amélioration de la taille d'infarctus? Nous avons mesuré une taille d'infarctus d'environ 45 % de la zone à risque avec le ratio 1:5  $\omega$ -3/ $\omega$ -6. Lorsque l'on compare les résultats antérieurs de taille d'infarctus chez les rats soumis à la diète recommandée usuelle de Charles River 5075-US c'est-à-dire contenant une faible proportion de lipides (4,5 %) et peu d' $\omega$ -3, aucune différence notable n'est présente. En effet, la taille d'infarctus observée varie d'environ 45 à 50 % de la zone à risque selon les études [54, 166, 168, 213]. Ainsi, bien que le ratio 1:5  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 par rapport à la diète nord-américaine contienne plus d' $\omega$ -3, il semble nécessaire de viser un ratio alimentaire plus élevé que 1:5 pour obtenir un bénéfice cardioprotecteur.

La nouveauté de cette étude provient de notre intérêt à approfondir le mécanisme cardioprotecteur en nous penchant sur les deux principales voies connues de cardioprotection: RISK et SAFE. Nous sommes d'ailleurs les premiers à associer une activité accrue de la protéine Akt impliquée dans la voie RISK à la réduction de la taille d'IM dans une étude nutritionnelle. Deux études vont dans le même sens que nos observations. La première de McGuinness et coll. démontre une augmentation des HSP 72 lors d'infusion d' $\omega$ -3 dans un modèle ischémie-reperfusion chez le lapin. La présence de HSP 72 est un marqueur de l'état préconditionné du cœur associé à une cardioprotection [345]. Une seconde étude d'Abdukeyum et coll. propose qu'un mécanisme commun existe entre les  $\omega$ -3 et le préconditionnement ischémique [348]. Comme le préconditionnement ischémique induit une cardioprotection par la voie RISK [106], il serait possible que les  $\omega$ -3 soient cardioprotecteurs via une activation de cette voie.

Un autre lien intéressant entre les  $\omega$ -3 et la voie cardioprotectrice RISK se fait au niveau de la mitochondrie. Une étude récente d'O'Shea et coll. décèle une augmentation de la résistance du canal mPTP à s'ouvrir dans le myocarde sain, correspondant à une meilleure capacité à capter le calcium lors de supplémentation en  $\omega$ -3. Ceci n'était

cependant pas retrouvé dans le myocarde infarci. Une limite de cette étude est que le supplément a été administré après l'ischémie [378]. Il est tout de même intéressant d'observer une modulation du mPTP par les  $\omega$ -3. Ainsi puisque la voie RISK converge vers le pore mitochondrial mPTP [106], il serait possible que les  $\omega$ -3 influencent la fonctionnalité du pore mPTP soit via Akt ou par une interaction plus directe.

Par ailleurs, un autre mécanisme possible permettant d'expliquer la réduction de la taille d'infarctus par les  $\omega$ -3 serait inhérent à leurs propriétés anti-inflammatoires. Rappelons le rôle de l'inflammation dans les lésions de reperfusion. Bien qu'une diminution des cytokines pro-inflammatoires ne permette pas en soi de réduire la taille d'infarctus [54], il est possible qu'en formant des métabolites moins biologiquement actifs, les  $\omega$ -3 puissent la diminuer. Plus précisément la formation de métabolites chimioattractants des  $\omega$ -3 qui sont moins actifs que ceux des AA, pourrait amoindrir l'appel des neutrophiles, qui sont impliqués dans les lésions de reperfusion [60]. Ajoutons la propriété des  $\omega$ -3 à moduler l'expression génique des molécules d'adhésion [379] réduisant la migration des neutrophiles par l'inhibition de NF $\kappa$ -B. Finalement, l'incorporation des  $\omega$ -3 dans les neutrophiles améliore leur capacité à phagocyter et subséquentement à réduire la production de ROS, délétère pour le tissu [380].

Par la suite, nous avons observé une diminution significative du TNF- $\alpha$  plasmatique chez les groupes nourris avec des diètes à haut ratio  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 (5:1 et 1:1) en comparaison avec ceux à faible ratio (1:5) après 24 heures de reperfusion. Aucune différence n'a pourtant été observée entre les différents groupes après 15 min de reperfusion. Ceci suppose que l'effet des  $\omega$ -3 nécessite un certain temps après le déclenchement du processus inflammatoire d'ischémie-reperfusion pour influencer la réponse inflammatoire par le TNF- $\alpha$ . Dans les premières minutes suivant un IM, le TNF- $\alpha$  qui est constitutivement exprimé dans les cardiomyocytes, serait responsable d'induire la cascade inflammatoire. Aussi les

mastocytes présents dans le tissu myocardique participent à la mise en branle de l'inflammation et libèrent du TNF- $\alpha$  déjà formé et accumulé dans leurs granules [52, 381]. Les niveaux retrouvés après 15 min de reperfusion pourraient représenter davantage la première libération du TNF- $\alpha$  déjà accumulé dans les mastocytes et les cardiomyocytes, c'est-à-dire la réponse aiguë déclencheur. Il faut rappeler que les  $\omega$ -3 une fois incorporés dans les membranes, nécessitent un facteur initiant, c'est-à-dire un dommage cellulaire ou autre déclencheur pour être libérés de la membrane et former les prostaglandines. À ce moment, l'effet anti-inflammatoire de ces dérivés pourra être observé. On attribue aussi aux  $\omega$ -3 des effets inhibiteurs sur NF $\kappa$ -B [302]; ceux-ci ne pourraient être visibles que lorsque l'expression génique des cytokines et molécules d'adhésion est accentuée. Ainsi, les  $\omega$ -3 n'influenceraient que peu la libération du TNF- $\alpha$  dans les premières minutes après l'IM.

Après 24 heures de reperfusion, une plus faible concentration de TNF- $\alpha$  est retrouvée avec les ratios 5:1 et 1:1 comparativement à un ratio 1:5  $\omega$ -3/ $\omega$ -6. La diminution des concentrations plasmatiques du TNF- $\alpha$  par les  $\omega$ -3 a été observée dans plusieurs études effectuées dans des pathologies cardiovasculaires [382-384]. D'un autre côté, avec une inflammation induite par du LPS, les  $\omega$ -3 ne réduisent pas les concentrations du TNF- $\alpha$  [385, 386]. Ceci peut suggérer que l'effet anti-inflammatoire des  $\omega$ -3 dépend du stimulus à l'origine et du type de réponse inflammatoire. On retrouve dans l'IM une réponse inflammatoire cellulaire développée où les neutrophiles et monocytes jouent un rôle important [43], contrairement à la réponse impliquant majoritairement les macrophages avec le LPS [386].

De nombreux mécanismes pourraient contribuer à la diminution du TNF- $\alpha$ . D'une part, rappelons l'effet des  $\omega$ -3 sur l'expression génique des cytokines via une inhibition de NF $\kappa$ -B [299]. De plus, les dérivés des prostaglandines produites à partir des  $\omega$ -3, moins efficaces et plus difficilement métabolisables par les COX, diminuent le recrutement et

l'activation des cellules immunitaires qui produisent les cytokines [292]. Finalement, il est possible que l'effet anti-inflammatoire soit une conséquence d'une lésion tissulaire initiale plus faible observée par une taille d'infarctus réduite avec les ratios 5:1 et 1:1  $\omega$ -3/ $\omega$ -6.

Dans le système limbique, l'augmentation du ratio  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 alimentaire à 5:1 ou 1:1 aide à prévenir l'apoptose en comparaison avec un ratio de 1:5  $\omega$ -3/ $\omega$ -6. Les diètes riches en  $\omega$ -3 modulent la voie intrinsèque de l'apoptose via une réduction de l'activité de la caspase-9 dans la région du CA1 après 15 min et 24 h. Elles diminuent aussi l'activité de la caspase-8 dans la région du Gd associée à une modulation de la voie extrinsèque après 15 min et 24 h. En premier lieu, le CA1 est une région plus sensible à l'hypoxie [387]. Des résultats non publiés de notre laboratoire ont décelé une circulation sanguine cérébrale réduite après l'IM. Comme les diètes élevées en  $\omega$ -3 (5:1 et 1:1) réduisent la taille d'infarctus, il s'ensuit possiblement une meilleure circulation sanguine et donc une meilleure oxygénation. Cette hypothèse peut expliquer une activation réduite de la voie intrinsèque de l'apoptose pouvant être déclenchée par l'hypoxie. En fait, les  $\omega$ -3 permettent de réduire l'apoptose dans la région CA1 [388] et d'améliorer les fonctions cérébrales après un manque d'oxygénation induit par ischémie cérébrale [389, 390]. Il serait alors possible qu'un mécanisme protecteur relié au maintien d'une circulation sanguine adéquate puisse également contribuer à la diminution de l'apoptose dans CA1.

En second lieu, les diètes riches en  $\omega$ -3 semblent prévenir l'apoptose par la voie extrinsèque dans la région du Gd. Cette voie apoptotique peut être déclenchée par la liaison d'un ligand avec un récepteur de type DR. Le TNF- $\alpha$  peut accéder aux récepteurs pro-apoptotiques [83] en passant du plasma au cerveau à travers la BHE par un transporteur [179] ou par diffusion dans la région sans BHE du circumventriculaire [173]. De plus, une étude récente démontre que le TNF- $\alpha$  participe à l'apoptose dans le Gd après 15 min de reperfusion [53]. Conséquemment, il est fort probable que la diminution du TNF- $\alpha$  observée dans cette étude contribue à la réduction de l'apoptose dans le Gd.

Il y a présence d'apoptose après un IM dans les mêmes régions CA1 et Gd, après 15 min de reperfusion, lorsque les animaux sont nourris avec la diète standard de Charles Rivers 5075-US. Après 24 heures suivant l'IM, l'apoptose est observée dans le CA1, le Gd et dans l'amygdale. Il semblerait donc que les diètes avec un ratio élevé 5:1 et 1:1  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 ne modifient pas significativement les marqueurs apoptotiques dans l'amygdale lorsque comparées au ratio 1:5. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce résultat. Tout d'abord, le ratio 1:5 contribue déjà à une augmentation en  $\omega$ -3 par rapport à la diète usuelle chez le rat, ceci peut protéger la région de l'amygdale. En second lieu, l'élément ou le mécanisme déclencheur de l'apoptose dans cette région n'est peut-être pas influencé par les  $\omega$ -3. Selon certains auteurs, il semble qu'un ratio 1:4 serait suffisant pour avoir des effets positifs sur les cellules nerveuses et donc, il est probable que le ratio utilisé dans notre étude serait suffisant pour diminuer les effets néfastes [284]. Toutefois, un ratio supérieur tel que 1:4 serait intéressant à utiliser, pour tester cette hypothèse.

En plus de pouvoir améliorer l'apport sanguin et de réduire le TNF- $\alpha$ , d'autres effets des  $\omega$ -3 peuvent contribuer à la diminution des marqueurs apoptotiques tels qu'observés. Une première hypothèse porte sur la formation de la neuroprotectine D, métabolite du DHA. Ce métabolite inhibe la réponse inflammatoire et augmente l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 [366, 367]. De plus, l'administration systémique de DHA dans un modèle d'ischémie cérébrale induit une neuroprotection et augmente la présence de neuroprotectine D [391]. Ceci appuie la possibilité que la neuroprotectine D protège contre l'apoptose lors d'une diminution de la circulation sanguine cérébrale comme dans l'IM et pourrait donc intervenir dans notre étude.

