

Université de Montréal

**Caractérisation de l'apoptose observée dans le système
limbique après une ischémie myocardique transitoire
chez le rat**

par

Sévan Kaloustian

Département de pharmacologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de docteur
en pharmacologie

Décembre, 2009

© Sévan Kaloustian, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Caractérisation de l'apoptose observée dans le système limbique après une ischémie
myocardique transitoire chez le rat

présentée par :
Sévan Kaloustian

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Denis Deblois, Ph.D., président-rapporteur
Guy Rousseau, Ph.D., directeur de recherche
Philippe Ryvlin, M.D., Ph.D., co-directeur
Anne-Noël Samaha, Ph.D., membre du jury
Guy Drolet, Ph.D., examinateur externe
Adriana Di Polo, Ph.D., représentant du doyen et de la FESP

Résumé

Au niveau clinique, il a été observé que de 15 à 30 % des patients qui ont subi un infarctus du myocarde développent une dépression majeure. De plus, la population atteinte de dépression post-infarctus présente un risque de mortalité de trois à quatre fois plus élevé, et ce, en comparaison avec la population non dépressive post-infarctus. Dans un modèle de rat développé pour étudier la dépression post-infarctus, des cellules apoptotiques ont été retrouvées au niveau du système limbique. Il apparaît que les cytokines seraient en partie responsables de cette mort cellulaire qui relie le cœur en ischémie et le système nerveux central.

Donc, les objectifs de cette thèse sont : 1) de caractériser spatialement et temporellement la survenue de la mort cellulaire par apoptose dans les structures du système limbique du rat, à la suite d'un infarctus du myocarde ; 2) de déterminer l'effet de l'anti-inflammatoire celecoxib sur cette apoptose observée au niveau de l'amygdale et de déterminer l'implication de l'enzyme COX-2 ; 3) de déterminer l'implication de la cytokine pro-inflammatoire TNF- α dans l'apoptose observée au niveau des structures du système limbique du rat, à la suite d'un infarctus du myocarde.

Afin d'atteindre ces objectifs, les rats ont subi une ischémie de 40 minutes, suivi d'une période de reperfusion qui varie d'un protocole à l'autre (15 minutes, 24, 48, 72 heures ou 7 jours). De plus, en fonction du protocole, ces rats ont été traités avec soit du célécoxib (inhibiteur sélectif de la COX-2), soit avec du PEG sTNF-R1 (inhibiteur du TNF- α). À la suite de ces protocoles, les rats ont été sacrifiés, la taille de l'infarctus a été déterminée et les différentes structures cérébrales du système limbique prélevées. Des tests biochimiques propres à chaque protocole ont été réalisés afin de documenter l'apoptose.

Il a alors été observé qu'aucun des deux traitements ne présentait d'effet sur la taille de l'infarctus. L'étude de l'apoptose dans le système limbique a révélé que : 1) le processus apoptotique se mettait en place dans l'hippocampe dès les 15 premières minutes de reperfusion suivant l'infarctus du myocarde et que ce processus était spatialement

dynamique dans le système limbique jusqu'au septième jour postreperfusion ; 2) il est apparu que la COX-2 était impliquée dans l'apoptose du système limbique ; 3) il a été observé que le TNF- α périphérique était impliqué dans ce processus apoptotique après 72 heures de reperfusion en activant la voie extrinsèque de l'apoptose.

Ces résultats ont permis de caractériser la survenue de l'apoptose au niveau du système limbique chez le rat à la suite d'un infarctus du myocarde et de documenter l'implication de la COX-2 et du TNF- α dans ce processus.

Bien que ces résultats n'apportent pas de schémas thérapeutiques clairs ou de mécanismes physiopathologiques globaux ces derniers permettent une meilleure compréhension de la relation existante entre le cœur et le système nerveux central dans le cadre de l'infarctus du myocarde. De manière moins spécifique ils précisent la relation entre le système inflammatoire et le système nerveux central.

Mots-clés : infarctus du myocarde, apoptose, système limbique, cytokine, célécoxib, PEG'sTNF-R1

Abstract

About 15 to 30% of clinical patients with myocardial infarction develop major depression. This population is three to four times more vulnerable to fatalities such as death when compared to the non depressed post-myocardial population. In a rat model, developed in order to study post myocardial infarct depression, apoptotic cells within the limbic system have been found. It has been shown that cytokines could be responsible for the cell death linking the ischemic heart to the central nervous system.

Thus, the aims of this thesis are: 1) to characterize the spatial time course of the apoptotic cell death within the limbic system, following a myocardial infarct, in a rat model; 2) to determine the effect of the anti-inflammatory celecoxib on this apoptosis in the amygdala and determine the COX-2 enzyme's implication; 3) to determine the implication of the pro-inflammatory cytokine TNF- α in the apoptosis observed within the limbic system, following a myocardial infarct, in a rat model.

In order to achieve these goals, rats were submitted to 40 minutes of myocardial ischemia followed by a variable reperfusion period (15 minutes, 24, 48, 72 hours or 7 days). Moreover, depending on the protocol, rats were treated with celecoxib (COX-2 selective inhibitor), or with PEG sTNF-R1 (TNF- α inhibitor). At the end of each respective reperfusion period, rats were sacrificed, infarct size was determined and the different structures of the limbic system were dissected for further analysis. Biochemical tests, specific to each protocol were performed in order to characterize this apoptosis.

With respect to obtained results, we observed that the infarct size was impacted by none of the two treatments. Apoptosis study within the limbic system revealed that: 1) the apoptotic process was activated in the hippocampus area within the first 15 minutes of reperfusion and this process was spatially dynamic in the limbic system until the seventh day of reperfusion; 2) it appeared that COX-2 was implicated in the apoptosis in the limbic system; 3) peripheral TNF- α was implicated in the apoptotic process after 72 hours of reperfusion by activating the extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis.

These results allowed characterization of apoptosis within the limbic system, in a rat model, following a myocardial infarct and the establishment of the implication of COX-2 and TNF- α in this process.

Although these results do not provide any clear therapeutic schemas or global physiopathological mechanisms, they allow a better comprehension of the existing relationship between the heart and the central nervous system within the myocardial infarct context. To a less specific extent these results bring more information on the relationship between the inflammatory system and the central nervous system.

Keywords: myocardial infarct, apoptosis, limbic system, cytokine, celebrex, PEG'sTNF-R1

Table des matières

Introduction	1
1 Chapitre 1 : Le myocarde	2
1.1 L'infarctus du myocarde	2
1.1.1 L'ischémie	2
1.1.1.1 Définitions	2
1.1.1.2 L'apport et la demande pour le cœur	2
1.1.1.2.1 Apport	2
1.1.1.2.1.1 Forces compressives extravasculaires	4
1.1.1.2.1.2 Facteurs humoraux	4
1.1.1.2.1.3 Autorégulation	5
1.1.1.2.1.4 Contrôle métabolique	5
1.1.1.2.1.5 Contrôle neuronal	6
1.1.1.2.2 Demande	6
1.1.1.2.3 Équilibre bouleversé pendant l'ischémie	7
1.1.1.3 Susceptibilité de la région endocardique à l'ischémie	8
1.1.1.4 Conséquence : biochimie et pathologie de l'ischémie	9
1.1.2 Somme des effets : l'infarctus du myocarde	10
1.1.2.1 Apparition d'un infarctus du myocarde : occlusion d'une artère coronaire	10
1.1.2.2 Progression de l'infarctus	10
1.1.2.2.1 Phénomène du front de vague (<i>wave front</i>)	10
1.1.2.2.2 Déterminants de l'infarctus	10
1.1.3 Reperfusion	11
1.1.3.1 Définition	11
1.1.3.2 Lésions de reperfusion	12
1.1.3.2.1 Lésions de reperfusion non létales	12
1.1.3.2.1.1 La sidération myocardique	12

1.1.3.2.1.2	Arythmies de reperfusion	14
1.1.3.2.2	Lésions de reperfusion létales	14
1.1.3.2.2.1	Neutrophiles	15
1.1.3.2.2.2	Plaquettes	16
1.1.3.2.2.3	Surcharge calcique	17
1.1.3.2.2.4	Radicaux libres	19
1.1.3.2.2.5	Apoptose	20
2	Chapitre 2 : La dépression	23
2.1	Définition et physiopathologie	23
2.1.1	La neurotransmission	25
2.1.2	Altérations structurales	26
2.1.3	Système endocrinien	27
2.1.4	Introduction au BDNF	29
2.1.5	Hypothèse des cytokines	30
2.1.6	Système limbique	30
2.1.6.1	L'amygdale	31
2.1.6.1.1	Connexions afférentes et efférentes	31
2.1.6.1.1.1	Connectivité Subcorticale	32
2.1.6.1.1.2	Connectivité avec le système olfactif	34
2.1.6.1.1.3	Connectivité avec l'hippocampe	34
2.1.6.1.1.4	Connectivité avec le néocortex	34
2.1.6.1.2	Amygdale et troubles comportementaux	35
2.1.6.2	Hippocampe	37
2.1.6.3	Hypothalamus	39
2.1.6.4	Cortex préfrontal	42
2.1.7	Implication du facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF)	43
2.2	Les modèles animaux de la dépression et les tests comportementaux	48
2.2.1	Les modèles animaux de la dépression	48

2.2.1.1	Le stress chronique	48
2.2.1.2	Bulbectomie	49
2.2.2	Les testes comportementaux	49
2.2.2.1	Test de préférence au sucrose (anhédonie)	49
2.2.2.2	Test de la nage forcée (abandon)	50
3	Chapitre 3 : La dépression post-infarctus du myocarde	51
3.1	Dépression et maladie cardiovasculaire : Interface système limbique/système cardiovasculaire	53
3.1.1	Mécanisme	54
3.1.1.1	Hyperactivité de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien et système sympatho-adrénergique	54
3.1.1.2	Réduction de la variabilité du rythme cardiaque	56
3.1.1.3	Augmentation de la réactivité des plaquettes	57
3.1.1.4	Ischémie myocardique et instabilité ventriculaire	58
3.1.1.5	Nouveaux concepts	59
3.1.1.5.1	La sensibilité du baroréflexe	59
3.1.1.5.2	Anomalie du système immunitaire	60
3.1.1.5.3	La fatigue et l'activité physique	61
3.1.1.6	Dépression et autres pathologies associées	62
4	Chapitre 4 : L'apoptose	63
4.1	Définition	63
4.2	Protéines impliquées et signalisations	65
4.2.1	Les caspases	65
4.2.1.1	Généralités et structure	65
4.2.1.2	Signalisation	66
4.2.2	Akt/PKB	66
4.2.2.1	Structure	67
4.2.2.2	Activation	68

4.2.3	Famille protéique Bcl-2	69
4.2.3.1	Généralité et structure	69
4.2.3.2	Activation	70
4.3	Mécanisme d'action et voies de signalisation	70
4.3.1	Voies intrinsèques	73
4.3.1.1	Mitochondrie	73
4.3.1.2	Noyau	76
4.3.2	Voie extrinsèque, dite des récepteurs de mort	76
4.4	Apoptose et dépression	77
5	Chapitre 5 : Inflammation	79
5.1	Définition	79
5.2	Propagation	80
5.2.1	La réponse de type aigu	80
5.2.2	La réponse de type chronique	81
5.3	Cellules majeures de l'inflammation	82
5.3.1	Neutrophiles	82
5.3.2	Macrophages	82
5.4	Molécules de l'inflammation	83
5.4.1	Les Cyclooxygénases (COX)	84
5.4.1.1	Généralités	84
5.4.1.2	Localisation et fonction	86
5.4.1.2.1	Au niveau gastro-intestinal	86
5.4.1.2.2	Au niveau rénal	86
5.4.1.2.3	Au niveau du système nerveux central	86
5.4.1.2.4	Au niveau pulmonaire	87
5.4.1.2.5	Au niveau plaquettaire	87
5.4.1.3	L'inhibition de la COX	88
5.4.1.3.1	Mécanisme d'inhibition :	88

5.4.1.3.2	Inhibition sélective de la COX-2 : le célécoxib	89
5.4.1.3.3	Coxibs et problèmes cardiovasculaires	89
5.4.1.4	La COX-2	91
5.4.1.4.1	Régulation générale de la COX-2	91
5.4.1.4.2	COX-2 et pathologies :	93
5.5	Inflammation et ischémie/reperfusion du myocarde	94
5.6	Inflammation et apoptose	95
5.7	Inflammation, dépression et infarctus du myocarde	96
6	Chapitre 6 : Cytokines et dépression post infarctus du myocarde	98
6.1	Généralités	98
6.2	Hypothèse des cytokines. Évidences expérimentales et cliniques	99
6.2.1	Activation immunitaire chez le patient dépressif	101
6.3	Voies de communication entre les cytokines périphériques et le cerveau	102
6.3.1	Espaces circumventriculaires	102
6.3.2	Nerf Vague	103
6.3.3	Transport actif spécifique	103
6.4	Cytokines dans le système nerveux central	104
6.4.1	Actions des cytokines dans le cerveau	104
6.4.2	Actions des cytokines sur les fonctions cérébrales	105
6.4.3	Cytokines, dépression et système sérotoninergique	106
6.4.4	Cytokines et antidépresseurs	106
6.5	La famille tumor necrosis factor (TNF)	108
6.5.1	Le TNF- α	109
6.5.1.1	Généralités	109
6.5.1.2	Récepteurs	109
6.5.2	Le PEG sTNF-R1	111
7	Chapitre 7 : Objectifs et hypothèses	112
7.1	Caractérisation spatiale et temporelle de l'apoptose cérébrale	112

7.2	Action du célécoxib sur l'apoptose au niveau de l'amygdale suite à un infarctus du myocarde _____	113
7.3	Implication du TNF- α dans l'apoptose observée au niveau du système limbique suite à un infarctus du myocarde _____	114
8	Chapitre 8 : Méthodologie _____	115
9	Chapitre 9 : Brain Research (2008) _____	117
10	Chapitre 10: Apoptosis (2007) _____	140
11	Chapitre 11 : Apoptosis (2009) _____	169
12	Chapitre 12 : Discussion _____	204
12.1	Modèle expérimental _____	204
12.2	Distribution spatiale et temporelle _____	205
13	Conclusion _____	211
14	Bibliographie _____	212

Liste des figures

Figure 1.1: Équilibre entre l'apport et la demande. (Adapté de Ardehali et al, (1990)).....	4
Figure 1.2 : Surcharge calcique et implication du PTPm dans la survie cellulaire, (adapté de (Halestrap et al, (2006))	19
Figure 2.1 : Stress, axe HPA et rétrocontrôle négatif des RG du cortisol (adapté de Raison (2003))	29
Figure 2.2 : Signalisation intracellulaire et implication des antidépresseurs et stabilisateurs d'humeur sur la régulation de la transcription du gène de BDNF (Tiré de Hashimoto (2004))	47
Figure 3.1 : Relation entre la dépression majeure et les maladies cardiovasculaires. Hypothèses des altérations pathophysiologiques, associées à la dépression, qui contribueraient à l'augmentation de la vulnérabilité aux maladies cardiovasculaires (tiré de Musselman et al (1998)).....	54
Figure 4.1 : Représentation des voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque, ainsi que des protéines de signalisations impliquées (tiré de (Chowdhury, Tharakan et al. 2006)) ..	72
Figure 5.1 : Voie catabolique de l'acide arachidonique (tiré de Vane et al (1987)).....	84
Figure 5.2 : Facteurs endogènes et exogènes interagissant avec les récepteurs impliqués dans les voies de signalisations impliquées dans la régulation de l'expression de la COX-2 (tiré de Tsatsanis et al (2006)).....	93

Liste des abréviations

5-HT : Sérotonine

AA : Acide Arachidonique

ACTH: Adrénocorticotropine hormone

ACV : Accident cérébro-vasculaire

AD: Antidépresseur

AIF: Apoptosis inducing factor

AINS: Anti-inflammatoire non stéroïdien

Akt : Protéine Kinase B (PKB)

AL: Amygdale latérale

AM: Amygdale médiane

ANT : Translocateur de nucléotide adénine

AP 1: Activating protein

APAF-1: Apoptosis proteases activating factor-1

APO-E : Apolipoprotein E

ARE : AU riche element

ARN: Acide ribonucléique

ARNm: Acide ribonucléique messenger

ATP: Adénosine triphosphate

Bcl-2: B-cell lymphoma-2

BDNF: Brain derived neurotrophic factor

BH: Bcl-2 homology

BHE: Barrière hémato-encéphalique

BZD: Benzodiazepine

CA 3: Corne d'Ammon 3

CA1: Corne d'Ammon 1

CAD: Caspase activates DNase

CARD: Caspase recruitment domain

CK: Creatine kinase

CREB: cAMP-response element binding protein

CRF: Corticotropin-releasing factor

CRH: Cortico-trophin releasing hormone

CRP : protéine C réactive

CSF : fluide cérébrospinal	GSK-3: Glycogene synthase kinase 3
DA : Dopamine	HETEs: Hydroxy-eicosatetraenoic acid
DD: Death domain	HPA: Hypothalamo-hypophyso surrénalien
DED: Death effector domain	Hsp: Heat shock proteins
DFF: DNA fragmentation factor	i.m: Intra musculaire
DISC: Death inducing signaling complex	i.v: Intra veineux
EGF: Epidermal growth factor	IAP: Inhibitors of apoptosis proteins
ELISA : Enzyme linked immunoabsorbant assay	ICAMs: Inter cellular adhesion molecule soluble
EROs: Espèces réactives de l'oxygène	IDO : Indoleamine 2,3 dioxygénase
FADD: Fas associated death domain	IFN: Interferon
FGF: Fibroblast growth factor	IKK: Iκ-BKinase
FKHR: Forkhead	IL: Interleukine
FLIP: FADD-like interleukine 1Beta converting enzyme-like inhibitory protein	IL-1ra : IL-1-receptor antagonist
GD: Gyrus dentelé de l'hippocampe	iNOS : Monoxyde d'azote synthase inductible
GM-CSF: Granulocyte macrophage colony-stimulating factor	IRMf : Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle
GR: Glucocorticoid receptor	ISEL: In situ end labeling

ISRS: Inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine

K_{ATP} : Canal potassique dépendant de l'ATP

kDa: Kilo Dalton

LDL: Low density lipoprotein

LDLR: LDL receptor

LPS: lipopolysaccharide

LT: leukotriènes

MAO: Monoamine oxydase

MAPK: Mitogen activated protein kinase

MCP : Mort cellulaire programmée

MCV : Maladie cardiovasculaire

MDD : Major depressive disorder

Mdm2: Murine double minute 2

MMP-9 : Matrix métallo-protéinases-9

MPO : Myéloperoxidase

NA : Noradrénaline

NFS : Noyau du faisceau solitaire

NF- κ B : Nuclear facteur Kappa B

NGF: Nerve growth factor

NK : Natural killer

NO: Oxyde nitrique

NT: Neurotrophine

OCV : Organes circumventriculaires

PA : Pression artérielle

PBMC : Peripheral blood mononuclear cells

Pc: Prostacyclines

PDGF: Platelet derived growth factor

PDK1: Kinase phosphoinositide-dépendant kinase 1

PF : Platelet factor

PGE2: Prostaglandine E2

PGG2: Prostaglandine G2

PGH2: Prostaglandine H2

PGHS: Prostaglandin endoperoxide H synthase

PH: Pleckstrin homology	RIA: radio-immunoassay
PI3K : Phosphatidylinositol 3 kinase	SCD: Sudden cardiac death
PKA : Protéine kinase dépendante de l'AMPc	Smac: Second mitochondrial activator of caspases
PKB : Protéine kinase B ou Akt	SOD: Superoxyde dismutase
PKC : Protéine kinase C	SPAK: Stress-activated protein kinase
PLC: Phospholipase	TACE : TNF alpha converting enzyme
PtdIns-3,4,5-P ₃ : Phosphoinositol-3,4,5 triphosphate	TCA : Antidépresseurs tricycliques
PtdIns-3,4-P ₂ : Phosphoinositol-3,4,5 biphosphate	TEP : Tomographie par émission de positons
PTEN: Phosphatase and tensin Homolog)	TGF-β: Transforming Growth Factor-β
PTPm : Pore de transition de perméabilité mitochondrial	TNF: Tumor Necrosis Factor
PVC : Contraction ventriculaire prématurée	TRAF: TNF receptor associated factor
RANK : Receptor activated NF-kB	TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand
RCPG : Récepteurs couplés aux protéines G	Trk: Tropomyosine related kinase
RI: Réponse inflammatoire	TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nickend labelling
	TxA ₂ : Thromboxane A ₂

VDAC: Voltage dependent anion channel

YAP: Yes-associated protein

VEGF: Vascular endothelial growth
factor

“It is not the strongest of the species that survives, nor the most intelligent that survives. It is the one that is the most adaptable to change.”

Charles Robert Darwin (1809-1882)

*Si malgré tout, bien avant vous
tout a raté, faut essayer !*

La vérité, la liberté

l’amour et la paix, faut essayer !

Essayer ! Essayer ! Essayer !

Johnny Hallyday - Parc de Princes 2003

Remerciements

Jean Paul Sartre a un jour écrit : « L'enfer, c'est les Autres ». Avec tout le respect que je dois à M. Sartre, cette section sera dédiée à souligner mon plus grand désaccord, vis-à-vis de ces célèbres mots. En effet,

Merci au Dr Guy Rousseau. Sans lui, ce manuscrit, ainsi que les quatre années de travail réalisé, n'auraient pas existé. Merci Guy pour ta compréhension, ta présence de chaque instant et ton soutien sans relâche. « Boss! », ces quatre années sous ta direction ont été un plaisir, un honneur et une réelle chance.

Merci au Professeur Philippe Ryvlin, pour sa direction et son soutien tout au long de ces quatre années. Merci pour vos conseils ainsi que pour votre confiance. Ce fut un honneur d'être sous votre direction.

Merci au Dr Roger Godbout pour son importante implication dans ce projet ainsi que dans mon parcours. Merci pour votre passion et pour nos discussions si intéressantes.

Merci au département de pharmacologie de l'Université de Montréal. Merci au Dr René Cardinal pour sa confiance et son encadrement. Merci à Mmes Sylvie Caron et Francine Côté pour leur aide si précieuse.

Merci au « Labo » du centre de recherche de l'hôpital du Sacré-Cœur de Montréal. Merci au Dr Boubacar Pasto Wann et au Dr Matthieu Boucher pour leur amitié ainsi que leurs énormes héritages scientifiques. Merci à M. Thierno Madjou Bah pour sa présence, son aide ainsi que pour son amitié si chère. Merci à Mlles Stéphanie Falcao, Stéphanie Anne Girard, Laura Lada-Moldovan, Sophie Mathieu, Isabelle Rondeau et M. Marc-André Déry et M. Setrak Ishak pour leur amitié, présence et soutien. Merci également à M. Pierre Fortier, Mme Caroline Bouchard, M. Louis Chiochio, ainsi que Mlle Sophie Binette, pour leur patience et aide inestimable.

Merci au Dr Marc Janier et à Mme Amélie Lothe pour leur aide et implication.

Merci au jury de cette thèse pour leur temps et précieux commentaires.

Merci au Dr Michelle Savoie et Me Christine O'Doherty pour leur implication, soutien et confiance. Mesdames votre aide fut décisive au terme de ce doctorat.

Merci à Mme Paillot pour son soutien depuis 1991. Merci de n'avoir jamais laissé tomber les étudiants.

Merci à Mlle Zoe Paschalis et M. Phu Vinh On pour leur amitié et soutien.

Merci à M. Charles Dabone et à sa famille pour leur soutien et amitié. Merci Charly pour ces si chers moments passés ensemble.

Merci à M. Vicente Vicente pour son amitié depuis 15 ans. Merci Vicente.

Merci à Stéphane Waffo pour sa confiance, soutien et pour son amitié.

Merci à Akram El Saïdy pour tout ce qui existe depuis janvier 2004.

Merci à la famille Delarue pour leur soutien et présence de chaque instant.

Merci à M. Boris Gil pour la si belle amitié qu'il m'accorde : « Oh, Non, Ouais ! ».

Merci à M. Jérémie Gnonlonfoun pour m'avoir tout offert. Jérémie, tu es « mon maître et mon ami » et cette thèse de doctorat n'aurait jamais existé sans toi.

Merci à la famille Ter Schiphorst pour leur éternel soutien et bien plus encore.

Merci à Mlle Anna Apostolakis et à sa famille pour l'essentiel. *Efharisto para poli!*

Merci à tous ceux qui ont de près ou de loin participé à la réalisation de ce travail. Qu'ils en soient tous ici remerciés.

Merci enfin, à toute ma famille. Ils sont à l'origine de tout, ainsi que la solution à tout. Merci pour votre soutien indéfectible. Absolument tout vous est dû.

Voilà M. Sartre, je m'arrête ici! Je m'arrête à regret, avec la conviction que ces remerciements auraient dû être plus longs et que, sans ces « Autres », rien de tout cela n'aurait existé.

Introduction

L'infarctus du myocarde correspond à un arrêt de l'irrigation sanguine dans le tissu cardiaque, privant ainsi ce dernier de l'oxygène et des nutriments nécessaires à son fonctionnement. Ceci a comme conséquence de provoquer une mort cellulaire au niveau cardiaque pouvant alors, dans certains cas, compromettre le sain fonctionnement du cœur.

Suite à un infarctus du myocarde, environ 15 à 30 % des patients développent une dépression majeure. Cette dépression est un indicateur de risque de mortalité cardiovasculaire, à moyen et long terme, pour cette population. En effet, les patients post-infarctus du myocarde qui présentent une dépression, ont un risque de mortalité cardiovasculaire de trois à quatre fois plus élevé que ces mêmes patients sans dépression. Également, suite à un infarctus du myocarde, de la mort cellulaire par apoptose a été retrouvée au niveau des structures du système limbique.

Bien que le mécanisme reliant le myocarde en ischémie, la survenue de cette apoptose et l'apparition de la dépression, ne soit pas encore clairement établi, il apparaît que la réaction inflammatoire et les cytokines associées sont impliquées dans cette physiopathologie.

Les objectifs de ces travaux étaient donc de caractériser spatialement et temporellement la survenue de la mort cellulaire par apoptose, dans des structures du système limbique; de déterminer l'implication de la réaction inflammatoire et plus particulièrement de l'enzyme COX-2; et enfin de déterminer l'implication de la cytokine pro-inflammatoire TNF- α dans ce phénomène, chez le rat à la suite d'un infarctus du myocarde.

1 Chapitre 1 : Le myocarde

1.1 L'infarctus du myocarde

1.1.1 L'ischémie

1.1.1.1 Définitions

Étymologiquement, le mot ischémie vient du grec *iskhaimos* et signifie un arrêt de la circulation sanguine. L'ischémie est donc une condition de privation d'oxygène consécutive à une perfusion sanguine réduite ou bloquée. Parallèlement à ce manque d'oxygène, une disponibilité réduite de substrats énergétiques est observée entraînant une diminution de l'évacuation de métabolites toxiques (CO_2 , acide lactique, H^+) produits localement. Cette situation engendre des dommages cellulaires qui sont réversibles mais qui deviennent rapidement irréversibles. Au cours de ce chapitre nous verrons les effets d'une ischémie myocardique à court et à long terme.

1.1.1.2 L'apport et la demande pour le cœur

Les cardiomyocytes nécessitent un équilibre constant entre l'apport et la demande en oxygène pour fonctionner adéquatement. Lorsqu'il y a un déséquilibre entre l'apport et la demande, il peut en résulter deux types d'ischémies du myocarde : 1) l'ischémie d'apport et 2) l'ischémie de demande (Effat 1995). Le premier type survient lorsque la perfusion myocardique est atténuée par la réduction de la lumière artérielle induite par un vasospasme ou par la formation d'un thrombus bloquant la circulation. Ce premier type est responsable de l'infarctus du myocarde et de la majorité des épisodes d'angine. L'ischémie de demande survient lorsque l'augmentation du débit coronarien est insuffisante pour satisfaire la demande. Ceci peut se produire lors d'efforts physiques ou d'une forte émotion. Ces éléments illustrent le fait que le tissu myocardique est en besoin constant d'oxygène et que le maintien de cet équilibre fait intervenir de nombreux paramètres.

1.1.1.2.1 Apport

Le débit coronarien et la capacité de transport en oxygène du sang sont les facteurs qui influencent l'apport en oxygène. Le passage d'un état de repos à un effort intense peut entraîner une augmentation du débit cardiaque d'un facteur huit (Ardehali and Ports 1990). De son côté, au repos, la saturation de l'hémoglobine en O₂ est de l'ordre de 97-99 % (Antman and Braunwald 2001). Le débit coronarien apparaît alors comme le déterminant principal de l'apport. Ce débit est fonction de la phase diastolique, de la contraction cardiaque et de la résistance vasculaire. Cette dernière est régulée par les forces compressives extravasculaires, les facteurs humoraux, l'autorégulation, le contrôle métabolique et le contrôle neuronal (Ardehali and Ports 1990) (Figure 1.1).

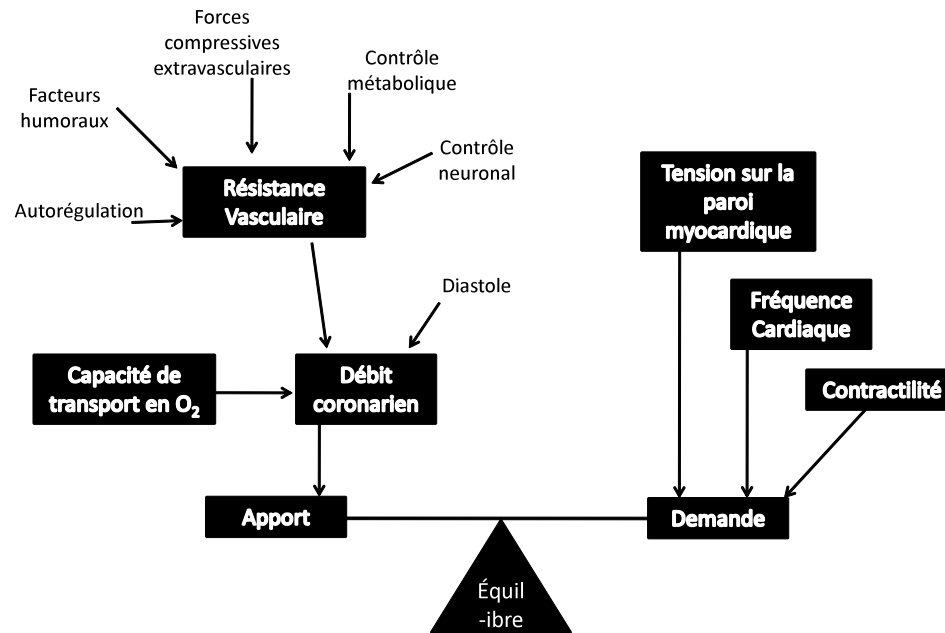


Figure 1.1: Équilibre entre l'apport et la demande. (Adapté de Ardehali et al, (1990))

1.1.1.2.1.1 Forces compressives extravasculaires

Durant la phase diastolique le myocarde est perfusé par les artères coronariennes (Smucker, Tedesco et al. 1988). C'est à ce moment que les forces compressives extravasculaires et la résistance intravasculaire sont au minimum et que le sang circule dans les artérioles et les capillaires. Durant la systole, la pression intraventriculaire gauche (maximale dans la région endocardique) ainsi que la compression des artères font en sorte que le tissu cardiaque en contraction empêche un débit coronarien adéquat ; la phase diastolique demeure le seul moment où le myocarde est perfusé correctement.

1.1.1.2.1.2 Facteurs humoraux

Les facteurs humoraux constituent des substances circulantes ayant un impact sur l'apport sanguin. En effet, des agents humoraux comme la bradykinine (puissant

vasodilatateur), l'angiotensine (puissant vasoconstricteur), la prostacycline (vasodilatateur), le thromboxane A2 (vasoconstricteur) et la sérotonine (vasoconstricteur) agissent sur l'endothélium vasculaire en altérant le débit coronarien. Ces facteurs ont donc un rôle important dans le maintien de cet équilibre entre l'apport et la demande. (Antman and Braunwald 2001)

1.1.1.2.1.3 Autorégulation

L'autorégulation est définie comme la capacité à maintenir une perfusion constante suite à un changement au niveau de la pression (Antman and Braunwald 2001). La relation entre la perfusion et le changement de pression est inverse afin de maintenir le débit constant : plus la pression diminue, plus la résistance augmente (vasoconstriction). L'acteur principal de cette autorégulation est le NO (vasodilatateur). Une inhibition de NO atténue l'autorégulation et dans ce cas, une compensation via l'adénosine peut être observée (Tayama, Okumura et al. 1998). Également, le contrôle myogénique est un élément d'une certaine importance dans le rôle de l'autorégulation (Bayliss 1902; Meininger and Davis 1992). En effet, il s'observe lors d'une contraction des muscles lisses, suite à une augmentation de la pression intraluminaire et permet alors un retour à la normale du débit sanguin. Cependant, ce dernier n'a pas un rôle majoritaire et se voit diminuer lors de l'exercice (Muller, Myers et al. 1993).

1.1.1.2.1.4 Contrôle métabolique

Le contrôle métabolique, permettant une régulation du métabolisme énergétique, est un facteur important dans la régulation du débit coronarien. En effet, entre la consommation en oxygène du myocarde et le débit cardiaque, on observe une relation directe (Antman and Braunwald 2001). Ceci permet au cœur d'ajuster sa consommation en oxygène en fonction du débit coronarien. Cette relation étroite provient de plusieurs paramètres : 1) le cœur a de très faibles réserves en oxygène, 2) le myocarde dépend presque exclusivement d'un fonctionnement aérobique et 3) l'extraction de l'oxygène du sang est maximale (la saturation en oxygène est faible dans le sang veineux) (Tune,

Gorman et al. 2004). Ainsi, un changement métabolique résulte très rapidement en une dilatation des artères coronaires. Les deux principaux médiateurs de cette relation sont le NO et l'adénosine. Le NO augmente le débit coronarien en produisant une vasodilatation. Sa capacité est diminuée chez les patients souffrants d'athérosclérose, menant alors à une diminution de cette réponse vasodilatatrice adaptative (Quyyumi, Dakak et al. 1995). L'adénosine entraîne également une vasodilatation des vaisseaux coronariens (Berne 1980). Dans ce contrôle métabolique, les prostaglandines (Duffy, Castle et al. 1999), les canaux K_{ATP} (en causant une hyperpolarisation des muscles lisses) (Deussen, Brand et al. 2006), sont également impliqués et produisent une vasodilatation lors d'un stress métabolique. Cependant, certains travaux présentent des résultats contraires indiquant une absence d'implication (Tune, Richmond et al. 2001). En effet, Tune et coll ont montré sur un modèle canin que, l'inhibition combinée du canal potassium ATP, de la synthèse de NO et des récepteurs de l'adénosine diminuait l'équilibre au repos entre l'apport d'oxygène et sa consommation. Cependant ces trois facteurs n'étaient pas requis durant l'exercice.

1.1.1.2.1.5 Contrôle neuronal

Le contrôle neuronal est également un facteur important dans l'ajustement du débit coronarien. Les artères coronariennes épicaudiques sont innervées par des fibres du système sympathique et parasympathique (Feigl 1998). Une vasoconstriction est possible par la stimulation des récepteurs α -adrénergiques. En effet, une stimulation du récepteur α_1 adrénergique entraîne une activation de la phospholipase C aboutissant en une augmentation du calcium intracellulaire (Tune, Gorman et al. 2004). L'administration d'un antagoniste de ces récepteurs atténue la réponse vasoconstrictrice. Au contraire, la stimulation des récepteurs β -adrénergiques, de façon expérimentale, entraîne une vasodilatation coronarienne. La stimulation parasympathique, quant à elle, entraîne généralement une vasodilatation des artères coronaires épicaudiques (Tune, Gorman et al. 2004).

1.1.1.2.2 Demande

Trois grands facteurs régissent la demande en oxygène, 1) la fréquence cardiaque, 2) la contractilité et 3) la tension de la paroi myocardique (Figure 1.1). La fréquence cardiaque demeure le facteur le plus important et une augmentation de la chronotropie est liée à une augmentation de la consommation en oxygène (Weber and Janicki 1979). La contractilité, elle, est influencée par le système nerveux autonome, la fréquence cardiaque, la température du corps et des stimuli inotropiques positifs. Plus la contractilité est forte et plus la demande en oxygène sera importante (Hoffman and Buckberg 1978). Enfin, la tension sur la paroi myocardique est également en relation directe avec la consommation en oxygène. Plus la tension augmente, plus la consommation s'élève afin de contrer cette force (Beyar and Sideman 1986).

1.1.1.2.3 Équilibre bouleversé pendant l'ischémie

Nous avons vu que de nombreux mécanismes de contrôle et de régulation de l'équilibre existent. Cependant, lorsque la demande en oxygène excède l'apport, l'ischémie survient. Pour le patient, les signes cliniques de ce déséquilibre sont l'irradiation d'une douleur aux bras, au cou et à la mâchoire, l'anxiété et l'essoufflement, etc (Antman and Braunwald 2001). Ce cas peut se produire en situation pathologique où le contrôle homéostatique du débit coronarien est assuré par l'endothélium vasculaire et le muscle lisse. Ce contrôle est aussi assuré par des agents vasoactifs tels que les catécholamines, la vasopressine, l'angiotensine et l'adénosine. Également, produits par l'endothélium, il y a le NO, les prostacyclines et l'endothéline qui influencent le débit. D'autre part, la présence de plaques athéromateuses dans les artères provoque une dysfonction endothéliale, ce qui réduit la réponse dilatatoire. Cette dysfonction peut être accrue par des facteurs tels que la dyslipidémie, l'hypertension artérielle, le diabète et le tabagisme, etc (Antman and Braunwald 2001).

1.1.1.3 Susceptibilité de la région endocardique à l'ischémie

Les forces compressives, beaucoup plus importantes au niveau de la région endocardique qu'épicardique, réduisent le débit sanguin local (Downey and Kirk 1974) en formant une différence de pression (*waterfall* vasculaire) durant la systole (Downey and Kirk 1975). Ce phénomène suggère que durant la systole, lorsque la pression à l'intérieur du tissu (ou la pression veineuse) est supérieure à la pression artérielle (gradient de pression nul ou négatif), alors le débit sanguin local est réduit ou arrêté dans cette région. Ainsi, au niveau de la région endocardique, le débit sanguin est réduit ou arrêté et cette région n'est pas perfusée. Au contraire, lors de la diastole, le phénomène est inversé et la région endocardique est perfusée convenablement. Malgré les distinctions qui subsistent entre les régions, en terme de perfusion durant les différentes phases de la contraction, les deux régions en fin de cycle cardiaque ont été perfusées adéquatement (mais à des moments distincts du cycle).