En second lieu, une des hypothèses de la dépression impliquant les cytokines sous-entend que les cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL-1 $\beta$ , augmentent la transcription de COX-2 via NF- $\kappa$ B au niveau de la BHE. Ceci accroît le métabolisme des prostaglandines plus particulièrement celui de la PGE2 qui induit de manière dose-dépendante l'apoptose



cérébrale. Ce mécanisme pourrait jouer un rôle dans l'apoptose compte tenu du fait que l'hippocampe possède une proportion élevée en récepteurs PGE<sub>2</sub>. D'une part, en diminuant l'inflammation, les  $\omega$ -3 pourraient atténuer l'activation transcriptionnelle de COX-2 au niveau de la BHE. Ajoutons, à ceci l'inhibition directe de NF $\kappa$ -B par les  $\omega$ -3. Pour terminer, comme l'EPA et le DHA compétitionnent avec l'AA et sont plus lentement métabolisés par COX-2 contrairement à l'AA, ils contribuent à diminuer la PGE<sub>2</sub> et subséquemment l'apoptose induite par celui-ci. Il est à noter que le Celecoxib un inhibiteur de COX-2 diminue l'apoptose dans l'amygdale dans notre modèle d'IM chez le rat nourrit avec la diète usuelle de Charles River [212]. Les ratios élevés en  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 semblent donc avoir peu d'influence sur l'expression ou l'efficacité de COX-2 après un IM, car l'apoptose dans l'amygdale aurait également été réduite, à moins qu'une quantité minimale soit nécessaire et qu'elle ait déjà été atteinte avec la diète 1:5.

En dernier lieu, une étude récente a démontré qu'un supplément d' $\omega$ -3 chez des volontaires sains diminue les niveaux d'épinéphrine et de cortisol après un stress psychologique suggérant sa capacité de moduler l'axe HPA [392]. Il serait possible que les diètes élevées en  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 (5:1 et 1:1) aient un effet sur la production de glucocorticoïdes en modulant l'axe HPA dans notre modèle d'IM. Puisque les glucocorticoïdes augmentent la sensibilité de la région CA1 aux agents neurotoxiques telle que l'anoxie [231, 232] et qu'à forte concentration, ils diminuent la survie des neurones matures dans le Gd [235], leur réduction par les diètes riches en  $\omega$ -3 pourrait ainsi diminuer l'apoptose neuronale dans ces régions.

L'observation globale de nos résultats tant au niveau de la taille d'infarctus, des concentrations plasmatiques du TNF- $\alpha$  qu'au niveau des marqueurs d'apoptose dans le système limbique ne démontrent aucune différence significative entre les ratios 5:1 et 1:1  $\omega$ -3/ $\omega$ -6. Ceci suggère qu'il n'y aurait pas de bénéfice dans notre modèle expérimental à

augmenter le ratio alimentaire au-delà de 1:1. Ceci appuie l'hypothèse d'un ratio idéal de 1:1 chez l'homme [282]. Il reste possible que la taille de nos groupes expérimentaux ne permette pas de déceler une différence significative entre ces deux ratios. Cependant, comme nous l'avons observé, plusieurs études ont remarqué la présence d'un effet seuil avec l'ajout d' $\omega$ -3 dans l'alimentation [337, 340, 393].

Notre étude souligne l'importance du ratio  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 dans le système cardiovasculaire démontrant un bénéfice dû à l'augmentation de la consommation d' $\omega$ -3. Plusieurs études soulignent l'importance de ce ratio [248, 383, 394, 395], alors que d'autres la réfute [396, 397]. Harris remet en question l'application clinique du ratio  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 en tant que biomarqueur de maladies cardiovasculaires [396]. D'ailleurs, dans les maladies coronariennes le ratio membranaire EPA/AA prédit plus faiblement la condition clinique que la concentration d'EPA et DHA seule [397]. Il recommande des suppléments alimentaires et non un ratio  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 alimentaire spécifique pour augmenter la consommation en  $\omega$ -3 sans réduire l'apport lipidique [396]. D'ailleurs diminuer l'apport lipidique ne procure aucun bénéfice cardiovasculaire et c'est même le contraire qui s'observe [396]. Notre étude soutien qu'en maintenant un apport lipidique à 20 % de l'apport calorique, l'ingestion de portion égale en  $\omega$ -3 qu'en  $\omega$ -6 ou en proportion 5:1 apporte un bénéfice cardiovasculaire dans notre modèle d'IM.

Pour terminer, l'une des limites de notre étude est que la diète 1:5 ne contient pas d'huile de poisson. Les  $\omega$ -3 dans la diète 1:5 proviennent de l'huile de lin qui contient des concentrations de 24,1 % de LA comparativement à 47,4 % d'ALA [244]. Ceci représente cependant bien la population nord-américaine qui consomme peu ou pas de poisson et dont la principale source d'AG  $\omega$ -3 provient de sources végétales. L'absence d'huile de poisson dans la diète 1:5 soulève une objection par rapport à la diminution d'apoptose observée dans le système limbique. Rappelons que le DHA est un constituant essentiel pour le bon

fonctionnement cérébral; ainsi, une diminution de sa concentration pourrait affecter l'équilibre cellulaire neuronal. Cependant, même lors d'une déplétion en DHA, les concentrations de DHA sont maintenues par l'augmentation de leur production hépatique [398, 399]. Également avec une diète contenant uniquement de l'huile de tournesol (ne contenant que des traces d'ALA), les concentrations d' $\omega$ -3 étaient réduites dans le foie, le cœur, les testicules sans toutefois réduire dans le cerveau, et ce, jusqu'à 31 jours chez le rat [399]. Ceci suggère que dans le groupe 1:5, la réduction en AG  $\omega$ -3 n'influencerait pas la composition en DHA du cerveau des rats.

Une seconde limite à notre étude est l'utilisation de l'isoflurane pour perdurer l'anesthésie lors de la chirurgie. L'isoflurane administré au moment de la reperfusion potentialise les effets de post-conditionnement ischémique. Il est possible que dans notre modèle animal, l'utilisation d'anesthésiant telle que l'isoflurane puisse induire une potentialisation des effets protecteurs via Akt [400]. Cependant comme l'isoflurane a été utilisé pendant une même durée dans chacun des groupes, il devrait influencer chacun des groupes également. Des études additionnelles seront nécessaires pour évaluer si un effet protecteur additif est présent en combinant les  $\omega$ -3 et l'isoflurane.

Il serait possible d'améliorer cette étude par une mesure des lipides membranaires. Nous pouvons affirmer cependant, en nous basant sur la littérature, que 2 semaines de diète devraient être suffisantes pour induire des changements des compositions lipidiques membranaires. Effectivement, une diète contenant 10 % d'huile de poisson, tout comme la diète 5:1 utilisée dans cette étude, amènent les concentrations maximales d'EPA dans le myocarde à 7 jours et réduit de façon maximale la concentration en AA après 4 jours et d'acide linoléique après 14 jours. La proportion finale en  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 retrouvé dans le myocarde après une diète de 14 jours est de 1,24 [401].

Il est à noter également qu'il n'existe pas de groupe témoin parfait pour ce genre d'étude puisque les AG  $\omega$ -3 et  $\omega$ -6 sont essentiels à la diète. Ainsi peu importe la diète utilisée, il y aura toujours un ratio qui pourra influencer les fonctions physiologiques. Par exemple, l'utilisation de la diète usuelle de Charles River comme groupe témoin ne serait idéal car il contient une très faible concentration d'  $\omega$ -3 créant un ratio élevé en  $\omega$ -6.

Finalement, la présence d'un processus apoptotique accru dans les régions du système limbique, qui est impliqué dans les émotions et la mémoire, avec le ratio alimentaire 1:5 suppose une modification comportementale. Comme dans notre modèle d'IM, l'apoptose a été associée à des symptômes de dépression [168], il serait pertinent d'évaluer l'effet des diètes élevées en  $\omega$ -3 sur les symptômes dépressifs.

## Conclusion

La présente étude démontre qu'une modification du ratio alimentaire en  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 à 5:1 ou à 1:1 comparativement à un ratio de 1:5 permet de réduire la taille d'infarctus, l'inflammation et aide à prévenir l'apoptose dans le système limbique dans un modèle d'ischémie-reperfusion chez le rat. Cette étude permet d'avoir une vue d'ensemble sur plusieurs facteurs influençant l'IM, dont le système limbique qui semble jouer un rôle dans la dépression post-IM. Il amène une nouvelle hypothèse pour expliquer la cardioprotection des  $\omega$ -3 dans l'IM en observant une activation accrue d'Akt associée à la voie RISK.

Ce mémoire souligne également l'importance de rétablir le ratio alimentaire vers le 1:1 dans l'IM. À tort les  $\omega$ -6 sont trop souvent associés à un état pro-inflammatoire et voir même négatif dans les maladies cardiovasculaires. Les  $\omega$ -6 sont des AGE, et de ce fait doivent se retrouver dans notre alimentation [402]. Cette étude se veut ainsi à rééquilibrer le ratio  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 alimentaire.

## Bibliographie

1. Fondationsdesmaladiesducoeur. *Statistiques*. 2009 [cited 2009 2 septembre]; Available from: <http://www.fmcoeur.com/site/c.ntJXJ8MMIqE/b.3562179/k.9FCD/Statistiques.htm>.
2. Thygesen, K., J.S. Alpert, and H.D. White, *Universal definition of myocardial infarction*. *J Am Coll Cardiol*, 2007. **50**(22): p. 2173-95.
3. Chew, D.P., et al., *Coronary artery bypass surgery in patients with acute coronary syndromes is difficult to predict*. *Am Heart J*, 2008. **155**(5): p. 841-7.
4. Luepker, R.V., et al., *Case definitions for acute coronary heart disease in epidemiology and clinical research studies: a statement from the AHA Council on Epidemiology and Prevention; AHA Statistics Committee; World Heart Federation Council on Epidemiology and Prevention; the European Society of Cardiology Working Group on Epidemiology and Prevention; Centers for Disease Control and Prevention; and the National Heart, Lung, and Blood Institute*. *Circulation*, 2003. **108**(20): p. 2543-9.
5. Antman, E.M., et al., *2007 focused update of the ACC/AHA 2004 guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines*. *J Am Coll Cardiol*, 2008. **51**(2): p. 210-47.
6. Saltissi, S. and S.S. Mushahwar, *The management of acute myocardial infarction*. *Postgrad Med J*, 1995. **71**(839): p. 534-41.
7. Jennings, R.B., et al., *Development of cell injury in sustained acute ischemia*. *Circulation*, 1990. **82**(3 Suppl): p. II2-12.
8. Jennings, R.B. and K.A. Reimer, *Lethal myocardial ischemic injury*. *Am J Pathol*, 1981. **102**(2): p. 241-55.
9. Reimer, K.A., R.B. Jennings, and A.H. Tatum, *Pathobiology of acute myocardial ischemia: metabolic, functional and ultrastructural studies*. *Am J Cardiol*, 1983. **52**(2): p. 72A-81A.
10. Buja, L.M., *Myocardial ischemia and reperfusion injury*. *Cardiovasc Pathol*, 2005. **14**(4): p. 170-5.
11. Farber, J.L., K.R. Chien, and S. Mittnacht, Jr., *Myocardial ischemia: the pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia*. *Am J Pathol*, 1981. **102**(2): p. 271-81.
12. Asano, G., et al., *Pathogenesis and protection of ischemia and reperfusion injury in myocardium*. *J Nippon Med Sch*, 2003. **70**(5): p. 384-92.
13. Kloner, R.A. and R.B. Jennings, *Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1*. *Circulation*, 2001. **104**(24): p. 2981-9.
14. Jennings, R.B., et al., *Relation between high energy phosphate and lethal injury in myocardial ischemia in the dog*. *Am J Pathol*, 1978. **92**(1): p. 187-214.
15. Burke, A.P. and R. Virmani, *Pathophysiology of acute myocardial infarction*. *Med Clin North Am*, 2007. **91**(4): p. 553-72; ix.