Les besoins énergétiques de la région endocardique sont plus élevés que celle de l'épicarde. En effet, la pression de l'oxygène dans l'endocarde est plus basse et l'oxygène y est consommé plus rapidement que dans l'épicarde (Kirk and Honig 1964; Berman and Gamble 1975; Weiss, Neubauer et al. 1978). L'endocarde possède donc des besoins métaboliques plus élevés que l'épicarde.

La circulation collatérale est également un facteur distinguant les différentes couches du myocarde. Cette circulation est présente grâce à la formation d'anastomoses entre les différentes artères. Lors de l'occlusion d'une artère principale, le débit sanguin provenant de l'anastomose permet de retarder ou d'empêcher la mort des cellules cardiaques (Sasayama and Fujita 1992; Charney and Cohen 1993). Le débit collatéral est différent entre l'épicarde et l'endocarde, le premier étant mieux perfusé (Downey, Bashour et al. 1974; Kloner, Ganote et al. 1975).

Les forces compressives sont donc beaucoup plus importantes au niveau de l'endocarde, le soumettant ainsi à une consommation en oxygène plus élevée. Également, le

débit sanguin dans cette région semble être plus faible que dans l'épicarde, tant au niveau de la circulation coronarienne que de la circulation collatérale (Anand, Li et al. 2005). De plus, malgré les phénomènes d'adaptation de l'endocarde, il semble que celui-ci soit moins tolérant à l'ischémie que l'épicarde (Reimer, Lowe et al. 1977).

1.1.1.4 Conséquence : biochimie et pathologie de l'ischémie

En conséquence de l'ischémie, une adaptation métabolique aiguë et locale est observée. Elle comprend une perte importante de molécules énergétiques comme l'ATP et la phosphocréatine (témoignant d'un arrêt de la phosphorylation oxydative), ainsi qu'un changement de métabolisme passant de celui des lipides (β -oxydation) à celui des carbohydrates (glycolyse) (Opie 1971). Cette glycolyse anaérobie est source d'ATP, mais en quantité insuffisante pour répondre au besoin myocardique. Ceci a pour conséquence l'apparition de dommages cellulaires (Jennings, Hawkins et al. 1978) ainsi qu'un arrêt de la contraction.

La sévérité de ces dommages cellulaires est proportionnelle à la durée de l'ischémie. Plus la durée de l'occlusion est longue, plus les dommages sont importants (Reimer, Lowe et al. 1977). La cellule subit premièrement des dommages dits réversibles : léger œdème cellulaire et mitochondrial, agglomération de la chromatine ainsi qu'étirement de myofibrille (Jennings, Schaper et al. 1985).

Si l'ischémie persiste au-delà de 15-20 minutes, les dommages deviennent irréversibles et mènent à la mort de la cellule (Shen and Jennings 1972). Ces dommages vont toucher l'intégrité de la membrane, le passage des ions, l'accumulation de calcium, un œdème cellulaire et mitochondriale ainsi que la rupture de la bande Z qui mènent au déversement du contenu de la cellule dans le milieu extracellulaire. La mort des cellules ne survient pas simultanément dans toutes les régions du myocarde. Elle évolue selon un phénomène de front de vague, allant de la région endocardique vers la région épicaudique (Reimer, Lowe et al. 1977).

1.1.2 Somme des effets : l'infarctus du myocarde

1.1.2.1 Apparition d'un infarctus du myocarde : occlusion d'une artère coronaire

Dans le myocarde, l'infarctus survient principalement lors de la rupture d'une plaque athérosclérotique suivie de la formation d'un thrombus plaquettaire occlusif au niveau d'une artère coronarienne. La fissuration de la plaque expose l'endothélium et ses substances thrombogéniques aux plaquettes (Gresle and Agnelli 2002). Les plaquettes s'activent, s'agrègent et entraînent la formation d'un thrombus occlusif ainsi qu'un arrêt de la circulation sanguine. L'arrêt de la circulation réduit ou arrête complètement l'apport en oxygène (ischémie). L'apport étant inférieur à la demande, ce déficit induit des changements biochimiques et ultra-structuraux aux cellules cardiaques menant à leur mort.

1.1.2.2 Progression de l'infarctus

Pour toutes les raisons soulevées précédemment (section 1.1.1.3), le susendocarde est plus vulnérable à l'ischémie que le subépicarde. Nous allons ici voir comment les dommages ischémiques se propagent à travers le myocarde selon un front de vague.

1.1.2.2.1 Phénomène du front de vague (*wave front*)

En 1977, Reimer et coll. (Reimer, Lowe et al. 1977) ont démontré que la quantité de dommage cellulaire augmentait proportionnellement à la durée de l'ischémie. Ils ont également remarqué qu'après 40 minutes d'ischémie, la nécrose se développait au niveau du susendocarde pour progresser vers le subépicarde en suivant la prolongation de l'ischémie, pour alors devenir une nécrose transmurale. Ce phénomène est connu sous le nom de front de vague (*wave front*). Les auteurs avaient alors soulevé les possibilités de ce phénomène en termes de cardioprotection pharmacologique ou chirurgicale dans une fenêtre temporelle de une à six heures après le début de l'ischémie.

1.1.2.2.2 Déterminants de l'infarctus

En 1985, Reimer et coll. (Reimer, Jennings et al. 1985), lors d'une étude regroupant trois centres de recherche sur un modèle canin, ont mis en évidence les quatre facteurs influençant le plus la taille de l'infarctus du myocarde :

- La durée de l'ischémie ;
- La taille de la zone à risque ;
- La demande métabolique du myocarde ;
- La présence et la quantité du système des vaisseaux collatéraux.

Concernant le premier point, la taille de l'infarctus augmente avec la durée de l'ischémie. Pour le deuxième point, il a été démontré que la taille de l'infarctus est proportionnelle à la taille de la zone à risque (Wagdy and Christian 1996). Concernant la demande métabolique, cette dernière a également été impliquée dans de nombreuses études où plus la demande métabolique en O₂ était forte, plus le déséquilibre était fort et plus la taille de l'infarctus était grande (Christian, Schwartz et al. 1992). Il est intéressant de noter que cette demande métabolique est déterminée par des paramètres hémodynamiques incluant le rythme cardiaque et la tension sur la paroi (*wall tension*) et la contractilité du tissu (Reimer, Jennings et al. 1985). Enfin, le système collatéral a été inversement corrélé à la taille de l'infarctus. En d'autres termes, plus ce système est développé, plus la taille de l'infarctus sera diminuée. Chez l'homme, son importance bénéfique a déjà été démontrée il y a plus de 20 ans (Cohen and Rentrop 1986).

1.1.3 Reperfusion

1.1.3.1 Définition

La reperfusion est l'action de rétablir la circulation sanguine au niveau du tissu ischémique. Comme démontré plus haut, les dommages tissulaires et donc la taille de l'infarctus augmentent avec le temps d'ischémie. Le moyen le plus efficace pour réduire les dommages ischémiques est donc de reperfuser le tissu le plus rapidement possible par

thrombolyse, pontage cardiaque ou angioplastie coronarienne transluminale (Ginks, Sybers et al. 1972; Maroko, Libby et al. 1972). Cette pratique a démontré, chez le chien, une réduction de la mortalité associée à cette occlusion coronarienne (Baughman, Maroko et al. 1981; Lavalley, Cox et al. 1983).

Cependant, les effets bénéfiques de la reperfusion s'accompagnent de nombreux effets délétères pour le myocarde (si le temps d'ischémie est supérieur à 20 minutes mais inférieur à 3 heures). Ces phénomènes, appelés lésions de reperfusion, ont fait l'objet de très nombreuses études (Becker and Ambrosio 1987; Park and Lucchesi 1999), où il a été montré que ces lésions pouvaient augmenter la taille de l'infarctus lors de la période de reperfusion.

1.1.3.2 Lésions de reperfusion

En effet, la taille de l'infarctus augmente avec la durée de la période de reperfusion. Des travaux menés chez le chien par de Lorgeril et coll, ont montré que la taille de l'infarctus augmente de 33 % entre la troisième heure et la sixième heure de reperfusion (de Lorgeril, Rousseau et al. 1990). On a classifié les lésions de reperfusion en deux types : non létales ou létales.

1.1.3.2.1 Lésions de reperfusion non létales

Ces lésions, qui n'entraînent pas une augmentation de la taille de l'infarctus lors de la période de reperfusion, comprennent principalement la sidération (*stunning*) myocardique ainsi que les arythmies de reperfusion (Opie 1992).

1.1.3.2.1.1 La sidération myocardique

Au moment de la reperfusion survient la phase réactive hyperémique où une augmentation du débit sanguin coronaire est observée. Cette phase est associée à une récupération partielle de la capacité contractile du tissu myocardique. Après quelques minutes de reperfusion, le débit coronarien revient à la normale mais le défaut contractile

du tissu persiste et peut même se détériorer. Ce phénomène prolongé mais réversible est appelé myocarde sidéré (*stunning* myocardique) (Heyndrickx, Millard et al. 1975; Braunwald and Kloner 1982). Il peut être également défini comme une dysfonction mécanique post-ischémique qui persiste après la reperfusion en dépit de l'absence de dommages irréversibles. Cette dysfonction du tissu myocardique viable est complètement réversible mais peut durer des heures, des jours, voire des semaines (Bolli 1992).

Les mécanismes impliqués dans cette dysfonction sont nombreux et aucun consensus n'est encore clair quant à la pathophysiologie de ce mécanisme (Gowda, Khan et al. 2004). En effet, au début des années 1980 fut mise de l'avant l'hypothèse de la diminution de la production d'ATP au niveau du tissu sidéré (Ellis, Henschke et al. 1983). Toutefois, rapidement de nombreux modèles ont montré un niveau normal de phosphocréatine dans le tissu sidéré (Guth, Martin et al. 1987). De nombreuses autres théories ont été abandonnées au cours des trente dernières années (Bolli and Marban 1999). Cependant, deux hypothèses persistent. La première implique le stress oxydatif qui est associé à la production de radicaux libres. La seconde est reliée à la théorie du calcium. Toutefois, une interrelation entre les EROs (espèces réactives de l'oxygène) et le Ca^{2+} est aussi envisageable (Opie 1992).

La source première de radicaux libres au niveau du myocarde sidéré est la xanthine oxydase (Charlat, O'Neill et al. 1987). L'action dépressive de la capacité contractile des radicaux libres a été montrée in vivo et in vitro (Bolli 1990). Le sarcolème semble être une cible de ces espèces réactives. En effet, les EROs interfèrent avec le transport de calcium au niveau du sarcolème (Hearse 1991) en interférant avec l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et la pompe Na^+/K^+ ATPase. Cette observation montre qu'une production excessive d'EROs peut résulter en une augmentation de l'influx calcique. Enfin, les EROs ont aussi été montrées comme capables d'endommager le réticulum sarcoplasmique (Hearse 1991). Les EROs peuvent également causer des dommages aux myofilaments, diminuant ainsi leurs réponses au calcium (Suzuki, Kaneko et al. 1991). Ces éléments, en touchant des points clés du

mécanisme physiologique de la contraction, convergent vers la même notion d'altération de cette capacité musculaire.

L'hypothèse calcique est impliquée dans de nombreuses théories. Cependant, on remarque une désensibilisation des myofilaments au calcium ainsi qu'une perte de myofilaments. Gao et coll. ont démontré une réponse contractile réduite pour une même quantité de calcium dans le tissu cardiaque sidéré (Gao, Atar et al. 1995). Dans ce mécanisme, les EROs semblent être impliquées.

La pathophysiologie de la sidération myocardique apparaît comme complexe et n'a pas encore été élucidée.

1.1.3.2.1.2 Arythmies de reperfusion

Les arythmies peuvent survenir dès les premières secondes après la reperfusion et ont été mises en évidence chez de nombreuses espèces, y compris l'homme (Goldberg, Greenspon et al. 1983). Les arythmies de reperfusion sont différentes électrophysiologiquement des arythmies de l'ischémie. Sont impliqués dans ce mécanisme : 1) les EROs, 2) la perturbation de l'équilibre calcique et potassique, 3) la stimulation des récepteurs adrénergiques et 4) une augmentation du niveau AMPc (Petrich and Schanne 1996). Il a été montré que la présence d'arythmies de reperfusion n'entraînait pas l'augmentation des dommages (de Lorgeril, Basmadjian et al. 1990). La taille de l'infarctus n'est donc pas modifiée par ce phénomène mais les arythmies peuvent provoquer une fibrillation ventriculaire et entraîner la mort.

1.1.3.2.2 Lésions de reperfusion létales

Ces lésions entraînent la mort des cellules et du tissu encore viable au moment de la reperfusion. Ces événements létaux peuvent être causés par plusieurs phénomènes (Karmazyn 1996) : 1) l'accumulation de neutrophiles, 2) l'accumulation de plaquettes, 3) la surcharge calcique, 4) le stress oxydatif (radicaux libres) et 5) l'apoptose.

1.1.3.2.2.1 Neutrophiles

Les neutrophiles sont une composante majeure de la réponse inflammatoire contribuant aux lésions de reperfusion (Lautsch 1979). La migration de ces neutrophiles vers le lieu de l'ischémie constitue la première étape d'une suite d'événements qui culminera en la réorganisation du tissu myocardique et laissera un tissu cicatriciel. L'infiltration des neutrophiles au niveau de la zone ischémique facilite le remplacement de cette zone nécrotique en stimulant et en faisant la promotion de son élimination par les macrophages. Après élimination de ces débris tissulaires, les fibroblastes envahissent la zone infarctée et démarrent la formation d'un tissu cicatriciel riche en collagène en lieu et place de la zone nécrotique (Lautsch 1979).

Des études histologiques ont suggéré un lien entre la durée de l'ischémie, la taille de l'infarctus et l'accumulation de neutrophiles tissulaires. Dans ce contexte, en utilisant un sérum antineutrophile, des études ont démontré que la diminution de l'accumulation de neutrophiles dans le myocarde résultait en une diminution de la taille de l'infarctus (Romson, Hook et al. 1983; Simpson, Todd et al. 1988). De Lorgeril et coll. ont également démontré l'importante accumulation de neutrophiles dans les régions ischémiques lors des premières heures de reperfusion, alors que dans les régions non ischémiques, cette accumulation était très faible, voire nulle (de Lorgeril, Rousseau et al. 1990). Dans un modèle canin d'ischémie reperfusion, ce même groupe a montré que le taux d'accumulation de neutrophiles était maximal durant les six premières heures de reperfusion et que ce niveau revenait à la normale vers la vingt-quatrième heure. Cette cinétique d'accumulation est parallèle à la cinétique d'augmentation de la taille de l'infarctus, suggérant un lien entre les deux événements.

La migration et l'accumulation des neutrophiles font tout d'abord partie d'un mécanisme qui répond à une agression : l'ischémie ou la libération de substances chimiotactiques. Cependant, une augmentation des dommages myocardiques est contemporaine à ce mécanisme de réparation et de réorganisation du tissu infarcté. Une fois

stimulés, les neutrophiles relâchent une grande quantité de radicaux libres (anion superoxyde, radical hydroxyle). Ces derniers dégradent les macromolécules extracellulaires, attaquent les phospholipides membranaires et contribuent à la mort des cellules (Del Maestro, Thaw et al. 1980). De plus, les neutrophiles relâchent également des enzymes lysosomiales, entraînant la rupture et la liquéfaction des tissus infarcis et viables (en bordure) (Weissmann, Smolen et al. 1980). Enfin, les neutrophiles déclenchent la relâche de l'acide arachidonique par les phospholipides membranaires. Ce dernier est converti par les lipoxygénases en un puissant chimioattractant, l'acide hydroxy-eicosatétraenoïque (HETEs) (Snyderman and Goetzl 1981). Cette molécule va entretenir la boucle d'accumulation et du recrutement des neutrophiles au lieu de l'ischémie.

1.1.3.2.2 Plaquettes

Le phénomène d'activation, d'adhésion et d'agrégation plaquettaire dans les lésions de reperfusion fut démontré il y a plusieurs années (Schafer and Handin 1979). Dans les minutes qui suivent la reperfusion, les plaquettes sont recrutées sur le lieu de la zone infarctée chez le primate (Leinberger, Suehiro et al. 1979) ainsi que chez l'homme (Haerem 1978). Les plaquettes activées, via l'agrégation plaquettaire et la relâche de thromboxane A2 peuvent contribuer à l'occlusion des vaisseaux coronariens (Coker, Parratt et al. 1981). Ces mêmes mécanismes plaquettaires ont également été impliqués dans la génération d'arythmie (Swies, Omogbai et al. 1990).

Le rôle des plaquettes apparaît comme complémentaire et concomitant à celui des neutrophiles. Cependant, il est important de souligner les travaux de Bednar et coll. qui ont démontré que cette accumulation plaquettaire (au site infarcté) est secondaire et dépendante de l'étape d'accumulation des neutrophiles (Bednar, Smith et al. 1985). En effet, lors d'une neutropénie induite dans un modèle d'ischémie reperfusion, l'accumulation des plaquettes était significativement réduite en comparaison au groupe témoin. D'autre part, afin d'évaluer ce rôle des plaquettes, Jolly et coll. ont induit une thrombocytopénie dans un modèle canin d'ischémie reperfusion et aucune différence significative au niveau de la

taille de l'infarctus n'a été observée (Jolly, Schumacher et al. 1985). Ceci suggère que les plaquettes circulantes ne sont pas l'élément déterminant de l'évolution de la taille de l'infarctus pendant la période de reperfusion.

Cependant, Rousseau et coll. ont mis en évidence qu'en présence d'une sténose résiduelle (rétrécissement de la lumière du vaisseau) lors de la reperfusion, une thrombocytopénie réduisait la taille des dommages induits au myocarde (Rousseau, Hebert et al. 1993). D'autre part, ce même groupe a démontré qu'une neutropénie en combinaison à la thrombocytopénie ne réduisait pas d'avantage les dommages. Au contraire, une thrombocytopénie sans sténose n'a pas permis de réduire la taille des dommages. Ceci suggère donc, que les plaquettes pourraient générer des dommages au myocarde lorsque la reperfusion survient en présence d'une sténose résiduelle (Rousseau, Hebert et al. 1993).

1.1.3.2.2.3 Surcharge calcique

Lors de la transition entre l'ischémie et la reperfusion, il y a un grand débalancement de l'homéostasie du calcium et ces changements ont des effets importants sur le dysfonctionnement du myocarde (Gross, Kersten et al. 1999). Shen et Jennings ont démontré que la reperfusion, à la suite d'un temps d'ischémie nécessaire pour induire des lésions irréversibles, était associée à une accumulation massive de calcium dans les cardiomyocytes. De plus, aucune accumulation calcique n'était observée durant la reperfusion, si la période d'ischémie était trop courte pour induire des dommages irréversibles (Shen and Jennings 1972; Shen and Jennings 1972). Ces expériences ont mis en évidence le rôle potentiel de cette accumulation calcique dans les lésions de reperfusion.

L'hypothèse calcique (Shen and Jennings 1972; Shen and Jennings 1972) suggère que l'ischémie induit une dérégulation de son calcium intracellulaire, qui en bout de ligne peut mener, lors de la reperfusion, à une accumulation toxique de calcium. Le glycolyx présent au niveau du sarcolème joue un rôle important dans la liaison au calcium et régule ainsi son entrée. À la suite d'une ischémie et donc d'une perte importante d'ATP, les sites

de liaison du calcium sur cette couche sont inopérants, ce qui facilite l'entrée massive de calcium dans le myocyte (Moens, Claeys et al. 2005).

De plus, le calcium est le seul ion à avoir un mécanisme de transport spécifique. Ce dernier entre dans la mitochondrie via un uniport électrogénique et est expulsé par un antiport $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Gunter, Buntinas et al. 2000). Précisons que cet antiport est saturable alors que l'uniport d'entrée, agissant comme un canal, n'est pas saturable (Opie 1992). Ces caractéristiques font que la mitochondrie, lors d'une augmentation de Ca^{2+} , ne peut réguler correctement son niveau de calcium intramitochondrial (matriciel), menant ainsi à une surcharge calcique (Gunter, Buntinas et al. 2000). Si cette surcharge est accompagnée de facteurs tels que ceux observés lors de l'ischémie reperfusion (stress oxydatif, haute concentration en phosphate et une faible concentration de nucléotides adénine, accumulation d'acide lactique), alors la mitochondrie subit une « perméabilité de transition » (Opie 1992). Dans ce cas, le port de la membrane intérieure mitochondriale, connu sous le nom de PTPm (pore de transition de perméabilité mitochondrial) s'ouvre. Cette ouverture va rendre la membrane mitochondriale non spécifiquement perméable à toutes molécules de moins de 1.5 kDa (Halestrap, McStay et al. 2002). La mitochondrie devient alors incapable de maintenir son pH, son gradient et son potentiel membranaire et enfin sa synthèse d'ATP. Ceci conduira à la perte métabolique et à la non-intégrité ionique de la cellule (Halestrap 2006) (Figure 1.2). Il apparaît clairement que les conditions pathologiques de l'ischémie reperfusion sont des conditions qui favorisent l'ouverture de ce port (Halestrap, Clarke et al. 2004).

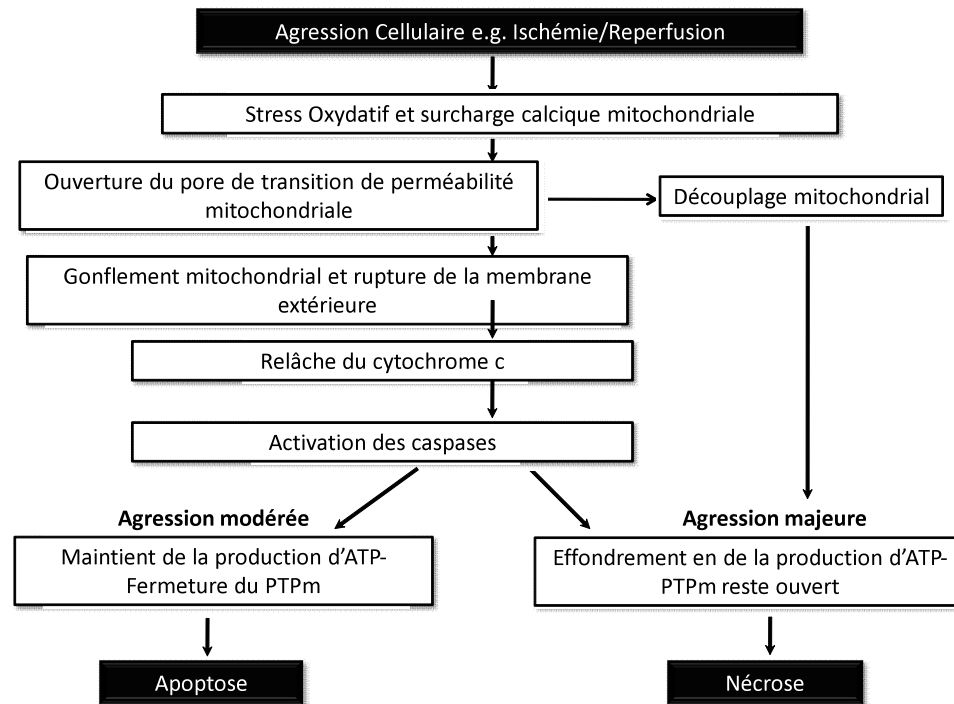


Figure 1.2 : Surcharge calcique et implication du PTPm dans la survie cellulaire, (adapté de (Halestrap et al, (2006))

1.1.3.2.2.4 Radicaux libres

Les radicaux libres peuvent être définis comme tout atome ou molécule, pouvant exister de manière indépendante avec un ou plusieurs électrons ne se présentant pas en paire sur son orbite externe. De par cette structure, ils sont très instables et hautement réactifs. La formation de l'anion superoxyde O_2^- est la première étape de formation des autres produits réactifs dérivés de l'oxygène (peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle ou peroxydinitrite) (Park and Lucchesi 1999). Il existe de nombreuses réactions et plusieurs mécanismes enzymatiques considérés comme sources de production des radicaux libres. Par exemple, le peroxydinitrite $ONOO^-$ est formé lors du contact entre l'anion superoxyde et l'un des éléments suivants : le NO relâché par l'endothélium, la xanthine oxydase (Rathaus and Bernheim 2002), la cytochrome oxydase mitochondriale, la voie de la cyclooxygénase, l'auto-oxydation des catécholamines (Jewett, Eddy et al. 1989) et la lipoxygénase. Enfin,

les neutrophiles lors de la relâche de leurs enzymes protéolytiques entraînent la relâche de peroxydite de façon massive. Ce dernier attaque l'endothélium vasculaire et stimule l'expression de molécules d'adhésion (Deisher, Garcia et al. 1993) et crée des lésions qui augmentent la perméabilité de l'endothélium (Svendsen and Bjerrum 1992).

Indépendamment de la source de production des radicaux libres, leurs effets délétères s'exercent quand le stress oxydatif dépasse le potentiel réducteur (antioxydant) de l'organisme. Soit ce dernier est dépassé, soit il est endommagé par le stress oxydatif. Des études utilisant un modèle canin ont révélé les premières évidences fondamentales, suggérant l'implication des radicaux libres dans les lésions de reperfusion. Lors de ces études, le modèle proposait un temps d'ischémie de 90 minutes suivi de 24 heures de reperfusion. Le SOD (*super-oxyde dismutase*, piègeur de radicaux libres), était administré soit avant l'induction de l'ischémie, soit 15 minutes avant le début de la reperfusion. Dans les deux cas, une diminution de la taille de l'infarctus était observée (Werns, Shea et al. 1985; Ambrosio, Becker et al. 1986). Dans le cas où ces administrations étaient effectuées 40 minutes après le début de la reperfusion, aucun effet protecteur n'était observé (Jolly, Kane et al. 1984). L'implication et la formation des radicaux libres ont également été démontrées et observées chez l'humain lors des différentes techniques de reperfusion : thrombolyse (Beard, Carrie et al. 1994), angioplastie coronarienne (Roberts, Young et al. 1990) et opération « à cœur ouvert » (Kim, Chung et al. 1994).

Cependant, de nombreuses équipes ont échoué dans leurs tentatives de démontrer l'implication de radicaux libres dans les lésions de reperfusion (Gallagher, Buda et al. 1986; Uraizee, Reimer et al. 1987). Des différences dans le protocole expérimental pourraient expliquer ces différences. En effet, en considérant le caractère hautement instable des radicaux libres, de faibles variations de protocole peuvent avoir des effets importants.

1.1.3.2.2.5 Apoptose

Au cours des dernières années, la pensée opposant fortement l'apoptose et la nécrose a beaucoup évolué pour devenir de plus en plus étroite et nuancée (Eefting, Rensing et al. 2004). L'apoptose se caractérise par une disparition cellulaire, sans activation d'un processus inflammatoire, basée sur la fragmentation de l'ADN et des organelles cellulaires. Cette mort cellulaire requiert de l'ATP (Buja 1998) ainsi que l'activation des caspases (Garg, Hofstra et al. 2003). Toutes ces caractéristiques seront détaillées au quatrième chapitre de cette thèse. La nécrose est, quant à elle, associée à une réponse inflammatoire, une détresse métabolique et une rupture de la membrane cytoplasmique entraînant le déversement du milieu intérieur de la cellule dans le milieu extérieur.

Il apparaît difficile, lors du processus de mort cellulaire, d'être catégorique sur le type de mort cellulaire subi par un groupe de myocytes. En effet, entre la nécrose et l'apoptose il existe un phénomène de continuum (Eefting, Rensing et al. 2004). De plus, un grand nombre de techniques différentes sont utilisées pour détecter le phénomène apoptotique. Cette diversité est source de variation des résultats et d'incertitudes (van Heerde, Robert-Offerman et al. 2000). Citons ici certaines techniques. D'abord, la microscopie électronique (chromatine et intégrité mitochondriale), puis la fragmentation de l'ADN par TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nickend labeling* ou encore *in situ end labeling* (ISEL)), ensuite le gel électrophorèse (échelle ADN), puis la coloration de l'Annexine V, puis encore la mesure d'activité de la caspase trois et enfin l'évaluation du potentiel membranaire mitochondrial, etc.

Il a été montré que la reperfusion mène, chez le lapin, à une augmentation de l'apoptose (Gottlieb, Burleson et al. 1994). La présence de cellules apoptotiques myocardiques était détectée après quatre heures de reperfusion, mais pas après 30 minutes d'ischémie, suggérant ainsi que l'apoptose était initiée par la reperfusion. Cette même observation fut réalisée sur un modèle canin d'ischémie reperfusion (Zhao, Nakamura et al. 2000). Néanmoins, il faut souligner que pour des modèles de rongeurs les conclusions étaient différentes. En effet, d'autres groupes ont montré que l'apoptose pouvait être initiée pendant l'ischémie et que ce processus était accéléré pendant la reperfusion (Fliss and

Gattinger 1996). De plus, dans un modèle d'ischémie global sur un cœur de rat isolé, il a été observé une fuite du cytochrome ainsi qu'une activation des caspases (dépendante du temps de l'ischémie) (Borutaite, Jekabsone et al. 2003). Ces différences ainsi observées, peuvent être attribuables aux différentes techniques et modèles utilisés (Eefting, Rensing et al. 2004).

La démonstration de l'apoptose comme conséquence de l'ischémie reperfusion et de son importance a entraîné de nombreuses tentatives d'intervention visant son blocage. Ces tentatives ont utilisé des outils pharmacologiques, (Verma, Maitland et al. 2002), des facteurs de croissance (Gao, Gao et al. 2002) ou encore des outils génétiques (Doevendans, Daemen et al. 1998). Un grand nombre de ces stratégies ont été concluantes sur les modèles animaux. Cependant, ces mêmes approches furent décevantes lors d'essais cliniques chez l'homme (Theroux, Chaitman et al. 2000). Ceci pouvant être expliqué par les différences physiologiques évidentes humains/animaux ou sur le moment de l'intervention.

Il apparaît donc que l'infarctus du myocarde provoque une mort cellulaire par nécrose lors de l'ischémie. Bien que de nombreuses évidences montrent que l'apoptose soit subséquente à la nécrose, ceci n'est pas encore clair en fonction du modèle animal utilisé. L'intérêt de réduire cette apoptose chez l'homme reste sans réponse; d'autres études sont encore nécessaires.

2 Chapitre 2 : La dépression

2.1 Définition et physiopathologie

De Kessler, a défini la dépression comme une maladie dévastatrice qui affecte 17 % de la population à un certain moment de leur vie. Il existe une composante génétique, mais des événements marquants et une vie stressante peuvent aussi mener à des épisodes dépressifs (Kessler 1997).

Selon le DSM IV TR (Manuel de diagnostic et statistique des troubles mentaux, 2000), la dépression se définit comme un état mental généralisé qui entraîne la perte de capacité à fonctionner dans la vie familiale ou professionnelle, et ce, pendant au moins deux semaines. Cette incapacité est due à des perturbations d'humeur, de sommeil, de concentration, d'estime de soi, d'appétit et d'énergie physique ou sexuelle. Il faut ajouter qu'au moins cinq des symptômes de la liste suivante doivent être observés dans les deux semaines précédant l'examen médical :

- Une humeur déprimée durant presque toute la journée, presque tous les jours;
- Une diminution d'intérêt ou de plaisir dans presque toutes les activités et tous les jours;
- Une perte ou un gain de poids significatif (plus de 5 %) en un mois;
- Une augmentation ou une diminution quotidienne de l'appétit;
- Une insomnie ou une hypersomnie journalière;
- Une agitation ou un retard psychomoteur presque quotidien;
- Une fatigue ou une perte d'énergie quotidienne;
- Une réduction de la capacité de réflexion, de concentration ou de l'indécision presque quotidienne;
- Des pensées récurrentes de mort, des idées de suicide sans plan spécifique.

La dépression n'est pas un état mental pessimiste dû à des événements difficiles de la vie. Elle est une pathologie réelle du système nerveux central, avec des mécanismes pathophysiologiques, des répercussions physiologiques et anatomiques sur de nombreux

organes du corps humain. En effet, la dépression est impliquée ou associée à de nombreuses maladies chroniques comme le diabète (Lustman, Clouse et al. 1998), les obstructions pulmonaires chroniques, ou encore l'arthrite rhumatoïde (Dunlop, Lyons et al. 2004). Cette implication croisée entre des maladies chroniques graves et cette pathologie dépressive, rend difficile l'identification de cette dernière comme facteur de risque ou comme conséquence. Ceci a pour effet de rendre le diagnostic et le traitement plus difficile à évaluer, d'une part en milieu hospitalier et encore plus au niveau ambulatoire (Katon and Sullivan 1990; Katon and Ciechanowski 2002).

Bien que les premières descriptions de la pathologie dépressive remontent à plus de 2000 ans (Sartorius 2001), elle reste largement incomprise. De plus, ce n'est pas avant la fin des années 1950 que le premier traitement chimique de la dépression a vu le jour, avec la découverte de la monoamine oxydase (MAO) et des antidépresseurs tricycliques (TCA). Les premières molécules chimiques ayant amélioré les symptômes des patients dépressifs, augmentaient les concentrations synaptiques des monoamines (sérotonine, dopamine, noradrénaline). Ceci mena à l'hypothèse monoaminergique (Schildkraut and Kety 1967; Omenn 1976). Cette hypothèse proposait comme base physiopathologique de la dépression, la baisse des niveaux centraux de noradrénaline et de sérotonine. Il est alors apparu des molécules qui augmentaient la sérotonine ou la transmission noradrénergique (Loomer, Saunders et al. 1957; Lehmann 1965). Cependant, bien que partie intégrante du processus pathophysiologique de la dépression, ces hypothèses ne suffirent pas à l'expliquer intégralement. S'ajoutèrent alors d'autres modèles et hypothèses (Hindmarch 2002) incluant, les récepteurs imidazoles, les neurotrophines, les phospholipides et l'axe hypothalamo-pituitaire thyroïde (HPT).

Les procédés d'imagerie par résonance magnétique (IRM) et de tomographie par émission de positons (TEP), ont été utilisés sur des modèles humains et animaux. Ils ont alors permis la mise en évidence de nombreux mécanismes et changements physiologiques, métaboliques (variations de débit sanguin, consommation de glucose) et anatomiques qui sont engendrés par la pathologie dépressive. En effet, des variations de volume de certaines

régions du cerveau ont été observées, (Sheline 2003) ainsi que des variations dans l'expression de certains récepteurs, notamment ceux de la sérotonine (Kuikka, Pitkanen et al. 1995).

Aujourd'hui la physiopathologie de la dépression implique trois systèmes fonctionnels centraux : 1) la neurotransmission, 2) l'activité du système limbique, 3) le système endocrinien.

2.1.1 La neurotransmission

Comme nous venons de le voir plus haut, trois molécules chimiques du système nerveux central sont impliquées dans la dépression (Elhwuegi 2004). Il s'agit de la sérotonine (5-HT), de la dopamine (DA) et de la noradrénaline (NA). Des variations de leurs niveaux peuvent avoir des répercussions sur l'équilibre psychologique du patient et participer à l'apparition de la pathologie dépressive (Schildkraut 1965). Sont également impliqués, les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT₂ ainsi que les récepteurs α 1-NA ou β -NA (Potter 1996), donnant lieu à l'élaboration de différentes classes d'antidépresseurs (Nutt 2002). Les études qui ont supporté l'implication de la sérotonine dans la dépression, provenaient de démonstrations pharmacologiques où la sérotonine atténuait la dépression (Blier 2003). Également, des études *post mortem* et du liquide céphalorachidien ont révélé, chez les suicidés ainsi que chez ceux qui ont fait des tentatives de suicide, de faibles concentrations de sérotonine et de son métabolite, l'acide 5-hydroxyindolacétique, (Anguelova, Benkelfat et al. 2003).

L'hypothèse des monoamines a également été supportée par l'observation que le traitement aux antidépresseurs (les trycliques et les inhibiteurs des monoamines oxydases) augmentait la concentration des monoamines à court terme (Duman, Heninger et al. 1997). L'action inhibitrice de ces molécules sur le transporteur de la sérotonine, a placé ce dernier au centre de la physiopathologie dépressive (Malison, Price et al. 1998).

Également, l'administration d'un inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine (ISRS), telle que la fluoxétine, est requise pour obtenir une désensibilisation maximale des autorécepteurs 5-HT_{1A} (Blier and de Montigny 1994). Ceci permet de restaurer la décharge normale des neurones de la sérotonine dans le noyau du raphé dorsal. L'internalisation associée à la désensibilisation des autorécepteurs 5-HT_{1A} est compatible avec le long délai (trois à plusieurs semaines) observé dans la réponse thérapeutique aux ISRS (Beer, Kennett et al. 1990). Ainsi, le traitement aigu avec la fluoxétine induit une internalisation des autorécepteurs dans le noyau du raphé dorsal et non dans l'hippocampe où se trouvent des hétérorécepteurs (Riad, Zimmer et al. 2004).

2.1.2 Altérations structurales

Plusieurs structures du système nerveux central sont impliquées dans la physiopathologie dépressive, particulièrement les structures préfrontales et limbiques. Ces circuits neuroanatomiques incluent : le cortex préfrontal ventromédian (VMPFC, impliqué dans la médiation de la douleur, l'agression, les fonctions sexuelles et les comportements alimentaires) ; le cortex préfrontal latéral orbital (LOPFC, impliqué dans l'évaluation du risque, modulation de l'état affectif) ; le cortex préfrontal dorsolatéral (DLPFC, maintenance des fonctions exécutives, de l'effort, de l'attention et de la mémoire) ; le cortex cingulé antérieur (ACC, impliqué dans la fonction cognitive et exécutive et l'évaluation de l'information émotionnelle et motivationnelle) ; le striatum ventral (incluant les noyaux accumbens) ; l'amygdale et l'hippocampe (impliqué dans la régulation de l'humeur, l'apprentissage et la mémoire contextuelle) (Maletic, Robinson et al. 2007). Des études mesurant les débits sanguins régionaux ont montré une hyperactivité des zones VMPFC et LOPFC et une hypoactivité du DLPFC (Drevets 1998) chez les patients souffrant de dépression majeure comparativement à des patients sains. D'autres études ont montré une diminution de la communication entre l'amygdale et la région ACC (Anand, Li et al. 2005) ou une diminution du volume de l'hippocampe chez le patient dépressif majeur en comparaison au groupe témoin (Videbech and Ravnkilde 2004). Toutes ces

modifications biochimiques, anatomiques et structurales peuvent influencer la physiopathologie de la maladie dépressive comme nous le verrons un peu plus loin dans cette thèse.