16. Carmeliet, E., *Myocardial ischemia: reversible and irreversible changes*. Circulation, 1984. **70**(1): p. 149-51.
17. Jennings, R.B., et al., *Ischemic injury of myocardium*. Ann N Y Acad Sci, 1969. **156**(1): p. 61-78.
18. Barry, W.H., *Mechanisms of myocardial cell injury during ischemia and reperfusion*. J Card Surg, 1987. **2**(3): p. 375-83.
19. Reimer, K.A., et al., *The wavefront phenomenon of ischemic cell death. I. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs*. Circulation, 1977. **56**(5): p. 786-94.
20. Reimer, K.A. and R.B. Jennings, *The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow*. Lab Invest, 1979. **40**(6): p. 633-44.
21. 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.
22. Herdson, P.B., H.M. Sommers, and R.B. Jennings, *A Comparative Study of the Fine Structure of Normal and Ischemic Dog Myocardium with Special Reference to Early Changes Following Temporary Occlusion of a Coronary Artery*. Am J Pathol, 1965. **46**: p. 367-86.
23. Levin, D.C., *Pathways and functional significance of the coronary collateral circulation*. Circulation, 1974. **50**(4): p. 831-7.
24. Miwa, K., et al., *Absence of myocardial ischemia during sudden controlled occlusion of coronary arteries in patients with well-developed collateral vessels*. Coron Artery Dis, 1999. **10**(7): p. 459-63.
25. Charney, R. and M. Cohen, *The role of the coronary collateral circulation in limiting myocardial ischemia and infarct size*. Am Heart J, 1993. **126**(4): p. 937-45.
26. Kloner, R.A., K.A. Reimer, and R.B. Jennings, *Distribution of coronary collateral flow in acute myocardial ischaemic injury: effect of propranolol*. Cardiovasc Res, 1976. **10**(1): p. 81-90.
27. Leshnower, B.G., et al., *Progression of myocardial injury during coronary occlusion in the collateral-deficient heart: a non-wavefront phenomenon*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(3): p. H1799-804.
28. 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.
29. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial reperfusion injury*. N Engl J Med, 2007. **357**(11): p. 1121-35.
30. Virmani, R., M.B. Forman, and F.D. Kolodgie, *Myocardial reperfusion injury. Histopathological effects of perfluorochemical*. Circulation, 1990. **81**(3 Suppl): p. IV57-68.
31. Ganz, W., *Direct Demonstration in Dogs of the Absence of Lethal Reperfusion Injury*. J Thromb Thrombolysis, 1997. **4**(1): p. 105-107.
32. Zahger, D., et al., *Absence of lethal reperfusion injury after 3 hours of reperfusion. A study in a single-canine-heart model of ischemia-reperfusion*. Circulation, 1995. **91**(12): p. 2989-94.

33. Zweier, J.L., *Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury.* J Biol Chem, 1988. **263**(3): p. 1353-7.
34. Kloner, R.A., K. Przyklenk, and P. Whittaker, *Deleterious effects of oxygen radicals in ischemia/reperfusion. Resolved and unresolved issues.* Circulation, 1989. **80**(5): p. 1115-27.
35. Ambrosio, G., et al., *Reduction in experimental infarct size by recombinant human superoxide dismutase: insights into the pathophysiology of reperfusion injury.* Circulation, 1986. **74**(6): p. 1424-33.
36. Jolly, S.R., et al., *Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase.* Circ Res, 1984. **54**(3): p. 277-85.
37. Chen, J.K. and S.E. Chow, *Antioxidants and myocardial ischemia: reperfusion injuries.* Chang Gung Med J, 2005. **28**(6): p. 369-77.
38. Park, J.L. and B.R. Lucchesi, *Mechanisms of myocardial reperfusion injury.* Ann Thorac Surg, 1999. **68**(5): p. 1905-12.
39. Shen, A.C. and R.B. Jennings, *Myocardial calcium and magnesium in acute ischemic injury.* Am J Pathol, 1972. **67**(3): p. 417-40.
40. Piper, H.M., K. Meuter, and C. Schafer, *Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury.* Ann Thorac Surg, 2003. **75**(2): p. S644-8.
41. 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.
42. 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.
43. Frangogiannis, N.G., *The immune system and cardiac repair.* Pharmacol Res, 2008. **58**(2): p. 88-111.
44. Oyama, J., et al., *Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice.* Circulation, 2004. **109**(6): p. 784-9.
45. 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.
46. Zacharowski, K., et al., *Reduction of myocardial infarct size with sCR1sLe(x), an alternatively glycosylated form of human soluble complement receptor type 1 (sCRI), possessing sialyl Lewis x.* Br J Pharmacol, 1999. **128**(5): p. 945-52.
47. Vakeva, A.P., et al., *Myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion: role of the terminal complement components and inhibition by anti-C5 therapy.* Circulation, 1998. **97**(22): p. 2259-67.
48. Lucchesi, B.R. and K.S. Kilgore, *Complement inhibitors in myocardial ischemia/reperfusion injury.* Immunopharmacology, 1997. **38**(1-2): p. 27-42.



49. Trescher, K., et al., *Adenovirus-mediated overexpression of inhibitor kappa B-alpha attenuates postinfarct remodeling in the rat heart*. Eur J Cardiothorac Surg, 2004. **26**(5): p. 960-7.
50. Sharma, H.S. and D.K. Das, *Role of cytokines in myocardial ischemia and reperfusion*. Mediators Inflamm, 1997. **6**(3): p. 175-83.
51. Deten, A., et al., *Differential cytokine expression in myocytes and non-myocytes after myocardial infarction in rats*. Mol Cell Biochem, 2003. **242**(1-2): p. 47-55.
52. Frangogiannis, N.G., C.W. Smith, and M.L. Entman, *The inflammatory response in myocardial infarction*. Cardiovasc Res, 2002. **53**(1): p. 31-47.
53. Kaloustian, S., et al., *Tumor necrosis factor-alpha participates in apoptosis in the limbic system after myocardial infarction*. Apoptosis, 2009.
54. Wann, B.P., et al., *Apoptosis detected in the amygdala following myocardial infarction in the rat*. Biol Psychiatry, 2006. **59**(5): p. 430-3.
55. Gourdin, M.J., B. Bree, and M. De Kock, *The impact of ischaemia-reperfusion on the blood vessel*. Eur J Anaesthesiol, 2009. **26**(7): p. 537-47.
56. Zhao, Z.Q., et al., *Dynamic progression of contractile and endothelial dysfunction and infarct extension in the late phase of reperfusion*. J Surg Res, 2000. **94**(2): p. 133-44.
57. de Lorgeril, M., et al., *Spacial and temporal profiles of neutrophil accumulation in the reperfused ischemic myocardium*. Am J Cardiovasc Pathol, 1990. **3**(2): p. 143-54.
58. Chatelain, P., et al., *Neutrophil accumulation in experimental myocardial infarcts: relation with extent of injury and effect of reperfusion*. Circulation, 1987. **75**(5): p. 1083-90.
59. Smith, E.F., 3rd, et al., *Temporal relation between neutrophil accumulation and myocardial reperfusion injury*. Am J Physiol, 1988. **255**(5 Pt 2): p. H1060-8.
60. Vinten-Johansen, J., *Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 481-97.
61. Vinten-Johansen, J., et al., *Inflammation, proinflammatory mediators and myocardial ischemia-reperfusion Injury*. Hematol Oncol Clin North Am, 2007. **21**(1): p. 123-45.
62. Engler, R.L., et al., *Role of leukocytes in response to acute myocardial ischemia and reflow in dogs*. Am J Physiol, 1986. **251**(2 Pt 2): p. H314-23.
63. Lefer, D.J., et al., *Combined inhibition of P-selectin and ICAM-1 reduces myocardial injury following ischemia and reperfusion*. Am J Physiol, 1996. **271**(6 Pt 2): p. H2421-9.
64. Ioculano, M., et al., *Antibodies against intercellular adhesion molecule 1 protect against myocardial ischaemia-reperfusion injury in rat*. Eur J Pharmacol, 1994. **264**(2): p. 143-9.
65. Gill, E.A., Y. Kong, and L.D. Horwitz, *An oligosaccharide sialyl-Lewis(x) analogue does not reduce myocardial infarct size after ischemia and reperfusion in dogs*. Circulation, 1996. **94**(3): p. 542-6.

66. de Lorgeril, M., et al., *Influence of leukopenia on collateral flow, reperfusion flow, reflow ventricular fibrillation, and infarct size in dogs*. Am Heart J, 1989. **117**(3): p. 523-32.
67. Rousseau, G., et al., *Diltiazem at reperfusion reduces neutrophil accumulation and infarct size in dogs with ischaemic myocardium*. Cardiovasc Res, 1991. **25**(4): p. 319-29.
68. Kloner, R.A., et al., *Mummification of the infarcted myocardium by high dose corticosteroids*. Circulation, 1978. **57**(1): p. 56-63.
69. Barandon, L., et al., *[Study of postmyocardial infarction scar-formation mechanisms: advantage of an experimental myocardial infarction model in mice]*. Can J Cardiol, 2004. **20**(14): p. 1467-75.
70. Anversa, P., et al., *Apoptosis and myocardial infarction*. Basic Res Cardiol, 1998. **93 Suppl 3**: p. 8-12.
71. Papaliagkas, V., et al., *The proteins and the mechanisms of apoptosis: A mini-review of the fundamentals*. Hippokratia, 2007. **11**(3): p. 108-13.
72. Saikumar, P., et al., *Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease*. Am J Med, 1999. **107**(5): p. 489-506.
73. 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.
74. Antonsson, B., et al., *Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2*. Science, 1997. **277**(5324): p. 370-2.
75. Hacker, G. and A. Weber, *BH3-only proteins trigger cytochrome c release, but how?* Arch Biochem Biophys, 2007. **462**(2): p. 150-5.
76. Brunelle, J.K. and A. Letai, *Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 4): p. 437-41.
77. Shi, Y., *Apoptosome assembly*. Methods Enzymol, 2008. **442**: p. 141-56.
78. Fan, T.J., et al., *Caspase family proteases and apoptosis*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2005. **37**(11): p. 719-27.
79. Chowdhury, I., B. Tharakan, and G.K. Bhat, *Caspases - an update*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2008. **151**(1): p. 10-27.
80. Shiozaki, E.N. and Y. Shi, *Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology*. Trends Biochem Sci, 2004. **29**(9): p. 486-94.
81. Wang, C. and R.J. Youle, *The Role of Mitochondria in Apoptosis*. Annu Rev Genet, 2009.
82. Broker, L.E., F.A. Kruyt, and G. Giaccone, *Cell death independent of caspases: a review*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(9): p. 3155-62.
83. Rossi, D. and G. Gaidano, *Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease*. Haematologica, 2003. **88**(2): p. 212-8.
84. Ashkenazi, A. and V.M. Dixit, *Death receptors: signaling and modulation*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1305-8.
85. 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.

86. Schmitz, I., S. Kirchhoff, and P.H. Krammer, *Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways*. Int J Biochem Cell Biol, 2000. **32**(11-12): p. 1123-36.
87. Eefting, F., et al., *Role of apoptosis in reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 414-26.
88. Bennett, M.R., *Apoptosis in the cardiovascular system*. Heart, 2002. **87**(5): p. 480-7.
89. Gottlieb, R.A., et al., *Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes*. J Clin Invest, 1994. **94**(4): p. 1621-8.
90. Holly, T.A., et al., *Caspase inhibition reduces myocyte cell death induced by myocardial ischemia and reperfusion in vivo*. J Mol Cell Cardiol, 1999. **31**(9): p. 1709-15.
91. Yaoita, H., et al., *Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor*. Circulation, 1998. **97**(3): p. 276-81.
92. Brocheriou, V., et al., *Cardiac functional improvement by a human Bcl-2 transgene in a mouse model of ischemia/reperfusion injury*. J Gene Med, 2000. **2**(5): p. 326-33.
93. 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.
94. 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.
95. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium*. Circulation, 1986. **74**(5): p. 1124-36.
96. Granfeldt, A., D.J. Lefer, and J. Vinten-Johansen, *Protective ischaemia in patients: preconditioning and postconditioning*. Cardiovasc Res, 2009. **83**(2): p. 234-46.
97. 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.
98. 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.
99. 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.
100. Yamashita, K., et al., *Reperfusion-activated Akt kinase prevents apoptosis in transgenic mouse hearts overexpressing insulin-like growth factor-1*. Circ Res, 2001. **88**(6): p. 609-14.
101. Gross, E.R., A.K. Hsu, and G.J. Gross, *Opioid-induced cardioprotection occurs via glycogen synthase kinase beta inhibition during reperfusion in intact rat hearts*. Circ Res, 2004. **94**(7): p. 960-6.
102. Sanada, S., et al., *Optimal windows of statin use for immediate infarct limitation: 5'-nucleotidase as another downstream molecule of phosphatidylinositol 3-kinase*. Circulation, 2004. **110**(15): p. 2143-9.

103. Wynne, A.M., M.M. Mocanu, and D.M. Yellon, *Pioglitazone mimics preconditioning in the isolated perfused rat heart: a role for the prosurvival kinases PI3K and P42/44MAPK*. J Cardiovasc Pharmacol, 2005. **46**(6): p. 817-22.
104. Yue, T.L., et al., *Inhibition of extracellular signal-regulated kinase enhances Ischemia/Reoxygenation-induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates reperfusion injury in isolated perfused heart*. Circ Res, 2000. **86**(6): p. 692-9.
105. Fujio, Y., et al., *Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart*. Circulation, 2000. **101**(6): p. 660-7.
106. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection*. Heart Fail Rev, 2007. **12**(3-4): p. 217-34.
107. Rozengurt, E., *Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors*. J Cell Physiol, 2007. **213**(3): p. 589-602.
108. 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.
109. Datta, S.R., et al., *Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery*. Cell, 1997. **91**(2): p. 231-41.
110. Harada, H., et al., *p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(17): p. 9666-70.
111. Cardone, M.H., et al., *Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation*. Science, 1998. **282**(5392): p. 1318-21.
112. 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.
113. 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.
114. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion*. J Mol Cell Cardiol, 2003. **35**(4): p. 339-41.
115. Griffiths, E.J. and A.P. Halestrap, *Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion*. Biochem J, 1995. **307** ( Pt 1): p. 93-8.
116. Juhaszova, M., et al., *Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore*. J Clin Invest, 2004. **113**(11): p. 1535-49.
117. Brookes, P.S., et al., *Concentration-dependent effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition and cytochrome c release*. J Biol Chem, 2000. **275**(27): p. 20474-9.

118. Baines, C.P., et al., *Protein kinase Cepsilon interacts with and inhibits the permeability transition pore in cardiac mitochondria*. *Circ Res*, 2003. **92**(8): p. 873-80.
119. Lacerda, L., et al., *Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway*. *Cardiovasc Res*, 2009. **84**(2): p. 201-8.
120. Lecour, S., et al., *Pharmacological preconditioning with tumor necrosis factor-alpha activates signal transducer and activator of transcription-3 at reperfusion without involving classic prosurvival kinases (Akt and extracellular signal-regulated kinase)*. *Circulation*, 2005. **112**(25): p. 3911-8.
121. Lecour, S., *Multiple protective pathways against reperfusion injury: a SAFE path without Aktion?* *J Mol Cell Cardiol*, 2009. **46**(5): p. 607-9.
122. Imada, K. and W.J. Leonard, *The Jak-STAT pathway*. *Mol Immunol*, 2000. **37**(1-2): p. 1-11.
123. Negoro, S., et al., *Activation of JAK/STAT pathway transduces cytoprotective signal in rat acute myocardial infarction*. *Cardiovasc Res*, 2000. **47**(4): p. 797-805.
124. Hattori, R., et al., *Role of STAT3 in ischemic preconditioning*. *J Mol Cell Cardiol*, 2001. **33**(11): p. 1929-36.
125. WorldHealthOrganisation, *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems in 10th Revision 2007*.
126. Patten, S.B., et al., *Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) clinical guidelines for the management of major depressive disorder in adults. I. Classification, burden and principles of management*. *J Affect Disord*, 2009. **117 Suppl 1**: p. S5-14.
127. Manji, H.K., W.C. Drevets, and D.S. Charney, *The cellular neurobiology of depression*. *Nat Med*, 2001. **7**(5): p. 541-7.
128. Anda, R., et al., *Depressed affect, hopelessness, and the risk of ischemic heart disease in a cohort of U.S. adults*. *Epidemiology*, 1993. **4**(4): p. 285-94.
129. Ferketich, A.K., et al., *Depression as an antecedent to heart disease among women and men in the NHANES I study*. *National Health and Nutrition Examination Survey*. *Arch Intern Med*, 2000. **160**(9): p. 1261-8.
130. Ford, D.E., et al., *Depression is a risk factor for coronary artery disease in men: the precursors study*. *Arch Intern Med*, 1998. **158**(13): p. 1422-6.
131. Wulsin, L.R. and B.M. Singal, *Do depressive symptoms increase the risk for the onset of coronary disease? A systematic quantitative review*. *Psychosom Med*, 2003. **65**(2): p. 201-10.
132. Brown, A.D., D.A. Barton, and G.W. Lambert, *Cardiovascular abnormalities in patients with major depressive disorder: autonomic mechanisms and implications for treatment*. *CNS Drugs*, 2009. **23**(7): p. 583-602.
133. Penninx, B.W., et al., *Depression and cardiac mortality: results from a community-based longitudinal study*. *Arch Gen Psychiatry*, 2001. **58**(3): p. 221-7.
134. Barefoot, J.C. and M. Schroll, *Symptoms of depression, acute myocardial infarction, and total mortality in a community sample*. *Circulation*, 1996. **93**(11): p. 1976-80.

135. Guck, T.P., et al., *Assessment and treatment of depression following myocardial infarction*. Am Fam Physician, 2001. **64**(4): p. 641-8.
136. Musselman, D.L., D.L. Evans, and C.B. Nemeroff, *The relationship of depression to cardiovascular disease: epidemiology, biology, and treatment*. Arch Gen Psychiatry, 1998. **55**(7): p. 580-92.
137. Frasure-Smith, N., F. Lesperance, and M. Talajic, *Depression and 18-month prognosis after myocardial infarction*. Circulation, 1995. **91**(4): p. 999-1005.
138. Frasure-Smith, N., F. Lesperance, and M. Talajic, *Depression following myocardial infarction. Impact on 6-month survival*. JAMA, 1993. **270**(15): p. 1819-25.
139. Welin, C., G. Lappas, and L. Wilhelmsen, *Independent importance of psychosocial factors for prognosis after myocardial infarction*. J Intern Med, 2000. **247**(6): p. 629-39.
140. Frasure-Smith, N., et al., *Social support, depression, and mortality during the first year after myocardial infarction*. Circulation, 2000. **101**(16): p. 1919-24.
141. Berkman, L.F., et al., *Effects of treating depression and low perceived social support on clinical events after myocardial infarction: the Enhancing Recovery in Coronary Heart Disease Patients (ENRICH) Randomized Trial*. JAMA, 2003. **289**(23): p. 3106-16.
142. Jorge, R.E., et al., *Mortality and poststroke depression: a placebo-controlled trial of antidepressants*. Am J Psychiatry, 2003. **160**(10): p. 1823-9.
143. Glassman, A.H., J.T. Bigger, Jr., and M. Gaffney, *Psychiatric characteristics associated with long-term mortality among 361 patients having an acute coronary syndrome and major depression: seven-year follow-up of SADHART participants*. Arch Gen Psychiatry, 2009. **66**(9): p. 1022-9.
144. Freedland, K.E., et al., *Underdiagnosis of depression in patients with coronary artery disease: the role of nonspecific symptoms*. Int J Psychiatry Med, 1992. **22**(3): p. 221-9.
145. Fielding, R., *Depression and acute myocardial infarction: a review and reinterpretation*. Soc Sci Med, 1991. **32**(9): p. 1017-28.
146. Glassman, A.H., S.P. Roose, and J.T. Bigger, Jr., *The safety of tricyclic antidepressants in cardiac patients. Risk-benefit reconsidered*. JAMA, 1993. **269**(20): p. 2673-5.
147. Taylor, D., *Antidepressant drugs and cardiovascular pathology: a clinical overview of effectiveness and safety*. Acta Psychiatr Scand, 2008. **118**(6): p. 434-42.
148. Krishnan, V. and E.J. Nestler, *The molecular neurobiology of depression*. Nature, 2008. **455**(7215): p. 894-902.
149. Delgado, P.L., *How antidepressants help depression: mechanisms of action and clinical response*. J Clin Psychiatry, 2004. **65 Suppl 4**: p. 25-30.
150. rLanni, C., et al., *Depression and antidepressants: molecular and cellular aspects*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(18): p. 2985-3008.
151. Fuchs, E., et al., *Alterations of neuroplasticity in depression: the hippocampus and beyond*. Eur Neuropsychopharmacol, 2004. **14 Suppl 5**: p. S481-90.
152. Bremner, J.D., et al., *Hippocampal volume reduction in major depression*. Am J Psychiatry, 2000. **157**(1): p. 115-8.