2.1.3 Système endocrinien

Un taux élevé de cortisol (hormone du stress), provenant de l'activation de l'axe HPA, est chez une certaine population de patients, une des caractéristiques des patients qui souffrent de dépression (Pariante 2003). Également, un taux élevé de cortisol a montré des effets négatifs sur la neuroplasticité, ainsi que sur la résilience cellulaire (Manji, Quiroz et al. 2003).

D'autre part, des études (utilisant la technologie de l'IRM) ont révélé des modifications structurales durables au niveau central (hippocampe, cortex préfrontal, etc.), chez des patients dépressifs (avec des taux de cortisol élevés) ou présentant des désordres mentaux (Manji, Quiroz et al. 2003).

Également, bien que la composante génétique de l'étiologie dépressive soit acceptée, des évidences ont souligné l'importance des facteurs de stress dans la mise en place de la dépression et des troubles de l'humeur chez les patients susceptibles. Cette implication du stress semble être en partie reliée à la propriété des glucocorticoïdes, d'exercer un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion des hormones de l'axe HPA, via les récepteurs des minéralocorticoïdes (RM) et des glucocorticoïdes (RG) au niveau de l'axe HPA (les RG sont également présents dans toutes les régions du cerveau), menant alors à une hypercortisolémie (Raison and Miller 2003). L'axe HPA est gouverné par la vasopressine et le CRH (*corticotropin-releasing hormone*) sécrétés par l'hypothalamus. Ces derniers activent la sécrétion de l'ACTH (Adrénocorticotropine hormone) par la tige pituitaire qui enfin stimule la sécrétion des glucocorticoïdes par le cortex de la glande surrénale (Figure 2.1) (Raison and Miller 2003). Ces glucocorticoïdes peuvent alors interagir avec leurs récepteurs présents dans de nombreux tissus, incluant l'axe HPA où ils sont responsables du rétrocontrôle négatif de la sécrétion de l'ACTH et du CRH. Les

glucocorticoïdes régulent de nombreuses fonctions, surtout le métabolisme énergétique et présente une action anti-inflammatoire et immunosuppressive (Jurueña, Cleare et al. 2004).

Lors d'un stress, il y a donc une diminution de la sensibilité des récepteurs aux glucocorticoïdes (GR). En effet, il a été observé, sous des conditions de stress chronique, que cette diminution de sensibilité empêcherait les récepteurs des glucocorticoïdes d'avoir un rétrocontrôle sur le premier signal initiateur au stress (diminution du rétrocontrôle négatif) (Raison and Miller 2003). Par la suite, l'hyperactivation de l'axe HPA et de l'amygdale vont mener à l'augmentation du signal sympathique. Ce dernier aura pour effet de favoriser la relâche des cytokines proinflammatoires (IL-1, IL-6 et TNF- α) par les macrophages, ceci contribuant également à la diminution de la sensibilité des récepteurs des glucocorticoïdes, perpétuant ainsi le dérèglement neuroendocrinien (Wieseler-Frank, Maier et al. 2005). Les cytokines proinflammatoires peuvent également interférer avec les signaux neurotrophiques et la neurotransmission monoaminergique, pouvant mener à des dommages gliaux et à la mort par apoptose des neurones (Raison, Capuron et al. 2006; Rajkowska and Miguel-Hidalgo 2007).

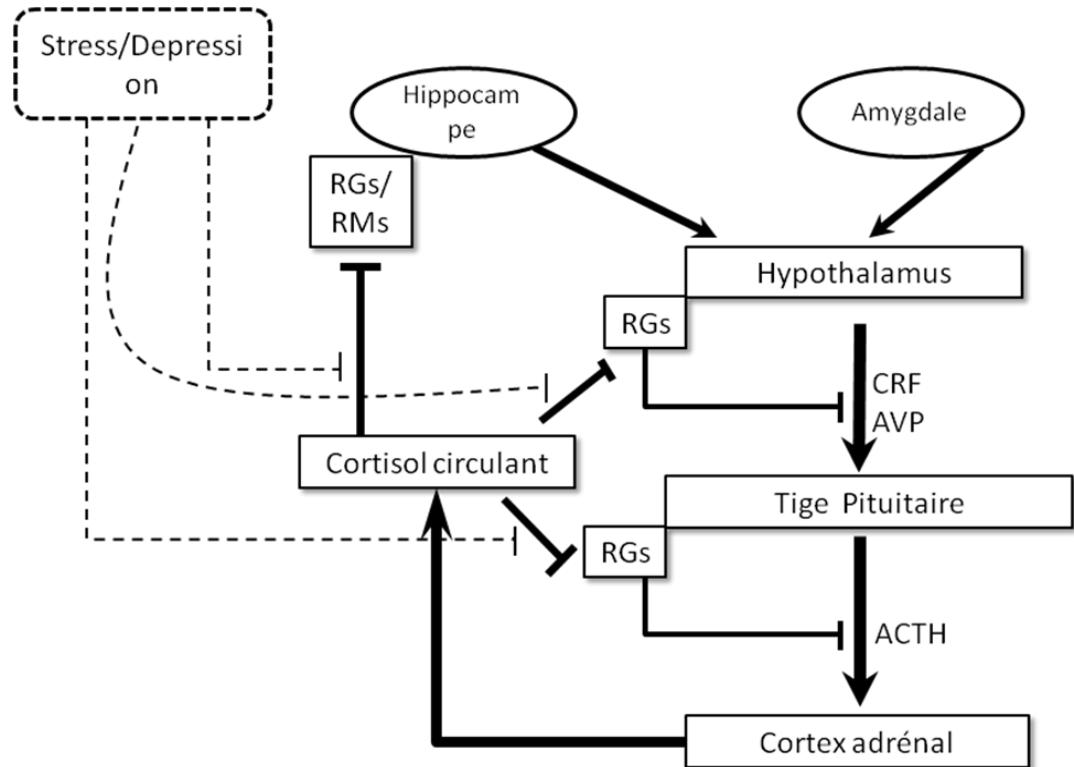


Figure 2.1 : Stress, axe HPA et rétrocontrôle négatif des RG du cortisol (adapté de Raison (2003))

2.1.4 Introduction au BDNF

Le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) est impliqué dans la neurogenèse, la maintenance cellulaire, la plasticité, la croissance et la mort cellulaire par apoptose. Le BDNF est la neurotrophine de l'hippocampe la plus abondante et est largement distribuée dans le cerveau de manière générale (Duman, Heninger et al. 1997; Tapia-Arancibia, Rage et al. 2004). Des études cliniques et précliniques ont suggéré que la dérégulation du BDNF survient sous des conditions de stress ou de dépression. Le niveau de BDNF est diminué chez les patients souffrant de dépression et qui ne reçoivent pas de traitement, en comparaison des patients dépressifs traités ou par rapport au groupe témoin

sans dépression (Shimizu, Hashimoto et al. 2003). La diminution de ce facteur de croissance a un impact négatif sur la structure, ainsi que sur le mécanisme fonctionnel du système limbique. Ceci pouvant résulter en des observations d'atrophie de l'hippocampe et que nous avons déjà soulevé plus haut. De plus, il est également intéressant de préciser que les antidépresseurs couramment utilisés dans le traitement de la pathologie dépressive, augmentent le niveau de BDNF cérébral (Gonul, Akdeniz et al. 2005). L'implication du BDNF sera plus détaillée à la section 2.1.7.

2.1.5 Hypothèse des cytokines

Bien que cette section soit traitée avec plus de détails ultérieurement dans cette thèse (section 6.2), il est d'ores et déjà intéressant de soulever quelques éléments de cette hypothèse. En effet, il a été supposé que certains types de dépression pourraient être causés par une augmentation importante de la sécrétion de cytokines (Dunn, Swiergiel et al. 2005). Également, la dépression a été observée comme un effet secondaire fréquent des thérapies utilisant les cytokines (e.g. hépatite C). Ces cytokines produisent alors des effets caractéristiques de la dépression tels que l'asthénie, la myalgie et des symptômes similaires à ceux de la grippe (Valentine, Meyers et al. 1998). Enfin, au niveau clinique, des troubles du comportement s'apparentant à la dépression ont été observés chez des patients traités avec de l'IFN et de l'IL-2 (Dunn, Swiergiel et al. 2005).

2.1.6 Système limbique

Le mot limbique vient du latin *limbus* et qui signifie : limites/bords. Ce terme a été décrit pour la première fois par Paul Broca en 1878. Depuis, sa définition a beaucoup évolué et ce sont les méthodes de TEP et d'IRMf qui ont permis d'identifier que ce système était intégré dans la gestion des émotions. Bien que l'amygdale apparaisse comme la région clé de ce système, les autres structures sont également impliquées dans la gestion de l'information reliée aux émotions et, de manière plus générale aux mécanismes reliés à l'apprentissage et de récompense, etc.

Ce système comporte différentes structures du système nerveux central. Le lobe limbique et toutes les structures qui lui sont connectées forment le système limbique. Ce système a un rôle prépondérant et essentiel dans la fonction viscérale, le comportement émotionnel, la mémoire et l'intégration des réponses homéostatiques (préservation de l'espèce, réponse de lutte ou de fuite) (Ter Horst 1999).

De part ses fonctions physiologiques, une atteinte à l'intégrité de ce système aurait des répercussions évidentes sur la survenue de la pathologie dépressive. De plus, considérant ses connexions anatomiques périphériques, ce système est étroitement relié au système cardiovasculaire.

Nous allons voir à présent les différentes composantes du système limbique.

2.1.6.1 L'amygdale

L'amygdale, dont la forme anatomique ressemble à une amande et a été identifiée par Burdach au début du 19^{ième} siècle. L'amygdale fait partie du système limbique et est située dans le lobe temporal médian. Elle est composée de plus de 13 noyaux (complexe amygdaloïde) et chacun de ces noyaux a des connexions avec les différentes structures du cerveau. Brièvement, ces différents noyaux sont classés en trois groupes (McDonald 1998) : 1) le groupe profond basolatéral ; 2) le groupe superficiel ou *cortical-like* ; et 3) le groupe centromédian.

2.1.6.1.1 Connexions afférentes et efférentes

Concernant les différentes connexions afférentes et efférentes de la structure amygdalienne, les connaissances viennent pour la plupart d'études où des traceurs ont été injectés, puis localisés au niveau des noyaux amygdaliens. Ceci a permis de mettre en évidence le fait que chaque noyau de l'amygdale reçoit et émet des informations de plusieurs régions distinctes du cerveau (Pitkanen, Pikkarainen et al. 2000). De manière générale, les informations afférentes sont séparés en deux groupes, celles provenant des structures corticales et thalamiques (informations des aires sensibles et de la mémoire) et

celles venant de l'hypothalamus ou du tronc cérébral (informations reliées au comportement et au système autonome) (McDonald 1998). De plus, l'amygdale reçoit des informations de nombreux autres systèmes : olfactif, somatosensitif, gustatif, viscéral, auditif et visuel (Scalia and Winans 1975; Shi and Cassell 1998).

Concernant les efférences, les structures amygdaliennes ont de nombreuses projections. De manière générale, celles-ci se rendent au niveau cortical, à l'hypothalamus et à la région du tronc cérébral (Sah, Faber et al. 2003).

De plus, il existe des connexions intra-amygdaloïde, intra ou internoyau (Krettek and Price 1978). Des études ont montré que l'information sensitive entrant dans l'amygdale par le noyau basolatéral, puis évoluait en se dirigeant vers la partie médiane, puis centromédiane (cette zone est considérée comme la station «émettrice») (Pitkanen, Savander et al. 1997).

De manière simplifiée, les informations proviennent de différentes régions dont l'hypothalamus, l'hippocampe, les cortex entorhinal et préfrontal, le système olfactif, le cortex sensoriel et le thalamus. Alors que les informations provenant de l'hypothalamus sont principalement perçues par la région de l'amygdale élargie, les autres régions projettent principalement vers le groupe nucléaire superficiel similaire au cortex (cortical-like) et le complexe basolatéral.

Le complexe amygdalien est réciproquement interconnecté à plusieurs régions subcorticales par la voie amygdalofugale ventrale et la strie terminale. Même si ces deux voies sont classiquement reconnues comme étant les voies les plus importantes, en réalité plusieurs connexions ne suivent pas ces voies (Freese and Amaral 2005).

Concernant le noyau basolatérale de l'amygdale, il est important de souligner qu'il projette directement au noyau accumbens et au cortex préfrontal médian (McGinty and Grace 2009).

2.1.6.1.1.1 Connectivité Subcorticale

L'amygdale, principalement via les noyaux basal et basal accessoire, envoie des informations au néostriatum (caudate et putamen) et au striatum ventral et ceci même si le striatum ne projette pas vers l'amygdale (Nauta 1962; Russchen, Bakst et al. 1985; Fudge, Kunishio et al. 2002). Au-delà du noyau basal, les neurones du cortex périamygdalien et de l'aire amygdalohippocampal projettent principalement vers les parties plus médiales et ventrales du caudate et putamen, alors que les projections du noyau latéral sont dirigées majoritairement vers les parties caudales du putamen ventral et de la queue du noyau caudal (Fudge, Kunishio et al. 2002).

Plusieurs noyaux de l'amygdale projettent vers le prosencéphale basal dont le noyau basal, le noyau basal accessoire et le noyau central (Price and Amaral 1981; Russchen, Bakst et al. 1985).

Les projections les plus importantes de l'amygdale vers le thalamus sont originaires du noyau basal (Aggleton and Mishkin 1984; Russchen, Amaral et al. 1987). Le noyau latéral, le noyau accessoire basal, le cortex périamygdalien et l'aire amygdalohippocampal contribuent également à ces projections (Aggleton and Mishkin 1984).

Les projections les plus substantielles de l'hypothalamus vers le complexe amygdalien sont originaires du noyau ventromédial et se terminent dans le noyau central (Amaral, Veazey et al. 1982). Le noyau ventromédial projette également vers le noyau basal, le noyau basal accessoire et le noyau médial de l'amygdale. De plus faibles projections existent également vers le cortex périamygdalien (Turner, Gupta et al. 1978), le noyau latéral du tractus olfactif et de l'aire amygdalien antérieur (Amaral, Veazey et al. 1982). Ces projections sont bilatérales mais les projections vers l'hypothalamus sont considérablement plus faibles (Amaral, Veazey et al. 1982). L'hypothalamus projette également vers le noyau médian de l'amygdale.

Finalement, le noyau central de l'amygdale envoie également un nombre significatif de fibres vers la substantia nigra, le noyau péripédonculaire, l'aire tegmental ventral, la

formation réticulaire mesencéphalique, le noyau de la commissure postérieure, le noyau raphé, le noyau cunéiforme, la médulla et le pont (Price and Amaral 1981; Price 1986).

2.1.6.1.1.2 Connectivité avec le système olfactif

Le système olfactif envoie des projections directes vers le noyau antérieur, le noyau du tractus olfactif et le cortex périamygdaloïde (Turner, Gupta et al. 1978). De façon réciproque, le noyau latéral du tractus olfactif et le cortex périamygdaloïde envoient des projections vers le bulbe olfactif (Amaral and Insausti 1992).

2.1.6.1.1.3 Connectivité avec l'hippocampe

Le complexe amygdalien est connecté avec l'hippocampe via le noyau basal accessoire et le noyau cortical postérieur (Aggleton 1986; Amaral 1986; Saunders, Rosene et al. 1988). Des projections du noyau basal, particulièrement de la partie parvicellulaire, innervent la région bordure du subiculum-CA1 (Amaral and Cowan 1980; Amaral 1986; Saunders, Rosene et al. 1988).

2.1.6.1.1.4 Connectivité avec le néocortex

L'amygdale projette vers le cortex frontal principalement dans les régions orbitofrontal et médiolatéral et dans une moindre mesure vers la région dorsolatérale (Amaral et Price 1984; Barbas et De Olmos, 1990; Baylis, Rolls et Baylis 1995; Ghashghaei et Barbas 2002). Les projections du cortex frontal vers l'amygdale est plus extensif et incluent plus de projection vers le noyau amygdalien que les projections de retour (Cavada et al 2002). La majorité des projections qui arrivent vers l'aire orbitofrontal cortical proviennent du noyau basal et dans une moindre mesure du noyau latéral et du noyau accessoire basal (Amaral and Price 1984; Barbas and De Olmos 1990; Ghashghaei and Barbas 2002). Le noyau basal projette également vers le cortex préfrontal médian (Amaral and Price 1984; Barbas and De Olmos 1990; Ghashghaei and Barbas 2002).

Les régions des noyaux latéral, basal, accessoire basal, médial, antérieur cortical, périamygdaloïde et de l'aire amygdaloïde antérieur projettent vers les régions superficielles et profondes du cortex insulaire (Amaral and Price 1984; Carmichael and Price 1995). Le cortex insulaire est impliqué dans le rythme cardiaque et dans le processus du goût.

La région du noyau basal projette également vers les cortex cingulé, pariétal (Amaral and Price 1984; Freese and Amaral 2005) alors que les régions latéral et basal accessoire projettent moins fortement vers ces régions.

2.1.6.1.2 Amygdale et troubles comportementaux

Les premières études qui ont examiné les effets des lésions du lobe temporal sur le comportement du singe, ont permis d'observer des changements marqués dans le comportement des animaux : absence de peur et de colère, augmentation de l'exploration, hypersexualité et perte de l'interaction sociale. (Klüver and Bucy 1997). Ces observations ont eu pour effet d'inclure les structures temporales, dont l'amygdale, dans le circuit de la gestion des émotions et des problèmes comportementaux associés (e.g. le syndrome de Klüver et Bucy). En effet, avant ces études, l'hypothalamus et ses connexions étaient définis comme le circuit majeur (Cannon 1987). Plus tard, cette structure et son activation ont été clairement associées à la dépression (Drevets 1999). Des augmentations du débit sanguin et du métabolisme du glucose ont été observées au niveau de l'amygdale chez les patients dépressifs. L'intensité de ces variations a été corrélée au degré de dépression et à la concentration plasmatique de cortisol (Drevets 1999).

De plus, le traitement avec des antidépresseurs ramène ces mesures à des niveaux observés chez les patients non dépressifs (Drevets, Bogers et al. 2002). Sheline et coll. ont également démontré que chez les patients dépressifs, il y avait une diminution du volume de l'amygdale par rapport aux patients sains (Sheline, Gado et al. 1998).

De manière générale, une compréhension complète de l'implication de l'amygdale et de ses structures dans les processus entourant les émotions est limitée par l'aspect abstrait et la nature même des émotions. En effet, toutes les études animales sont limitées

par notre incapacité à comprendre exactement comment ils se sentent. Bien que nos modèles et outils soient performants et validés, ils atteignent rapidement certaines limites. Ces raisons sont, en partie, celles qui ont poussé de nombreux groupes de recherche à s'orienter vers l'étude de la peur. En effet, la peur entraîne un très grand nombre d'effets autonomes et hormonaux plus facilement mesurables. La réponse de peur inclut la cessation de mouvement, la transpiration, le changement du rythme cardiaque, de la pression sanguine et la sécrétion d'adrénaline. Cette réponse est la même chez l'homme et chez l'animal (Lang, Davis et al. 2000). Les différentes études ont rapporté l'implication de l'amygdale dans la gestion et la réponse de peur (Adolphs, Tranel et al. 1998; Wilensky, Schafe et al. 2006).

L'amygdale serait également impliquée dans l'augmentation de la vigilance en affaiblissant le seuil neuronal des systèmes sensoriels. Ceci surviendrait via l'activation des neurones cholinergiques dans le cerveau antérieur basal qui affaiblissent les seuils de réponse des aires corticales sensorielles à travers la libération de l'acétylcholine (Metherate and Ashe 1991). De plus, l'activation des neurones cholinergiques, dopaminergiques, sérotoninergiques et noradrénergiques dans le tronc cérébral peut avoir des grandes influences sur les transmissions sensorielles et motrice thalamique et sous thalamique (Whalen, Rauch et al. 1998). Le rôle de l'amygdale dans la modulation des niveaux de vigilance en réponse à l'incertitude a des implications importantes pour l'étude de la psychopathologie humaine. L'hypervigilance est par exemple un symptôme clé du trouble de l'anxiété ; l'anxiété pathologique peut ne pas être un trouble de la peur mais un trouble de vigilance. En effet, les études de neuro-imagerie impliquent l'amygdale dans les troubles psychiatriques tels que l'anxiété (Rauch, van der Kolk et al. 1996) et la dépression (Drevets, Videen et al. 1992).

Enfin, la structure amygdalienne est impliquée dans les processus d'apprentissage et de mémorisation, ainsi que dans la consolidation de l'information en lien avec les émotions (McGaugh, Cahill et al. 1996).

2.1.6.2 Hippocampe

L'hippocampe fait partie du système limbique. C'est une structure bilatérale et symétrique, située dans la face médiane du lobe temporal. L'hippocampe est constitué du corps godronné, de la corne d'Amon (subdivisée en 3 parties : CA1, CA2 et CA3) et des structures para-hippocampiques (subiculum et cortex entorhinal).

Au niveau des connexions internes à la structure, le flux d'informations à travers l'hippocampe est unidirectionnel et est organisé de manière lamellaire. La voie principale excitatrice implique quatre groupes de neurones : 1) les *cellules pyramidales* du cortex entorhinal qui envoient leurs axones et forment alors la voie perforante vers le corps godronné ; 2) les *cellules granulaires* ; 3) les axones des cellules granulaires, les *fibres moutasses*, qui contactent les cellules pyramidales du CA3 et qui à leur tour envoient des axones appelés ; 4) les *collatérales de Schaffer* à travers le stratum pyramidale vers l'aire du CA1. Ces derniers neurones envoient leurs projections hors de l'hippocampe vers le subiculum, qui contacte en retour le cortex entorhinal, formant ainsi une boucle anatomique. Outre cette voie trisynaptique, d'autres régions de l'hippocampe sont également contactées par le cortex entorhinal, telles que le CA1 et le CA3, ainsi que le subiculum (Andersen, Bliss et al. 1971).

Concernant les connexions externes de l'hippocampe, il est intéressant de noter que l'hippocampe reçoit des afférences majoritairement de quatre régions (Amaral and Witter 1989) : l'hippocampe controlatéral, le cortex entorhinal, l'aire du septum médian et différents sites du tronc cérébral. Précisions que concernant les afférences du tronc cérébral, les zones telles que le noyau du raphé (sérotoninergique) ont une action inhibitrice sur les cellules pyramidales du CA1, du CA3 et du Gyrus dentelé. De plus, le *Locus Coeruleus* (noradrénergique) a une action inhibitrice sur les zones du *stratum lacunosum moleculare* du CA1, CA3 et GD (via le cortex rétrospinal).

La principale voie efférente de la structure est le fornix. Les neurones pyramidaux y sont concentrés et se projettent vers des structures de l'encéphale et du diencéphale, telles

que le noyau accumbens, la formation réticulée et le tronc cérébral (Swanson and Cowan 1977). Le thalamus, l'amygdale et le cortex préfrontal sont également reliés à la structure hippocampale.

De part ses nombreuses connexions, l'hippocampe se trouve être un carrefour et reçoit un grand nombre d'informations spécialisées (des différentes modalités sensorielles) (Amaral and Witter 1989). Ceci lui confère donc, de nombreux rôles et fonctions. L'hippocampe est impliqué dans la mémoire mais ne semble pas être le siège des souvenirs. Cependant, il prend part dans la formation des souvenirs. Enfin, il est impliqué dans la mémoire explicative ou déclarative, par opposition à la mémoire du savoir-faire (procédurale).

Ces dernières années, de nombreuses études ont mis en évidence un lien entre la neurophysiologie de l'hippocampe et les troubles du comportement telle que la dépression. En effet, chez les patients dépressifs, le volume de l'hippocampe est diminué (Sheline, Wang et al. 1996). Cette diminution pourrait être la conséquence d'un remodelage incluant la perte et le retrait des dendrites, la diminution de la neurogenèse dans le GD ainsi que la perte des cellules gliales (Malberg, Eisch et al. 2000; Rajkowska 2000). D'autre part, l'augmentation de molécules du stress, telle que le cortisol, responsable de la perte de rétrocontrôle de l'activation de l'axe HPA (désensibilisation des récepteurs des glucocorticoïdes) serait impliquée lors de ces modifications anatomiques (Rogatsky, Trowbridge et al. 1997). Ce mécanisme (perte de rétrocontrôle) a également montré un impact négatif sur la production de BDNF et qui pourrait également avoir un impact sur la diminution de volume observée (Cosi, Spoerri et al. 1993).

Au niveau des modèles expérimentaux, il a été observé que l'action des antidépresseurs pourrait avoir un effet neuroprotecteur en augmentant la neurogenèse (Young 2002). En effet, les antidépresseurs augmentent les taux de BDNF au niveau du GD et du CA3 (MacQueen, Ramakrishnan et al. 2003) (l'action du BDNF sera plus détaillé section 2.1.7). D'autre part, les traitements à long terme aux antidépresseurs jouent sur le

système des monoamines et augmentent l'activité de l'adénylate cyclase, de l'AMPc et de CREB au niveau du CA1, CA3 et GD (Young, Bakish et al. 2002); l'AMPc et CREB étant impliqués dans la neuroprotection et la survie neuronale (Castren, Voikar et al. 2007).

Enfin, la technologie de tomographie à émission de positons (TEP) a permis d'étudier les débits sanguins régionaux ainsi que la consommation de glucose. Il a été montré que chez les patients dépressifs une augmentation des deux paramètres survenait en comparaison au groupe témoin. De plus, ces résultats étaient corrélés avec le score total du test de Hamilton Depression Rating Scale (Videbech, Ravnkilde et al. 2001; Videbech, Ravnkilde et al. 2002). Ces éléments suggèrent un rôle important de l'hippocampe dans la physiopathologie dépressive.

À présent, il est intéressant de voir comment la mémoire, l'hippocampe et la dépression sont liés. Lors d'une étude sur 726 patients souffrant de dépression, il a été montré que la dépression avait un impact négatif important sur la mémoire explicite déclarative, ainsi qu'un effet mineur sur la mémoire implicite de travail (Zakzanis, Leach et al. 1998) en comparaison aux patients sains.

Bien que ces nombreuses évidences soulèvent un fort lien entre l'hippocampe et la physiopathologie de la dépression, il est important de mentionner qu'un consensus général n'est pas encore établi (Kempermann 2002).

2.1.6.3 Hypothalamus

L'hypothalamus est situé à la base du diencephale. Il est délimité à l'avant par le chiasma optique et à l'arrière par le thalamus. Il forme le plancher et les parois du troisième ventricule et est relié à l'hypothalamus postérieur par la tige pituitaire. La structure de l'hypothalamus se présente sous trois grands ensembles (Afifi 1998). Il y a d'abord, l'hypothalamus antérieur qui se situe au dessus du chiasma optique. Cette partie comprend les noyaux préoptiques périventriculaires, médians et latéraux, ainsi que le noyau suprachiasmatique. Puis, il y a l'hypothalamus moyen se trouvant au dessus de la tige pituitaire. Cette deuxième structure comporte les noyaux arqués, ventromédians,

dorsomédians, paraventriculaires, périventriculaires et supraoptiques. Enfin, la troisième division, l'hypothalamus postérieur, inclut les corps mamillaires et ses noyaux ainsi que le noyau hypothalamique postérieur (Swanson and Sawchenko 1983).

Concernant les afférences de l'hypothalamus, ce dernier reçoit de l'information du noyau du faisceau solitaire (NFS, reliant l'information du nerf vague), de la formation réticulée du tronc cérébral, du fornix (information venant des structures limbiques telles que l'amygdale ou l'hippocampe), de la rétine (rythmes circadiens), des organes circumventriculaires (OCV) et des différents systèmes sensoriels (olfactif et visuel).

Concernant les efférences, il existe deux grands faisceaux de sortie (Afifi 1998). Tout d'abord le faisceau médian du télencéphale. Il connecte l'hypothalamus au tronc cérébral, à l'amygdale et au cortex cérébral (contrôle de la fréquence cardiaque et vasoconstriction). Ensuite, le deuxième système de sortie relie l'hypothalamus au mésencéphale (gestion des comportements simples et stéréotypés) et à l'éminence médiane, où les axones libèrent des hormones dans un système porte local qui véhicule le sang jusqu'à l'hypophyse antérieure ou adénohypophyse.

Il y a également de très nombreuses interconnexions entre les différents noyaux constituant l'hypothalamus. Principalement, il y a le tractus hypothalamo-hypophysaire reliant les noyaux supraoptiques et paraventriculaires de l'hypothalamus avec le lobe postérieur de l'hypophyse. Par ce tractus, sont transportées la vasopressine (ADH) et l'ocytocine. Il y a aussi le tractus tubérohypophysaire reliant les noyaux arqués et périventriculaires par où l'hormone de libération de corticotrophine (CRH) est transportée.

De manière générale, le rôle de l'hypothalamus est d'assurer le maintien de l'homéostasie, c'est-à-dire, le maintien des conditions internes constantes pour des conditions externes variables. De manière plus précise, chaque fonction effectuée par l'hypothalamus peut être associée à une ou plusieurs connexions anatomiques décrites ci-dessus. Comme nous venons de le voir, la relation hypothalamo-neurohypophysaire concerne l'ocytocine et la vasopressine (maintient de la pression artérielle). La relation

hypothalamo-adénohypophysaire concerne les fonctions de régulation des caractères sexuels (axe gonadotrope), de la température corporelle (axe thyroïdienne), de régulation face au stress (axe corticotrope), de la croissance de l'organisme (facteurs de croissance, axe somatotrope). L'axe lactotrope régule la croissance mammaire et la sécrétion de lait. Les noyaux dorsomédians et l'air hypothalamique latéral sont responsables du comportement alimentaire et de la sensation de soif, alors que les rythmes circadiens sont régulés par le noyau suprachiasmatique (Afifi 1998).

Le lien existant entre la pathologie dépressive et la structure hypothalamique implique l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien (HPA). En effet, d'importantes modifications de cet axe surviennent chez les patients dépressifs. Une augmentation importante du niveau sanguin de cortisol et de CRH a été associée à un dysfonctionnement de la régulation de l'axe HPA (désensibilisation des GR) (Carroll, Curtis et al. 1976; Nemeroff, Widerlov et al. 1984). Dans ce même contexte, il est observé que l'administration de certains antidépresseurs, a un effet régulateur sur ces niveaux hormonaux. Il est également intéressant de voir que ces antidépresseurs augmentent la transcription des récepteurs des glucocorticoïdes (RG, responsables du rétrocontrôle de l'axe HPA) (Pepin, Govindan et al. 1992). Les antidépresseurs augmenteraient les RG qui sensibilisent l'axe HPA à la rétroaction des glucocorticoïdes. De plus, au niveau clinique, il a été observé que l'action des antidépresseurs sur les récepteurs des glucocorticoïdes coïncidait avec leur action sur l'axe HPA (régulation du cortisol) et que ceci se produisait de manière contemporaine aux améliorations symptomatiques des patients dépressifs traités (Barden 1996; Barden 2004). Ces éléments placent donc fortement l'hypothalamus et l'axe HPA au centre de la physiopathologie dépressive.

Notons que chez le patient dépressif les variations de volume observées sur cette structure (diminution) semblent mettre en cause une diminution de la transcription du BDNF pouvant ainsi participer à son atrophie (Duman and Monteggia 2006).

2.1.6.4 Cortex préfrontal

Le cortex préfrontal est la partie antérieure des lobes frontaux situé en avant des cortex moteur et prémoteur. Le cortex préfrontal peut être divisé en trois aires (Krawczyk 2002) : 1) l'aire orbitofrontal (OFC) et ventromédiane (vm-PFC) ; 2) le cortex préfrontal dorsolatéral (dl-PFC) ; 3) le cortex cingulé antérieur et ventral.

Le cortex préfrontal est impliqué de manière générale dans les fonctions exécutives supérieures telles que la gestion et la planification (Rolls 1998). De manière plus précise, les zones OFC et vm-PFC sont impliquées dans le processus de décision avec rétribution (Fuster 1996; Rolls 1998; Miller and Cohen 2001).

La région dl-PFC possède un rôle critique dans le processus décisionnel et plus particulièrement en ce qui concerne les décisions qui nécessitent l'intégration de sources multiples d'information (Fuster 1996; Rolls 1998; Miller and Cohen 2001).

La région du cortex cingulé antérieur et ventral apparaît importante dans la prise de décision et la classification des options conflictuelles (Rolls 1998).

Concernant le rôle de cette région et son implication au niveau de la pathologie dépressive, de nombreux travaux d'imagerie ont été effectués et bien que certains résultats soient contradictoires (Steele, Currie et al. 2007), l'implication de cette région dans cette pathologie semble claire. Drevets et coll. ont mis en évidence l'association entre la survenue de la pathologie dépressive et l'augmentation du débit sanguin cérébral et du métabolisme au niveau du cortex orbitofrontal postérieur et cingulé rostral antérieur (Drevets 1999). Mayberg et coll., quant à eux, ont associé la dépression à une diminution de la fonction du lobe frontal et plus précisément du cortex préfrontal orbitofrontal, ventrolatéral et dorsolatéral (Mayberg 2003). Il apparaît alors que malgré des résultats pouvant présenter quelques variations, le cortex préfrontal présente indéniablement une implication dans la physiopathologie dépressive.

Egalement, des études d'imageries ont permis de mettre en évidence que des zones du cortex préfrontal présentaient des différences fonctionnelles et structurelles chez la population dépressive. Les zones du cortex préfrontal impliquées étaient les suivantes : le cortex préfrontal ventromédian qui module la douleur et les comportements alimentaires et sexuels et régule la réponse au stress (Ongur and Price 2000) ; Le cortex préfrontal orbital latéral dont l'activité est augmentée lors de la dépression et des stress post-traumatiques, il corrige et inhibe des réponses émotionnelles mal adaptées. (Davidson, Pizzagalli et al. 2002) ; Le cortex préfrontal dorsolatéral qui est impliqué dans le contrôle cognitif, la résolution des tâches complexes, une hypoactivité de cette région dans la dépression a été associée avec des manifestations neuropsychologiques de la dépression. (MacDonald, Cohen et al. 2000)

2.1.7 Implication du facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF)

Chez les patients dépressifs, dans les différentes régions du système limbique, on observe des changements de types métabolique ou anatomique. En effet, des études moléculaires chez les patients dépressifs, ont montré un lien entre la diminution de volume de l'hippocampe et la diminution de la quantité de facteur neurotrophique et neurogénique (Duman and Monteggia 2006). De manière intéressante, les antidépresseurs en administration chronique augmentent les niveaux de neurogenèse dans l'hippocampe et de facteurs neurotrophiques, diminuant ainsi les dommages décrits précédemment chez le patient dépressif (Dranovsky and Hen 2006). Ceci suggère un rôle important de ces facteurs neurotrophiques dans la dépression et plus particulièrement le BDNF.

Le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) appartient à la famille des NGF (*nerve growth factor*). Le NGF a été découvert en 1952 par Rita Levi-Montalcini (Levi-Montalcini and Hamburger 1951; Levi-Montalcini 1987; Aloe 2004). Le clonage du BDNF a élargi cette famille des facteurs neurotrophiques qui comprend également la neurotrophine 3 et 4/5 (NT-3 et NT-4/5) (Barde 1990).

Physiologiquement, les neurotrophines sont d'abord synthétisées en précurseurs protéiques (ou pro-neurotrophine) de 30 à 35 kDa, puis sont clivées par des pro-convertases sur des sites très conservés générant ainsi la protéine mature (Mowla, Farhadi et al. 2001). Ces neurotrophines ont le même nombre d'acides aminés (118-120), un poids moléculaire avoisinant les 12 kDa et environ le même point isoélectrique (9-10). Toutes les neurotrophines ont une structure commune et une structure variable qui détermine leur spécificité à leurs récepteurs et l'action biologique en découlant (Heumann 1994). Toutes les neurotrophines lient le récepteur p75^{NGRF}, (peu sélectif et faible affinité). Cependant, chacune se lie sélectivement (haute affinité) avec un récepteur kinase de la famille *trk* (Tropomyosine related kinase). NGF lie le TrKA, BDNF et NT-4 lient le TrKB et NT-3 lie le TrKC (et faiblement le TrKB) (Lee, Kim et al. 2001). Les membres de la famille TrK sont des récepteurs tyrosine kinase transmembranaires avec un domaine intracellulaire très conservé qui médient une voie de signalisation impliquant un contrôle via Ras de : Cdc 42/Rac/RhoG, les MAPK, la PI3K et la PLC gamma (Patapoutian and Reichardt 2001; Chao 2003).

La liaison du BDNF à son récepteur TrkB entraîne une dimérisation de ce dernier, suivie d'une phosphorylation et d'une activation des domaines tyrosine kinase intracellulaires. Ceci démarre alors la cascade de signalisations se terminant par l'effet biologique.

L'expression de l'ARNm ou les niveaux protéiques du TrkB, ont été retrouvés modifiés chez le rat au niveau de l'hippocampe ou du cortex dans plusieurs cas : après administration d'acide kaïnique (Goutan, Marti et al. 1998), après des lésions expérimentales cérébrales (Hicks, Zhang et al. 1998), après un traitement aux antidépresseurs (Saarelainen, Hendolin et al. 2003) et enfin après un stress répété (Nibuya, Takahashi et al. 1999). Ces expériences démontrent la sensibilité de ce récepteur aux conditions physiologiques.

Les souris *knock-out* du gène de BDNF ou du récepteur TrkB ne sont pas viables. Dans ce contexte, les études sur ce domaine ont inclus des modèles de souris KO hétérozygotes ou des modèles où la signalisation du BDNF ou du TrkB était altérée. Ces études ont montré que l'altération de la signalisation BDNF/TrkB ne menait pas à la dépression, mais que celle-ci amoindrissait la réponse comportementale aux antidépresseurs (Saarelainen, Hendolin et al. 2003; Chen, Jing et al. 2006). De plus, l'augmentation de la neurogenèse dans l'hippocampe est requise pour observer l'effet comportemental des antidépresseurs sur certains modèles animaux (Santarelli, Saxe et al. 2003). Cependant, sur des modèles de souris BDNF +/- et TrkB dominant négatif (Sairanen, Lucas et al. 2005), la survie des neurones immatures est fortement diminuée. De plus, dans ce même modèle de souris, l'augmentation de la survie des jeunes neurones, normalement observée par le traitement aux antidépresseurs, était bloquée.