153. Stockmeier, C.A., et al., *Cellular changes in the postmortem hippocampus in major depression*. Biol Psychiatry, 2004. **56**(9): p. 640-50.
154. MacQueen, G.M., et al., *Course of illness, hippocampal function, and hippocampal volume in major depression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(3): p. 1387-92.
155. Rajkowska, G., et al., *Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression*. Biol Psychiatry, 1999. **45**(9): p. 1085-98.
156. Rajkowska, G., *Postmortem studies in mood disorders indicate altered numbers of neurons and glial cells*. Biol Psychiatry, 2000. **48**(8): p. 766-77.
157. Czeh, B. and P.J. Lucassen, *What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated?* Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci, 2007. **257**(5): p. 250-60.
158. 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.
159. Elfving, B., et al., *Inverse correlation of brain and blood BDNF levels in a genetic rat model of depression*. Int J Neuropsychopharmacol, 2009: p. 1-10.
160. Dias, B.G., et al., *Differential regulation of brain derived neurotrophic factor transcripts by antidepressant treatments in the adult rat brain*. Neuropharmacology, 2003. **45**(4): p. 553-63.
161. De Foubert, G., et al., *Fluoxetine-induced change in rat brain expression of brain-derived neurotrophic factor varies depending on length of treatment*. Neuroscience, 2004. **128**(3): p. 597-604.
162. Rogoz, Z., G. Skuza, and B. Legutko, *Repeated treatment with mirtazepine induces brain-derived neurotrophic factor gene expression in rats*. J Physiol Pharmacol, 2005. **56**(4): p. 661-71.
163. Lewin, G.R. and Y.A. Barde, *Physiology of the neurotrophins*. Annu Rev Neurosci, 1996. **19**: p. 289-317.
164. 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.
165. 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.
166. Kaloustian, S., et al., *Apoptosis time course in the limbic system after myocardial infarction in the rat*. Brain Res, 2008. **1216C**: p. 87-91.
167. 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.
168. Wann, B.P., et al., *Behavioural signs of depression and apoptosis in the limbic system following myocardial infarction: effects of sertraline*. J Psychopharmacol, 2008.
169. 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.

170. Drzyzga, L.R., A. Marcinowska, and E. Obuchowicz, *Antiapoptotic and neurotrophic effects of antidepressants: a review of clinical and experimental studies*. Brain Res Bull, 2009. **79**(5): p. 248-57.
171. Samuels, M.A., *The brain-heart connection*. Circulation, 2007. **116**(1): p. 77-84.
172. Wilson, D.R. and L. Warise, *Cytokines and their role in depression*. Perspect Psychiatr Care, 2008. **44**(4): p. 285-9.
173. Yarlagadda, A., E. Alfson, and A.H. Clayton, *The blood brain barrier and the role of cytokines in neuropsychiatry*. Psychiatry (Edgmont), 2009. **6**(11): p. 18-22.
174. 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.
175. Zlokovic, B.V., *The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders*. Neuron, 2008. **57**(2): p. 178-201.
176. Gatti, S. and T. Bartfai, *Induction of tumor necrosis factor-alpha mRNA in the brain after peripheral endotoxin treatment: comparison with interleukin-1 family and interleukin-6*. Brain Res, 1993. **624**(1-2): p. 291-4.
177. Bluthe, R.M., et al., *Lipopolysaccharide induces sickness behaviour in rats by a vagal mediated mechanism*. C R Acad Sci III, 1994. **317**(6): p. 499-503.
178. Ban, E., F. Haour, and R. Lenstra, *Brain interleukin 1 gene expression induced by peripheral lipopolysaccharide administration*. Cytokine, 1992. **4**(1): p. 48-54.
179. Banks, W.A., A.J. Kastin, and R.D. Broadwell, *Passage of cytokines across the blood-brain barrier*. Neuroimmunomodulation, 1995. **2**(4): p. 241-8.
180. Blum, M.S., et al., *Cytoskeletal rearrangement mediates human microvascular endothelial tight junction modulation by cytokines*. Am J Physiol, 1997. **273**(1 Pt 2): p. H286-94.
181. 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.
182. Bret-Dibat, J.L., et al., *Lipopolysaccharide and interleukin-1 depress food-motivated behavior in mice by a vagal-mediated mechanism*. Brain Behav Immun, 1995. **9**(3): p. 242-6.
183. Wiczorek, M., et al., *Physiological and behavioral responses to interleukin-1beta and LPS in vagotomized mice*. Physiol Behav, 2005. **85**(4): p. 500-11.
184. 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.
185. Dowlati, Y., et al., *A Meta-Analysis of Cytokines in Major Depression*. Biol Psychiatry, 2009.
186. Lee, K.S., et al., *Simultaneous measurement of 23 plasma cytokines in late-life depression*. Neurol Sci, 2009. **30**(5): p. 435-8.
187. Sutcgil, L., et al., *Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in major depression: effect of sertraline therapy*. Clin Dev Immunol, 2007. **2007**: p. 76396.
188. Pollmacher, T., et al., *Low levels of circulating inflammatory cytokines--do they affect human brain functions?* Brain Behav Immun, 2002. **16**(5): p. 525-32.
189. Myers, J.S., *Proinflammatory cytokines and sickness behavior: implications for depression and cancer-related symptoms*. Oncol Nurs Forum, 2008. **35**(5): p. 802-7.



190. 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.
191. Bluthé, R.M., K.W. Kelley, and R. Dantzer, *Effects of insulin-like growth factor-I on cytokine-induced sickness behavior in mice.* *Brain Behav Immun*, 2006. **20**(1): p. 57-63.
192. Dantzer, R., et al., *Central administration of insulin-like growth factor-1 inhibits lipopolysaccharide-induced sickness behavior in mice.* *Neuroreport*, 1999. **10**(2): p. 289-92.
193. Bluthé, R.M., et al., *Central injection of IL-10 antagonizes the behavioural effects of lipopolysaccharide in rats.* *Psychoneuroendocrinology*, 1999. **24**(3): p. 301-11.
194. Capuron, L., A. Ravaut, and R. Dantzer, *Early depressive symptoms in cancer patients receiving interleukin 2 and/or interferon alfa-2b therapy.* *J Clin Oncol*, 2000. **18**(10): p. 2143-51.
195. Constant, A., et al., *Mood alterations during interferon-alfa therapy in patients with chronic hepatitis C: evidence for an overlap between manic/hypomanic and depressive symptoms.* *J Clin Psychiatry*, 2005. **66**(8): p. 1050-7.
196. Kraus, M.R., et al., *Psychiatric symptoms in patients with chronic hepatitis C receiving interferon alfa-2b therapy.* *J Clin Psychiatry*, 2003. **64**(6): p. 708-14.
197. Capuron, L., et al., *Neurobehavioral effects of interferon-alpha in cancer patients: phenomenology and paroxetine responsiveness of symptom dimensions.* *Neuropsychopharmacology*, 2002. **26**(5): p. 643-52.
198. Musselman, D.L., et al., *Paroxetine for the prevention of depression induced by high-dose interferon alfa.* *N Engl J Med*, 2001. **344**(13): p. 961-6.
199. 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.
200. Dunn, A.J., *Systemic interleukin-1 administration stimulates hypothalamic norepinephrine metabolism paralleling the increased plasma corticosterone.* *Life Sci*, 1988. **43**(5): p. 429-35.
201. Wong, M.L., et al., *Pronounced and sustained central hypernoradrenergic function in major depression with melancholic features: relation to hypercortisolism and corticotropin-releasing hormone.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(1): p. 325-30.
202. 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.
203. 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.
204. Wichers, M.C. and M. Maes, *The role of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in the pathophysiology of interferon-alpha-induced depression.* *J Psychiatry Neurosci*, 2004. **29**(1): p. 11-7.
205. Dunn, A.J., *Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry.* *Clin Neurosci Res*, 2006. **6**(1-2): p. 52-68.

206. Pecchi, E., et al., *Prostaglandins and sickness behavior: old story, new insights*. *Physiol Behav*, 2009. **97**(3-4): p. 279-92.
207. 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.
208. Rivest, S., *How circulating cytokines trigger the neural circuits that control the hypothalamic-pituitary-adrenal axis*. *Psychoneuroendocrinology*, 2001. **26**(8): p. 761-88.
209. Takadera, T., et al., *Prostaglandin E(2) induces caspase-dependent apoptosis in rat cortical cells*. *Neurosci Lett*, 2002. **317**(2): p. 61-4.
210. Francis, J., et al., *Acute myocardial infarction induces hypothalamic cytokine synthesis*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. **286**(6): p. H2264-71.
211. Zhang, J. and S. Rivest, *Distribution, regulation and colocalization of the genes encoding the EP2- and EP4-PGE2 receptors in the rat brain and neuronal responses to systemic inflammation*. *Eur J Neurosci*, 1999. **11**(8): p. 2651-68.
212. Kaloustian, S., et al., *Celecoxib after the onset of reperfusion reduces apoptosis in the amygdala*. *Apoptosis*, 2007. **12**(11): p. 1945-51.
213. Boucher, M., et al., *Reduction of apoptosis in the amygdala by an [Formula: see text] adenosine receptor agonist following myocardial infarction*. *Apoptosis*, 2006.
214. Gardner D., S.D., *Greenspan's Basic and clinical endocrinology*. eight edition ed. 2007, New-York: McGraw-Hill Medical. 1010.
215. Bao, A.M., G. Meynen, and D.F. Swaab, *The stress system in depression and neurodegeneration: focus on the human hypothalamus*. *Brain Res Rev*, 2008. **57**(2): p. 531-53.
216. Pariante, C.M. and S.L. Lightman, *The HPA axis in major depression: classical theories and new developments*. *Trends Neurosci*, 2008. **31**(9): p. 464-8.
217. Raison, C.L. and A.H. Miller, *When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders*. *Am J Psychiatry*, 2003. **160**(9): p. 1554-65.
218. Pariante, C.M. and A.H. Miller, *Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment*. *Biol Psychiatry*, 2001. **49**(5): p. 391-404.
219. Mazure, C.M., et al., *Adverse life events and cognitive-personality characteristics in the prediction of major depression and antidepressant response*. *Am J Psychiatry*, 2000. **157**(6): p. 896-903.
220. Heim, C., et al., *The dexamethasone/corticotropin-releasing factor test in men with major depression: role of childhood trauma*. *Biol Psychiatry*, 2008. **63**(4): p. 398-405.
221. Tyrka, A.R., et al., *Childhood parental loss and adult hypothalamic-pituitary-adrenal function*. *Biol Psychiatry*, 2008. **63**(12): p. 1147-54.
222. Starkman, M.N., D.E. Scheingart, and M.A. Schork, *Depressed mood and other psychiatric manifestations of Cushing's syndrome: relationship to hormone levels*. *Psychosom Med*, 1981. **43**(1): p. 3-18.