Chez le rat adulte, l'ARNm de BDNF est exprimé dans l'hippocampe, le septum, l'hypothalamus, le cortex et dans les noyaux adrénergiques du tronc cérébral (Castren, Thoenen et al. 1995; Katoh-Semba, Takeuchi et al. 1997). La localisation immunohistochimique a révélé la présence de BDNF chez le rat dans le cortex cérébral, l'hippocampe, le prosencéphale basal, le striatum, l'hypothalamus, le cervelet (Kawamoto, Nakamura et al. 1996) et également dans le cortex pariétal et entorhinal, l'amygdale et dans le soma des noyaux (Wetmore, Cao et al. 1991). On voit donc que de manière générale le lieu d'expression de l'ARNm et de la protéine se recoupe. Cependant, pour certaines régions ce constat ne coïncide pas. Ceci peut s'expliquer par des niveaux d'ARNm ou protéique trop bas pour être détectés par les méthodes utilisées, ou alors la protéine pourrait être sécrétée ou transportée (transport antérograde ou rétrograde).

Le BDNF est donc impliqué physiologiquement durant la période fœtale, le développement et la vie adulte au niveau de la neurogenèse et de la plasticité neuronale. Des modifications du BDNF sont retrouvées dans de nombreuses pathologies telles que l'épilepsie (Isackson, Huntsman et al. 1991), la maladie d'Alzheimer (Hock, Heese et al.

2000), la maladie de Parkinson (Mogi, Togari et al. 1999) et la physiopathologie dépressive.

Également, il est intéressant de souligner que les antidépresseurs sont impliqués dans la régulation de la transcription de l'ARNm de BDNF (Figure 2.2) (Dias, Banerjee et al. 2003). En accord avec ce point, il a été observé que l'administration chronique d'antidépresseurs augmente le BDNF dans certaines structures du système limbique, telle que l'hippocampe (Nibuya, Morinobu et al. 1995). D'autre part, une diminution de BDNF a été observée chez les gens diagnostiqués de dépression sévère (Karege, Perret et al. 2002).

Enfin, le BDNF est également impliqué dans des fonctions dites « non neurotrophiques ». Le BDNF est impliqué dans la régulation du comportement alimentaire, dans les bienfaits associés à l'activité physique et également au niveau de la physiologie associée aux rythmes circadiens et du stress (Tapia-Arancibia, Rage et al. 2004).

Tous ces éléments font des neurotrophines des éléments essentiels de la physiopathologie du SNC et ici plus particulièrement, le BDNF et la dépression.

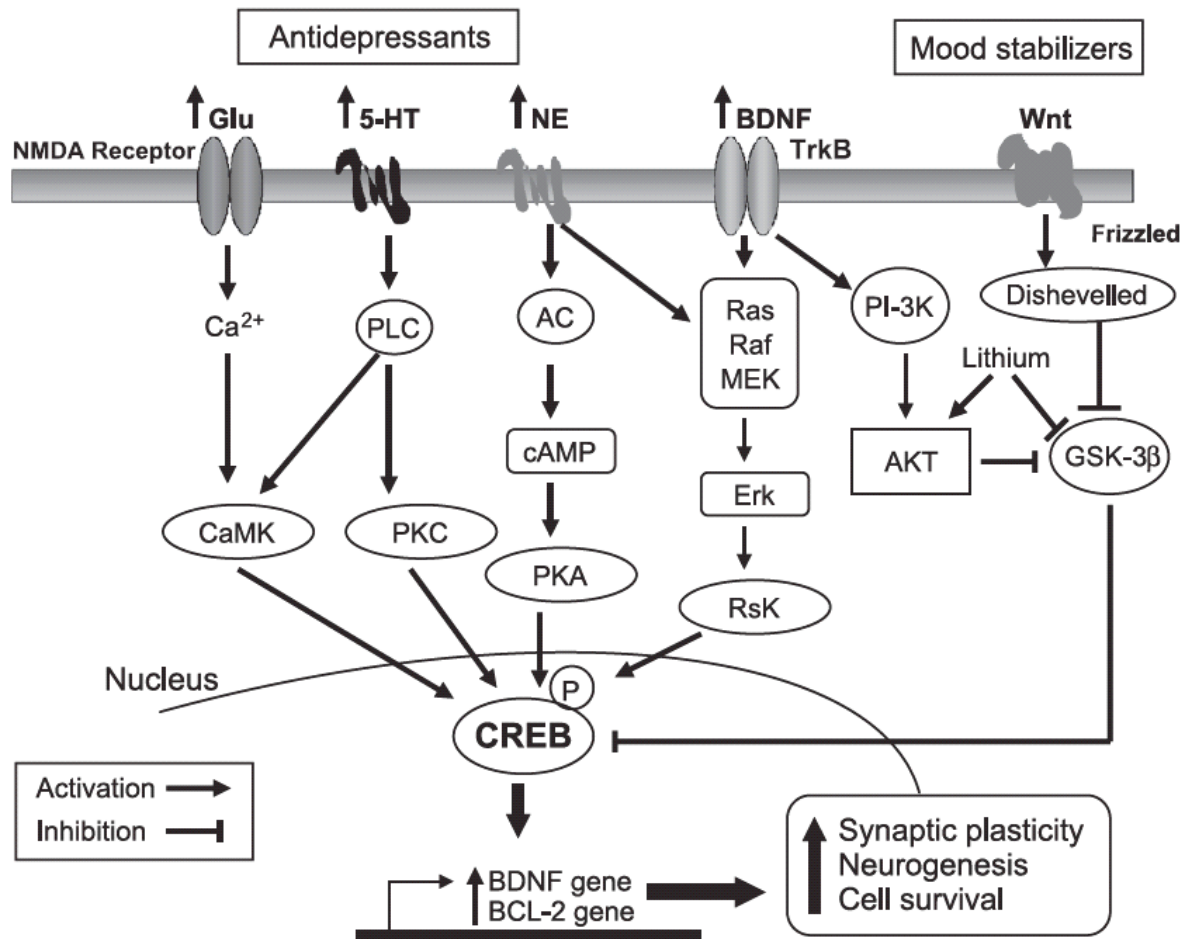


Figure 2.2 : Signalisation intracellulaire et implication des antidépresseurs et stabilisateurs d'humeur sur la régulation de la transcription du gène de BDNF (Tiré de Hashimoto (2004))

A présent, il est intéressant de soulever le lien existant entre cette pathophysiologie dépressive et le système cardiaque. En effet, les arythmies cardiaques, l'activité et l'agrégation des plaquettes, la variabilité du rythme cardiaque, les niveaux de noradrénaline (NA) plasmatique et l'hyperactivité de l'axe HPA sont tous des éléments qui ont été retrouvés affectés chez la population dépressive. Cela semble alors suggérer un lien entre ces deux systèmes. Dans la prochaine section, ce lien sera détaillé dans le cadre de la pathologie de la dépression post-infarctus.

2.2 Les modèles animaux de la dépression et les tests comportementaux

Il est difficile d'étudier tous les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la dépression humaine, d'où l'importance des modèles animaux. En considérant un modèle animal de la dépression, ou de n'importe quelle maladie observée chez l'homme, il est important de clarifier les buts poursuivis (McKinney 2001). Un modèle animal de la dépression peut par exemple être utilisé pour étudier les mécanismes biologiques à la base des symptômes et développer de nouveaux traitements (Nestler, Gould et al. 2002). On cherchera donc à répliquer en laboratoire un ou des facteurs étiologiques qui sont associés à la dépression chez l'homme et ensuite vérifier la présence d'un ou plusieurs des symptômes qui caractérisent la dépression. Parmi les symptômes de la dépression certains sont difficiles sinon impossibles à modéliser, par exemple les pensées suicidaires, la culpabilité ou le sentiment de dévalorisation alors que d'autres le sont plus facilement, comme la perte d'intérêt ou de l'anhédonie (Vaugeois, El Yacoubi et al. 2004). Il existe plusieurs modèles animaux et tests utilisés dans la recherche sur la dépression, et les plus utilisés sont décrits ci-dessous.

2.2.1 Les modèles animaux de la dépression

2.2.1.1 Le stress chronique

Plusieurs tests basés sur l'exposition des animaux à un stress non contrôlable ont été utilisés chez les rats (Willner 1997). En général, il a été beaucoup plus difficile d'établir des tests équivalents chez la souris. Dans le paradigme du stress chronique modéré, les rongeurs sont exposés à une variété de stress relativement modéré (perturbations du cycle lumière-obscurité, privation d'eau, inclinaison des cages, etc.), intermittent pour des périodes de temps relativement prolongées (par exemple plusieurs semaines). L'avantage de ce test est d'abord sa grande validité par ce qu'il implique des efforts naturels ; de plus

les animaux stressés montrent une réduction de préférence au sucrose et une variété de séquelles cardiovasculaires et neuroendocrines renversées par un traitement aux antidépresseurs à long terme dans certaines études (Nestler, Gould et al. 2002). Le désavantage majeur du modèle de stress chronique est sa faible reproductibilité (Nestler, Gould et al. 2002).

2.2.1.2 Bulbectomie

L'ablation bilatérale des bulbes olfactifs provoque des perturbations, qui sont dues d'une part, à la dégénérescence des fibres efférentes, comme les projections de l'acide γ -aminobutyrique (GABA), issues des corps cellulaires des bulbes olfactifs, vers les structures limbiques (Cairncross, Cox et al. 1979). D'autre part, ces perturbations sont dues à la dégénérescence des fibres afférentes, telles que les projections noradrénergiques et sérotoninergiques provenant respectivement du Locus Coeruleus et des noyaux du raphé du cerveau médian vers les bulbes olfactifs (Cairncross, Cox et al. 1979). Ces perturbations peuvent être, entre autres, biochimiques, physiologiques ou comportementales (Kelly, Wrynn et al. 1997). Cette chirurgie est réalisée selon la méthode de Van Riezen et Leonard (1990) et consiste à trépaner le crâne du rat d'environ 2 mm de diamètre au dessus des bulbes olfactifs, soit à environ 6 mm du côté rostral de Bregma ; les bulbes olfactifs sont ensuite aspirés, l'espace vacant est comblé avec du matériel stérile.

2.2.2 Les testes comportementaux

2.2.2.1 Test de préférence au sucrose (anhédonie)

Ce test a été utilisé pour reproduire l'anhédonie qui représente la perte d'intérêt ou de plaisir, un symptôme majeur dans une tentative de modélisation de la dépression. Plus spécifiquement, l'anhédonie a été définie comme une réduction de la prise du sucrose comparée au groupe témoin (Willner, Towell et al. 1987). Ce test consiste à permettre au rat d'avoir libre accès à deux bouteilles d'eau : une contenant l'eau plate et la deuxième une solution d'eau sucrée (1% de sucrose). La position des deux bouteilles est alternée chaque

jour pour éviter de créer une habitude. La prise hydrique est estimée en pesant les bouteilles chaque jour.

2.2.2.2 Test de la nage forcée (abandon)

Ce test également connu sous le nom de test de Porsolt est largement utilisé dans la recherche avec modèles animaux de la dépression, plus spécifiquement dans la détermination de l'efficacité des antidépresseurs (Porsolt 2000). Ce test consiste à placer un rat ou une souris dans une piscine remplie d'eau sans possibilité de s'échapper et de mesurer trois paramètres : le temps d'immobilité, le temps de nage et celui d'échappement. L'avantage du test de la nage forcée est la facilité avec laquelle on peut l'utiliser ; il fournit également un modèle utile qui permet d'étudier les mécanismes neurobiologiques et génétiques qui sous tendent les réponses au stress et aux antidépresseurs (Lucki 2001).

3 Chapitre 3 : La dépression post-infarctus du myocarde

En 1993, Lespérance et coll. (Frasure-Smith, Lesperance et al. 1993) ont suivi 222 patients pendant six mois après un infarctus du myocarde (IM). Ils ont alors observé que la dépression majeure était prédictive de la mortalité. La même observation était faite 18 mois plus tard (Frasure-Smith, Lesperance et al. 1995).

Les patients souffrant d'une dépression post-infarctus, présentent un risque de mortalité trois à quatre fois plus élevé que les patients ayant subi un infarctus du myocarde sans dépression (Ladwig, Kieser et al. 1991).

De manière intéressante, une relation étroite existe entre le niveau de dépression et le taux de mortalité observé après cinq ans (Lesperance, Frasure-Smith et al. 2002). Dans cette étude, 896 patients post-IM ont subi le test de mesure de la dépression BDI (*Beck depression inventory*) au moment de l'admission et après un an. Ainsi, une relation dose-réponse entre le score BDI et la mortalité cardiaque a pu être observée. Il a alors été révélé que le taux de mortalité cardiovasculaire était plus important chez les patient post-IM avec d'importants symptômes de dépression (haut score BDI) en comparaison avec les patients post-IM ayant un faible score BDI.

Lors d'une autre étude, Welin et coll. (Welin, Lappas et al. 2000) ont observé chez 275 patients de moins de 65 ans, ayant eu un infarctus du myocarde, que l'augmentation du risque de mortalité était associée au niveau de base de dépression. De plus cette relation était toujours présente 9 ans après l'IM, avec un rapport de risque de 3.16 et un intervalle de confiance à 95 % de (1.38, 7.25).

Lors d'une revue de la littérature, la prévalence de la dépression majeure chez le survivant de l'IM était d'environ 20 %. Cependant, cette valeur est très dépendante de la méthode d'évaluation utilisée pour déterminer le niveau de dépression (BDI ou HADS).

Également, il apparaît que si une deuxième maladie vient s'ajouter, cela complique davantage le dépistage et le travail du praticien. Bien que les lignes directrices pratiques en cas d'hospitalisation pour un IM recommandent l'évaluation du statut psychosocial, cet

examen approfondi de l'état psychologique n'est pas effectué systématiquement (Bush, Ziegelstein et al. 2005). Ces éléments rendent difficiles le dépistage et donc le traitement (Thombs, Bass et al. 2006). À ce propos, d'après le DSM IV, la pathologie dépressive est classifiée en trois catégories : 1) la dépression réactive (60 % des cas), 2) la dépression majeure dite endogène (25 %) ; 3) la dépression bipolaire affective (10-15 %). La dépression survenant après l'IM appartient à la première catégorie. Cependant, il n'existe pas de catégorie propre à cette pathologie qui présente pourtant des symptômes différents de la dépression dite « classique ». Ceci rend son dépistage et son traitement plus difficiles. Ce manque de considération pourrait provenir du fait que la dépression post-IM est souvent perçue comme un événement transitoire, logique et attendu suite à l'épisode de l'infarctus du myocarde.

Dans une approche inversée, une méta-analyse (onze études) a relevé la relation entre le score de dépression et la survenue de la maladie coronarienne sur une population n'ayant jamais eu d'infarctus du myocarde (Rugulies 2002). De manière intéressante, il a alors été montré qu'il y avait également une relation dose-réponse entre l'intensité des symptômes dépressifs et la survenue d'un premier problème cardiovasculaire.

Le ou les liens entre ces deux pathologies ne sont pas encore complètement connus. La question, malgré les évidences, reste toujours de savoir si la dépression est la cause ou la conséquence, ou encore si elle se retrouve seulement associée par le fruit du hasard (Lesperance and Frasure-Smith 2007). Cependant, certaines pistes méritent d'être ici développées. En effet, la dépression pourrait promouvoir des comportements se trouvant à être des facteurs de risque cardiovasculaire : tabagisme, faible activité sportive, mauvaises habitudes alimentaires, etc. (Lesperance and Frasure-Smith 2007).

Enfin, sur un autre aspect, la dépression post-IM ajoute à l'augmentation de la mortalité, à la diminution de l'observance au traitement, à l'augmentation de la comorbidité ainsi qu'à la plus grande utilisation du système de santé. Pour toutes ces raisons, cette pathologie représente un défi important (Musselman, Evans et al. 1998).

3.1 Dépression et maladie cardiovasculaire : Interface système limbique/système cardiovasculaire

Les arythmies cardiaques, l'activité et l'agrégation des plaquettes, la diminution de la variabilité du rythme cardiaque, l'élévation de la noradrénaline (NA) plasmatique et l'hyperactivité de l'axe HPA sont tous des éléments observés chez la population dépressive. Cependant, il est intéressant de voir lesquels apparaissent comme des marqueurs cliniques et contribuent à la vulnérabilité observée chez les patients dépressifs (Figure 3.1).

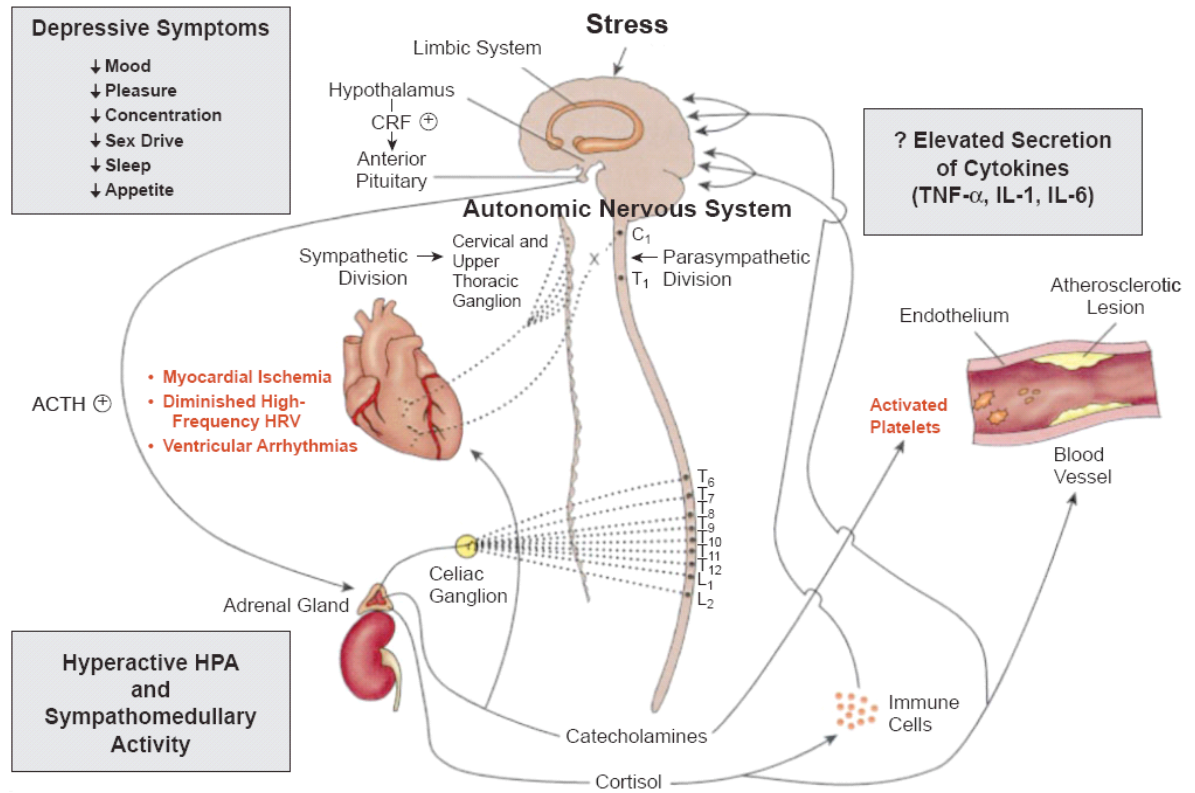


Figure 3.1 : Relation entre la dépression majeure et les maladies cardiovasculaires. Hypothèses des altérations pathophysiologiques, associées à la dépression, qui contribueraient à l'augmentation de la vulnérabilité aux maladies cardiovasculaires (tiré de Musselman et al (1998))

3.1.1 Mécanisme

3.1.1.1 Hyperactivité de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien et système sympatho-adrénergique

Comme évoqué plus haut, une des caractéristiques de certains patients dépressifs est l'hyperactivité de l'axe HPA. Cette dernière se caractérise par une augmentation de

l'hormone de libération de corticotropine (CRH) dans le liquide céphalorachidien, une diminution du rétrocontrôle négatif et une hypercortisolémie (section 2.1.3).

Également, des éléments ont souligné qu'une hyperactivité du système sympatho-adrénergique observée chez les patients dépressifs pouvait contribuer au développement des maladies cardiovasculaires. En effet, l'hyperactivité sympatho-adrénergique a été impliquée dans le développement des maladies cardiovasculaires à travers l'effet des catécholamines sur le cœur, les vaisseaux, les plaquettes, les facteurs hémodynamiques (la force de cisaillement), les lipides circulants et sur l'inhibition de la synthèse des eicosanoïdes vasculaires (Musselman, Evans et al. 1998).

Les patients souffrant de dépression majeure présentent souvent une dérégulation du système sympatho-adrénergique. Bien que la régulation de ce système ne soit que partiellement comprise, les neurones du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (différents de ceux impliqués dans la libération du CRH) envoient des signaux stimulateurs à de nombreux centres autonomiques impliqués dans la régulation de l'activité sympathique (Swanson, Sawchenko et al. 1983). Ces impulsions nerveuses des centres régulateurs du SNC contrôlent la relâche de catécholamines du système sympatho-adrénal.

Également, une augmentation du rythme cardiaque a été observée chez des patients dépressifs en comparaison aux patients non dépressifs. Ces patients dépressifs montraient également une élévation du taux plasmatique de NA et de sérotonine (Lechin, van der Dijs et al. 1995). De plus, l'hypersecretion de NA dans la dépression unipolaire a été documentée, celle-ci résultant en des taux élevés de NA plasmatique et de métabolites de la NA (notamment dans les urines) (Wyatt, Portnoy et al. 1971). Cependant, lors des traitements avec des TCA (antidépresseurs tricycliques) l'excrétion urinaire de NA et de ses métabolites diminuait et il en était de même pour les concentrations plasmatiques (Charney, Menkes et al. 1981; Linnoila, Karoum et al. 1982).

3.1.1.2 Réduction de la variabilité du rythme cardiaque

La variabilité du rythme cardiaque (HRV) est calculée avec la déviation standard de l'intervalle de temps entre deux ondes R de l'ECG. Elle reflète la balance et l'activité existante entre les systèmes sympathique et parasympathique au niveau cardiaque.

La différence entre deux ondes RR a été notée pour la première fois en 1965 par Hon et Lee. Depuis, cette valeur est un marqueur de mortalité cardiovasculaire à la suite d'un infarctus du myocarde ou dans des cas d'insuffisance cardiaque (Chattipakorn, Incharoen et al. 2007). Une diminution de la valeur de ce marqueur est associée à une augmentation du risque. En effet, un faible HRV suggère une activité sympathique excessive ou une modulation parasympathique inadéquate, soit les deux (Carney, Freedland et al. 2005). La régulation de ce marqueur est assurée, au niveau périphérique, par le nerf vague (cholinergique, parasympathique) et au niveau central par l'hypothalamus, le système limbique et le tronc cérébral. Cette régulation comprend alors des neurotransmetteurs, tels que l'acétylcholine, la NA, la sérotonine et la dopamine (Shields 1993).

Lors d'une étude clinique, 100 patients post-IM ont subi le test d'évaluation BDI afin d'évaluer leur niveau de dépression. Ces patients furent séparés en trois groupes selon leur niveau de dépression: 1) dépression majeure ; 2) dépression modérée ; 3) non dépressif (Drago, Bergerone et al. 2007). Il a alors été observé chez les patients dépressifs majeurs une augmentation du rythme cardiaque au repos, ainsi qu'une diminution significative du HRV en comparaison avec les patients sans dépression majeure (groupe 2 et 3). Il est intéressant de noter que le niveau de dépression n'était pas relié à la sévérité de la pathologie ischémique.

Il semble que la diminution du HRV corresponde principalement à une diminution de l'activité parasympathique. Ceci serait physiologiquement plausible et associable aux complications post-IM, telles que l'augmentation des arythmies ventriculaires et de la

pression artérielle ainsi que l'augmentation de la mortalité cardiovasculaire observée chez les patients dépressifs post-IM (Roose, Glassman et al. 1989).

Les antidépresseurs tricycliques, quant à eux, augmentent le rythme cardiaque et diminuent le HRV. En raison de leurs effets secondaires de type anticholinergique, ils constituent un choix inadéquat pour le patient à risque cardiovasculaire. À l'inverse, les inhibiteurs spécifiques de la recapture de la sérotonine (ISRS) semblent ne pas avoir ces effets « cardiotoxiques » et sont donc le traitement de choix de la pathologie dépressive. Dans une étude clinique (McFarlane, Kamath et al. 2001) un ISRS, la sertraline, s'est montré capable d'améliorer le HRV chez les patients dépressifs post-IM. Ces résultats étaient observés en comparaison avec ce même type de patient recevant un placebo.

3.1.1.3 Augmentation de la réactivité des plaquettes

Les plaquettes ont un rôle central dans l'homéostasie, la thrombose, le développement de l'athérosclérose et des syndromes coronariens (Lefkovits, Plow et al. 1995).

Markowitz et Matews (Markovitz and Matthews 1991) ont proposé qu'une réponse exacerbée des plaquettes (thrombose), à la suite d'un stress psychologique, pourrait contribuer au déclenchement d'accidents coronariens. En effet, il a été montré chez des patients dépressifs présentant des facteurs de risque ou avec des évidences cliniques de maladies cardiaques de type ischémique, que les plaquettes circulantes présentaient une activation accrue. Cette activation se traduisait par une augmentation des récepteurs GPIIb/IIIa (Musselman, Tomer et al. 1996), de la P-sélectine (Piletz, Zhu et al. 2000) ainsi qu'une dégranulation plus importante des plaquettes (Whyte, Pollock et al. 2001). Ces éléments étant des étapes essentielles du processus thrombotique.

L'effet des ISRS sur la fonction plaquettaire a été étudié en de nombreuses occasions (Maurer-Spurej 2005). Une diminution de la sécrétion plaquettaire en réponse à une stimulation au collagène a été observée avec un traitement à la sertraline (Markovitz, Shuster et al. 2000). Chez des patients présentant une dépression majeure, une diminution

significative du nombre de récepteurs GPIIb/IIIa et la sécrétion de facteur plaquettaire 4 (PF4) ont été observées suite à un traitement à la paroxétine (Musselman, Marzec et al. 2000).

Dans une autre étude sur les inhibiteurs spécifiques de la recapture de la sérotonine (ISRS), une activation plaquettaire accrue (augmentation de la sécrétion de PF4 et de B-Thromboglobuline) a été observée dans le groupe souffrant de maladies cardiovasculaires (MCV) et de dépressions, en comparaison des patients avec MCV non dépressifs ou en comparaison avec des patients sains (Laghrissi-Thode, Wagner et al. 1997).

Bien que les mécanismes responsables de ces observations ne soient pas complètement élucidés, il semble que les plaquettes joueraient un rôle dans l'augmentation de la mortalité observée chez les patients dépressifs ayant subi un infarctus (Musselman, Marzec et al. 2000). Cependant, précisons que lorsqu'activées, les plaquettes secrètent de la sérotonine. Il est important de souligner que la sérotonine est un agent activateur des plaquettes et un vasoconstricteur agissant via les récepteurs 5-HT₂ de l'endothélium des vaisseaux et des artères coronariennes (Weyrich, Solis et al. 1992). Cette même relation plaquettes/sérotonine, ainsi que sa dérégulation ont été impliquées dans la physiopathologie dépressive (Owens and Nemeroff 1994).

Enfin, les patients dépressifs démontrent une diminution du nombre de plaquettes circulantes, ainsi que du nombre de transporteurs sérotoninergiques (Raisman, Briley et al. 1982). Ces éléments pourraient diminuer le stockage de la sérotonine et ainsi augmenter son exposition aux récepteurs et par là même augmenter les risques cardiovasculaires (Cerrito, Lazzaro et al. 1993).

3.1.1.4 Ischémie myocardique et instabilité ventriculaire

Les arythmies ventriculaires peuvent résulter d'un myocarde vulnérable suite à un infarctus du myocarde (IM) ou à la survenue d'émotions négatives (Verrier 1990). Le système nerveux central contrôle la sensibilité du seuil de déclenchement des arythmies ventriculaires (Lown, DeSilva et al. 1980). Dans ce contexte, il a été montré que chez les

patients avec maladie coronarienne, un stress psychologique en diminuant le seuil de déclenchement des arythmies ventriculaires, prédispose à une activité rythmique ventriculaire anormale (Tavazzi, Zotti et al. 1986). Notons également que la fibrillation ventriculaire est la cause principale de la mort subite et que cette dernière est la cause de mortalité la plus fréquente chez les patients ayant des maladies cardiovasculaires (Lown and Verrier 1976).

Enfin, Frasure-Smith et coll. (Frasure-Smith, Lesperance et al. 1995) ont proposé que la dépression dégradait le pronostic après un infarctus du myocarde (IM) via le mécanisme des contractions ventriculaires prématurées (PVC). En effet, parmi des patients dépressifs post-IM, il a été observé que le risque de mort subite augmentait pour les patients présentant 10 ou plus PVC par heure. De plus, 60 % de cette sous population mourraient dans les 18 mois. Ceci positionne les arythmies ventriculaires comme élément clé de ce mécanisme, reliant la dépression et la mort subite observées chez de nombreux patients dépressifs ayant subi un infarctus du myocarde.

3.1.1.5 Nouveaux concepts

Les éléments décrits ci-dessus, ont été les premiers à être largement étudiés afin de comprendre cette interface cœur/cerveau. Cependant, d'autres éléments méritent d'être soulignés.

3.1.1.5.1 La sensibilité du baroréflexe

Le baroréflexe (BR) est mis en place rapidement en réponse à un changement de pression artérielle (PA). Il affecte alors le rythme cardiaque, le débit et la vasoconstriction. De plus, il reflète la combinaison de l'activité sympathique et parasympathique. Une altération de l'activité du BR a été associée à un mauvais pronostic cardiovasculaire (Grippe and Johnson 2002). Des altérations de la sensibilité du BR ont été reportées dans la population dépressive post-IM en comparaison avec les patients post-IM non dépressifs (Watkins and Grossman 1999). Cette même observation a été faite dans des cas de

dépression sans IM (Pitzalis, Iacoviello et al. 2001). Le maintien de l'intégrité de ce paramètre semble alors avoir une importance dans la physiologie dépressive post-infarctus du myocarde.

3.1.1.5.2 Anomalie du système immunitaire

Des études ont montré que la dépression était associée à des changements immunitaires. L'influence du système immunitaire dans l'interface dépression/maladie cardiovasculaire impliquerait des mécanismes centraux et périphériques (Grippe and Johnson 2002).

La dépression majeure a été associée à une sécrétion importante de molécules pro-inflammatoires comme l'interleukine -1β , le TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*) ou l'interféron γ , qui sont des cytokines impliquées dans la réponse immunitaire non spécifique (Maes 1995). De plus, lorsque le TNF- α a été administré chez l'humain, des symptômes dépressifs ont alors été observés (Spriggs, Sherman et al. 1988).

De manière opposée, on a pu observer une hypoactivité du système immunitaire en réponse à la pathologie dépressive. En effet, un excès de cortisol (retrouvé chez une certaine population de patients dépressifs) peut altérer l'immunité cellulaire. De plus, une exposition prolongée au stress peut altérer la fonction immunitaire chez l'animal (Connor, Kelly et al. 1998). La nature de l'interaction entre le système immunitaire et la pathologie dépressive n'est pas complètement définie. En effet, il n'apparaît pas encore clairement si les anomalies immunologiques observées ont un rôle étiologique ou alors résultent de la dépression.

D'autre part, des changements immunitaires sont également observés lors des maladies cardiovasculaires. En effet, les cellules du système immunitaire influencent l'activité des plaquettes, ceci pouvant mener à un accident cardiovasculaire (Grippe and Johnson 2002). Lors d'un infarctus du myocarde, il a été observé que les niveaux de TNF- α ainsi que les facteurs qui activent les plaquettes augmentaient (Pass, Mew et al. 1995). Cette observation implique le TNF- α au cœur de la régulation des deux systèmes.

Les cytokines peuvent également affecter la régulation cardiovasculaire via leurs interactions au niveau du SNC. Les cytokines sont impliquées dans le neurodéveloppement (Merrill 1992), dans la relâche des facteurs neurotrophiques (Mehler, Goldstein et al. 1996.) et dans le métabolisme des neurotransmetteurs, tels que la sérotonine, NE et la dopamine. Ces éléments sont impliqués dans la régulation cardiovasculaire sympathique, ainsi que dans la physiopathologie dépressive (Grippe and Johnson 2002) comme nous l'avons vu plus tôt.

3.1.1.5.3 La fatigue et l'activité physique

Les patients dépressifs présentent régulièrement une fatigue chronique (fatigue mentale et physique, maux de tête, etc.) (Puffer and McShane 1992). Une fatigue excessive pourrait jouer un rôle important entre la dépression et les maladies cardiovasculaires, surtout chez les patients les plus vieux. Bruce et coll. (Bruce, Seeman et al. 1994) ont suggéré qu'une importante fatigue, survenant pendant une dépression, affectait le comportement quotidien du patient et de ce fait, s'en suivait une diminution de l'activité physique constituant un facteur de risque de maladies cardiovasculaires. De plus, les patients avec fatigue chronique montrent une altération du système immunitaire similaire aux patients dépressifs (Klimas and Koneru 2007). Ces anomalies étaient rétablies par un traitement de type antidépresseur (fluoxétine).

L'excès de fatigue a été impliqué comme précurseur dans les maladies cardiovasculaires et la mort subite (Appels and Mulder 1989). L'épuisement est considéré comme étant un facteur de risque à court terme et est prédictif de la survenue d'un deuxième infarctus. De manière intéressante, l'entraînement physique améliore l'état psychologique et l'estime de soi chez les patients en réhabilitation cardiaque (Beniamini, Rubenstein et al. 1997). Des études ont comparé l'effet de l'activité physique chez une population souffrant d'insuffisance cardiaque. Après un an, la population entraînée présentait une réduction de 63 % du taux de mortalité, une augmentation de la variabilité du rythme cardiaque (HRV) et un baroréflexe (BR) plus sensible (Collins and DiCarlo 1997).

Comme vu précédemment, ces paramètres sont impliqués dans la pathologie dépressive et les maladies cardiovasculaires.

3.1.1.6 Dépression et autres pathologies associées

Comme décrit précédemment la pathologie dépressive est associée aux maladies cardiovasculaires. Elle a également été associée au diabète, à l'arthrite rhumatoïde et à l'ostéoporose (Grippe and Johnson 2002; Carney, Freedland et al. 2005; Friedewald, Arnold et al. 2007). Il est intéressant de noter que ces maladies associées à la pathologie dépressive, ont en commun une forte composante inflammatoire ainsi qu'une action chronique. Bien que ces pathologies ne fassent pas partie de cette thèse, il était important d'évoquer la relation entre ces maladies, la réponse inflammatoire et la dépression.

4 Chapitre 4 : L'apoptose

Il a été observé précédemment que les maladies cardiovasculaires présentaient une composante inflammatoire importante. Cette inflammation chronique peut avoir de nombreuses conséquences au niveau cellulaire, dont la mort cellulaire par apoptose. Dans cette section, l'implication de l'apoptose dans ces pathologies sera détaillée.

4.1 Définition

Apoptose est un terme dérivé du grec qui signifie : les feuilles tombant de l'arbre (Fadell 2003). Le terme de mort cellulaire programmée (MCP) a, quant à lui, d'abord été utilisé pour décrire la mort cellulaire arrivant à un endroit et à un moment prévisible pendant le développement. Le concept d'apoptose vit le jour en 1972 (Kerr, Wyllie et al. 1972), à la suite d'une étude réalisée sur le foie du rat (Kerr 1965). Cette mort cellulaire programmée a été décrite comme un mécanisme majeur permettant une régulation fine du nombre de cellules dans un organisme (Raff 1992). L'apoptose est définie comme un processus de mort cellulaire hautement régulé, conservé au cours de l'évolution et consommateur d'énergie. Ce processus intervient comme défenseur en éliminant les cellules non désirées et potentiellement dangereuses. Ce processus de mort cellulaire programmé est, entre autres, nécessaire au bon développement physiologique de l'embryon.

Ce sont des études génétiques sur le *Caenorhabditis elegans* qui ont mené à la découverte et à l'identification des gènes de mort (ced). Il a été montré que les gènes ced-3 et ced-4 sont indispensables pour la mort cellulaire, alors que ced-9 est un antagoniste des activités de ced-3 et 4 (Mignotte and Vayssiere 1998). Au niveau des mammifères, il est apparu que les caspases (cystéines aspartate, pro-apoptotiques) sont les homologues des ced-3, alors que ced-9 apparaît comme étant l'homologue des protéines de la famille Bcl-2 (Mignotte and Vayssiere 1998).

La mort cellulaire a été l'objet d'importants travaux lors des 25 dernières années. Au cours de ces années, de plus en plus d'éléments ont caractérisé l'apoptose et le terme de nécrose s'est retrouvé alors utilisé dans son contexte propre ; une frontière s'était tracée. À

présent la frontière s'amincit et ces deux phénomènes se retrouvent souvent dans un esprit de continuum.

Lors de l'apoptose, la cellule s'engage dans une autodestruction ne provoquant ni inflammation, ni dégâts collatéraux. Le résultat de ce processus sera éliminé par phagocytose des macrophages. À l'opposé, la nécrose se décrit comme une mort cellulaire catastrophique et non régulée déclenchant un processus inflammatoire et ayant des répercussions sur les cellules adjacentes (Majno and Joris 1995). Le processus apoptotique peut être vu comme une cascade d'événements initiés par des stimuli de mort. On peut diviser cette séquence en quatre étapes, dont certains éléments se recoupent (Vaux and Strasser 1996) : 1) La phase d'initiation : un stimulus initie la réponse apoptotique. Le signal peut être externe (voie extrinsèque) ou interne à la cellule (voie intrinsèque) ; 2) La phase de transduction du signal. Le signal est traduit et transmis aux effecteurs de la mort cellulaire ; 3) La phase effectrice : les protéases sont activées, de même que leurs régulateurs ; 4) La phase post mortem : la chromatine et l'ADN de la cellule sont dégradés et la cellule est phagocytée et éliminée.

De très nombreux stimuli peuvent initier ou influencer la cascade de la mort cellulaire programmée. Ces signaux peuvent être de plusieurs types : facteurs de survie extra-cellulaires, interactions cellulaires, hormones, contacts cellulaires et trauma physique. Cependant, l'exécution est très conservée et est associée à des changements biochimiques et morphologiques, caractéristiques formant ainsi la marque de ce qui fut appelé : l'apoptose (Mignotte and Vayssiere 1998).

Concernant sa détection, il existe de nombreuses manières et méthodes permettant l'évaluation de l'apoptose. Chacune des approches utilise les caractéristiques biochimiques et morphologiques de cette mort cellulaire : mesure de la condensation de la chromatine, rétrécissement de la cellule, etc. (Neuss, Crow et al. 2001).

4.2 Protéines impliquées et signalisations

Ce processus implique un grand nombre de protéines, telles que les caspases, l'Akt/PKB ou les protéines de la famille Bcl-2. Celles-ci seront détaillées dans cette section.

4.2.1 Les caspases

4.2.1.1 Généralités et structure

Les caspases sont une famille de protéines hautement conservées, dont l'activité est dite : cystéine-dépendante, aspartate-spécifique, acide protéase. Les caspases ont trois domaines polypeptidiques communs : 1) un large et central domaine interne (p20) de 20kDa contenant un domaine effecteur de mort (DED, *death effector domain*) actif ; 2) un petit domaine C-terminal de 10-kDa appelé le domaine recruteur de caspase (CARD (*caspase recruitment domain*)) ; 3) un pro-domaine NH-2 terminal appelé le domaine de mort (DD, *death domain*) (Salvesen and Dixit 1997). Le DED et le CARD sont des domaines critiques dans la fonction des caspases. Ils jouent un rôle majeur dans la régulation et l'exécution du phénomène apoptotique (Salvesen and Dixit 1997).

Chez les mammifères, 14 caspases distinctes ont été identifiées (Shi 2002). Les caspases se retrouvent dans les cellules sous forme latente de précurseurs zymogéniques, c'est-à-dire inactives. Elles deviennent actives en réponse à des signaux spécifiques, donnant lieu à deux clivages protéolytiques au niveau des résidus aspartate spécifiques (Yan and Shi 2005). Il existe trois voies distinctes permettant l'activation des caspases chez les mammifères. 1) le clivage par des caspases activées en amont ; 2) le clivage par la granzyme B, une sérine protéase aspartate spécifique retrouvée dans les granules cytoplasmiques des cellules T. 3) par une auto-activation zymogénique avec l'aide d'autres caspases (Salvesen and Dixit 1997).

En fonction de la structure du pro-domaine et de leurs fonctions, les caspases sont classées en trois sous-classes. Les caspases 1, 4 et 5 possèdent un grand prodomaine et sont impliquées dans la maturation des cytokines et la réponse inflammatoire. Elles sont appelées groupe 1 ou caspases inflammatoires (Roth 2001). Concernant ces caspases, elles se retrouvent dans un complexe appelé inflammasome. En réponse à un pathogène, ce complexe active par clivage IL-1 β et IL-18, permettant ainsi la réponse immunitaire (Nagata 2000; Martinon and Tschopp 2004). Les caspases du second groupe possèdent un long prodomaine (supérieur à 90 a.a.), contenant soit un DED (caspases 8 et 10) soit le CARD (caspases 2 et 9). Ces caspases sont dites initiatrices. Les caspases du troisième groupe contiennent un court prodomaine (20 à 30 a.a.). Les caspases 3, 6 et 7 font partie de ce groupe 3 aussi appelé caspases effectrices.

4.2.1.2 Signalisation

La signalisation des caspases peut démarrer par deux voies: 1) soit par un signal apoptotique via les récepteurs de mort (voie extrinsèque) (section 4.3.2), recrutant d'abord puis activant la caspase 8 ou 10 ; 2) soit au niveau mitochondrial (voie intrinsèque) (section 4.3.1), voie qui implique la procaspase 9. À partir de ces deux scénarios, les caspases s'activent en cascade pour enfin mener au clivage et à l'activation d'autres substrats spécifiques de l'apoptose, tels que les inhibiteurs de nucléases, les protéines clés du cytosquelette, etc. (Nagata 2000).

Concernant leur inhibition, la famille protéique des protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP : *inhibitors of apoptosis proteins*), constituée de huit membres, représentent une grande classe des inhibiteurs naturels des caspases. La surexpression des IAP est induite par la protéine Bax (Deveraux and Reed 1999).

4.2.2 Akt/PKB

Akt est une sérine/thréonine kinase aussi connu sous le nom de PKB. Akt/PKB est le premier médiateur de la voie de signalisation de la *phosphatidyl inositol tri-phosphate*

kinase (PI3K). PI3K coordonne une variété de signaux intracellulaires, dont la réponse cellulaire aux différents stimuli qui régulent la prolifération et la survie cellulaire (Foster, Traer et al. 2003). Sous des conditions physiologiques normales Akt/PKB est activée par des facteurs de croissance, de l'insuline et des dommages à l'ADN (Brazil, Yang et al. 2004).

4.2.2.1 Structure

Concernant sa structure, trois isoformes d'Akt/PKB sont connus : PKB α /Akt1, PKB β /Akt2 et PKB γ /Akt3 (Manning and Cantley 2007). La première est exprimée ubiquitairement. PKB β est majoritairement exprimée dans les tissus cibles de l'insuline et enfin PKB γ est de manière générale moins exprimée. Cette famille a une structure très conservée présentant 95 % d'homologie de séquence entre l'homme, la souris et le rat.

Également Akt/PKB est une protéine cytosolique soluble de 57-kDa, avec trois domaines conservés dans chaque isoforme. Ces trois domaines sont :

1)- Le domaine N-terminal homologue à la Pleckstrine (PH). Ce domaine d'un peu plus de 100 acide aminés (a.a.) présente 80 % d'homologie entre les trois isoformes. L'identification du domaine PH, défini comme un module spécialisé liant les lipides, a permis la compréhension du mécanisme par lequel les lipides liés à la membrane transmettaient le message au cytosol (Bottomley, Salim et al. 1998). Initialement, la PI3K activée par ses agonistes génère des phospholipides inositols spécifiques : le Phosphoinositol-3,4,5 biphosphate (PtdIns-3,4-P₂) et le Phosphoinositol-3,4,5 triphosphate (PtdIns-3,4,5-P₃). Puis, ces lipides sont reconnus par des sous-domaines PH (Leevers, Vanhaesebroeck et al. 1999). Ce sont ces domaines PH qui relient spécifiquement les produits lipidiques de la PI3K à Akt/PKB et permettent ainsi la signalisation intracellulaire. La présence de ce domaine PH dans la structure d'autres protéines permet ainsi les interactions ;

2)- Le domaine central catalytique kinasique d'environ 250 a.a. et qui est très similaire à PKC ou à PKA. Il présente une homologie de 90 % chez les trois isoformes et

contient une thréonine (T308) très conservée, dont la phosphorylation est nécessaire pour une pleine activation ;

3)- Le domaine C-terminal d'environ 40 a.a., présentant 70 % d'homologie entre les trois isoformes et très proche de la famille des PKC. Ce domaine contient une sérine conservée (S473) dont la phosphorylation est nécessaire pour la pleine activation, ainsi qu'un domaine hydrophobique de type AGC kinase.

4.2.2.2 Activation

Consécutivement à l'activation de la PI3K, les lipides inositols générés interagissent avec l'Akt/PKB. Cette interaction n'active pas directement l'Akt/PKB. La liaison d'Akt/PKB avec PtdIns-3,4,5-P₃ induit un changement de conformation d'Akt/PKB qui facilite sa phosphorylation au niveau de la T308 et de la S473. Cette phosphorylation est effectuée par la PDK1 et PDK2 (*kinase phosphoinositide-dependent kinase*) (Thomas, Deak et al. 2002). Ces deux phosphorylations sont cruciales et activent Akt/PKB (Manning and Cantley 2007). Une fois activée, Akt/PKB se dissocie de la membrane plasmique et phosphoryle d'autres substrats dans le cytoplasme et le noyau.

Ces substrats peuvent être séparés en deux catégories. Ceux dont la modulation agit directement sur l'apoptose : AIF, caspase 9, facteur de fragmentation ADN (FDD40/CAD), acinus, la voie SAPK (*stress-activated protein kinase*), les protéines de choc thermique (*heat shock proteins*), la *glycogen synthase kinase 3* (GSK-3) et l'hexokinase. Puis, il y a ceux dont la modulation agit indirectement sur l'apoptose: *forkhead family*, *murine double minute 2* (Mdm2), NF-κB et la protéine liant l'élément de réponse à l'AMPc (CREB) (Parcellier, Tintignac et al. 2008).

De manière plus détaillée, les substrats les plus importants et représentatifs de cette fonction de survie (anti-apoptotique) sont les protéines : Bad, GSK-3, pro-caspase 9 et YAP (*yes-associated protein*) (Manning and Cantley 2007). Dans le cas de la protéine Bad, Akt phosphoryle la sérine (S136) de Bad et le dégage ainsi de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL. Cette dernière peut alors jouer son rôle anti-apoptotique. Également, PKB/Akt peut

activer par phosphorylation des facteurs de transcription (Du, Asahara et al. 2000) tels que CREB ou I κ BKinase (IKK, un régulateur positif de NF- κ B). Ces derniers pouvant réguler l'expression de gènes anti-apoptotiques tels que Bcl-2, Mcl-1 et Bfl-1. Enfin, les facteurs de transcription pro-apoptotiques de type Forkhead (FKHR, FKHL1 et AFX) peuvent également être inhibés par phosphorylation (pour FKHR, sur les sites T21, S256 et S318, chez l'homme). Cette inhibition les expulse du noyau, les empêchant ainsi de jouer leurs rôles physiologiques pro-apoptotiques dans le noyau (Biggs, Meisenhelder et al. 1999).

De part ce grand nombre de substrats, Akt/PKB est impliquée dans de nombreuses voies de signalisations, telles que le transport du glucose, la synthèse du glycogène, la lipolyse, la lipogénèse, l'angiogénèse, le contrôle du cycle cellulaire ainsi que le cancer. Concernant l'apoptose, Akt/PKB est considérée comme un facteur de survie. Une surexpression d'Akt de type activée diminue la mort cellulaire par apoptose, alors que celle-ci augmente en présence d'une forme dominante négative d'Akt/PKB (Sale and Sale 2008).

Le principal inhibiteur de cette voie de signalisation est la protéine PTEN (Phosphatase and tensin Homologue). En effet, la production, via PI3K, des lipides inositols est renversée par cette protéine qui possède une activité phosphatase 3'-phosphoinositide.

4.2.3 Famille protéique Bcl-2

4.2.3.1 Généralité et structure

La famille protéique Bcl-2 (B-Cell/Lymphoma-2 family) joue un rôle important dans l'apoptose. Elle intervient à des étapes dites de surveillance, telles que la réception des signaux de mort à la surface cellulaire, la formation de l'apoptosome ou encore l'activation de la cascade des caspases (Burlacu 2003). Cette famille a été d'abord découverte dans les lymphomes chez les cellules de type B (Tsujimoto, Cossman et al. 1985). Un grand nombre de protéines ont été caractérisées et ont alors été classées en deux sous-familles. On

retrouve les protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Mcl-1 et Bcl-XL) et les protéines pro-apoptotiques (Bax, Bad, Bcl-2 associated X protein). Tous ces membres sont caractérisés par au moins un des quatre domaines BH1, BH2, BH3,-BH4 (Bcl-2 Homology) (Adams and Cory 1998). De manière générale, les membres anti-apoptotiques présentent une séquence très conservée dans les quatre domaines, alors que les membres pro-apoptotiques présentent une perte de conservation au niveau du domaine BH4. Le domaine BH3 semble être le domaine critique responsable de la mort cellulaire chez les membres pro-apoptotiques (Puthalakath and Strasser 2002). Ces protéines ont la capacité de former un homo ou hétérodimère et au niveau de la régulation de l'apoptose elles peuvent fonctionner de manière indépendante ou en groupe.

4.2.3.2 Activation

En l'absence de stimulus de mort, ces protéines sont localisées dans des compartiments intracellulaires distincts (Zhu, Cowie et al. 1996). Les membres anti-apoptotiques sont initialement localisés au niveau des membranes mitochondriales, du réticulum endoplasmique et de la membrane nucléaire (Nguyen, Millar et al. 1993). Lors de la réception d'un stimulus de mort cellulaire, les membres pro-apoptotiques peuvent changer leur localisation dans la cellule et subir différentes modifications translationnelles (Burlacu 2003). Ils changent alors de conformation et intègrent la membrane externe de la mitochondrie. Au niveau de la mitochondrie, les membres anti-apoptotiques forment un canal ionique et aident au maintien de l'intégrité mitochondriale via l'exportation de l'ion H^+ . L'association parmi les différentes protéines de cette famille n'est pas statique, mais dépendante des phosphorylations (Gross, McDonnell et al. 1999).

4.3 Mécanisme d'action et voies de signalisation

Il existe deux voies majeures d'activation de l'apoptose. D'abord, la voie intrinsèque que nous détaillerons en premier lieu, puis la voie extrinsèque. L'exécution de l'une de ces deux voies dépend du type de stimulus de mort cellulaire émis. Cependant, de

manière commune à ces deux voies, les signaux pro- et anti-apoptotiques s'affrontent, s'activent, s'inhibent et se neutralisent, composant ainsi un équilibre dynamique duquel la mort ou la survie de la cellule dépend. (Figure 4.1)

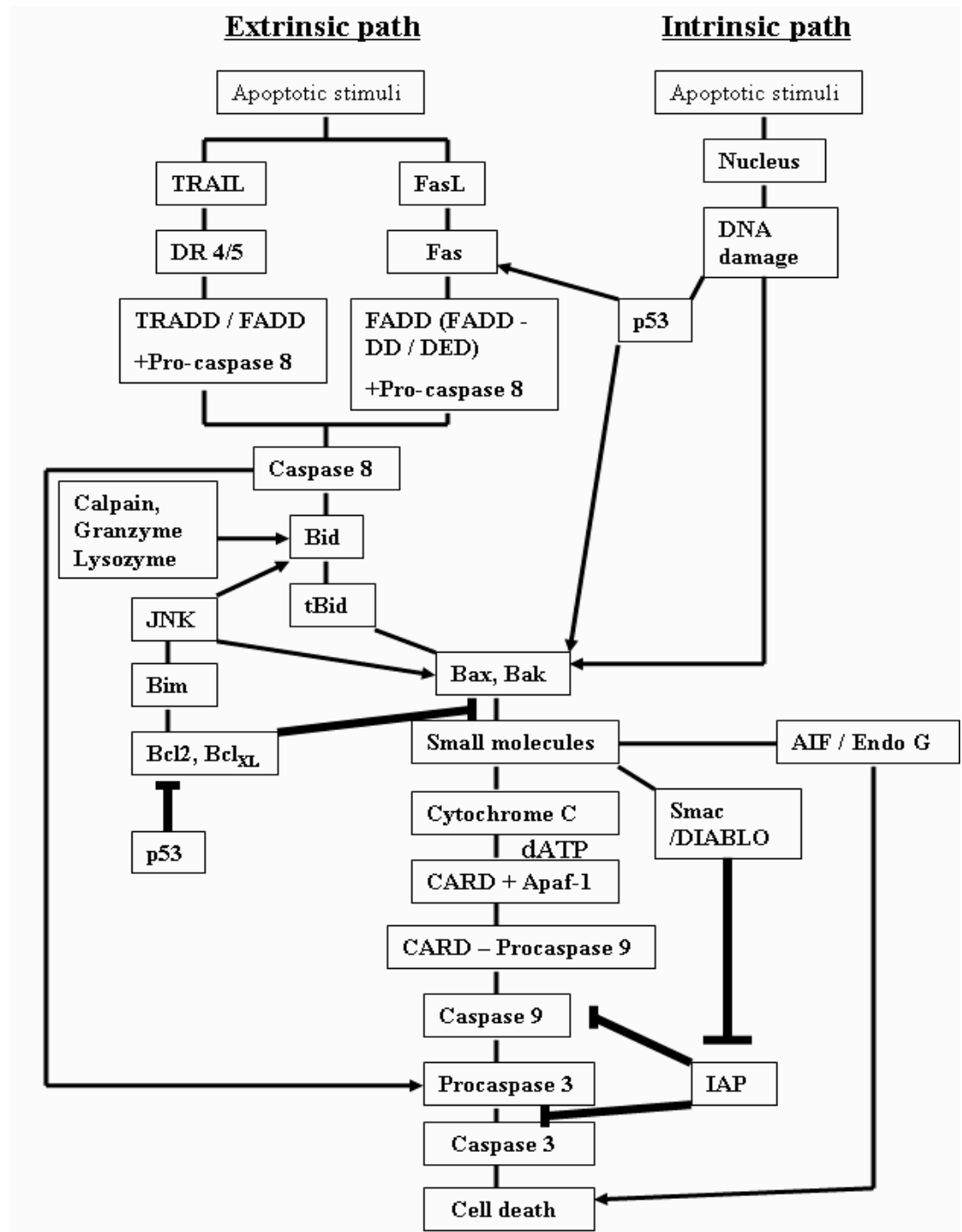


Figure 4.1 : Représentation des voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque, ainsi que des protéines de signalisations impliquées (tiré de (Chowdhury, Tharakan et al. 2006))

4.3.1 Voies intrinsèques

Cette voie concerne deux sites majeurs de la cellule : la mitochondrie et le noyau.

4.3.1.1 Mitochondrie

La première mise en cause de la mitochondrie dans le processus de la mort cellulaire programmée vient d'études de cytotoxicité utilisant le TNF- α . Lors de ces études, des altérations de la fonction mitochondriale étaient associées aux phases précoces de la mort cellulaire programmée (Schulze-Osthoff, Bakker et al. 1992). Également, il a été montré que des protéines mitochondriales étaient capables d'activer directement des programmes d'apoptose cellulaire (Liu, Kim et al. 1996). Ces protéines, qui habituellement résident dans l'espace intermembranaire mitochondriale, peuvent être relâchées dans le cytoplasme cellulaire. Elles peuvent alors activer et promouvoir l'apoptose. Pour cela, elles activent les caspases, les nucléases, ou neutralisent les inhibiteurs de ce processus. Enfin, cette étape mitochondriale est perçue comme essentielle, avec comme caractéristique majeure, l'arrêt de la chaîne de phosphorylation oxydative (Schulze-Osthoff, Beyaert et al. 1993).

Le cytochrome c, élément clé de la phosphorylation oxydative mitochondriale a la capacité d'initier l'apoptose lorsqu'il est relâché de la mitochondrie. En effet, des injections de cytochrome-c dans des cellules ont pu initier l'apoptose (Zhivotovsky, Orrenius et al. 1998). Sa liaison avec l'APAF-1 (facteur protéasique activateur d'apoptose - *apoptosis proteases activating factor-1*) recrute la pro-caspase 9, de l'ATP et forme ainsi l'apoptosome. Cette liaison auto-activante mènera en bout de ligne à l'activation de la caspase 3 effectrice (ainsi que la caspase 6 et 7) (Rodriguez and Lazebnik 1999). Cette caspase effectrice peut alors cliver et activer de nombreux et importants substrats intracellulaires. Ces substrats mèneront aux changements morphologiques caractéristiques de l'apoptose, tels que la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN, l'externalisation de la phosphatidyl-sérine, etc. (Hengartner 2000). Les résultats

d'expériences sur gènes KO (knock-out), soit d'APAF-1, de caspase-9, ou de caspase-3 ont mené à l'inhibition de la majorité de la mort cellulaire se déroulant pendant la période du développement neuronal (Cecconi, Alvarez-Bolado et al. 1998). Ces expériences de KO ont également permis de confirmer l'enchaînement chronologique de la voie de signalisation : cytochrome-c/APAF-1/caspase9/caspase-3 (Yoshida, Kong et al. 1998).

Également d'une grande importance, la protéine mitochondriale Smac/Diablo (*second mitochondrial activator of caspases*) de 25-kDa est également relâchée dans le cytosol et peut initier l'apoptose (Verhagen, Ekert et al. 2000). Smac/Diablo a la capacité, une fois activée, de contourner l'action anti-apoptotique de la famille des IAP (protéines inhibitrices de l'apoptose).

D'autre part, la protéine AIF (*apoptosis inducing factor*) peut migrer de la mitochondrie vers le noyau, favorisant ainsi la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN (Susin, Lorenzo et al. 1999).

Comme il a été décrit, ces protéines mitochondriales pro-apoptotiques sont relâchées dans le cytosol. Il existe deux théories expliquant leur sortie: 1) via le pore formé par des protéines de la famille Bcl-2; 2) via le pore de transition de perméabilité mitochondrial (PTPm).

1) Bien que cette première hypothèse ne soit encore pas totalement élucidée, il apparaît que les protéines pro-apoptotiques Bid et Bax peuvent permettre la relâche du cytochrome-c (Finucane, Bossy-Wetzl et al. 1999). En effet, au niveau cellulaire, un stimulus apoptotique peut générer la translocation dans la mitochondrie des protéines Bax et Bid (Desagher, Osen-Sand et al. 1999) et permettre ainsi la relâche du cytochrome-c. Dans cette première hypothèse, la relâche est rendue possible par la formation de canaux ioniques à travers les deux bicouches lipidiques mitochondriales par les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bax, Bcl-x1, Bcl-2) (Minn, Velez et al. 1997; Schlesinger, Gross et al. 1997). Ces canaux permettraient ainsi l'efflux du cytochrome-c, initiant alors la cascade apoptotique.

2) La deuxième hypothèse, soutenant la présence de pores mitochondriaux permettant la sortie du cytochrome-c, intègre un modèle dit de, pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTPm). Le PTPm est un pore non spécifique et perméable à toutes molécules de moins de 1.5-kDa. Son ouverture peut être supportée par une chute des niveaux d'adénine nucléotide, une augmentation des phosphates, une augmentation du stress oxydatif ou une surcharge calcique. Il est intéressant de souligner que ces conditions sont celles retrouvées lors de l'ischémie reperfusion cardiaque (Weiss, Korge et al. 2003).

Le PTPm serait constitué d'un agrégat de protéines qui constituent un pore à travers les membranes internes et externes de la mitochondrie. Bien que la composition exacte de ce PTPm ne soit pas encore complètement décrite, on retrouve au niveau de la membrane interne le translocateur de nucléotide adénine (ANT), la créatine kinase et la cyclophiline D ; au niveau de la membrane externe il y a la porine VDAC (*voltage dependent anion channel*), l'hexokinase et le récepteur au benzodiazépine (BZD) (Weiss, Korge et al. 2003; Bernardi, Krauskopf et al. 2006).

Ce pore possède deux fonctions. Premièrement, il régule la phosphorylation oxydative et deuxièmement, il peut entraîner la mort de la cellule en ne jouant plus son rôle de pore, causant ainsi l'effondrement du potentiel de membrane mitochondriale et l'incapacité de produire de l'ATP (Grimm and Brdiczka 2007). Le maintien du potentiel de membrane mitochondriale est un élément fondamental et une force conductrice dans la chaîne respiratoire mitochondriale. Il a été découvert que dans la majorité des cas de mort cellulaire par apoptose, une altération majeure de ce potentiel de membrane était observée et ceci avant même la mise en place des autres marqueurs de l'apoptose, tels que l'externalisation de la phosphatidyl serine ou la dégradation du génome (Kroemer, Zamzami et al. 1997).

Lors de l'ouverture du PTPm, un gonflement de la matrice mitochondriale se produit. Ce dernier apparaît comme un élément clé du lien entre l'apoptose et l'ouverture du pore. En effet, l'ouverture du port permet un plus grand passage de soluté et va donc

mener à de nombreux déséquilibres osmotiques. Ceux-ci menant en bout de ligne à la rupture de la membrane externe de la mitochondrie, permettant alors la relâche au niveau du cytosol de la cellule, du cytochrome-c et d'autres protéines pro-apoptotiques telles que Smac/Diablo et AIF (Halestrap 2006).

De nombreuses molécules ou conditions régulent le PTPm. L'acide bongkreique et la cyclosporine A inhibent la mort cellulaire par apoptose tout en inhibant l'ouverture du PTPm. Les espèces réactives de l'oxygène et l'atractyloside sont des inducteurs du PTPm (Weiss, Korge et al. 2003). Également, la protéine Bax peut mener à l'altération du potentiel de membrane mitochondriale (Pastorino, Chen et al. 1998), alors que la protéine anti-apoptotique Bcl-2 possède une action protégeant ce potentiel membranaire (Zamzami, Brenner et al. 1998). Il apparaît donc que le maintien du potentiel membranaire mitochondrial et la régulation du PTPm (ouverture/fermeture) jouent un rôle important dans la régulation de l'apoptose. Il faut enfin souligner que l'ouverture du PTPm est également impliquée dans la nécrose (Bernardi, Krauskopf et al. 2006).

4.3.1.2 Noyau

Le noyau constitue également un lieu intrinsèque d'initiation et de régulation de l'apoptose. Des stimuli, tels que des mutations de l'ADN sur des gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, peuvent déclencher la cascade apoptotique. La protéine p53 est une des protéines reconnues pour son implication dans ce processus. Ce facteur de transcription une fois activé, permet la transcription et l'expression des gènes des récepteurs de mort Fas (Bennett, Macdonald et al. 1998) et de la protéine pro-apoptotique Bax (Wolter, Hsu et al. 1997).

4.3.2 Voie extrinsèque, dite des récepteurs de mort

L'activation de cette voie est initiée par la liaison entre les récepteurs transmembranaires de mort, tels que Fas, TNFR1 et TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) avec leur ligand naturel plasmatique respectif (FasL, TNF- α , TRAIL ou

APO2L) (Ashkenazi and Dixit 1998). Cette liaison stimule le recrutement de protéine adaptatrice telle que FADD (*fas associated via death domain*) qui à son tour recrute la pro-caspase 8 ou 10, formant ainsi un complexe nommé : DISC (complexe de signalisation induisant la mort - *death inducing signaling complex*) (Kischkel, Hellbardt et al. 1995). La formation de ce DISC est rendu possible par la présence d'un domaine de mort (DD) et d'un domaine effecteur de mort (DED) au niveau du FADD. La caspase 8, qui possède également un DED, permet son recrutement. Ce DISC active alors la cascade d'activation des caspases. Consécutivement, la protéine pro-apoptotique Bid est activée par clivage de la caspase 8 permettant ainsi la relâche mitochondriale des autres facteurs pro-apoptotiques (Luo, Budihardjo et al. 1998). De plus, la caspase 8 activée pourra à son tour activer les caspases effectrices pro-apoptotiques 3, 6 et 7.

4.4 Apoptose et dépression

La dépression majeure est associée à de nombreuses anomalies du système immunitaire (Herbert and Cohen 1993). En effet, chez des patients dépressifs, une augmentation de l'apoptose au niveau des lymphocytes circulants a été observée (Eilat, Mendlovic et al. 1999) et cette dernière était associée à une augmentation de l'expression du récepteur Fas (Ivanova, Semke et al. 2007). Une corrélation significative a également été décrite reliant un niveau de cortisol sérique élevé, une diminution du nombre de cellule T helper (CD4+), ainsi qu'une augmentation de l'expression des récepteurs impliqués dans l'apoptose (Ivanova, Semke et al. 2007). Ces résultats soulèvent l'implication potentielle du phénomène apoptotique dans les troubles du système immunitaire chez les patients dépressifs.

D'autre part, Lucassen et coll. ont montré, pour la première fois chez l'homme, que la mort par apoptose était impliquée dans le changement morphologique observé au niveau cérébral dans certaines régions chez le patient dépressif (Lucassen, Muller et al. 2001). Ce même groupe a démontré, sur un modèle de stress sur la toupaille de Bélanger (« tree shrew »), que le traitement avec un antidépresseur, la tianeptine, réduisait l'apoptose au

niveau de l'hippocampe et du cortex temporal (Lucassen, Fuchs et al. 2004). Cette observation suggérait ainsi un lien entre la perte cellulaire et la diminution de plasticité neuronale observée chez les patients dépressifs.

Enfin, la diminution du volume de l'hippocampe est un trait caractéristique de la pathologie dépressive et des troubles cérébraux en général (Neumeister, Wood et al. 2005). De ce fait, de nombreux travaux ont porté sur la relation entre cette diminution de volume et le processus apoptotique. Il faut préciser que d'un point de vue technique, l'observation des cellules apoptotiques dans les sections tissulaires est très rare. Au niveau in vivo peu de données existent, cependant il a été montré dans le cerveau de rat, que la mort cellulaire induite par stéroïdes était détectable pour uniquement 72 heures (Hu, Yuri et al. 1997). Donc la chance de détecter l'apoptose dans une fine section de tissu tirée d'un modèle chronique est très faible. L'étude de ce phénomène est donc difficile car les cellules disparaissent. D'autre part, les caractéristiques propres à l'apoptose font que les cellules traversent différentes étapes menant à la mort cellulaire. Donc, dans un même tissu, toutes les cellules ne subissent pas l'apoptose au même moment. Les résultats obtenus lors de l'étude de l'apoptose ne représentent, donc, qu'une situation à un moment donné dans une section de tissu. Dans ce cas, l'accumulation des effets de l'apoptose sur une période de temps, n'est pas facilement évaluable. Cependant, et en dépit des limites évoquées (courte présence et différentes étapes), les modifications observées du volume de l'hippocampe suggèrent une implication de l'apoptose (Czeh and Lucassen 2007).

5 Chapitre 5 : Inflammation

Le chirurgien écossais John Hunter a écrit en 1794 que l'inflammation en soit ne doit pas être considérée comme une maladie, mais comme une opération salutaire consécutive à des violences ou des maladies (Serhan and Savill 2005).

5.1 Définition

Le processus inflammatoire est un mécanisme de protection de l'organisme. Il est hautement régulé et influencé par de nombreux facteurs et est souvent représenté par quatre points spécifiques : rougeur, chaleur, douleur et gonflement. Témoin de son importance, des déficiences génétiques des principaux composants de ce processus mènent à de nombreuses maladies. Enfin, le processus inflammatoire est impliqué dans de nombreuses pathologies : l'arthrite rhumatoïde, l'asthme, l'athérosclérose, le cancer, le diabète de type 1, etc. (Nathan 2002).

Fréquemment, l'inflammation est la réponse à une infection causée par l'intrusion d'un pathogène dans l'organisme. Cependant, une brûlure, une réaction allergique ou une blessure physique peuvent également déclencher le processus inflammatoire. Une fois activé, ce processus entraîne de nombreuses réactions physiologiques incluant, de manière non exhaustive : l'activation de récepteurs, des dégranulations, l'apoptose, la thrombose, l'expression de molécules d'adhésion, la relâche d'espèces réactives de l'oxygène et de cytokines etc. (Schmid-Schonbein 2006).

Il existe deux types d'inflammation : le type aigu et le type chronique. Le premier constitue la réponse initiale du corps à un stimulus néfaste. Il implique un déplacement de liquide et de cellules sanguines sur le site initial. Ce mécanisme se met en place très rapidement et ne dure au maximum que quelques jours. Les principales cellules impliquées sont les neutrophiles (leucocytes polymorphonucléaires) (Fujiwara and Kobayashi 2005). Le deuxième type (chronique) peut durer de plusieurs semaines à plusieurs années. Il est vu comme un processus aigu n'ayant pas été résolu, soit à cause d'une stimulation continue, soit par un défaut du système de régulation. Il peut être causé par un stimulus inflammatoire continu ou par des activations auto-immunes et est caractérisé par une

destruction/réparation tissulaire continue entraînant une fibrose. Les monocytes et les lymphocytes sont les principales cellules impliquées.

De manière générale, trois grands événements se produisent durant l'inflammation : 1) L'augmentation de l'apport sanguin de la zone concernée ; 2) L'augmentation de la perméabilité capillaire ; 3) La migration leucocytaire des capillaires vers l'espace interstitiel jusqu'au site d'inflammation (Rankin 2004). Cette dernière étape est appelée la cascade d'adhésion leucocytaire et elle regroupe les étapes de la capture, le roulement, le ralentissement, l'adhésion ferme et la transmigraton.

5.2 Propagation

5.2.1 La réponse de type aigu

La réponse inflammatoire de type aigu peut se diviser en 4 étapes, dont chacune possède des éléments qui se recoupent et s'enchaînent en cascade.

1. La relâche des médiateurs en réponse au stimulus. Lors de cette étape, les macrophages et d'autres types cellulaires (fibroblastes, cellules endothéliales) relâchent des médiateurs inflammatoires dont les cytokines. Ces dernières sont soit pro-inflammatoires, par exemple TNF- α , soit anti-inflammatoires (IL-10). Les cytokines pro-inflammatoires supportent l'inflammation en augmentant l'expression des molécules d'adhésion, la perméabilité des vaisseaux et en favorisant la relâche de molécules inflammatoires (Rankin 2004). Les cytokines anti-inflammatoires, au contraire, diminuent la relâche des cytokines pro-inflammatoires (Grutz 2005).
2. Le changement de la réactivité vasculaire est principalement caractérisé par l'augmentation de la perméabilité endothéliale (Schmid-Schonbein 2006). Ceci permet un meilleur passage des cellules de l'inflammation et également la fuite des protéines dans l'espace interstitiel suivant le gradient de pression. Ces étapes mènent alors au gonflement (l'œdème).

3. Le recrutement des cellules inflammatoires et l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion au niveau des cellules vasculaires (Luster, Alon et al. 2005) permettent le recrutement des cellules de l'inflammation.
4. La résolution de l'inflammation et la réparation du tissu constituent la dernière étape. Les médiateurs anti-inflammatoires, comme l'IL-10 sont relâchés par les macrophages. Ils désactivent alors les cellules immunitaires et diminuent la relâche des médiateurs pro-inflammatoires (Moore, O'Garra et al. 1993). Les neutrophiles subissent alors l'apoptose et sont éliminés. Ces étapes mèneront enfin à la synthèse et à la relâche, par les macrophages, de facteurs de transformation, comme le TGF- β (*transforming growth factor- β*); d'autres médiateurs anti-inflammatoires, ainsi que des facteurs de croissance seront relâchés. Une cascade inflammatoire ne menant pas à cette étape de résolution peut mener à la perte ou à la dysfonction de l'organe, voire à la mort. Enfin, de nombreuses évidences montrent que cette dernière étape serait enclenchée dès le départ de la cascade inflammatoire, définissant ainsi le processus inflammatoire comme un mécanisme hautement régulé et programmé (Serhan and Savill 2005).

5.2.2 La réponse de type chronique

Cette réponse est perçue comme un processus aigu qui n'a pas été résolu. Cet échec est attribué soit à l'influence d'une stimulation continue, soit à un défaut du système de régulation (maladies auto-immunes, par exemple). Cette réponse partage de nombreux éléments avec la réponse aiguë mais il y a cependant certaines caractéristiques qui lui sont propres. En effet, la prolifération des cellules endothéliales, l'angiogénèse couplée au remodelage microvasculaire et l'infiltration des monocytes sont des éléments plus représentatifs de cette réponse (Ezaki, Baluk et al. 2001; Schmid-Schonbein 2006).

5.3 Cellules majeures de l'inflammation

5.3.1 Neutrophiles

Ces cellules sont les premières cellules non résidentes recrutées sur le site inflammatoire. Leur rôle principal est de détruire le pathogène. Pour ce faire, une fois activés, les neutrophiles produisent beaucoup d'espèces réactives de l'oxygène (EROs). Cependant, dans le cas de réponses hyperinflammatoires, la quantité de produits cytotoxiques relâchés par ces cellules peut également endommager les tissus adjacents. Ces cellules ont une demi-vie d'environ cinq heures une fois isolées du sang. Cependant, lors d'une stimulation, cette demi-vie peut augmenter jusqu'à 24 heures ou plus (Lee, Whyte et al. 1993).

5.3.2 Macrophages

Lors d'un stimulus inflammatoire, l'une des premières réponses de l'organisme est la relâche des médiateurs inflammatoires. La majorité de ces médiateurs sont produits par les macrophages. Ces médiateurs sont : IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF (*Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), interféron (IFN- $\alpha/\beta/\gamma$), et TNF- α . Les macrophages ont deux rôles. Tout d'abord la promotion de la réponse inflammatoire en augmentant le recrutement des cellules inflammatoires et ensuite la destruction de cette réponse en sécrétant des médiateurs anti-inflammatoires, tels que IL-10, IL-12, IL-18 et TGF- β (Fujiwara and Kobayashi 2005). Les macrophages participent aussi à la réparation du tissu. Lors de cette étape, ils ingèrent les neutrophiles apoptotiques et autres débris cellulaires et nettoient ainsi la zone inflammée (Tsirogianni, Moutsopoulos et al. 2006). De plus, ils secrètent de nombreux facteurs de croissance, tels que le PDGF (*Platelet derived growth factor*), le TGF- β (*Transforming growth factor β*), le FGF (*Fibroblast growth factor*) et le VEGF (*Vascular endothelial growth factor*). Ce dernier étant nécessaire à la réparation du tissu.

5.4 Molécules de l'inflammation

Malgré la grande diversité de la réponse inflammatoire, une longue liste de médiateurs est régulièrement impliquée dans cette cascade. On y retrouve des médiateurs, tels que l'histamine, la bradykinine, les cytokines et finalement les produits de l'acide arachidonique, qui sont représentés à la Figure 5.1, divisés en prostanoïdes et leucotriènes (Vane and Botting 1998). L'histamine provient des macrophages et est impliquée dans de nombreuses fonctions (vasodilatation, bronchoconstriction, réactions allergiques, etc.). La bradykinine cause la douleur, l'œdème ainsi qu'une vasodilatation. Les cytokines ont un grand rôle dans la régulation de la réponse inflammatoire (section 5.2). Les produits de l'acide arachidonique (AA), quant à eux, via la voie de la cyclooxygénase (COX) constituent la famille des prostanoïdes (prostaglandine et thromboxane) et des leucotriènes. L'AA est un acide gras polyinsaturé présent au niveau des membranes cellulaires. L'AA peut être métabolisé en prostanoïdes (PG, TxA2, Pc) par la voie des cyclooxygénases ou en leucotriène par la voie de la lipoxygénases (Vane and Botting 1987). Les molécules ainsi produites peuvent réguler la réponse inflammatoire. Les prostaglandines (PG) produites par un grand nombre de types cellulaires, sont impliquées dans la fièvre et la douleur. Le Thromboxane A2 (TxA2) stimule l'agrégation plaquettaire et la vasoconstriction et enfin les prostacyclines (Pc) inhibent l'agrégation plaquettaire et entraîne une vasodilatation. Enfin, les leucotriènes (LT) sont indépendants de la voie de la cyclooxygénase et donc, hors contrôle de l'aspirine et autres AINS (Anti-inflammatoire non stéroïdiens). Ici, tous ces éléments ne seront pas détaillés, mais une plus grande attention sera portée sur la famille des cyclooxygénases.