223. Shibli-Rahhal, A., M. Van Beek, and J.A. Schlechte, *Cushing's syndrome*. Clin Dermatol, 2006. **24**(4): p. 260-5.
224. Sachar, E.J., et al., *Cortisol production in depressive illness. A clinical and biochemical clarification*. Arch Gen Psychiatry, 1970. **23**(4): p. 289-98.
225. Gold, P.W., W.C. Drevets, and D.S. Charney, *New insights into the role of cortisol and the glucocorticoid receptor in severe depression*. Biol Psychiatry, 2002. **52**(5): p. 381-5.
226. Ising, M., et al., *The combined dexamethasone/CRH test as a potential surrogate marker in depression*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2005. **29**(6): p. 1085-93.
227. Holsboer-Trachsler, E., R. Stohler, and M. Hatzinger, *Repeated administration of the combined dexamethasone-human corticotropin releasing hormone stimulation test during treatment of depression*. Psychiatry Res, 1991. **38**(2): p. 163-71.
228. Pariante, C.M., *Glucocorticoid receptor function in vitro in patients with major depression*. Stress, 2004. **7**(4): p. 209-19.
229. Schule, C., *Neuroendocrinological mechanisms of actions of antidepressant drugs*. J Neuroendocrinol, 2007. **19**(3): p. 213-26.
230. Herbert, J., et al., *Do corticosteroids damage the brain?* J Neuroendocrinol, 2006. **18**(6): p. 393-411.
231. Tombaugh, G.C. and R.M. Sapolsky, *Corticosterone accelerates hypoxia- and cyanide-induced ATP loss in cultured hippocampal astrocytes*. Brain Res, 1992. **588**(1): p. 154-8.
232. Sapolsky, R.M. and W.A. Pulsinelli, *Glucocorticoids potentiate ischemic injury to neurons: therapeutic implications*. Science, 1985. **229**(4720): p. 1397-400.
233. Magarinos, A.M., M. Orchinik, and B.S. McEwen, *Morphological changes in the hippocampal CA3 region induced by non-invasive glucocorticoid administration: a paradox*. Brain Res, 1998. **809**(2): p. 314-8.
234. Ming, G.L. and H. Song, *Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system*. Annu Rev Neurosci, 2005. **28**: p. 223-50.
235. 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.
236. Belanoff, J.K., et al., *An open label trial of C-1073 (mifepristone) for psychotic major depression*. Biol Psychiatry, 2002. **52**(5): p. 386-92.
237. 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.
238. Claes, S., *Glucocorticoid receptor polymorphisms in major depression*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1179**: p. 216-28.
239. Miller, G.E., K.E. Freedland, and R.M. Carney, *Depressive symptoms and the regulation of proinflammatory cytokine expression in patients with coronary heart disease*. J Psychosom Res, 2005. **59**(4): p. 231-6.

240. Whitehead, D.L., et al., *Cortisol awakening response is elevated in acute coronary syndrome patients with type-D personality*. J Psychosom Res, 2007. **62**(4): p. 419-25.
241. Culiver, C., *Acides gras : nomenclature et sources alimentaires*. Ann Med Vet, 2004. **148**: p. 133-140.
242. Das, U.N., *Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology*. Biotechnol J, 2006. **1**(4): p. 420-39.
243. Lands, W.E.M., *Fish, Omega-3 and Human Health*. 2005, AOCS Press: Champaign, Illinois. p. 220.
244. Wertz, P., *Essential fatty acids and dietary stress*. Toxicol Ind Health, 2009. **25**(4-5): p. 279-83.
245. Voet D., V.J.G., *Biochimie*. De Boeck ed. Vol. 2e édition. 2005, Bruxelles, Belgique. 1583 p.
246. White, B., *Dietary fatty acids*. Am Fam Physician, 2009. **80**(4): p. 345-50.
247. Clayden J., G.N., Warren S. Wothers P., *Chimie organique*. De Boeck ed. Vol. 1ère édition. 2003, Paris, France.
248. Simopoulos, A.P., *The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases*. Exp Biol Med (Maywood), 2008. **233**(6): p. 674-88.
249. 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.
250. Brenna, J.T. and G.Y. Diau, *The influence of dietary docosahexaenoic acid and arachidonic acid on central nervous system polyunsaturated fatty acid composition*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2007. **77**(5-6): p. 247-50.
251. Uauy, R., et al., *Essential fatty acids in visual and brain development*. Lipids, 2001. **36**(9): p. 885-95.
252. 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.
253. Nakamura, M.T. and T.Y. Nara, *Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases*. Annu Rev Nutr, 2004. **24**: p. 345-76.
254. Stoffel, W., et al., *Delta6-desaturase (FADS2) deficiency unveils the role of omega3- and omega6-polyunsaturated fatty acids*. EMBO J, 2008. **27**(17): p. 2281-92.
255. 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.
256. Burke, J.E. and E.A. Dennis, *Phospholipase A2 biochemistry*. Cardiovasc Drugs Ther, 2009. **23**(1): p. 49-59.
257. Crofford, L.J., *Prostaglandin biology*. Gastroenterol Clin North Am, 2001. **30**(4): p. 863-76.
258. Funk, C.D., *Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology*. Science, 2001. **294**(5548): p. 1871-5.
259. Miller, S.B., *Prostaglandins in health and disease: an overview*. Semin Arthritis Rheum, 2006. **36**(1): p. 37-49.

260. Dubois, R.N., et al., *Cyclooxygenase in biology and disease*. FASEB J, 1998. **12**(12): p. 1063-73.
261. Kulmacz, R.J. and L.H. Wang, *Comparison of hydroperoxide initiator requirements for the cyclooxygenase activities of prostaglandin H synthase-1 and -2*. J Biol Chem, 1995. **270**(41): p. 24019-23.
262. Smith, W.L., *Cyclooxygenases, peroxide tone and the allure of fish oil*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(2): p. 174-82.
263. Kulmacz, R.J., R.B. Pendleton, and W.E. Lands, *Interaction between peroxidase and cyclooxygenase activities in prostaglandin-endoperoxide synthase. Interpretation of reaction kinetics*. J Biol Chem, 1994. **269**(8): p. 5527-36.
264. Malkowski, M.G., et al., *Structure of eicosapentaenoic and linoleic acids in the cyclooxygenase site of prostaglandin endoperoxide H synthase-1*. J Biol Chem, 2001. **276**(40): p. 37547-55.
265. Kabashima, K. and S. Narumiya, *The DP receptor, allergic inflammation and asthma*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2003. **69**(2-3): p. 187-94.
266. Sugimoto, Y. and S. Narumiya, *Prostaglandin E receptors*. J Biol Chem, 2007. **282**(16): p. 11613-7.
267. Denzlinger, C., *Biology and pathophysiology of leukotrienes*. Crit Rev Oncol Hematol, 1996. **23**(3): p. 167-223.
268. McMahon, B. and C. Godson, *Lipoxins: endogenous regulators of inflammation*. Am J Physiol Renal Physiol, 2004. **286**(2): p. F189-201.
269. Serhan, C.N., *Novel chemical mediators in the resolution of inflammation: resolvins and protectins*. Anesthesiol Clin, 2006. **24**(2): p. 341-64.
270. Heller, A.R., *Omega 3 fatty acids in clinical nutrition*. 2005, New York: Nova Science Publishers, Inc. 108.
271. Calder, P.C., *Dietary modification of inflammation with lipids*. Proc Nutr Soc, 2002. **61**(3): p. 345-58.
272. Budowski, P. and M.A. Crawford,  *$\alpha$ -Linolenic acid as a regulator of the metabolism of arachidonic acid: dietary implications of the ratio, n-6:n-3 fatty acids*. Proc Nutr Soc, 1985. **44**(2): p. 221-9.
273. Garg, M.L., A.B. Thomson, and M.T. Clandinin, *Interactions of saturated, n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids to modulate arachidonic acid metabolism*. J Lipid Res, 1990. **31**(2): p. 271-7.
274. Burns, T., et al., *Effect of omega-3 fatty acid supplementation on the arachidonic acid:eicosapentaenoic acid ratio*. Pharmacotherapy, 2007. **27**(5): p. 633-8.
275. Leece, E.A. and M.A. Allman, *The relationships between dietary alpha-linolenic:linoleic acid and rat platelet eicosapentaenoic and arachidonic acids*. Br J Nutr, 1996. **76**(3): p. 447-52.
276. 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*. J Nutr, 2007. **137**(4): p. 945-52.
277. Goyens, P.L., et al., *Conversion of alpha-linolenic acid in humans is influenced by the absolute amounts of alpha-linolenic acid and linoleic acid in the diet and not by their ratio*. Am J Clin Nutr, 2006. **84**(1): p. 44-53.

278. Portolesi, R., B.C. Powell, and R.A. Gibson, *Competition between 24:5n-3 and ALA for Delta 6 desaturase may limit the accumulation of DHA in HepG2 cell membranes*. *J Lipid Res*, 2007. **48**(7): p. 1592-8.
279. Plourde, M. and S.C. Cunnane, *Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements*. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2007. **32**(4): p. 619-34.
280. Riediger, N.D., et al., *A systemic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease*. *J Am Diet Assoc*, 2009. **109**(4): p. 668-79.
281. Simopoulos, A.P., *Evolutionary aspects of omega-3 fatty acids in the food supply*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1999. **60**(5-6): p. 421-9.
282. 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.
283. Simopoulos, A.P., *Omega-6/omega-3 essential Fatty acids: biological effects*. *World Rev Nutr Diet*, 2009. **99**: p. 1-16.
284. Yehuda, S., *Omega-6/omega-3 ratio and brain-related functions*. *World Rev Nutr Diet*, 2003. **92**: p. 37-56.
285. Chajes, V. and P. Bougnoux, *Omega-6/omega-3 polyunsaturated fatty acid ratio and cancer*. *World Rev Nutr Diet*, 2003. **92**: p. 133-51.
286. Bougnoux, P., V. Maillard, and V. Chajes, *Omega-6/omega-3 polyunsaturated fatty acids ratio and breast cancer*. *World Rev Nutr Diet*, 2005. **94**: p. 158-65.
287. Wahle, K.W., *Fatty acid modification and membrane lipids*. *Proc Nutr Soc*, 1983. **42**(2): p. 273-87.
288. 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.
289. Chapkin, R.S., et al., *Bioactive dietary long-chain fatty acids: emerging mechanisms of action*. *Br J Nutr*, 2008. **100**(6): p. 1152-7.
290. Laude, A.J. and I.A. Prior, *Plasma membrane microdomains: organization, function and trafficking*. *Mol Membr Biol*, 2004. **21**(3): p. 193-205.
291. Stillwell, W. and S.R. Wassall, *Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid*. *Chem Phys Lipids*, 2003. **126**(1): p. 1-27.
292. Calder, P.C., *Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: new twists in an old tale*. *Biochimie*, 2009.
293. Poudel-Tandukar, K., et al., *Dietary intakes of alpha-linolenic and linoleic acids are inversely associated with serum C-reactive protein levels among Japanese men*. *Nutr Res*, 2009. **29**(6): p. 363-70.
294. Vedin, I., et al., *Effects of docosahexaenoic acid-rich n-3 fatty acid supplementation on cytokine release from blood mononuclear leukocytes: the OmegAD study*. *Am J Clin Nutr*, 2008. **87**(6): p. 1616-22.
295. Ferrucci, L., et al., *Relationship of plasma polyunsaturated fatty acids to circulating inflammatory markers*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. **91**(2): p. 439-46.