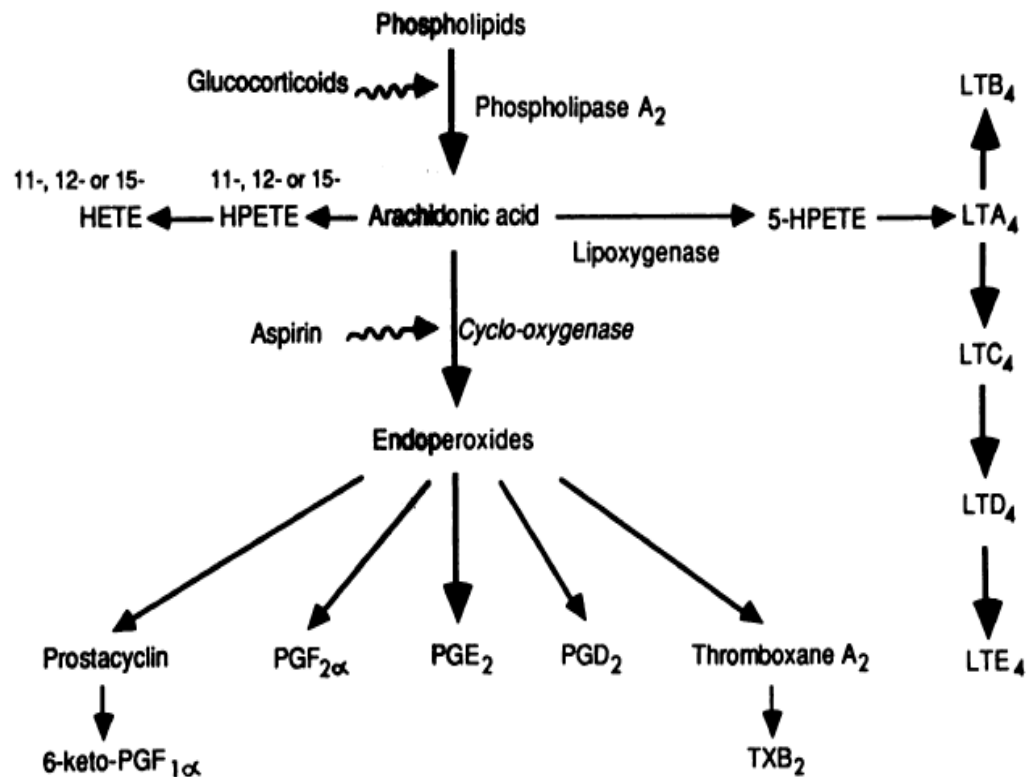


Figure 5.1 : Voie catabolique de l'acide arachidonique (tiré de Vane et al (1987))

5.4.1 Les Cyclooxygénases (COX)

5.4.1.1 Généralités

La COX ou prostaglandine H₂ synthase est une enzyme responsable de la formation des prostanoïdes et est hautement impliquée dans la réponse inflammatoire. La COX contient deux sites enzymatiques actifs. Un site de type cyclooxygénase où l'acide arachidonique (AA) est convertie en prostaglandine hydroxy-endoperoxyde (PGG₂) et un site hème présentant une activité peroxydase responsable de la réduction du PGG₂ (prostaglandine G₂) en PGH₂ (prostaglandine H₂). Le PGH₂ ainsi formé, est le précurseur des prostanoïdes issus de cette voie.

La COX est liée à la membrane (Marnett, Rowlinson et al. 1999) et appartient à la famille enzymatique des peroxydases hème dépendantes, comme les myéloperoxydase (MPO) (Garavito and Mulichak 2003).

La COX a été purifiée en 1976 et clonée en 1988 (Vane, Bakhle et al. 1998). Cette enzyme bifonctionnelle est composée de trois domaines distincts : 1) Le domaine N-terminal EGF (*epidermal growth factor*). Ce domaine pourrait jouer un rôle dans l'insertion dans la bicouche lipidique ; 2) Un domaine de liaison membranaire d'environ 48 a.a. ; 3) Un large domaine C-terminal globulaire catalytique contenant le site liant l'hème.

Bien qu'il existe trois isoformes de la COX, ici ne seront uniquement traités que les deux premiers et plus particulièrement la COX-2. Ce deuxième isoforme (COX-2) a été découvert au début des années 1990 et ceci donna le jour à de très nombreuses recherches dans le domaine de la réponse inflammatoire (Harris, McKanna et al. 1994; Breder, Dewitt et al. 1995; Vane, Bakhle et al. 1998).

La COX-1 et la COX-2 font 71-kDa (environ 600 a.a.) et partagent de 60 à 65 % d'homologie. Bien que l'on observe quelques différences d'ordre structural, il est important de souligner que les deux isoformes utilisent l'acide arachidonique comme substrat et forment les mêmes produits. Leurs différences majeures reposent au niveau de leurs fonctions pathophysiologiques (Vane, Bakhle et al. 1998).

La COX-1 est exprimée de manière constitutive à travers la plupart des cellules avec un rôle physiologique dit, d'entretien et de maintien de l'homéostasie. Elle fournit les prostaglandines au niveau de l'estomac et de l'intestin, maintenant ainsi l'intégrité de la muqueuse épithéliale. Dans ce cas, son inhibition mène à des dommages gastriques, des hémorragies et des ulcérations (Vane, Bakhle et al. 1998). De plus, elle fournit des prostacyclines qui, lorsque relâchées par l'endothélium, ont une action antithrombogénique (Moncada, Gryglewski et al. 1976).

À l'opposé, l'expression de la COX-2 est inductible et reste quasi indétectable sous des conditions normales dans la plupart des tissus (sauf dans le système nerveux central, les

reins et les gonades où son expression est constitutive). L'exposition des cellules à des bactéries, des cytokines, des hormones ou des facteurs de croissance induisent son expression en une durée de 2 à 6 heures (Tsatsanis, Androulidaki et al. 2006). Les cytokines anti-inflammatoires, telles que l'IL 4 et l'IL-10, diminuent son induction de même que les corticostéroïdes (Onoe, Miyaura et al. 1996). La COX-2 est définie comme ayant un rôle pathologique. À présent, voyons les différentes fonctions et répartitions de ces deux enzymes dans les différents systèmes et organes.

5.4.1.2 Localisation et fonction

5.4.1.2.1 Au niveau gastro-intestinal

L'action protectrice, via la COX-1, est réalisée par la PGE₂ qui diminue les sécrétions acides, stimule la sécrétion de mucus protégeant ainsi les parois de l'estomac et du duodénum. De faible quantité de COX-2 ont été retrouvée dans l'estomac des rats mais sans rôle spécifique à ce jour.

5.4.1.2.2 Au niveau rénal

Ici, l'action protectrice et d'entretien est assurée par les PG vasodilatatrices. Les patients souffrant d'insuffisance rénale sont à risque d'ischémie rénale lors de la prise d'AINS. Ici également, la PGE₂ synthétisée via la COX-1 est responsable de cet effet protecteur. Cependant, de faibles niveaux d'ARNm de COX-2 y ont été retrouvés sans rôle spécifique à ce jour (Harris, McKanna et al. 1994).

5.4.1.2.3 Au niveau du système nerveux central

La COX-1 y est retrouvée à l'état de base dans les neurones et dans le cerveau. L'ARNm de la COX-2 est induit dans le tissu cérébral lors de la présence de substances pyrogéniques, tels que le LPS (lipopolysaccharide) ou l'IL-1 (Cao, Matsumura et al. 1996). Cependant, de faibles niveaux de protéines et d'ARNm de la COX-2 ont été détectés dans les neurones du tronc cérébral à l'état basal (Breder, Dewitt et al. 1995). Notons qu'un

stress aigu augmente l'expression de la COX-2 dans le cortex cérébral (Yamagata, Andreasson et al. 1993). L'ARNm de COX-2 est également retrouvé de manière constitutive dans la moelle épinière de rat (Vane, Bakhle et al. 1998).

Plus précisément, la COX-2 est impliquée dans le processus de fièvre. Il a été avancé que le PGE₂ produit au niveau du SNC générerait des signaux neuronaux activant les centres thermorégulateurs de l'hypothalamus (Blatteis and Sehic 1997). La synthèse du PGE₂ est stimulée par des cytokines, comme l'IL-1. Bien qu'une augmentation de l'expression de la COX-2 dans le SNC ait déjà été observée après injection de LPS, cette induction ne se situe pas dans les neurones mais au niveau de la microglie et de l'endothélium des vaisseaux sanguins crâniens (Cao, Matsumura et al. 1996; Elmquist, Breder et al. 1997).

5.4.1.2.4 Au niveau pulmonaire

Au niveau respiratoire, le cas le plus représentatif est celui de l'hyperréactivité des voies respiratoires associées à l'asthme. La protéine et l'ARNm de la COX-2 sont retrouvés dans les différentes cellules des voies respiratoires lorsque traitées avec du LPS ou des cytokines pro-inflammatoires. Cependant, le tissu pulmonaire peut également exprimer la COX-2 de manière constitutive et l'exposition aux polluants environnementaux des voitures augmentent l'expression de la protéine COX-2 et la formation de PGE₂ et PGF₂ (Samet, Reed et al. 1996).

5.4.1.2.5 Au niveau plaquettaire

À ce niveau, seul l'isoforme de la COX-1 est présente. C'est cette caractéristique particulière qui est à l'origine de l'action protectrice de l'aspirine vis-à-vis des accidents thrombotiques. L'aspirine, en inhibant la COX-1 plaquettaire, diminue la production de TxA₂ (Vane 1971; Collaboration 1994). En parallèle, la production de PGI₂ par l'endothélium est diminuée. Cependant, au niveau endothélial, la COX-1 peut y être régénérée et ainsi rétablir les niveaux de PGI₂. À l'inverse, au niveau plaquettaire il n'y pas

de capacité de production de nouvelle enzyme COX-1. De ce fait, la synthèse du TxA2 est alors inhibée pour la durée de vie de la plaquette (neuf jours) (Vane, Bakhle et al. 1998). Le ratio TxA2/PGI₂ est alors déplacé en faveur du PGI₂. Ce mécanisme est à la source du célèbre conseil : une demi-aspirine par jour pour la prévention des événements thrombotiques (Collaboration 1994).

5.4.1.3 L'inhibition de la COX

La découverte du second isoforme de la COX a relancé l'étude des prostanoïdes. Ces études physiopathologiques ont alors permis de relier la COX à de nombreuses pathologies : thrombose, inflammation, douleur, fièvre, cancer et désordre neurologique (Garavito and Mulichak 2003). La COX-2 étant induite par l'inflammation, beaucoup ont suggéré que l'action anti-inflammatoire des AINS non sélectifs (inhibiteurs de COX-1 et de COX-2) était due à leur inhibition de la COX-2 et que leurs effets secondaires non désirés, au niveau de l'estomac et du rein, venaient de l'inhibition de la COX-1. La recherche pharmacologique alimentée par ces nouveaux horizons, a alors donné le jour aux AINS sélectifs de la COX-2 (par exemple, célécoxib et rofécoxib). Les inhibiteurs sélectifs de la COX-2, les coxibs, ont été développés dans deux buts (Vane, Bakhle et al. 1998). Tout d'abord, afin d'inhiber la synthèse des prostacyclines via la COX-2, induite au site d'inflammation, pour diminuer la réponse inflammatoire. Deuxièmement, afin de maintenir l'activité d'entretien physiologique de la COX-1 constitutive. Les coxibs se lient de manière sélective et bloquent le site actif de la COX-2. Les inhibiteurs de la COX-2 ont une action analgésique, antipyrétique et anti-inflammatoire similaire au AINS non sélectifs mais sans les problèmes gastriques associés à la COX-1 (Vane and Botting 1998).

5.4.1.3.1 Mécanisme d'inhibition :

La différence entre les AINS sélectifs et non sélectifs repose sur la structure du site de cyclooxygénation des deux enzymes. Ce site est dans les deux cas un long canal hydrophobique. Cependant, le site actif de la COX-2 est spatialement plus large que celui de la COX-1. De ce fait, de plus grosses molécules sont alors capables d'atteindre le site

enzymatique de la COX-2 sans être bloquées par un encombrement stérique (Wong, Bayly et al. 1997). Cet arrangement spatial différentiel est le résultat d'une substitution des acides aminés isoleucine et valine (Ile/Val) en position 523 (Smith, DeWitt et al. 2000). La plus petite taille de la valine, comparativement à l'isoleucine, permet au canal enzymatique de la COX-2 de laisser passer de plus grosses molécules comparativement à la COX-1. Ces plus grosses molécules, incapables de rejoindre le site enzymatique de la COX-1, deviennent donc plus sélectives de la COX-2 (Gierse, McDonald et al. 1996). C'est sur ce principe que repose la différence entre les AINS non sélectifs et ceux sélectifs de la COX-2 : ces derniers sont plus « gros ».

Les affinités comparées des principaux AINS, vis-à-vis de ces deux enzymes, peuvent être très variables (Mitchell, Akarasereenont et al. 1993). Cette variabilité d'affinité est la raison pour laquelle on observe des effets indésirables (sur l'estomac et les reins) très variables d'un AINS à l'autre. En effet, plus l'AINS présente une affinité pour la COX-1, par rapport à la COX-2, plus les effets indésirables seront augmentés.

5.4.1.3.2 Inhibition sélective de la COX-2 : le célécoxib

Le célécoxib (Celebrex®) ou (4-[5-(4-méthylphényl)-3-(trifluorométhyl)-1H-pyrazol-1-yl] benzenesulfonamide) est un inhibiteur sélectif de la COX-2, environ 10 à 20 fois plus sélectif pour la COX-2 que pour la COX-1. Il est autant efficace que les autres AINS dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde et de l'ostéoarthrite, tout en causant moins de problèmes gastriques que les AINS non sélectifs (Brooks and Day 2000). Il est métabolisé par le cytochrome P450 CYP 2C9 au niveau du foie. Son action analgésique intervient en une heure. Il a été approuvé par la FDA aux États-Unis d'Amérique le 31 décembre 1998 pour l'arthrite rhumatoïde et ostéoarthrite (Brooks and Day 2000).

5.4.1.3.3 Coxibs et problèmes cardiovasculaires

De manière générale, les inhibiteurs sélectifs de la COX-2 n'ont montré aucun effet sur l'agrégation plaquettaire. En effet, ce mécanisme ne reposant que sur la COX-1, les

inhibiteurs sélectifs de la COX-2 n'offrent pas cet effet cardioprotecteur, comparativement aux AINS non sélectifs (section 5.4.1.2.5). Cependant, d'importantes interrogations se posent encore quand à la sécurité cardiovasculaire de cette famille d'anti-inflammatoires.

Actuellement, les coxibs sont utilisés dans le traitement de la croissance tumorale ainsi que dans l'inflammation chronique. C'est dans ce deuxième domaine que de nombreuses inquiétudes sont survenues ces dernières années. En effet, trois études cliniques, publiées en 2005 dans le *New England Journal of Medicine*, ont rapporté que les patients recevant un inhibiteur sélectif de la COX-2 présentaient une augmentation statistiquement significative du risque de développer un infarctus du myocarde ou d'avoir un événement cardiovasculaire de type thrombotique. Ces études ont marqué l'histoire de ce champ thérapeutique et ont modifié l'utilisation des molécules impliquées. La première étude nommée APPROVe (« Adenomatous Polyp Prevention on Vioxx ») a mené au retrait du marché de la molécule rofécoxib (Vioxx[®]) (Bresalier, Sandler et al. 2005). La deuxième étude nommée APC (« Adenoma Prevention with celecoxib ») a entraîné des modifications et des avertissements concernant les risques cardiovasculaires sur la monographie d'utilisation du célécoxib (Celebrex[®]) (Solomon, McMurray et al. 2005). Enfin, la troisième étude évaluait la sécurité du Valdécoxib (Bextra[®]) et de sa forme injectable le parecoxib, suite à une opération de type pontage coronarien (CABG). Cette étude était arrivée aux mêmes conclusions que les deux premières et a mené au retrait du marché de cette molécule (Nussmeier, Whelton et al. 2005).

Ces trois études ont confirmé la toxicité cardiovasculaire des inhibiteurs sélectifs de la COX-2. Il a également été publié que le risque de développer un infarctus du myocarde, une mort subite cardiaque (SCD : *sudden cardiac death*) ou une angine instable, était 1.35 fois plus élevé avec un inhibiteur sélectif de la COX-2 qu'avec un AINS non sélectif (Tsatsanis, Androulidaki et al. 2006). Il est apparu, que dans ce phénomène, le ratio TxA2/Prostacycline soit mis en cause. En effet, les inhibiteurs de la COX-2 diminuent les niveaux de prostacyclines et déplacent le ratio en faveur du TxA2, perturbant ainsi

l'homéostasie de l'endothélium vasculaire et augmentant les chances de thrombose (Tsatsanis, Androulidaki et al. 2006).

5.4.1.4 La COX-2

5.4.1.4.1 Régulation générale de la COX-2

Bien qu'un très grand nombre de molécules influencent la COX-2, voici une liste principale de ces dernières et de leurs effets (Figure 5.2).

Le LPS a été le premier inducteur reconnu de la COX-2 dans les macrophages (Lee, Soyoola et al. 1992). Cette induction se réalise via l'activation de la p38 MAPK et du facteur de transcription ERK1/2.

Également, le NO affecte directement la COX-2 en augmentant son activité catalytique et indirectement en jouant sur les facteurs impliqués (AMPc/PKA/CREB) dans la transcription de la COX-2 (Landino, Crews et al. 1996; Liu, Borchert et al. 2004). De plus, la iNOS (monoxyde d'azote synthase inductible) augmente directement l'activité enzymatique de la COX-2 via une nitrosylation (Tsatsanis, Androulidaki et al. 2006).

D'autre part, les cytokines, telles qu'IL-1, TNF- α et IL-6 induisent l'expression de la COX-2. Ces voies impliquent l'AMPc, la PKA et le facteur de transcription CREB et ERK1/2 (Tsatsanis, Androulidaki et al. 2006).

Les facteurs de croissance, tels que l'IGF (*insulin like growth factor*), le FGF et l'EGF exercent une part de leur effet via la COX-2. Ces voies impliquent la PI3Kinase, ERK et la p38MAPK (Chun and Surh 2004). Aussi, les radiations UVB induisent l'expression de la COX2 dans les cellules cancéreuses. Cette voie recourt à la p38MAPK et la PI3K (Bachelor, Cooper et al. 2005).

Une régulation fine du niveau d'expression de la COX-2 peut être effectuée par les protéines se couplant aux RCPG (récepteurs couplés aux protéines G). Le CRH (hormone relâchant la corticotropine) augmente la COX-2 induite par le LPS via l'AMPc/PKA et

CREB (McEvoy, Bresnihan et al. 2004). Également, les lipides de type céramide, sont des médiateurs lors de l'induction de la COX-2 par TNF- α (Pettus, Bielawski et al. 2003).

Enfin, le niveau protéique de la COX-2 est également régulé à un niveau post-translational via une modulation de la stabilité de son ARNm. En effet, l'ARNm de la COX-2 présente à son extrémité 3' un élément nommé ARE (*AU riche element*) responsable de sa stabilité. Les cytokines IL-1- β et TNF- α augmentent la stabilité de la COX-2, via la p38MAPK. De plus, l'hypoxie semble augmenter cette stabilité via l'induction de TNF- α (Tsatsanis, Androulidaki et al. 2006).

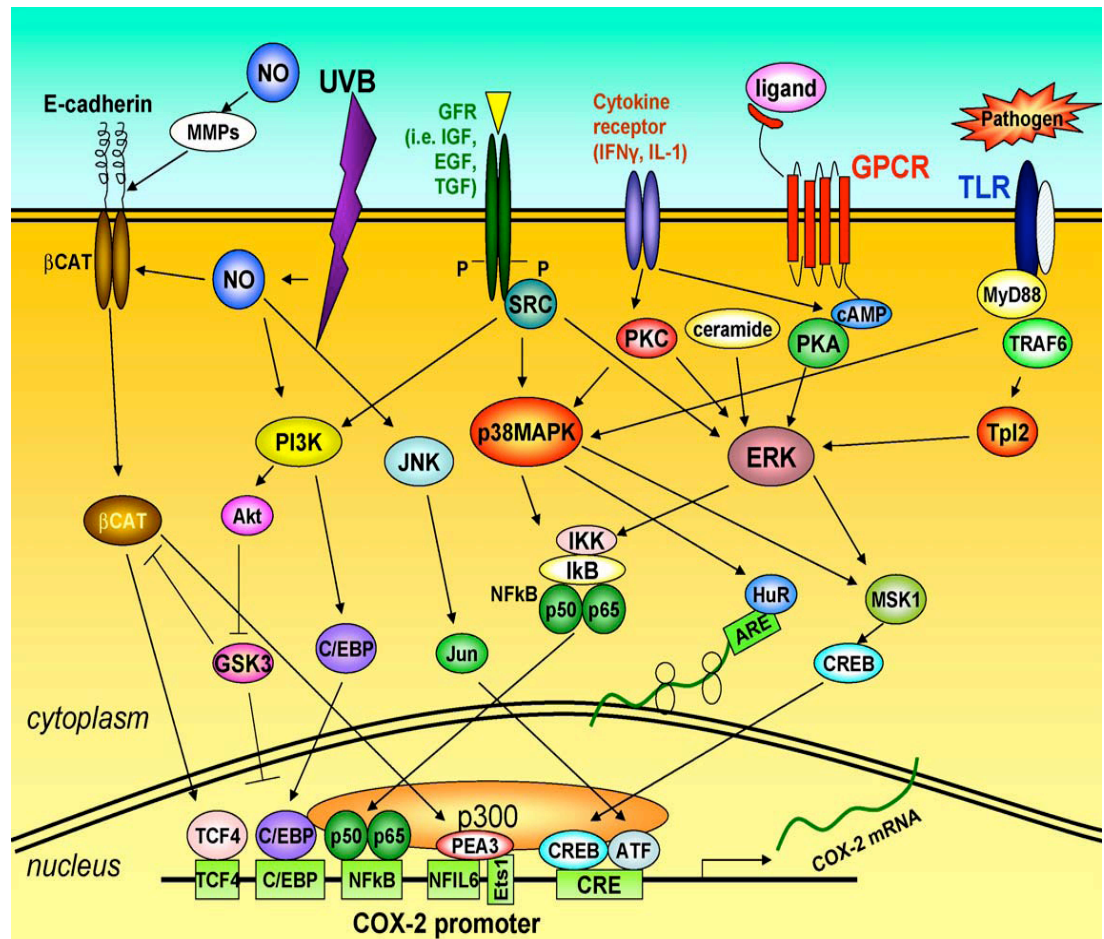


Figure 5.2 : Facteurs endogènes et exogènes interagissant avec les récepteurs impliqués dans les voies de signalisations impliquées dans la régulation de l'expression de la COX-2 (tiré de Tsatsanis et al (2006))

5.4.1.4.2 COX-2 et pathologies :

La COX-2 est associée à l'inflammation chronique, telle que l'arthrite rhumatoïde. En effet, la COX-2 est surexprimée au niveau synovial chez les patients avec de l'arthrite rhumatoïde (Tsatsanis, Androulidaki et al. 2006). D'autre part, l'expression de la COX-2 est augmentée dans les macrophages lors de l'exposition à de hauts niveaux de LDL oxydés (*low density lipoproteins*), (Tuomisto, Riekkinen et al. 2005). Également, des inhibitions sélectives de l'expression de la COX-2 réduisent l'athérogenèse précoce chez les souris

déficientes en récepteur au LDL (LDLR (-/-) et APO-E (-/-)) (Burleigh, Babaev et al. 2005).

La COX-2 a également été associée au cancer. En effet, l'induction de l'expression de la COX-2 a été impliquée dans les processus de tumorigénèse et de métastase. La COX-2 a été retrouvée hautement exprimée dans un grand nombre de cellules humaines malignes (Chun and Surh 2004). Un traitement aux inhibiteurs sélectifs de la COX-2 a montré une réduction de la croissance des carcinomes dans le colon ayant été transplantés dans un modèle de souris nude (système immunitaire déficient) (Sheng, Shao et al. 1997).

Il a également été observé une implication de la COX-2 dans la pathologie d'Alzheimer. Des études épidémiologiques ont suggéré que les AINS pourraient réduire le risque de développement d'Alzheimer ou retarderaient son démarrage (Launer 2003). En effet, le dépôt de plaques amyloïde- β est associé à une inflammation chronique (Vane, Bakhle et al. 1998). Cependant, les études cliniques conçues pour inhiber l'inflammation ou l'activité des cyclo-oxygénases (1 et 2) n'ont pas permis le traitement de la pathologie (Launer 2003; Hoozemans and O'Banion 2005).

5.5 Inflammation et ischémie/reperfusion du myocarde

Lors du premier chapitre de cette thèse (section 1.1.3.2), les éléments de la réponse inflammatoire impliqués dans l'ischémie/reperfusion, à savoir : l'activation du complément, l'infiltration des neutrophiles, la relâche des espèces réactives de l'oxygène, etc., ont été détaillés. Ces aspects ne seront donc pas revus ici.

Afin de développer des stratégies permettant la réduction de la blessure inflammatoire et la réparation du tissu myocardique, il est fondamental de bien comprendre la cascade de la réponse inflammatoire (section 5.2).

L'infarctus du myocarde est associé à une réponse inflammatoire très forte. Cette réponse inflammatoire constitue également le point de départ du processus de réparation et de formation de la cicatrice du tissu myocardique (Mehta and Li 1999). Dans cette

observation, la complexité réside dans le fait que l'action délétère et la réparation font partie du même processus. Le défi est donc d'orienter cet équilibre vers la réparation, plutôt que vers la blessure.

Dans cette thèse, il a principalement été question de la réponse inflammatoire consécutive à l'infarctus du myocarde. Cependant, la relation inverse peut s'avérer très intéressante. En effet, de nombreuses études épidémiologiques ont montré que des niveaux, même bas, d'inflammation, constituent un facteur prédictif, indépendant des maladies ischémiques cardiovasculaires (Ridker, Rifai et al. 2000; Ridker 2001). Récemment, l'étude JUPITER (Justification for the Use of Statins in Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin) a mis en évidence qu'un traitement avec le rosuvastatine, chez une population saine ne présentant pas d'hyperlipidémie, permettait, en diminuant les taux de protéine C réactive, une diminution du risque d'accident cardiovasculaire (Ridker, Danielson et al. 2008). De plus, des évidences expérimentales ont montré que les marqueurs d'inflammation chronique, tels que l'IL-6, le TNF- α et la protéine C réactive (CRP) avaient un rôle direct dans l'étiologie de l'athérosclérose (maladie inflammatoire) (Robbie and Libby 2001), elle-même menant aux accidents cardiovasculaires.

5.6 Inflammation et apoptose

L'apoptose est un processus hautement impliqué dans la phase de résolution de la réponse inflammatoire (RI) aiguë. Les neutrophiles sont constitutivement programmés pour subir l'apoptose, ce qui limite leur potentiel pro-inflammatoire et ultimement, mène à leur reconnaissance par les macrophages. Ce même mécanisme a également été observé chez les éosinophiles, les lymphocytes et les monocytes (Savill 1997). Cependant, il est généralement admis par la communauté scientifique que l'apoptose n'est pas source d'inflammation. Alors, la question est : comment les macrophages trouvent-ils leur cible? Il est fort probable qu'une réponse inflammatoire les attire sur ce lieu (Majno and Joris 1995). Bien que la question ne soit pas résolue, il est possible de penser que les cellules qui meurent par petit nombre à des moments différents, relâchent une quantité très faible de

composé chimiotactique. Cette quantité serait insuffisante pour déclencher une réponse inflammatoire d'intensité normale, mais suffisante pour attirer des macrophages. En effet, Bowen-Pope et coll ont montré que la mort par apoptose de cellules musculaires lisses initiée par le FADD ou une liaison à Fas, incluait l'expression spécifique de protéines pro-inflammatoire (Bowen-Pope and Schaub 2001).

5.7 Inflammation, dépression et infarctus du myocarde

À présent que chaque élément a été développé séparément, il est intéressant de voir comment les notions d'inflammation, de dépression et d'infarctus du myocarde (IM) peuvent s'agencer entre elles.

Comme il a déjà été abondamment décrit dans la section 3.1, la dépression est un élément prédictif de mortalité à long terme et à court terme chez les patients ayant déjà eu un infarctus du myocarde. D'autre part, avoir un infarctus du myocarde est également un facteur prédictif de la dépression dans la population en général (Lesperance and Frasure-Smith 2007). De plus, l'athérosclérose ou l'infarctus du myocarde peuvent entraîner des changements physiologiques menant à la dépression. En effet, ces deux pathologies ont en commun d'être associées à une forte augmentation de la production des cytokines périphériques (Kosmala, Przewlocka-Kosmala et al. 2005; Schiepers, Wichers et al. 2005). Ces dernières, en induisant la production de cytokines au niveau cérébral, activeraient l'axe HPA et inhiberaient l'activité sérotoninergique. Ce mécanisme pourrait alors potentiellement mener à des troubles du comportement (Maier and Watkins 1998).

Récemment, Wann et coll. ont développé un modèle de dépression post-infarctus du myocarde chez le rat. Il a alors été observé que 14 jours après l'infarctus du myocarde, les rats montraient des caractéristiques comportementales similaires à celles observées chez l'humain dépressif, c'est-à-dire une augmentation de l'anhédonie et de l'abandon. De plus, ces mêmes observations étaient associées à de l'apoptose dans certaines régions cérébrales (cortex préfrontal, amygdale, etc.), trois jours après l'infarctus du myocarde. Cette apoptose

et ces comportements étaient renversés par l'administration de pentoxifylline (inhibiteur de la synthèse des cytokines) ou d'un antidépresseur (Wann, Boucher et al. 2006; Wann, Bah et al. 2007). Cette étude souligne alors fortement la relation entre ces trois composantes : l'inflammation, la dépression et l'infarctus du myocarde.

Enfin, l'association entre les marqueurs de l'inflammation, tels que sICAM-1 (*soluble inter-cellular adhesion molecule 1*), IL-6 et PCR (protéine C réactive), la dépression et l'infarctus du myocarde a été évaluée. Chez 602 patients, après deux mois d'hospitalisation pour un infarctus du myocarde (IM), les niveaux de sICAM-1 et de PCR étaient significativement plus hauts chez la sous-population des patients avec dépression (Frasure-Smith, Lesperance et al. 2007).

À ce jour, il n'y a pas de schéma clair permettant d'ordonner et de définir la relation entre ces trois mécanismes. Cependant, leurs interconnexions apparaissent clairement. Pourtant, l'hypothèse suscitant de nombreuses études est celle des cytokines. En effet, ces dernières pourraient avoir un rôle de médiateur entre ces trois composantes.

6 Chapitre 6 : Cytokines et dépression post infarctus du myocarde

Les cellules, plus précisément celles du système immunitaire, peuvent interagir entre elles, et ce, grâce à des molécules de communications appelées cytokines. Ces cytokines sont vues comme les hormones du système immunitaire (SI) et orchestrent la réponse inflammatoire (RI). Elles peuvent coordonner les RI avec celles des autres systèmes physiologiques de l'organisme, incluant le système nerveux (Dunn, Swiergiel et al. 2005).

6.1 Généralités

Les cytokines sont des petites glycoprotéines solubles de 8 à 80 kDa. Elles sont produites par un large éventail de cellules immunitaires et non immunitaires (Rankin 2004). Ces cytokines peuvent avoir une action sur les cellules qui les produisent (autocrine), sur les cellules environnantes (paracrine) et sur des cellules plus lointaines (endocrine). Ces molécules jouent un rôle très important dans le processus inflammatoire et la réponse immunitaire. De plus, leurs actions peuvent être additives, synergiques ou inhibitrices (Kenis and Maes 2002).

L'ère des cytokines débuta dans les années 1960, avec la mise en évidence de médiateurs des lymphocytes : les lymphokines (Dumonde, Wolstencroft et al. 1969) et de l'interféron (IFN) en 1954 (Nagano and Kojima 1954). Les cytokines constituent la quatrième famille des molécules solubles intracellulaires avec les neurotransmetteurs, les hormones endocriniennes et les autocoïdes. Les cytokines sont classées en lymphokines, interleukines et chemokines. Cette classification tient compte de leurs actions, activités sécrétoires et actions sur la cible. De manière générale, les cytokines sont classées en deux types : pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires. Les cytokines pro-inflammatoires supportent la réponse inflammatoire et stimulent ou activent les cellules immunocompétentes. Les cytokines anti-inflammatoires inhibent la réponse inflammatoire (RI) et désactivent ces cellules impliquées. Les cytokines pro-inflammatoires les plus importantes sont IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α et IFN- γ . Le plus grand représentant des anti-

inflammatoires est l'IL-10 (Kenis and Maes 2002). Il est possible de souligner quatre grandes caractéristiques concernant les cytokines :

- Des cellules de différents types peuvent produire la même cytokine ;
- Les cytokines peuvent agir sur différents types cellulaires sous diverses circonstances (pleiotropisme) ;
- Différentes cytokines peuvent avoir la même activité dépendamment de la situation (redondance) ;
- Les cytokines peuvent agir entre elles, en combinaison, produisant ainsi des effets synergiques sur la cellule cible.

D'autre part, il existe environ trente cytokines chimioattractantes appelées chemokines responsables de ce phénomène (Furie, Tancinco et al. 1991). Il faut rappeler que le chimiotactisme est le processus responsable de l'attraction des cellules immunitaires sur le lieu de l'inflammation.

Concernant leurs effets, les cytokines agissent via des récepteurs spécifiques liés aux membranes. Ensuite, par des mécanismes de signalisation intracellulaire, incluant des enzymes intracellulaires et des facteurs de transcription, elles peuvent réguler les gènes relatifs aux cytokines ou à d'autres protéines (Schwartz and Barry 1994). Il existe également une forme de récepteur soluble dans la circulation (Nathan and Sporn 1991).

Enfin, il existe des inhibiteurs endogènes des cytokines, dont l'IL-1ra (Licinio, Wong et al. 1991). Les glucocorticoïdes et les oméga 3 présentent également une action inhibitrice (Cooper, Horan et al. 1992). La méthylxanthine pentoxifylline, via l'inhibition de la PDE (phosphodiesterase), les inhibe également (LeMay, Vander et al. 1990).

6.2 Hypothèse des cytokines. Évidences expérimentales et cliniques

Dernièrement, il fut supposé que certains types de dépression pourraient être causés par une augmentation importante de la sécrétion de cytokines, elle-même consécutive à

l'activation du système immunitaire (Dunn, Swiergiel et al. 2005). En effet, il a été observé un plus grand nombre d'anomalies du système immunitaire chez les patients dépressifs par rapport à la population générale.

De plus, la dépression a été observée comme un effet secondaire courant des thérapies utilisant les cytokines. Les cytokines (IFN- α , IFN- β , IFN- γ et IL-2) sont en effet utilisées dans le traitement de certaines maladies comme l'hépatite C. L'incidence de la dépression lors de ces traitements varie de 0 à 45 % (de Beaurepaire 2005). Ces cytokines produisent alors des effets caractéristiques de la dépression, tels que l'asthénie, la myalgie et des symptômes similaires à ceux produits par la grippe (Valentine, Meyers et al. 1998). Au niveau clinique, des troubles du comportement s'apparentant à la dépression, ont été observés chez des patients traités avec de l'IFN et de l'IL-2 (Dunn, Swiergiel et al. 2005).

D'autre part, les animaux malades présentent de manière générale une diminution de l'alimentation, de l'exploration et de l'activité sexuelle. On observe également une augmentation de la température corporelle et du temps de sommeil. Ces mécanismes ont été avec le temps, définis comme une stratégie hautement organisée ayant pour but la survie. Ben Hart, le père de cette idée, a souligné que l'IL-1 et le LPS induisaient des comportements similaires à ceux de l'animal malade (Hart 1988; Kent, Bluthé et al. 1992). Bien que les caractéristiques de cette maladie du comportement et celles de la dépression ne se recoupent pas parfaitement, cette hypothèse croisée a suscité de nombreuses études. De plus, il a été montré que l'administration de LPS ou d'IL-1 entraînait des comportements appelés maladie du comportement (Kent, Bluthé et al. 1992). Smith, quant à lui, suggéra que la dépression était associée à une augmentation de la sécrétion des cytokines, spécialement l'IL-1 produit par les macrophages (Smith 1991). Il montra également, qu'en plus d'induire des comportements de type dépressif, l'IL-1 activait l'axe HPA. Ce dernier étant un élément caractéristique retrouvé chez certains patients dépressifs, comme il a été décrit précédemment (section 2.1.3).

6.2.1 Activation immunitaire chez le patient dépressif

Au cours de la dépression, une activation du système immunitaire a été observée. Une augmentation des protéines positives de la phase aiguë (céruloplasmine, PCR, emopexine) et une diminution de la concentration plasmatique des protéines négatives de la phase aiguë (albumine, transferrine) furent alors associées à la dépression (Maes 1995). Ce bilan est le témoin d'un état inflammatoire. Il a alors été avancé que la dépression chronique était associée à l'inflammation chronique (Maes 1995). De plus, les sujets dépressifs ont montré une augmentation des marqueurs inflammatoires, tels que les prostaglandines et le thromboxane A₂ (Lieb, Karmali et al. 1983). L'IL-1 β et l'IL-6 et les IFN étaient également augmentés dans le plasma des patients dépressifs (Maes, Bosmans et al. 1993). De manière intéressante, une étude a révélé une augmentation des taux d'IL-1 β et une diminution d'IL-6 dans le CSF (fluide cérébrospinal) chez les patients déprimés. Cette augmentation d'IL-1 β a été corrélée à la sévérité de la dépression (Levine, Barak et al. 1999). D'autre part, la dépression, ainsi que ses symptômes, ont été observés dans des maladies non infectieuses associées à une activation chronique du système immunitaire, telles que l'allergie ou l'arthrite rhumatoïde (Dickens, McGowan et al. 2002). Cependant, bien que Maes et coll ont été les premiers à avancer les analogies entre la dépression chronique et l'inflammation chronique, ces résultats et cette hypothèse restent très controversés car ces résultats n'ont pas toujours été répliqués avec d'autres auteurs (Dantzer and Kelley 2007). Cette théorie, des cytokines pro-inflammatoires responsables de la réponse aiguë et qui agiraient sur le cerveau pour induire la dépression, nécessite encore des travaux.