296. Moreno, J.J., *Differential effects of arachidonic and eicosapentaenoic Acid-derived eicosanoids on polymorphonuclear transmigration across endothelial cell cultures.* J Pharmacol Exp Ther, 2009. **331**(3): p. 1111-7.
297. Kohli, P. and B.D. Levy, *Resolvins and protectins: mediating solutions to inflammation.* Br J Pharmacol, 2009.
298. Deckelbaum, R.J., T.S. Worgall, and T. Seo, *n-3 fatty acids and gene expression.* Am J Clin Nutr, 2006. **83**(6 Suppl): p. 1520S-1525S.
299. Price, P.T., C.M. Nelson, and S.D. Clarke, *Omega-3 polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression.* Curr Opin Lipidol, 2000. **11**(1): p. 3-7.
300. Chawla, A., et al., *Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files.* Science, 2001. **294**(5548): p. 1866-70.
301. Jump, D.B., *N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription.* Curr Opin Lipidol, 2008. **19**(3): p. 242-7.
302. 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.
303. Ghosh, S. and M. Karin, *Missing pieces in the NF-kappaB puzzle.* Cell, 2002. **109 Suppl**: p. S81-96.
304. Di Nunzio, M., et al., *n-3 and n-6 Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element binding protein activity and increase flow of non-esterified cholesterol in HepG2 cells.* Br J Nutr. **103**(2): p. 161-7.
305. Middaugh, J.P., *Cardiovascular deaths among Alaskan Natives, 1980-86.* Am J Public Health, 1990. **80**(3): p. 282-5.
306. Dyerberg, J., *Coronary heart disease in Greenland Inuit: a paradox. Implications for western diet patterns.* Arctic Med Res, 1989. **48**(2): p. 47-54.
307. Bjerregaard, P., G. Mulvad, and H.S. Pedersen, *Cardiovascular risk factors in Inuit of Greenland.* Int J Epidemiol, 1997. **26**(6): p. 1182-90.
308. Wang, C., et al., *n-3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not alpha-linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review.* Am J Clin Nutr, 2006. **84**(1): p. 5-17.
309. Marik, P.E. and J. Varon, *Omega-3 dietary supplements and the risk of cardiovascular events: a systematic review.* Clin Cardiol, 2009. **32**(7): p. 365-72.
310. Daviglius, M.L., et al., *Fish consumption and the 30-year risk of fatal myocardial infarction.* N Engl J Med, 1997. **336**(15): p. 1046-53.
311. Lavie, C.J., et al., *Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases.* J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(7): p. 585-94.
312. Grimsgaard, S., et al., *Highly purified eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in humans have similar triacylglycerol-lowering effects but divergent effects on serum fatty acids.* Am J Clin Nutr, 1997. **66**(3): p. 649-59.
313. Harris, W.S., *n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies.* Am J Clin Nutr, 1997. **65**(5 Suppl): p. 1645S-1654S.
314. Bays, H.E., et al., *Prescription omega-3 fatty acids and their lipid effects: physiologic mechanisms of action and clinical implications.* Expert Rev Cardiovasc Ther, 2008. **6**(3): p. 391-409.

315. Berger, J. and D.E. Moller, *The mechanisms of action of PPARs*. Annu Rev Med, 2002. **53**: p. 409-35.
316. Adkins, Y. and D.S. Kelley, *Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids*. J Nutr Biochem.
317. Bao, D.Q., et al., *Effects of dietary fish and weight reduction on ambulatory blood pressure in overweight hypertensives*. Hypertension, 1998. **32**(4): p. 710-7.
318. Mori, T.A., et al., *Docosahexaenoic acid but not eicosapentaenoic acid lowers ambulatory blood pressure and heart rate in humans*. Hypertension, 1999. **34**(2): p. 253-60.
319. Geleijnse, J.M., et al., *Blood pressure response to fish oil supplementation: metaregression analysis of randomized trials*. J Hypertens, 2002. **20**(8): p. 1493-9.
320. Erkkila, A.T., et al., *Effects of fatty and lean fish intake on blood pressure in subjects with coronary heart disease using multiple medications*. Eur J Nutr, 2008. **47**(6): p. 319-28.
321. Grimsgaard, S., et al., *Effects of highly purified eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on hemodynamics in humans*. Am J Clin Nutr, 1998. **68**(1): p. 52-9.
322. Prisco, D., et al., *Effect of medium-term supplementation with a moderate dose of n-3 polyunsaturated fatty acids on blood pressure in mild hypertensive patients*. Thromb Res, 1998. **91**(3): p. 105-12.
323. 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.
324. Frenoux, J.M., et al., *A polyunsaturated fatty acid diet lowers blood pressure and improves antioxidant status in spontaneously hypertensive rats*. J Nutr, 2001. **131**(1): p. 39-45.
325. Gutierrez, O.G., Jr., et al., *Fish protein-rich diet attenuates hypertension induced by dietary NG-nitro-L-arginine in normotensive Wistar-Kyoto rats*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1994. **21**(11): p. 875-9.
326. Watanabe, Y., et al., *The effect of dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids on blood pressure and tissue fatty acid composition in spontaneously hypertensive rats*. Lipids, 1989. **24**(7): p. 638-44.
327. Chen, H.W., et al., *Blood pressure-lowering effect of fish oil is independent of thromboxane A2 level in spontaneously hypertensive rats*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1996. **54**(2): p. 147-54.
328. Vermeirssen, V., J. Van Camp, and W. Verstraete, *Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides*. Br J Nutr, 2004. **92**(3): p. 357-66.
329. Leclercq, B., E.A. Jaimes, and L. Raij, *Nitric oxide synthase and hypertension*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2002. **11**(2): p. 185-9.
330. von Schacky, C., *Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2007. **10**(2): p. 129-35.
331. Willerson, J.T. and P.M. Ridker, *Inflammation as a cardiovascular risk factor*. Circulation, 2004. **109**(21 Suppl 1): p. I12-10.



332. von Schacky, C., et al., *The effect of dietary omega-3 fatty acids on coronary atherosclerosis. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial.* Ann Intern Med, 1999. **130**(7): p. 554-62.
333. 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.
334. Din, J.N., et al., *Dietary intervention with oil rich fish reduces platelet-monocyte aggregation in man.* Atherosclerosis, 2008. **197**(1): p. 290-6.
335. Den Ruijter, H.M., et al., *Pro- and antiarrhythmic properties of a diet rich in fish oil.* Cardiovasc Res, 2007. **73**(2): p. 316-25.
336. Anand, R.G., et al., *The role of fish oil in arrhythmia prevention.* J Cardiopulm Rehabil Prev, 2008. **28**(2): p. 92-8.
337. Albert, C.M., et al., *Fish consumption and risk of sudden cardiac death.* JAMA, 1998. **279**(1): p. 23-8.
338. Marchioli, R., et al., *Early protection against sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction: time-course analysis of the results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-Prevenzione.* Circulation, 2002. **105**(16): p. 1897-903.
339. Investigators, G.-P., *Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico.* Lancet, 1999. **354**(9177): p. 447-55.
340. Burr, M.L., et al., *Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART).* Lancet, 1989. **2**(8666): p. 757-61.
341. Singh, R.B., et al., *Randomised controlled trial of cardioprotective diet in patients with recent acute myocardial infarction: results of one year follow up.* BMJ, 1992. **304**(6833): p. 1015-9.
342. Lee, S.H., et al., *Blood eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid as predictors of all-cause mortality in patients with acute myocardial infarction--data from Infarction Prognosis Study (IPS) Registry.* Circ J, 2009. **73**(12): p. 2250-7.
343. 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.
344. Landmark, K., et al., *Eating fish may reduce infarct size and the occurrence of Q wave infarcts.* Eur J Clin Nutr, 1998. **52**(1): p. 40-4.
345. McGuinness, J., et al., *Myocardial protection using an omega-3 fatty acid infusion: quantification and mechanism of action.* J Thorac Cardiovasc Surg, 2006. **132**(1): p. 72-9.
346. Xiao, Y.F., et al., *Pericardial delivery of omega-3 fatty acid: a novel approach to reducing myocardial infarct sizes and arrhythmias.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**(5): p. H2212-8.

347. Helton, S., *Long-term dietary fish oil supplementation protects against ischemia-reperfusion-induced myocardial dysfunction in isolated rat hearts*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1994. **18**(4): p. 383-4.
348. Abdukeyum, G.G., A.J. Owen, and P.L. McLennan, *Dietary (n-3) long-chain polyunsaturated fatty acids inhibit ischemia and reperfusion arrhythmias and infarction in rat heart not enhanced by ischemic preconditioning*. J Nutr, 2008. **138**(10): p. 1902-9.
349. Ogita, H., et al., *Eicosapentaenoic acid reduces myocardial injury induced by ischemia and reperfusion in rabbit hearts*. J Cardiovasc Pharmacol, 2003. **41**(6): p. 964-9.
350. Patel, J.V., et al., *Omega-3 polyunsaturated fatty acids: a necessity for a comprehensive secondary prevention strategy*. Vasc Health Risk Manag, 2009. **5**: p. 801-10.
351. Kidd, P.M., *Omega-3 DHA and EPA for cognition, behavior, and mood: clinical findings and structural-functional synergies with cell membrane phospholipids*. Altern Med Rev, 2007. **12**(3): p. 207-27.
352. Tully, A.M., et al., *Low serum cholesteryl ester-docosahexaenoic acid levels in Alzheimer's disease: a case-control study*. Br J Nutr, 2003. **89**(4): p. 483-9.
353. Tiemeier, H., et al., *Plasma fatty acid composition and depression are associated in the elderly: the Rotterdam Study*. Am J Clin Nutr, 2003. **78**(1): p. 40-6.
354. Conklin, S.M., et al., *High omega-6 and low omega-3 fatty acids are associated with depressive symptoms and neuroticism*. Psychosom Med, 2007. **69**(9): p. 932-4.
355. Chiu, C.C., et al., *The effects of omega-3 fatty acids monotherapy in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a preliminary randomized double-blind placebo-controlled study*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2008. **32**(6): p. 1538-44.
356. 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*. Aust N Z J Psychiatry, 2008. **42**(3): p. 192-8.
357. Lesperance, F., et al., *The efficacy of omega-3 supplementation for major depression: a randomized controlled trial*. J Clin Psychiatry.
358. Lin, P.Y. and K.P. Su, *A meta-analytic review of double-blind, placebo-controlled trials of antidepressant efficacy of omega-3 fatty acids*. J Clin Psychiatry, 2007. **68**(7): p. 1056-61.
359. 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, 2009. **302**(15): p. 1651-7.
360. Su, K.P., *Biological mechanism of antidepressant effect of omega-3 fatty acids: how does fish oil act as a 'mind-body interface'?* Neurosignals, 2009. **17**(2): p. 144-52.
361. Boudrault, C., R.P. Bazinet, and D.W. Ma, *Experimental models and mechanisms underlying the protective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in Alzheimer's disease*. J Nutr Biochem, 2009. **20**(1): p. 1-10.
362. Chalon, S., et al., *Polyunsaturated fatty acids and cerebral function: focus on monoaminergic neurotransmission*. Lipids, 2001. **36**(9): p. 937-44.

363. Delion, S., et al., *Chronic dietary alpha-linolenic acid deficiency alters dopaminergic and serotonergic neurotransmission in rats*. J Nutr, 1994. **124**(12): p. 2466-76.
364. Akbar, M., et al., *Docosahexaenoic acid: a positive modulator of Akt signaling in neuronal survival*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(31): p. 10858-63.
365. Kim, H.Y., *Biochemical and biological functions of docosahexaenoic acid in the nervous system: modulation by ethanol*. Chem Phys Lipids, 2008. **153**(1): p. 34-46.
366. Bazan, N.G., *Cellular and molecular events mediated by docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 signaling in photoreceptor cell survival and brain protection*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2009.
367. Marcheselli, V.L., et al., *Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression*. J Biol Chem, 2003. **278**(44): p. 43807-17.
368. Lengqvist, J., et al., *Polyunsaturated fatty acids including docosahexaenoic and arachidonic acid bind to the retinoid X receptor alpha ligand-binding domain*. Mol Cell Proteomics, 2004. **3**(7): p. 692-703.
369. Ali, S., et al., *Association between Omega-3 Fatty Acids and Depressive Symptoms among Patients with Established Coronary Artery Disease: Data from the Heart and Soul Study*. Psychother Psychosom, 2009. **78**(2): p. 125-127.
370. Frasure-Smith, N., F. Lesperance, and P. Julien, *Major depression is associated with lower omega-3 fatty acid levels in patients with recent acute coronary syndromes*. Biol Psychiatry, 2004. **55**(9): p. 891-6.
371. Amin, A.A., et al., *Acute coronary syndrome patients with depression have low blood cell membrane omega-3 fatty acid levels*. Psychosom Med, 2008. **70**(8): p. 856-62.
372. Schins, A., et al., *Altered omega-3 polyunsaturated fatty acid status in depressed post-myocardial infarction patients*. Acta Psychiatr Scand, 2007. **115**(1): p. 35-40.
373. Severus, W.E., A.B. Littman, and A.L. Stoll, *Omega-3 fatty acids, homocysteine, and the increased risk of cardiovascular mortality in major depressive disorder*. Harv Rev Psychiatry, 2001. **9**(6): p. 280-93.
374. Simopoulos, A.P., et al., *Le régime oméga-3*. 2nd edition ed. 2004, Grenobles: EDP Sciences.
375. Wilber, C. and L. VE, *Fat metabolism in Alaskan Eskimos*. Exp Med Surg, 1950. **8**: p. 422-425.
376. Denke, M.A., *Diet, lifestyle, and nonstatin trials: review of time to benefit*. Am J Cardiol, 2005. **96**(5A): p. 3F-10F.
377. Schwalfenberg, G., *Omega-3 fatty acids: their beneficial role in cardiovascular health*. Can Fam Physician, 2006. **52**: p. 734-40.
378. Burdge, G.C. and P.C. Calder, *Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults*. Reprod Nutr Dev, 2005. **45**(5): p. 581-97.
379. Lands, W.E.M., *Fish, Omega-3 and human health*. 2nd ed. 2005, Champaign, Illinois: AOCS Press.

380. Skyschally, A., et al., *Ischemic postconditioning in pigs: no causal role for RISK activation*. *Circ Res*, 2009. **104**(1): p. 15-8.
381. 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.
382. 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.
383. Lesperance, F. and N. Frasure-Smith, *Depression and heart disease*. *Cleve Clin J Med*, 2007. **74 Suppl 1**: p. S63-6.
384. 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.
385. Heller, A., S. Stehr, and T. Koch, *Omega 3 fatty acids in clinical nutrition*. First ed. 2006, New York: Nova Science Publishers, Inc.
386. Mills, S.C., A.C. Windsor, and S.C. Knight, *The potential interactions between polyunsaturated fatty acids and colonic inflammatory processes*. *Clin Exp Immunol*, 2005. **142**(2): p. 216-28.
387. Simopoulos, A.P., *The omega-6/omega-3 fatty acid ratio, genetic variation, and cardiovascular disease*. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2008. **17 Suppl 1**: p. 131-4.
388. Zhu, B.Q., et al., *Is the reduction of myocardial infarct size by dietary fish oil the result of altered platelet function?* *Am Heart J*, 1994. **127**(4 Pt 1): p. 744-55.
389. Datta, S.R., et al., *Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery*. *Cell*, 1997. **91**: p. 231-241.
390. Kang, Y.C., et al., *Serum bioactive lysophospholipids prevent TRAIL-induced apoptosis via PI3K/Akt-dependent cFLIP expression and Bad phosphorylation*. *Cell Death Differ*, 2004. **11**(12): p. 1287-98.
391. Kuwahara, K., et al., *Cardiotrophin-1 phosphorylates akt and BAD, and prolongs cell survival via a PI3K-dependent pathway in cardiac myocytes*. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2000. **32**: p. 1385-1394.
392. Hausenloy, D.J., et al., *Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning?* *Cardiovasc Res*, 2002. **55**(3): p. 534-43.
393. Zhao, Z.Q., et al., *Adenosine attenuates reperfusion-induced apoptotic cell death by modulating expression of Bcl-2 and Bax proteins*. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2001. **33**: p. 57-68.
394. Hausenloy, D., et al., *Transient mitochondrial permeability transition pore opening mediates preconditioning-induced protection*. *Circulation*, 2004. **109**(14): p. 1714-7.
395. Miura, T. and T. Miki, *GSK-3beta, a Therapeutic Target for Cardiomyocyte Protection*. *Circ J*, 2009. **73**(7): p. 1184-92.
396. Nishihara, M., et al., *Modulation of the mitochondrial permeability transition pore complex in GSK-3beta-mediated myocardial protection*. *J Mol Cell Cardiol*, 2007. **43**(5): p. 564-70.

397. von Schacky, C., *Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2004. **7**(2): p. 131-6.
398. Bhattacharya, A., et al., *Different ratios of eicosapentaenoic and docosahexaenoic omega-3 fatty acids in commercial fish oils differentially alter pro-inflammatory cytokines in peritoneal macrophages from C57BL/6 female mice*. *J Nutr Biochem*, 2007. **18**(1): p. 23-30.
399. LeBlanc, C.J., et al., *Effects of dietary supplementation with fish oil on in vivo production of inflammatory mediators in clinically normal dogs*. *Am J Vet Res*, 2008. **69**(4): p. 486-93.
400. Thorburn, A., *Death receptor-induced cell killing*. *Cell Signal*, 2004. **16**(2): p. 139-44.
401. 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.
402. Mukherjee, P.K., et al., *Neurotrophins enhance retinal pigment epithelial cell survival through neuroprotectin D1 signaling*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(32): p. 13152-7.
403. Belayev, L., et al., *Robust docosahexaenoic acid-mediated neuroprotection in a rat model of transient, focal cerebral ischemia*. *Stroke*, 2009. **40**(9): p. 3121-6.
404. Lee, J.H., et al., *Omega-3 fatty acids for cardioprotection*. *Mayo Clin Proc*, 2008. **83**(3): p. 324-32.
405. Oskarsson, H.J., et al., *Dietary fish oil supplementation reduces myocardial infarct size in a canine model of ischemia and reperfusion*. *J Am Coll Cardiol*, 1993. **21**(5): p. 1280-5.
406. Yang, B., et al., *Dietary fish oil supplementation attenuates myocardial dysfunction and injury caused by global ischemia and reperfusion in isolated rat hearts*. *J Nutr*, 1993. **123**(12): p. 2067-74.
407. Kris-Etherton, P.M., et al., *Position of the American Dietetic Association and Dietitians of Canada: dietary fatty acids*. *J Am Diet Assoc*, 2007. **107**(9): p. 1599-611.
408. Mancardi, D., et al., *Omega 3 has a beneficial effect on ischemia/reperfusion injury, but cannot reverse the effect of stressful forced exercise*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2009. **19**(1): p. 20-6.
409. O'Shea, K.M., et al., *Dietary omega-3 fatty acids alter cardiac mitochondrial phospholipid composition and delay Ca<sup>2+</sup>-induced permeability transition*. *J Mol Cell Cardiol*, 2009. **47**(6): p. 819-27.
410. Calder, P.C., *n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored*. *Clin Sci (Lond)*, 2004. **107**(1): p. 1-11.
411. Pisani, L.F., et al., *In vitro modulatory effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid (EPA and DHA) on phagocytosis and ROS production of goat neutrophils*. *Vet Immunol Immunopathol*, 2009.
412. Frangogiannis, N.G., et al., *Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion*. *Circulation*, 1998. **98**(7): p. 699-710.

413. Mehra, M.R., et al., *Fish oils produce anti-inflammatory effects and improve body weight in severe heart failure*. J Heart Lung Transplant, 2006. **25**(7): p. 834-8.
414. Wang, S., et al., *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, 2009. **204**(1): p. 147-55.
415. Duda, M.K., et al., *Fish oil, but not flaxseed oil, decreases inflammation and prevents pressure overload-induced cardiac dysfunction*. Cardiovasc Res, 2009. **81**(2): p. 319-27.
416. Gabler, N.K., et al., *n-3 PUFA attenuate lipopolysaccharide-induced down-regulation of toll-like receptor 4 expression in porcine adipose tissue but does not alter the expression of other immune modulators*. J Nutr Biochem, 2008. **19**(1): p. 8-15.
417. Sugawara, T., et al., *Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia*. NeuroRx, 2004. **1**(1): p. 17-25.
418. Bas, O., et al., *The protective effect of fish n-3 fatty acids on cerebral ischemia in rat hippocampus*. Neurochem Int, 2007. **50**(3): p. 548-54.
419. Plamondon, H. and M.C. Roberge, *Dietary PUFA supplements reduce memory deficits but not CA1 ischemic injury in rats*. Physiol Behav, 2008. **95**(3): p. 492-500.
420. Fernandes, J.S., et al., *Long-term treatment with fish oil prevents memory impairments but not hippocampal damage in rats subjected to transient, global cerebral ischemia*. Nutr Res, 2008. **28**(11): p. 798-808.
421. Delarue, J., et al., *Fish oil prevents the adrenal activation elicited by mental stress in healthy men*. Diabetes Metab, 2003. **29**(3): p. 289-95.
422. Lindberg, M., et al., *Long-chain n-3 fatty acids and mortality in elderly patients*. Am J Clin Nutr, 2008. **88**(3): p. 722-9.
423. Hu, F.B., *The balance between omega-6 and omega-3 fatty acids and the risk of coronary heart disease*. Nutrition, 2001. **17**(9): p. 741-2.
424. Harris, W.S., *The omega-6/omega-3 ratio and cardiovascular disease risk: uses and abuses*. Curr Atheroscler Rep, 2006. **8**(6): p. 453-9.
425. Harris, W.S., B. Assaad, and W.C. Poston, *Tissue omega-6/omega-3 fatty acid ratio and risk for coronary artery disease*. Am J Cardiol, 2006. **98**(4A): p. 19i-26i.
426. Igarashi, M., et al., *Docosahexaenoic acid synthesis from alpha-linolenic acid by rat brain is unaffected by dietary n-3 PUFA deprivation*. J Lipid Res, 2007. **48**(5): p. 1150-8.
427. Bourre, J.M., et al., *Dietary alpha-linolenic acid deficiency in adult rats for 7 months does not alter brain docosahexaenoic acid content, in contrast to liver, heart and testes*. Biochim Biophys Acta, 1992. **1124**(2): p. 119-22.
428. Chiari, P.C., et al., *Isoflurane protects against myocardial infarction during early reperfusion by activation of phosphatidylinositol-3-kinase signal transduction: evidence for anesthetic-induced postconditioning in rabbits*. Anesthesiology, 2005. **102**(1): p. 102-9.
429. Owen, A.J., et al., *Dietary fish oil dose- and time-response effects on cardiac phospholipid fatty acid composition*. Lipids, 2004. **39**(10): p. 955-61.

430. Harris, W.S., et al., *Omega-6 Fatty Acids and Risk for Cardiovascular Disease. A Science Advisory From the American Heart Association Nutrition Subcommittee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism; Council on Cardiovascular Nursing; and Council on Epidemiology and Prevention.* Circulation, 2009.