L'activation de l'axe HPA chez l'homme, révélée par l'augmentation des taux sanguins de cortisol chez une certaine population de patients, est l'un des marqueurs biologiques de la pathologie dépressive. Il est retrouvé chez 50 à 70 % des patients (Maes, Bosmans et al. 1993). Les cytokines, telles que l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- α ont pu activer l'axe HPA (Besedovsky, del Rey et al. 1986). Également, l'IFN- α et l'IFN- γ ont pu causer

une activation marquée de l'axe HPA chez l'homme (Capuron, Raison et al. 2003). Cette activation de l'axe HPA apparaît alors comme un marqueur de dépistage des patients dépressifs et semble au centre de la physiopathologie dépressive.

6.3 Voies de communication entre les cytokines périphériques et le cerveau

Les cytokines sont des molécules hydrophiles de taille importante (8-80 kDa). Pourtant, malgré l'existence de la barrière hémato-encéphalique (BHE), il semble y avoir une communication forte entre les cytokines périphériques et le système nerveux central (SNC). Bien que pas totalement éclaircie, la relation entre la production de cytokines périphériques et la production de cytokines au niveau central apparaît très forte. En effet, il a été rapporté que l'injection périphérique de LPS induit l'expression d'ARNm d'IL-1 β , d'IL-6 et de TNF- α dans le SNC (Dantzer 1994). Les caractéristiques physico-chimiques des cytokines rendent très faibles la portion de cytokines capables de traverser la BHE par diffusion passive (Connor and Leonard 1998), il existe donc d'autres voies de communication.

6.3.1 Espaces circumventriculaires

Les cytokines périphériques profiteraient de zones où la BHE n'est pas fonctionnelle (Hosoi, Okuma et al. 2002). Ces zones sont appelées organes ou espaces circumventriculaires (Hopkins and Rothwell 1995). Il a été montré que les cytokines se lient aux cellules gliales qui se retrouvent dans ces zones. Ces cellules, à leur tour, produisent des cytokines et d'autres médiateurs de l'inflammation, comme le PGE₂ (Zhang and Rivest 1999; Rivest 2001). Chez le rat, il a été montré que des injections périphériques d'IL-1 β élevaient les niveaux de PGE₂ centraux (Komaki, Arimura et al. 1992). Cette augmentation était plus importante et plus rapide au niveau des organes circumventriculaires et précédait l'apparition de la fièvre. Également, de nombreuses cytokines tout comme le LPS, ont induit des réponses neurochimiques et comportementales

apparentées à la dépression. Ces dernières ont pu être atténuées par des inhibiteurs de la COX comme l'indométhacine, renforçant ainsi l'implication du PGE₂ (Connor and Leonard 1998). Enfin, il a été suggéré que l'IL-1 périphérique agirait sur la COX au niveau des neurones situés dans les organes circumventriculaires, produisant ainsi des prostaglandines locales. Ceci suggère alors que l'IL-1 périphérique induirait la synthèse et la relâche d'IL-1 au niveau central (Saper and Breder 1992).

6.3.2 Nerf Vague

Un mécanisme de type neural permettrait aux cytokines périphériques d'agir sur le SNC (Dantzer 1994) (Hosoi, Okuma et al. 2002). En effet, il a été montré qu'une vagotomie (subdiaphragme) atténuait les effets de type dépressif consécutifs à l'injection d'endotoxine. Dans ce contexte, la diminution de l'expression d'ARNm d'IL- β dans l'hypothalamus a également été observée (Dantzer 1994). De plus, la vagotomie bloquait l'activation de l'axe HPA normalement observée par administration périphérique d'IL-1 β et de TNF- α (Fleshner, Goehler et al. 1995). L'implication du nerf vague s'explique par les éléments suivants. D'abord, le nerf crânien numéro 10 innerve des tissus connus pour participer à la fonction immunitaire, tels que le thymus, le foie et le tractus gastro-intestinal. Puis, le nerf vague est souvent associé aux nœuds lymphatiques relatifs aux régions actives d'un point de vue immunitaire (Maier, Goehler et al. 1998). Enfin, il possède un grand pourcentage de fibres afférentes se terminant au niveau du tronc cérébral (noyaux du tractus solitaire), région présentant une forte activation lors d'un challenge immunitaire (Wan, Wetmore et al. 1994). D'autre part, il a également été observé que des injections d'IL-1 β au niveau de la veine hépato-portale augmentaient l'activité électrique du nerf vague (Niiijima 1996).

6.3.3 Transport actif spécifique

Des études ont montré que l'IL-1 pouvait traverser la BHE via des transporteurs actifs (Banks, Kastin et al. 1989; Banks, Ortiz et al. 1991). Ce même type de mécanisme a

été décrit pour le TNF- α (Gutierrez, Banks et al. 1993). Cependant, ce type de voie ne serait responsable du passage que d'une très faible quantité de cytokines (Hopkins and Rothwell 1995; Hosoi, Okuma et al. 2002).

6.4 Cytokines dans le système nerveux central

Les taux constitutifs des cytokines sont normalement bas (Hopkins 2003). Cependant, lors d'agressions diverses et variées, on observe une production centrale de cytokines. Les cellules immunitaires telles que les macrophages, les cellules T et les neutrophiles et qui envahissent le cerveau lors de l'inflammation, sont une grande source de cytokines (Hopkins and Rothwell 1995). Également, les astrocytes, les cellules de la microglie, les neurones, les cellules endothéliales ainsi que les cellules périvasculaires peuvent produire ces cytokines. Il est également apparu que la production d'IL-1, d'IL-6 et de TNF- α était plus importante au niveau de l'hypothalamus et de l'hippocampe (Breder, Dinarello et al. 1988). Ceci correspond à l'identification des récepteurs de cytokines dans le tissu cérébral, où une forte densité de ceux-ci a été relevée dans ces régions (hypothalamus et hippocampe).

6.4.1 Actions des cytokines dans le cerveau

Comme il a déjà été évoqué, la fièvre, l'altération des fonctions neuro-endocriniennes, cardiaques, l'augmentation du métabolisme, l'altération du comportement (maladie du comportement) et la synthèse protéique de phase aiguë sont caractéristiques d'une infection ou d'une inflammation. Il apparaît que la plupart de ces caractéristiques ont pu être mimées par une injection périphérique ou centrale de cytokines (Rothwell and Hopkins 1995). Cependant, l'injection centrale s'est révélée plus efficace. Les cytokines peuvent donc moduler des fonctions systémiques par actions directes sur le cerveau. La découverte et l'utilisation de l'inhibiteur endogène IL-1-récepteur antagoniste (IL-1ra), présent dans le tissu cérébral normal, a permis de nombreuses découvertes (Licinio, Wong et al. 1991). En effet, des injections centrales d'IL-1ra ont inhibé l'activation de l'axe HPA,

les désordres du sommeil ainsi que les désordres comportementaux (Rivier and Rivest 1993; Opp and Krueger 1994; Rothwell and Hopkins 1995). Sur un autre aspect, la réponse de type pyrogénique consécutive à l'injection centrale de la plupart des cytokines a été attribuée à la relâche de prostaglandines (Kluger 1991).

Les cytokines peuvent également influencer les fonctions immunitaires périphériques par des effets directs sur le cerveau. Une injection centrale d'IL-1 a causé une augmentation marquée des concentrations circulantes d'IL-6 (De Simoni, De Luigi et al. 1993), ainsi qu'une diminution de l'activité des cellules NK (*natural killer*) au niveau périphérique (Sundar, Cierpial et al. 1990).

Dans des modèles d'ACV (accident cérébro-vasculaire), il a été montré que l'inflammation périphérique entraînait une diminution de la perméabilité de la BHE. Ce mécanisme incluait les cytokines, les neutrophiles et la MMP-9 (matrix métalloprotéinases-9) (McColl, Rothwell et al. 2008).

6.4.2 Actions des cytokines sur les fonctions cérébrales

Les cytokines peuvent influencer de diverses manières de nombreux neurotransmetteurs, NE, 5-HT, GABA et ACh ainsi que l'expression de plusieurs neuropeptides (CRH, somatostatine, substance P, opioïdes) dans différentes régions cérébrales (Hopkins and Rothwell 1995; Rothwell and Hopkins 1995). En effet, les cytokines, via leurs récepteurs, agissent sur un grand nombre de seconds messagers, tels que l'AMPc, la PKC, etc. Ceci permet aux cytokines d'être impliquées dans d'autres phénomènes, tels que la croissance et la différenciation neuronale (Patterson and Nawa 1993) et dans l'évolution de la plasticité neuronale. Ces mécanismes intracellulaires croisés rendent difficiles l'attribution des effets pour chacune des cytokines au niveau cérébral. Il est donc complexe d'établir spécifiquement le lien entre une variation observée au niveau d'un neurotransmetteur et l'effet d'une cytokine spécifique.

6.4.3 Cytokines, dépression et système sérotoninergique

Les troubles du système sérotoninergique (incluant les récepteurs) sont depuis longtemps présentés comme d'importants acteurs dans la pathophysiologie dépressive. En effet, de nombreux antidépresseurs affectent la neurotransmission sérotoninergique (Manji, Drevets et al. 2001). De manière intéressante, l'IFN- γ sécrété lors d'une inflammation/infection induit fortement l'indoleamine 2,3 dioxygénase (IDO) dans les macrophages et d'autres cellules (Wichers and Maes 2004). Cette enzyme dégrade le tryptophane précurseur de la sérotonine. Des concentrations faibles en tryptophane ont été associées à la dépression (Coppen and Wood 1978). Bien qu'il apparaisse peu probable qu'une baisse de tryptophane déclenche la dépression, il apparaît que cette dernière entraîne la rechute chez un patient déjà dépressif traité aux antidépresseurs (de type ISRS) (Delgado, Miller et al. 1999).

6.4.4 Cytokines et antidépresseurs

Une augmentation importante des niveaux de cytokines a été associée à la mise en place de la pathologie dépressive (ou une rechute). Il semble alors légitime de postuler qu'un traitement aux antidépresseurs contreviendrait à cette relâche de cytokines par les cellules immunitaires périphériques ou par les cellules du SNC. Dans cette optique, il a été montré que lors d'une induction au LPS, l'incubation in vitro de monocytes avec des antidépresseurs, tels que la clomipramine, l'imipramine ou le citalopram, produisait une inhibition marquée de la sécrétion d'IL-1 β , de TNF- α et d'IL-6 (Xia, DePierre et al. 1996). De manière intéressante, il a également été montré qu'un traitement chronique (28 jours) à l'imipramine ou à la fluvoxamine produisait une grande augmentation de l'expression d'IL-1ra (antagoniste endogène du récepteur) dans le cerveau du rat (Suzuki, Shintani et al. 1996). Cette augmentation était observée de manière plus significative au niveau de l'hypothalamus, l'hippocampe, le cortex frontal et le tronc cérébral. Cependant, cette observation était également associée à une augmentation de l'expression de l'ARNm d'IL-

1 β , mais de manière moins importante. Il est intéressant de souligner que ces observations, réalisées après un traitement chronique de 28 jours, n'étaient pas présentes lors d'un traitement aigu de 4 jours. Il semble alors que la cinétique temporelle des changements moléculaires correspond à la période nécessaire pour la mise en place des effets thérapeutiques des antidépresseurs.

Lors de l'administration de LPS à un animal, on observe des comportements appelés maladie du comportement. Shen et coll. ont montré que lors d'un traitement chronique avec la désipramine (antidépresseur tricyclique), la production de TNF- α consécutive à l'injection de LPS était inhibée et la sécrétion d'IL-10 était potentialisée. De plus, un prétraitement à la désipramine atténuait les changements comportementaux consécutifs à l'injection de LPS (Shen, Connor et al. 1999). Il est à noter que la paroxétine (ISRS) n'a pas présenté ces mêmes résultats.

À présent, bien que rien ne soit complètement élucidé, il serait intéressant de voir rapidement les mécanismes envisagés pouvant expliquer les effets des antidépresseurs sur les cytokines. Le premier mécanisme ferait intervenir les effets des antidépresseurs sur le système sérotoninergique. En effet, les récepteurs de ce système sont présents sur les cellules immunitaires. Également, la sérotonine (5-HT) inhibe la production d'IFN- γ lorsque stimulé par du PBMC humain (*peripheral blood mononuclear cells*) (Arzt, Fernandez-Castelo et al. 1988). Les ISRS, en augmentant les niveaux de 5-HT, peuvent par cette voie participer à l'inhibition des cytokines (Kubera, Kenis et al. 2000). Cependant, d'autres études opposées aux précédentes, décrivent des vertus immunostimulantes à la sérotonine. En effet, de faibles doses de sérotonine stimuleraient la synthèse de cytokines, alors qu'à de hauts niveaux, la sérotonine inhiberait leur synthèse (Hellstrand, Czerkinsky et al. 1993).

La deuxième voie serait l'augmentation par les antidépresseurs, dans de nombreux types cellulaires dont les cellules immunitaires, des niveaux d'AMPc. Il a été montré que l'activation de la cascade de signalisation de l'AMPc/PKA inhibait la synthèse des

cytokines (Zidek 1999). De manière intéressante, de nombreux récepteurs présentant une affinité pour les antidépresseurs sont également couplés positivement à cette voie de signalisation PKA/AMPC, comme le récepteur β_2 adrénergique, de nombreux récepteurs de la sérotonine, etc. De plus, l'activation de cette voie stimule la synthèse d'IL-10 (Benbernou, Esnault et al. 1997).

De manière générale, bien que la nature de cette relation reste encore à préciser, l'association entre l'apparition de la dépression et l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires semble établie. Devant la diversité des résultats des études qui traitent de cette question, il est important de rappeler l'importance des outils d'analyse et de mesure. En effet, concernant les cytokines, il faut rappeler que les niveaux retrouvés à l'état normal et pathologique sont très faibles. De plus, la multitude de tests et de méthodologies utilisés lors de ces études ont participé à cette variabilité de résultats. A présent, la méthode ELISA (*enzyme linked immunoabsorbant assay*), ainsi que le *radio-immunoassay* (RIA) sont les références dans ce domaine et apportent une certaine standardisation. Cependant, la venue de techniques plus sensibles, standardisées et reproductives sera un élément déterminant dans l'évolution de ces recherches (Kenis and Maes 2002).

6.5 La famille tumor necrosis factor (TNF)

C'est en 1968 (Granger and Williams 1968; Williams and Granger 1968) et en 1975 (Carswell, Old et al. 1975) que des études ont montré l'existence de molécules aux propriétés cytotoxiques. Ces molécules relâchées dans la circulation de l'animal par les lymphocytes et les macrophages après une stimulation au LPS, ont tout d'abord été nommées lymphotoxine et TNF. Après identification de leur structure et constatation de leur homologie, ces molécules devinrent respectivement le TNF- β et le TNF- α (Carswell, Old et al. 1975). Lors de cette découverte, des propriétés antitumorales furent également associées à cette famille de TNF appartenant aux groupes des cytokines.

6.5.1 Le TNF- α

6.5.1.1 Généralités

Le TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*) est une cytokine soluble pléiotropique. Elle est impliquée dans l'apoptose, l'activité antitumorale, la prolifération cellulaire, l'immunomodulation, l'inflammation (infarctus du myocarde), la régulation du sommeil, l'allergie, le développement embryonnaire (Idriss and Naismith 2000), ainsi que dans les maladies auto-immunes comme l'arthrite rhumatoïde (Beutler 1999). Le TNF- α existe sous deux formes (Beyaert and Fiers 1994). Il est d'abord exprimé sous forme de précurseur de 157 a.a., précédés de 76 a.a., dits de préséquence. Cette préséquence est très conservée et joue un rôle d'ancrage dans la membrane (Vilcek and Lee 1991). A la différence du TNF- β qui est sécrété, le TNF- α est produit comme une protéine membranaire de type 2. À ce stade la TNF- α présente un poids moléculaire de 26 kDa. Son clivage protéolytique par la métalloprotéase TACE (*TNF alpha converting enzyme*) donnera la deuxième forme active soluble du TNF- α de 17kDa (Idriss and Naismith 2000). Le TNF- α ainsi clivé se retrouve sous forme d'homotrimère de 52 kDa (Smith and Baglioni 1987). Le TNF- α est produit par une très grande variété de cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques telles que les macrophages, les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, les lymphocytes B, les cellules NK, les neutrophiles, les astrocytes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (Vilcek and Lee 1991). Enfin, le TNF- α agit via ses récepteurs sur un grand nombre de voies de signalisation. Ceci a pour conséquence, que le TNF- α peut soit conférer une résistance à certaines maladies, soit peut causer des complications pathologiques (Fiers 1991).

6.5.1.2 Récepteurs

Les récepteurs de la famille TNF contiennent de deux à six domaines riches en cystéines dans leur domaine extracellulaire. Il existe deux types de récepteurs au TNF. D'abord le type 1 (TNF-R1, CD120a, p55/60, 55kDa) exprimé dans toutes les cellules et le

type 2 (TNF-R2, CD120b, p75/80, 75 kDa) exprimé uniquement au niveau des cellules du système immunitaire et des cellules endothéliales (Dembic, Loetscher et al. 1990; Schall, Lewis et al. 1990). Ces récepteurs se lient soit à la forme membranaire (mem-TNF), soit à la forme soluble du TNF (sTNF) (Wajant, Pfizenmaier et al. 2003). Les souris TNFR KO montrent une augmentation de la susceptibilité à l'infection microbienne ainsi qu'une suppression inflammatoire sous challenge bactérien (Acton, Dahlberg et al. 1996). Ceci démontre le rôle clé du TNF- α dans la réponse inflammatoire et l'immunité. Les récepteurs TNFR-1 et TNFR-2 appartiennent à la super famille des récepteurs du TNF. Cette super famille inclut FAS, CD40, CD27 et RANK (*receptor activated NF-kB*). Ces récepteurs partagent un motif commun qui est un domaine extracellulaire compris entre deux à six motifs riches en cystéines.

La transduction du signal de mort cellulaire est principalement véhiculée par le TNF-R1 via son domaine cytoplasmique de mort (*death domain*). Ce dernier recrute et active la caspase 8 qui active alors à son tour la caspase 3 effectrice de l'apoptose. Le TNF-R2 recrute directement TRAF (TNF *receptor associated factor*) permettant ainsi l'induction et l'expression de gènes qui recourent fortement la signalisation du TNF-R1 (Wajant, Pfizenmaier et al. 2003).

Le TNF- α exerce ses fonctions en liant, sous forme de trimère, ses récepteurs (Loetscher, Gentz et al. 1991). Ce complexe ligand /récepteur (formé d'un homotrimère de TNF- α et de deux ou trois récepteurs) est rapidement internalisé par des puits de clathrine (Idriss and Naismith 2000). L'unique liaison au TNFR-2 n'est pas suffisante pour avoir l'effet cytotoxique, alors que la liaison au TNFR-1 est suffisante (Van Ostade, Vandenaabeele et al. 1993). La voie de signalisation du TNF- α inclut de nombreuses protéines, telles que des protéines G, des facteurs de transcription (NF-kB, AP-1), des protéines kinases (CK II, erk-1, MAP 2) des phospholipases (PLA2, PLC), des protéines mitochondriales, ainsi que les caspases. Le TNF- α peut induire la nécrose ou l'apoptose (Beyaert and Fiers 1994). Cependant, l'apoptose est de manière générale conduite par le

TNFR-1. Enfin, le TNF- α mène également à la survie cellulaire en activant le facteur de transcription NF-kB (Idriss and Naismith 2000).

6.5.2 Le PEG sTNF-R1

Comme cela vient d'être décrit, il existe deux types de récepteur au TNF- α : le TNF-R1 et le TNF-R2. Ces deux récepteurs sont présents à la surface des membranes (mem-TNF) ainsi que sous une forme soluble (sTNF-R). Les deux types de récepteur au TNF- α peuvent ainsi lier le TNF- α avec des affinités différentes (Edwards, Martin et al. 2003). Dans le cas de l'inflammation et de la propagation du signal de mort cellulaire par apoptose, il apparaît que le TNF-R1 est majoritairement impliqué par rapport au TNF-R2 (Grell, Wajant et al. 1998). Ce signal est transmis quand le TNF- α se lie et dimérise deux ou trois TNF-R1 ou TNF-R2 à la surface des cellules (Suda, Takahashi et al. 1993).

Il existe déjà de nombreuses molécules biologiques capables d'inhiber le TNF- α . Par exemple, l'etanercept (Enbrel[®]) (Weinblatt, Kremer et al. 1999), une protéine de fusion du TNF-R2 soluble et l'infliximab (Remicade[®]) (Maini, St Clair et al. 1999), un anticorps monoclonal anti TNF- α humain. Cependant, ces molécules présentent une forte immunogénicité ainsi qu'une demi-vie relativement faible, peu propice à l'utilisation chronique. Il apparaît alors intéressant de considérer le PEG sTNF-R1. Cette molécule de deuxième génération est une protéine recombinante methionyl du sTNF-R1 humain [r-metHu-sTNF-R1] produite dans *E. coli* (Edwards, Martin et al. 2003). Sa structure présente une forme tronquée des 4 domaines de la forme monomérique. Elle présente un haut poids moléculaire de 42 kDa ; le PEG (*polyethylen glycol*) de 30 kDa y est attaché afin d'améliorer ses propriétés pharmacocinétiques (Davis, Feige et al. 2000). De ce fait, le PEG sTNF-R1 présente une plus faible immunogénicité et une plus longue demi-vie d'élimination (83 heures). Cette molécule, qui a été conceptualisée afin de diminuer les taux de TNF- α observés dans l'arthrite rhumatoïde, présente alors un avantage lors de traitements chroniques (Edwards, Martin et al. 2003). De part ses propriétés, il apparaît fort probable que cette molécule ne traverse pas la BHE.

7 Chapitre 7 : Objectifs et hypothèses

7.1 Caractérisation spatiale et temporelle de l'apoptose cérébrale

Suite à un infarctus du myocarde, chez le rat, de l'apoptose a été observée dans certaines régions cérébrales du système limbique (Wann, Boucher et al. 2006). Cependant, ce phénomène reste peu documenté et n'est pas complètement caractérisé spatialement et temporellement. D'autre part, le facteur neurotrophique BDNF a été fortement impliqué dans la neurogénèse et la protection des cellules neuronales (Tapia-Arancibia, Rage et al. 2004) et, donc, aurait des effets opposés à l'apoptose dans ces régions. Toutefois, aucune donnée n'existe, quant à l'effet d'un infarctus du myocarde sur le facteur neurotrophique.

Les premiers travaux réalisés au cours de cette thèse étaient de type descriptif et avaient pour but, de définir spatialement et temporellement la survenue du phénomène apoptotique dans le système limbique du rat, suite à un infarctus du myocarde et d'observer les variations des niveaux de BDNF cérébraux.

Consécutivement à l'infarctus du myocarde, trois temps de reperfusion ont été utilisés (1, 2 et 7 jours) et neuf régions cérébrales ont été isolées. Lors de ces premiers travaux, la taille de l'infarctus a été mesurée et l'apoptose cérébrale a été caractérisée par des marqueurs, tels que l'activité caspase 3 et la coloration TUNEL. Également, afin de répondre au deuxième objectif de ces premiers travaux, les taux de BDNF cérébraux ont été mesurés par un dosage de type ELISA.

7.2 Action du célécoxib sur l'apoptose au niveau de l'amygdale suite à un infarctus du myocarde

Dans la relation clinique qui unit la survenue de la dépression suite à un infarctus du myocarde (Guck, Kavan et al. 2001), la réaction inflammatoire est apparue comme une avenue importante (Boucher, Wann et al. 2005). Selon certaines hypothèses, la présence de COX-2 pourrait avoir un rôle dans cette réponse inflammatoire (Rivest 2001). De plus, au sein du système limbique, l'amygdale a été définie, de part sa relation avec le cortex préfrontal médian, comme un élément de la physiopathologie dépressive (Nieuwenhuys 1996).

Lors de ce deuxième travail, nous avons caractérisé l'effet du célécoxib, un inhibiteur sélectif de la COX-2, dans l'apoptose observée au niveau de l'amygdale, et ce, 72 heures après un infarctus du myocarde. L'hypothèse est que la COX-2 serait impliquée dans la présence d'apoptose observée dans l'amygdale.

Pour cela, les niveaux de COX-2 et de Bax/Bcl-2 ont été mesurés dans l'amygdale après une ischémie myocardique transitoire et une reperfusion de 72 heures. L'activation de la protéine Akt, ainsi que l'activité de la caspase 3 ont également été déterminées.

7.3 Implication du TNF- α dans l'apoptose observée au niveau du système limbique suite à un infarctus du myocarde

À la suite d'un infarctus du myocarde, les concentrations de TNF- α cérébral augmentent (Francis, Chu et al. 2004). Or, il a été démontré que les cytokines pro-inflammatoires étaient impliquées dans l'apoptose observée dans le système limbique, (Wann, Boucher et al. 2006) sans toutefois spécifier si le TNF- α était l'un des principaux acteurs dans cette mort cellulaire.

Ce troisième et dernier travail a été proposé dans le but de déterminer l'implication du TNF- α dans le processus apoptotique. L'inhibiteur du TNF- α (PEG sTNF-R1) a été utilisé dans notre modèle d'infarctus du myocarde. De plus, le sacrifice des animaux à deux moments différents nous a permis de vérifier l'implication de la voie extrinsèque de l'apoptose dans ce phénomène.

Pour ces travaux, la taille de l'infarctus a été mesurée et l'apoptose cérébrale a été caractérisée par des marqueurs, tels que l'activité de la caspase 3, l'activité de la caspase 8 et la coloration TUNEL.

8 Chapitre 8 : Méthodologie

Pour cette thèse, la méthodologie n'a pas été détaillée exhaustivement dans le but de faciliter la lecture de l'introduction. Cependant, tous les détails techniques concernant la procédure chirurgicale, ainsi que la réalisation des tests biochimiques de chacun des articles, sont présentés dans la partie « *methods* ».

ERRATUM

Il est à noter que dans le chapitre 9, page 124, ligne 10 il est écrit : « and since it also occurs in the prefrontal cortex 7 days post-MI,.. ». Il faudrait en effet lire « in the frontal cortex » au lieu de « prefrontal cortex ».

Nos plus sincères excuses aux lecteurs.

9 Chapitre 9 : Brain Research (2008)

Kaloustian S, Wann BP, Bah MT, Girard SA, Apostolakis A, Ishak S, Mathieu S,
Ryvlin P, Godbout R, Rousseau G

Publié dans Brain Research
2008

Apoptosis time course in the limbic system after myocardial infarction in the rat
Volume 1216, Pages 87-91

Sévan Kaloustian est le principal auteur de cet article

Apoptosis time course in the limbic system after myocardial infarction in the rat

Kaloustian S^{1,3,4}, Wann BP³, Bah MT³, Girard SA³, Apostolakis A³, Ishak S³, Mathieu S³,
Ryvlin P⁴, Godbout R^{2,3}, Rousseau G^{1,3}

¹Département de pharmacologie, Université de Montréal

²Département de psychiatrie, Université de Montréal

³Centre de biomédecine, Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal

⁴Département de Neurologie Fonctionnelle et Épileptologie, Hospices Civils de Lyon et
Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

Number of pages: 16

Number of figures: 4

Address for correspondence and reprints:

Guy Rousseau, PhD

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

Abstract

Apoptosis is known to occur in the limbic system after myocardial infarction (MI) in the rat. Our study was designed to evaluate the time course dynamics of this phenomenon in limbic areas. Apoptosis, i.e., caspase-3 activity and the number of terminal dUTP nick-end labelling-positive cells, as well as brain-derived neurotrophic factor (BDNF) were quantitated in sham-operated controls and MI rats 1, 2 and 7 days after surgery. Both apoptosis parameters were increased throughout, although in different structures: the CA1 region of the hippocampus and the medial amygdala at day 1, the CA1 region of the hippocampus and the lateral amygdala at day 2, and the frontal cortex at day 7. At day 2, BDNF was decreased in the prefrontal cortex and medial amygdala, whereas it was elevated in the dentate gyrus of the hippocampus; at day 7, BDNF was reduced in the frontal cortex and posterior hypothalamus but was augmented in the medial amygdala. These data indicate that post-MI apoptosis in the limbic system is a dynamic process occurring mainly in the hippocampus and amygdala during the first days after MI. The fact that BDNF was increased as early as 2 days after MI suggests that neurogenesis can occur rapidly in selected limbic regions after MI.

Classification terms:

Section. Disease-related Neuroscience

Keywords. Limbic structure, Myocardial infarction, Apoptosis, Caspase-3, Hippocampus, Amygdala

INTRODUCTION

A reduction of volume in regions of the limbic system has been repeatedly observed in depressed patients (Fuchs, Czeh et al. 2004). Many hypotheses have been proposed, and it has been suggested recently that apoptosis (Lucassen, Heine et al. 2006) as well as a decreased capacity for neurogenesis may be involved (Czeh and Lucassen 2007). In our rat model of post-myocardial infarction (MI) depression, we reported the presence of apoptotic cells in different limbic regions, such as the amygdala (lateral and medial parts), hippocampus (CA1 and dentate gyrus) and anterior hypothalamus, 3 days post-MI (Wann, Bah et al. 2008). This apoptosis can be attenuated by pentoxifylline, a cytokine synthesis inhibitor, indicating that pro-inflammatory cytokines must be involved in the cell death process (Wann, Boucher et al. 2006). However, we have no clue about the kinetics of apoptosis in the limbic system after MI.

As opposed to cell death, neurogenesis can be increased by different neurotrophic factors, such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF). In humans, brain BDNF levels have been found to be reduced in postmortem samples from depressed patients and elevated by anti-depressant treatment (Castren, Voikar et al. 2007), suggesting a role of BDNF in depression. In the case of post-MI depression, we still ignore the variability of BDNF levels in the limbic system during the first days after ischemia.

For a better understanding of the balance between apoptosis and neurogenesis in our model of post-MI depression, we studied the kinetics of apoptosis in different limbic structures and the BDNF changes during the first week after MI.

RESULTS

Infarct size and area at risk (AR)

Forty min of ischemia followed by 1, 2 or 7 days of reperfusion induced MI size representing approximately 47-54% of the AR and more than 50% of the left ventricle (LV), without any significant differences between groups (Figure 1).

Evaluation of apoptosis

Caspase-3 activation

After 1 day of reperfusion, caspase-3 activity in the MI group was significantly increased in the CA1 region of the hippocampus and medial amygdala (Figure 2a). No significant changes were found in the other regions.

After 2 days of reperfusion, caspase-3 activity in the MI group was still elevated in the CA1 region compared to the sham group. In contrast to the results at 1 day, the lateral amygdala presented a significant increase of caspase-3 activity in MI rats compared to sham controls whereas no significant changes were observed in the medial amygdala (Figure 2b).

After 7 days of reperfusion, only the frontal cortex showed an increase of caspase-3 activity in MI rats; the values for other regions were similar to those of the sham group (Figure 2c).

Terminal dUTP Nick-end Labelling (TUNEL)

Results obtained with the TUNEL staining technique were comparable to the data on caspase-3 activity. Indeed, relative to sham rats, the number of TUNEL-positive cells identified in MI rats after 1 day of reperfusion was higher in the CA1 region of the hippocampus and in the medial amygdala (Figure 3a); after 2 days of reperfusion, this number was significantly higher in CA1 and the lateral amygdala (Figure 3b) and, after 7 days of reperfusion, the number of TUNEL-positive cells was significantly increased in the frontal cortex (Figure 3c). No other significant differences were seen.

BDNF levels

After 1 day of reperfusion, BDNF levels in MI and sham rats were not significantly different in any of the brain regions studied. After 2 days, BDNF levels in MI rats compared to sham controls were lower in the prefrontal cortex and medial amygdala, but were higher in the dentate gyrus (Figure 4a). After 7 days of reperfusion, BDNF levels were lower in the frontal cortex and posterior hypothalamus of MI rats than in sham controls, while they were higher in the medial amygdala (Figure 4b). No significant differences were observed in any other brain regions.

DISCUSSION

We have previously reported apoptosis in the amygdala and hippocampus 3 days post-MI (Wann, Boucher et al. 2006). In the present study, we discerned apoptosis in the same brain areas as early as 1 day post-MI, while this process seemed to be terminated by the seventh day post-MI. The time-course of post-MI apoptosis in these regions therefore appears to take place in at least the first 3 days but does not last more than 7 days. The data also show that the time-course of post-MI apoptosis is structure-dependent. For example, it is possible that apoptosis in one structure is a prerequisite for its occurrence in another structure. In previous experiments (Wann, Boucher et al. 2006), we observed apoptosis in the amygdala 3 days post-MI but not in the frontal cortex, whereas in the present study, apoptosis was documented in the frontal cortex 7 days post-MI. Interestingly enough, the ventromedial portion of the frontal cortex (including the cingulate gyrus) receives anatomical connections from the amygdala via direct amygdalo-cortical and indirect amygdalo-thalamo-cortical pathways (Porrino, Crane et al. 1981), indicating that early apoptosis in one region can be encountered later in other connected regions.

Elevated BDNF levels have been reported in models of depression, particularly in the CA3 region of the hippocampus (Chen, Dowlatshahi et al. 2001). Indeed, BDNF is known to enhance cell survival by activating different signaling pathways such as Akt and mitogen-activated protein kinase. The present data suggest that this route may not be as significant in our post-MI depression model. Indeed, BDNF levels significantly varied in an apparently independent fashion from the pattern of caspase-3 and TUNEL changes. In this

respect, it is noteworthy that we have not found any signs of apoptosis or BDNF modulation in the CA3 region of the hippocampus in either our previous experiments (Wann, Boucher et al. 2006; Wann, Bah et al. 2007) or in the present study.

Apoptosis in the amygdala and hippocampus is congruent with the volume reduction observed in these structures among depressed patients (Sheline, Gado et al. 1998). The present data indicated that the time window for post-MI apoptosis is relatively short, i.e., less than 7 days. This does not support the contention that severe and prolonged stress exposure is required for a detectable reduction of cell number and volume in the hippocampus (Lucassen, Heine et al. 2006). In fact, since apoptosis lasts at least 3 days in the amygdala and hippocampus according to the present data, and since it also occurs in the prefrontal cortex 7 days post-MI, a cumulative loss of neurons should result in a significant, early loss of volume in these structures. However, this needs to be confirmed by appropriate structural studies. Although the mechanisms by which apoptosis is induced in the limbic system after MI has not been fully elucidated, we have demonstrated previously that pro-inflammatory cytokines are involved in MI-associated apoptosis, since pentoxifylline, a cytokine synthesis inhibitor, reduced apoptosis in the limbic system 3 days post-MI (Wann, Boucher et al. 2006). The contribution of pro-inflammatory cytokines to early post-MI apoptosis is particularly supported by the fact that their levels are elevated as early as 30 min after the onset of myocardial ischemia (Francis, Chu et al. 2004).

It seems unlikely that cytokines released by the ischemic myocardium or invading inflammatory cells can explain the early increments of pro-inflammatory cytokines in

discrete brain regions, and we propose that other mechanisms, such as the cardiac nervous system, may be implicated (Francis, Zhang et al. 2004). Indeed, elevation of pro-inflammatory cytokines in the brain can be blunted by epicardial phenol but not by vagotomy (Francis, Zhang et al. 2004), suggesting that cardiac sympathetic afferent nerves activated by myocardial ischemia signal the brain to increase cytokine production.

Another issue raised by the present data concerns the fact that area CA1 of the hippocampus and the amygdala are the first 2 regions to show signs of apoptosis among those tested. Activation of pro-apoptotic receptors, such as tumor necrosis factor receptor I, is not a sufficient explanation since these receptors are widely expressed in the limbic system (Ding, Mrizek et al. 2006), so that additional signaling pathways are required. According to the literature, we hypothesize that the activation of glucocorticoid receptors (GRs) might play an additive role. First, it has been reported that the hypothalamus-pituitary-adrenal axis undergoes strong stimulation by prolonged cortisol secretion after reperfusion in MI patients (Paganelli, Frachebois et al. 2003). Second, cortisol-sensitive GRs are found in the hippocampus and the amygdala (Johnson, Farb et al. 2005; Swaab, Bao et al. 2005), 2 early regions affected by apoptosis in our model. Third, stimulation of GRs may induce apoptosis (Crochemore, Lu et al. 2005).

Based on the converging evidence described above, we hypothesize that the combined activation of pro-inflammatory cytokines and GRs is responsible for post-MI early cell death in the limbic system, particularly in the amygdala and hippocampus, leading to the depressive behavioral syndrome reported at 14 days post-MI (Wann, Bah et al. 2007;

Wann, Bah et al. 2008). Even though a causative link needs to be further substantiated by appropriate protocols, this hypothesis has the advantage of converging cardiovascular and central pathophysiology elements of depression.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Materials

Chemicals were obtained from different suppliers. Leupeptin and Microcystin LR: Alexis Biochemicals (San Diego, CA). Tween 20: Amersham Pharmacia Biotech (Baie-d'Urfé, Canada). Dimethylsulfoxide (DMSO), Tris(Hydroxymethyl)aminomethane (Tris) and sodium chloride: Laboratoire MAT (Beauport, Canada). Lowry protein assay reagents: Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). Enhanced chemiluminescence reagents: Perkin Elmer (Markham, Canada). TUNEL assay kit: Oncogene (La Jolla, CA). Propidium iodide: Calbiochem (537059; La Jolla, CA). All other chemicals were supplied by Sigma (St. Louis, MO).

Experimental groups

Male Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, Saint-Constant, Canada), weighing between 350 and 450 g, were handled in compliance with Canadian Council on Animal Care guidelines. The animals were randomly assigned to a sham or MI group. The MI group underwent 40-min occlusion of the coronary artery, and the sham group submitted to surgery, without occlusion (see below). The animals were sacrificed after 1, 2 or 7 days of reperfusion.

In vivo surgical procedure and brain region preparation

Anesthesia was induced with ketamine/xylazine (50 mg/kg and 5 mg/kg i.m., respectively). The animals were then intubated and anesthesia was maintained with

isoflurane (1%) ventilation by means of a small animal respirator. Body temperature was monitored throughout surgery with a rectal probe. Electrodes placed on paws recorded ECG and heart rate. A left thoracotomy was performed, and the left anterior descending coronary artery was occluded by a 4-0 silk suture with a plastic snare. Ischemia was confirmed by ST segment alterations and ventricular epicardial cyanosis. After 40 min of occlusion (ischemia), the ligature was loosened so that the myocardial tissue could be reperfused. Reperfusion was confirmed by the disappearance of cyanosis; the thorax was closed after 15-30 min of reperfusion and the animals were returned to their cages after receiving an antibiotic (15,000 IU penicillin G) and an analgesic (2 mg/kg of butorphanol). Sham animals were submitted to the same procedures with the exception that myocardial ischemia was not induced.

After 1, 2 or 7 days of reperfusion, the rats were secured in a restraint cone bag and rapidly decapitated. This route was chosen to avoid alteration of biochemical pathways associated with techniques such as anesthesia or CO₂ exposure. The heart was removed, and the brain was immediately placed in a dish standing on crushed ice, to dissect out the following areas according to the atlas of Paxinos and Watson (Paxinos and Watson 1986): frontal cortex, prefrontal cortex, hippocampus (CA1, CA3 and dentate gyrus), amygdala (medial and lateral parts), and hypothalamus (anterior and posterior parts). Tissues were snap-frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until required.

Measurements of heart AR and MI size

Heart AR and actual infarct size were determined in the following manner: upon sacrifice, the hearts of MI rats were removed, and the left anterior descending coronary artery occluded at the original site. To demarcate the AR, Evans Blue (0.5%) was infused into the aorta by retrograde perfusion. The heart was then frozen (-80°C for 5 min) and 4 2-mm transverse sections were sliced out. Each section was bathed at 37°C for 5 min in a 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride solution (TTC 1%, pH 7.4) to mark necrotic tissue surfaces (I). MI was expressed as the percentage of necrotic AR ($[I/AR] \times 100$). AR was further expressed as a percentage of LV area ($[AR/LV] \times 100$).

Caspase-3 activity

Caspase-3 activity was measured as described previously (Wann, Bah et al. 2007). Briefly, cytosolic proteins were extracted 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 g/mL Aprotinin). Enzymatic reactions were performed in reaction buffer (50 mM Tris (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.1% CHAPS, 1 mM DTT) with 25 µg of proteins and the fluorogenic substrate Ac-DEVD-AMC (40 µM). Reactions were incubated at 37°C for 3 h and stopped by the addition of 0.4 M NaOH and 0.4 M glycine buffer. Fluorescence was quantified with a spectrofluorometer (Photon Technology International, Lawrenceville, NJ) at an excitation wavelength of 365 nm and an emission wavelength of 465 nm.

TUNEL

TUNEL was undertaken, as described previously (Wann, Boucher et al. 2006), in accordance with the protocol provided by the manufacturer (Oncogene). In summary, cryostat sections were fixed in paraformaldehyde (4%) and rinsed. The sections were then permeabilized and, after washing, the labelling reaction was performed for 1 h at 37°C. The reaction was stopped, and all nuclei were stained with propidium iodide (1 μ M). The sample was viewed in a Leica epiillumination microscope with a filter for DAPI (330-380 nm). All sections were photographed at the same magnification (400 \times) in a Nikon Coolpix 995 camera. A total of 20-25 pictures were taken of each sample, with quantitation of cell positivity and total number.

BDNF

Tissue BDNF levels were analyzed with ELISA kits (Chemicon International, Temecula, Ca, Chemikine, BDNF Sandwich ELISA kit; Cat. No. CYT306) according to the manufacturer's specifications.

Statistics

The results are expressed as means (\pm standard error of the mean). Caspase-3 and BDNF levels were compared between groups by independent Student's t-tests for each reperfusion period. χ^2 tests were conducted to analyze the TUNEL data, comparing the number of TUNEL-positive and TUNEL-negative cells. $p < 0.05$ was considered significant.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Pierre Fortier, Caroline Bouchard, Sarah-Gabrielle Béland and Julie Turgeon for their skillful assistance and technical expertise. G.R. is a scholar of “*Fonds de la recherche en santé du Québec*” (FRSQ). M.T.B. holds a studentship from the FRSQ. This study was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). The editorial assistance of Ovid Da Silva is acknowledged.

REFERENCES

- Castren, E., Voikar, V., Rantamaki, T., 2007. Role of neurotrophic factors in depression. *Curr Opin Pharmacol.* 7, 18-21.
- Chen, B., Dowlatshahi, D., MacQueen, G.M., Wang, J.-F., Young, L.T., 2001. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol. Psychiatry.* 50, 260-265.
- Crochemore, C., Lu, J., Wu, Y., Liposits, Z., Sousa, N., Holsboer, F., Almeida, O.F., 2005. Direct targeting of hippocampal neurons for apoptosis by glucocorticoids is reversible by mineralocorticoid receptor activation. *Mol Psychiatry.* 10, 790-8.
- Czeh, B., Lucassen, P.J., 2007. What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 257, 250-60.
- Ding, Y.H., Mrizek, M., Lai, Q., Wu, Y., Reyes, R., Jr., Li, J., Davis, W.W., Ding, Y., 2006. Exercise preconditioning reduces brain damage and inhibits TNF-alpha receptor expression after hypoxia/reoxygenation: an in vivo and in vitro study. *Curr Neurovasc Res.* 3, 263-71.
- Francis, J., Chu, Y., Johnson, A.K., Weiss, R.M., Felder, R.B., 2004a. Acute myocardial infarction induces hypothalamic cytokine synthesis. *Am. J. Physiol.* 286, H2264-H2271.
- Francis, J., Zhang, Z.-H., Weiss, R.M., Felder, R.B., 2004b. Neural regulation of the proinflammatory cytokine response to acute myocardial infarction. *Am. J. Physiol.* 287, H791-H797.
- Fuchs, E., Czeh, B., Kole, M.H., Michaelis, T., Lucassen, P.J., 2004. Alterations of neuroplasticity in depression: the hippocampus and beyond. *Eur Neuropsychopharmacol.* 14 Suppl 5, S481-90.
- Johnson, L.R., Farb, C., Morrison, J.H., McEwen, B.S., LeDoux, J.E., 2005. Localization of glucocorticoid receptors at postsynaptic membranes in the lateral amygdala. *Neuroscience.* 136, 289-99.

- Lucassen, P.J., Heine, V.M., Muller, M.B., van der Beek, E.M., Wiegant, V.M., De Kloet, E.R., Joels, M., Fuchs, E., Swaab, D.F., Czeh, B., 2006. Stress, depression and hippocampal apoptosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 5, 531-46.
- Paganelli, F., Frachebois, C., Velut, J.G., Boullu, S., Sauze, N., Rosso, J.P., Barnay, P., Sbragia, P., Gelisse, R., Grino, M., Levy, S., Oliver, C., 2003. Hypothalamo-pituitary-adrenal axis in acute myocardial infarction treated by percutaneous transluminal coronary angioplasty: effect of time of presentation. *J Endocrinol Invest*. 26, 407-13.
- Paxinos, G., Watson, C., 1986. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, Vol., Academic Press, San Diego.
- Porrino, L.J., Crane, A.M., Goldman-Rakic, P.S., 1981. Direct and indirect pathways from the amygdala to the frontal lobe in rhesus monkeys. *J Comp Neurol*. 198, 121-36.
- Sheline, Y.I., Gado, M.H., Price, J.L., 1998. Amygdala core nuclei volumes are decreased in recurrent major depression. *Neuroreport*. 9, 2023-8.
- Swaab, D.F., Bao, A.M., Lucassen, P.J., 2005. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Res Rev*. 4, 141-94.
- Wann, B.P., Boucher, M., Kaloustian, S., Nim, S., Godbout, R., Rousseau, G., 2006. Apoptosis detected in the amygdala following myocardial infarction in the rat. *Biol Psychiatry*. 59, 430-3.
- Wann, B.P., Bah, T.M., Boucher, M., Courtemanche, J., Le Marec, N., Rousseau, G., Godbout, R., 2007. Vulnerability for apoptosis in the limbic system after myocardial infarction in rats: a possible model for human postinfarct major depression. *J Psychiatry Neurosci*. 32, 11-6.
- Wann, B.P., Bah, T.M., Kaloustian, S., Boucher, M., Dufort, A.-M., Le Marec, N., Rousseau, G., Godbout, R., 2008. Behavioural signs of depression and apoptosis in the limbic system following myocardial infarction: Effects of sertraline. *Journal of Psychopharmacology*. in press.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. A) Myocardial infarct size (I), expressed, as a percentage of the area at risk (AR), showed no difference between both groups. AR, expressed as a percentage of the left ventricle (LV), was similar between groups (n=7-10; □ 1 day, ■ 2 days, ■ 7 days).

Figure 2. Caspase-3 activity in the different regions assessed by *in vitro* spectrofluorescence after a) 1 day, b) 2 days, or c) 7 days of reperfusion. PF: prefrontal, F: frontal, CA1: hippocampus CA1, CA3: hippocampus CA3, DG: dentate gyrus, MA: medial amygdala, LA: lateral amygdala, AH: anterior hypothalamus, PH: posterior hypothalamus (n=5-8/group: *p<0.05; □ Sham, ■ MI).

Figure 3. Percent of TUNEL-positive cells in different regions after a) 1 day, b) 2 days, or c) 7 days of reperfusion. PF: prefrontal, F: frontal, CA1: hippocampus CA1, CA3: hippocampus CA3, DG: dentate gyrus, MA: medial amygdala, LA: lateral amygdala, AH: anterior hypothalamus, PH: posterior hypothalamus (*p<0.05; □ Sham, ■ MI).

Figure 4. BDNF concentrations in different regions assessed by ELISA kit after a) 2 days or b) 7 days of reperfusion. PF: prefrontal, F: frontal, CA1: hippocampus CA1, CA3: hippocampus CA3, DG: dentate gyrus, MA: medial amygdala, LA: lateral amygdala, AH: anterior hypothalamus, PH: posterior hypothalamus (n=5-8/group: *p<0.05; □ Sham, ■ MI).

FIGURE 1

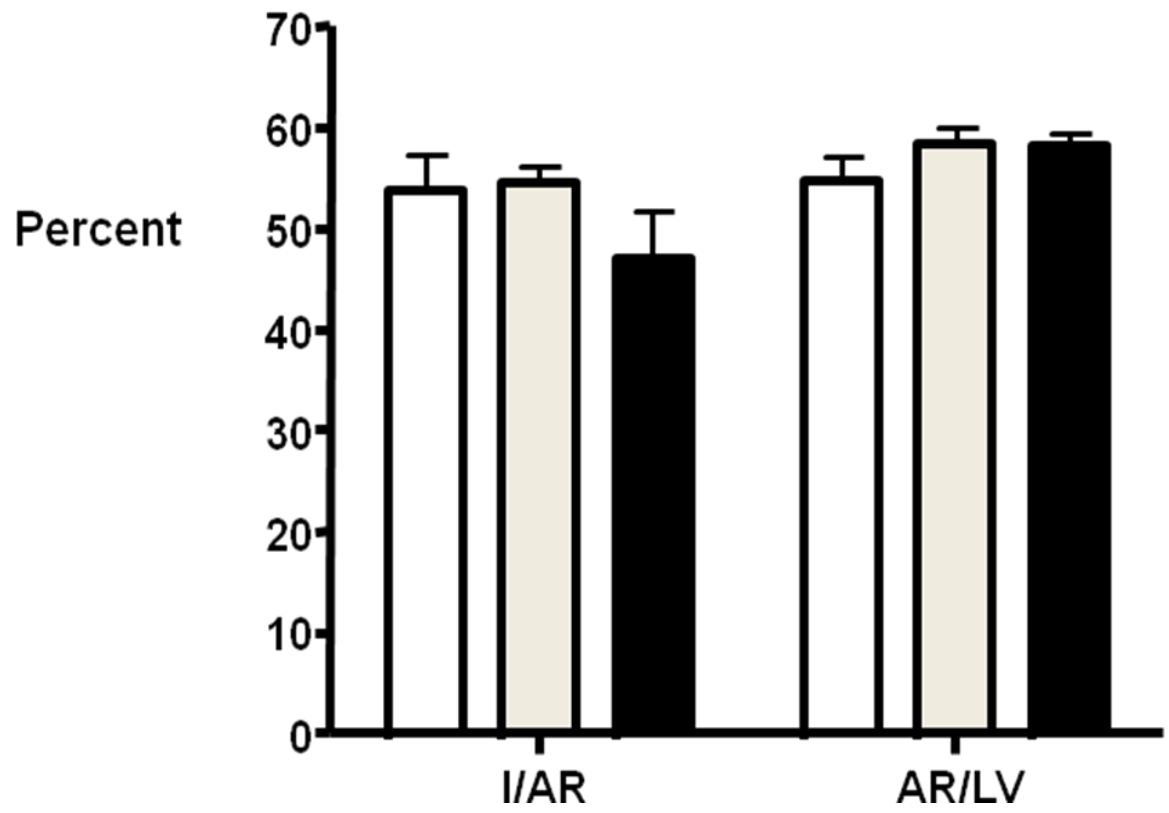


FIGURE 2

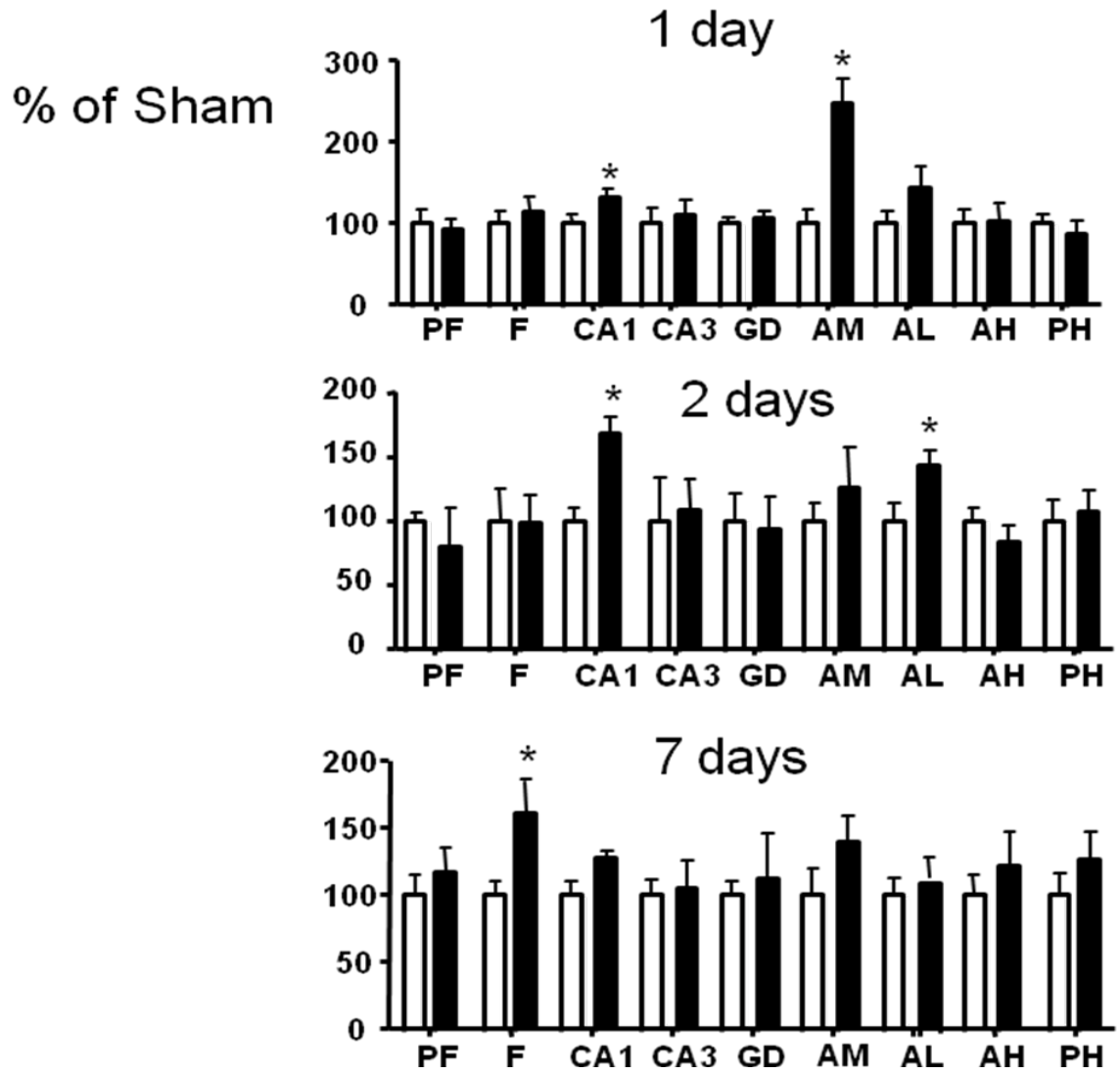


FIGURE 3

Tunel positive cells
(% of total cell count)

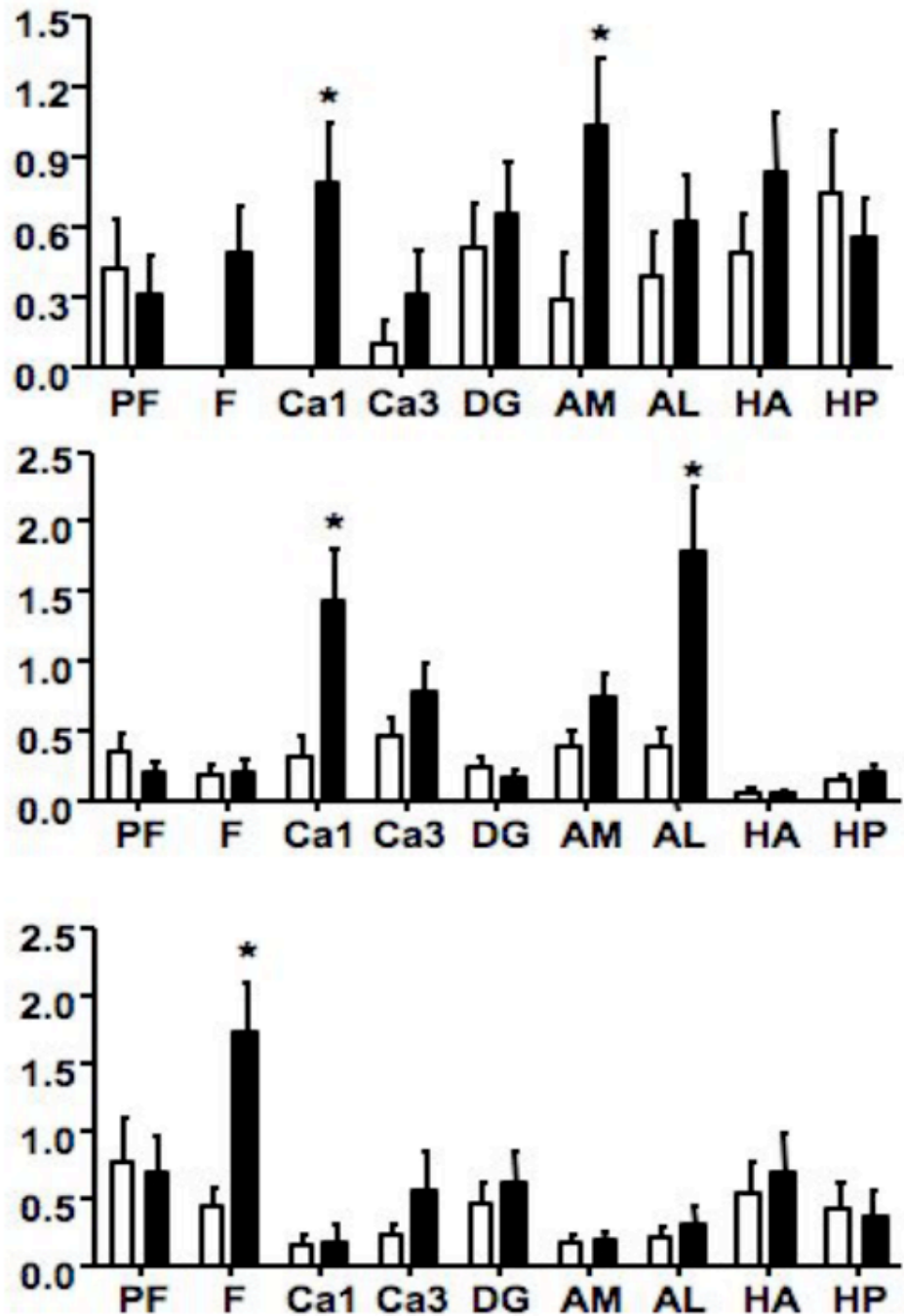
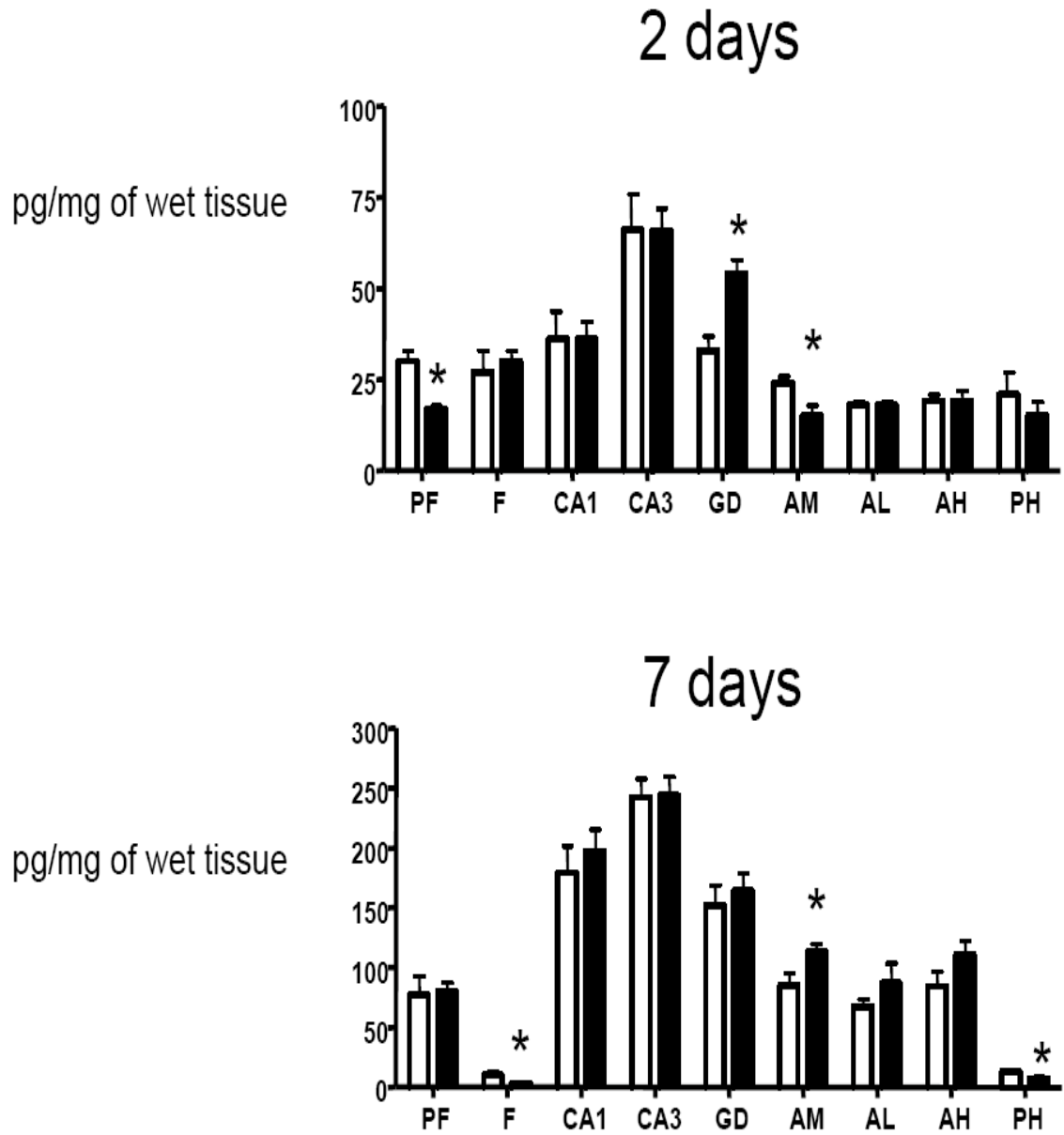


FIGURE 4



A Noter

Les travaux du chapitre 10 ont été engagés après le commencement de ceux du chapitre 9.

Mais la publication des résultats du chapitre 10 a été plus rapide que celle du chapitre 9.

Cependant, nous avons ici souhaité, pour un confort de lecture et afin de respecter l'évolution de notre travail, présenter les documents publiés dans l'ordre où ils ont été initiés.

10 Chapitre 10: Apoptosis (2007)

Kaloustian S, Wann BP, Bah TM, Falcao S, Dufort AM, Ryvlin P, Godbout R, Rousseau G

Publié dans *Apoptosis*

2007

Celecoxib after the onset of reperfusion reduces apoptosis in the amygdala

Volume 12, Volume 11, Pages 1945-51

Sévan Kaloustian est le principal auteur de cet article

Title Page

Paper Title: Celecoxib after the onset of reperfusion reduces apoptosis in the amygdala

Authors names: Kaloustian S^{1,3}, Wann BP², Bah TM², Falcao S¹, Dufort AM¹, Ryvlin P³, Godbout R², Rousseau G¹

Affiliations: ¹Département de Pharmacologie, Université de Montréal, Montréal (Québec), Canada; ²Département de Psychiatrie, Université de Montréal, Montréal (Québec), Canada; ³Département de Neurologie Fonctionnelle et Épileptologie, Hospices Civils de Lyon et Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France.

Address for correspondence and reprints: Guy Rousseau PhD, Centre de Biomédecine, Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, 5400 boul. Gouin Ouest, Montréal (Québec), Canada, H4J 1C5, Tel.: +1-514-338-2222 ext. 3421, Fax: +1-514-338-2694.

Abbreviated title: Celecoxib in post-MI apoptosis

Acknowledgment of support: Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

Abstract

Reperfused myocardial infarction induces an inflammatory response that is responsible for local and systemic alterations. Among these, apoptosis observed in the amygdala following myocardial infarction has been pointed out as a consequence of such an inflammatory process. We hypothesized that inhibition of the inducible inflammatory enzyme Cox-2 during the reperfusion period may attenuate the apoptotic process in the amygdala. Anaesthetized rats were subjected to left anterior descending coronary artery occlusion for 40 minutes, followed by reperfusion. The Cox-2 antagonist Celecoxib (3 mg/kg i.p.) was administered 10 minutes after the onset of the reperfusion period. After 72 hours of reperfusion, infarct size was determined and the lateral and medial amygdala were dissected from the brain. Infarct size was similar between untreated and Celecoxib-treated animals (40-45% of the area at risk). Cox-2 expression was significantly reduced in both parts of the amygdala in the Celecoxib group. Apoptosis regression was observed in the amygdala of the Celecoxib group as shown by decreased number of TUNEL positive cells and by decrease of caspase-3 activation. Bax/Bcl-2 ratio was not significantly altered by Celecoxib while Akt activation was increased in the lateral amygdala but not in the medial amygdala.

This data indicates that inhibition of Cox-2 by Celecoxib is associated with regression of apoptosis in the amygdala following myocardial infarction.

Key words: Celecoxib, Myocardial infarction, Reperfusion, Amygdala, Apoptosis

Introduction

Clinical studies reveal that depression is frequently observed following myocardial infarction, suggesting a link between heart disease and mood disorder (Guck, Kavan et al. 2001). Among the different brain structures involved in both pathologies, the amygdala is particularly interesting since it is a key component involved in emotion as well as in homeostatic regulation (Nieuwenhuys 1996).

We have previously observed that myocardial infarction is followed by apoptosis process-dependent cell death in the amygdala but not in other structures such as the hippocampus or the vermis (Wann, Boucher et al. 2006). The link between myocardial infarction and amygdala has not yet been fully elucidated but this can be prevented by pentoxifylline, a non-specific cytokine synthesis inhibitor, suggesting that elevation of circulating cytokines by ischemic myocardium must be important (Wann, Boucher et al. 2006).

Different hypothesis have been proposed to explain the central effects of circulating cytokines. Among these, one suggests that circulating cytokines induce expression of the Cox-2 enzyme at the surface of the endothelial cells and pericytes of the brain capillaries (Zhang and Rivest 2002). Prostaglandins (PG) produced by Cox-2 such as PGE2 can diffuse themselves across the brain parenchyma to bind EP receptors and to activate caspase-3, an effector enzyme of apoptosis (Zhang and Rivest 2002).

Cox-2 selective inhibitors have been developed for their anti-inflammatory properties without causing gastric side effects such as non-steroidal anti-inflammatory drugs

(NSAIDs) (Hewett, Bell et al. 2006). Cox-2 inhibitors are currently used to treat different pathologies such as acute pain and familial adenomatous polyposis (Hewett, Bell et al. 2006). In experimental studies, Celecoxib, a Cox-2 inhibitor, can reduce inflammation and oedema in intracerebral hemorrhage (Chu, Jeong et al. 2004) as well as apoptosis (Sinn, Lee et al. 2007). Thus in the present study, we tested the effects of Celecoxib on amygdala cell death following myocardial infarction. Caspase-3 activity, TUNEL positive cells, Bax/Bcl-2 ratio and Akt activity were used to evaluate cell death/survival signaling pathways.

METHODS

Materials

Chemicals were obtained from different suppliers. Leupeptin and Microcystin LR: Alexis Biochemicals (San Diego, CA). Anti-phospho-Akt (#9271), anti-Akt (#9272), anti-Cox2 (#4842), anti-rabbit (#7074) and anti-mouse (#7076) antibodies: Cell Signaling (Beverly, MA). Anti-Bax(B-9, sc-7480) and anti-Bcl-2(C-2, sc-7382): Santa-Cruz Biotechnology (Santa-Cruz, CA). Tween 20: Amersham Pharmacia Biotech (Baie-d'Urfé, Canada). Dimethylsulfoxide (DMSO), Tris(Hydroxymethyl)aminomethane (Tris) and sodium chloride: Laboratoire MAT (Beauport, Canada). Lowry protein assay reagents: Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). Enhanced chemiluminescence reagents: Perkin Elmer (Markham, Ontario). TUNEL assay kit: Oncogene (La Jolla, CA). Propidium iodide: Calbiochem (537059; CA). Celecoxib was a gift from Pfizer (Montreal, Canada). All other chemicals were obtained from Sigma (St-Louis, MO).

Experimental groups and protocols

Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, Saint-Constant, Québec), weighing 350-450g, were handled in compliance with procedures of the Local Animal Care Committee. Rats were randomly assigned to one of two groups. Control group (n = 10) received vehicle and the treated group (n = 10) received Celecoxib (3 mg/kg/day, IP) 10 minutes after the onset of reperfusion. This dose was chosen according to previous studies (Shinmura, Tang et al. 2000; Arnaud, Joyeux-Faure et al. 2003) and it was administered each day around noon.

In vivo surgical procedure and brain tissue preparation

Anesthesia was induced with ketamine/xylazine (50 mg/kg and 5 mg/kg i.m., respectively) and maintained with isoflurane (1%). Animals were intubated and placed on a small animal respirator to maintain ventilation. Body temperature was monitored during surgery using rectal probe. Electrodes were placed on paws to record electrocardiogram and heart rate. A left thoracotomy was performed and the left anterior descending coronary artery was occluded using a 4-0 silk suture with a plastic snare. Ischemia was confirmed by ST segment alterations and ventricular epicardial cyanosis. After 40 minutes of occlusion (ischemia), the ligature was loosened and the myocardial tissue was reperfused. Reperfusion was confirmed by the disappearance of cyanosis. Then, the thorax was closed after 15-30 minutes of reperfusion and, following administration of the pharmacological agent, the animals were returned to their cages. Antibiotic (15,000 IU penicillin G) and analgesic (2 mg/kg of butorphanol) therapies were instituted subsequent to surgery for all animals.

After 72 hours of reperfusion, animals were secured in a restraint cone bag and rapidly decapitated. This technique was chosen to avoid alteration of the biochemical pathways in the brain due to anesthesia or CO₂ exposure. Brains were rapidly placed on a dish standing on crushed ice to dissect lateral and medial amygdala. Tissues were snap frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until required. Hearts were rapidly excised for infarct sizing.

Infarct sizing and area at risk measurement

Infarct size and area at risk were determined as described previously (Boucher, Wann et al. 2006). Briefly, at the end of the reperfusion period, the heart was removed and the left anterior descending coronary artery was occluded at the same site. In order to determine the area at risk (AR), Evans Blue (0.5%) was infused into the aorta by retrograde perfusion. The heart was frozen (-80°C for 5 minutes) and then sliced in 4 transverse sections of two mm. Each section was stained at 37°C for 5 minutes in a 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride solution (TTC 1%, pH 7.4) to determine the area of necrosis (I). Myocardial infarction was expressed as a percentage of necrosis of the AR (I/AR). Moreover, AR was expressed as a percentage of left ventricle (LV) area (AR/LV).

Protein extraction

Protein extraction was performed as described previously (Wann, Bah et al. 2007). Amygdala tissue samples were homogenized in lysis buffer (50 mM Tris (pH 7.5), 20 mM β -glycerophosphate, 20 mM NaF, 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM benzamidine, 0.5 mM PMSF, 10 μ g/mL Leupeptin, 5 mM DTT, 1 μ M microcystin LR, and 1% Triton X-100). The homogenate was incubated for 30 min at 4°C and centrifuged for 15 min at 10,000 \times g at 4°C. The protein content was then assessed using the Lowry method (Bio-Rad).

Western blotting for Bax/Bcl2 and pAkt/Akt determination

Aliquots of 50-150 μg of protein were subjected to 10-15% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis on a mini-gel apparatus (Bio-Rad). Transfer was performed with a Trans-Blot SD Semi-dry transfer cell (Bio-Rad) on Protran nitrocellulose membrane (Mandel, Montréal, Québec). Protein transfer efficiency was assessed using Ponceau red S dye. Non-specific sites were blocked using 5% non-fat dry milk in TBS-T (10 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl and 0.05% Tween 20) and membranes were incubated at 4°C overnight with primary antibody (diluted 1:1000-2500 in 5% non-fat dry milk into TBS-T). Subsequently, membranes were washed and incubated for 45 minutes at room temperature with the secondary antibody (diluted 1:5000 in 5% non-fat dry milk into TBS-T) conjugated to horseradish peroxidase. Membranes were washed and exposed on a Scientific Imaging Film (Perkin Elmer Life Sciences, Ontario) or on a Kodak ImageStation 440CF using Enhanced Chemiluminescence Reagent (Perkin Elmer Life Sciences, Ontario). Band intensities were analyzed using Kodak 1D v.3.5.5 Scientific Imaging Software. Appropriate controls were evaluated for phosphorylated proteins by reprobing the same membrane with the total protein antibody.

Caspase-3 activity

Caspase-3 activity was determined as previously described (Wann, Bah et al. 2007). Briefly, cytosolic proteins were extracted 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). Enzymatic reactions were performed in reaction buffer (50 mM Tris (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.1% CHAPS, 1 mM DTT) with 25 µg of proteins and fluorogenic substrate, Ac-DEVD-AMC (40 µM). Reactions were incubated at 37°C for 3 h and stopped with the addition of 0.4 M NaOH and 0.4 M glycine buffer. Fluorescence was quantified with a spectrofluorometer (Photon Technology International, Lawrenceville, NJ, USA) at an excitation wavelength of 365 nm and an emission wavelength of 465 nm.

Terminal dUTP Nick-End Labelling (TUNEL) staining

TUNEL staining was done as previously described (Boucher, Wann et al. 2006) in accordance with the protocol provided by the manufacturer. Cryostat sections were fixed in paraformaldehyde (4%) and rinsed. Sections were permeabilised and, after washing, the labeling reaction was performed for one hour at 37°C. The reaction was stopped and all nuclei were stained with propidium iodide (1 µM). The sample was viewed using a Leica epiillumination microscope. All sections were photographed at the same magnification (400×) using a Nikon Coolpix 995.

Statistics

Results are expressed as mean (\pm standard error of the mean). Data were evaluated using student t-test. TUNEL staining data were evaluated with a χ^2 statistical test. $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Infarct size and area at risk. Forty minutes of ischemia followed by 72 hours of reperfusion induced a myocardial infarct size that represents about 40-45% of the area at risk (figure 1) without any significant difference between groups. Area at risk in both groups represents more than 50% of the left ventricle (figure 1).

Cox-2 protein content. Cox-2 is an inducible protein and we hypothesize that this expression can be affected in the amygdala following myocardial infarction. Evaluation of the Cox-2 content by western blot indicated a significant reduction of this protein in lateral (34.6%) and medial amygdala (38.6%) in the Celecoxib group as compared to the untreated group (figure 2). This result suggests that the Celecoxib treatment reduces the expression of Cox-2 observed in the amygdala following myocardial infarction.

Evaluation of cell death/survival in Amygdala.

Caspase-3 activation. In presence of Celecoxib, caspase-3 activity was about 45% less than the one observed in the untreated animal in both lateral and medial amygdala indicated that the blockade of Cox-2 reduces significantly the activity of enzyme involved in apoptosis (figure 3).

TUNEL. Evaluation of the number of apoptotic cells in the amygdala by the TUNEL technique indicated a significant reduction of the positive cells in the Celecoxib group.

Reduction around 40% of the TUNEL positive cells was observed in lateral and medial amygdala in the Celecoxib group as compared to the untreated group (figure 4 and Table 1 and 2).

Bax/Bcl-2 ratio. Western blots indicated that Celecoxib had no effect on the Bax/Bcl-2 ratio in any of the two regions of the amygdala, compared to the control group (figure 5).

Akt activation. Akt activation, assessed as the ratio of phosphorylated Akt over total Akt protein content, was enhanced significantly in the Celecoxib group ($162 \pm 25\%$; figure 6) compared to untreated group ($100.0 \pm 3.4\%$) in the lateral amygdala. In the medial amygdala, however, the activity was similar in both groups.

Discussion

Administration of Celecoxib 10 minutes after the onset of reperfusion had no effects on infarct size but induced a reduction in the expression of Cox-2 as well as of the apoptotic process in the amygdala (lateral and medial parts), as shown by results of caspase-3 activation and number of positive TUNEL cells.

The timing of the administration of Celecoxib was chosen to prevent a potential modification of infarct size that would introduce a bias on dependent measures and limit the interpretation of the results. It has been observed that administration of Cox-2 inhibitors can reduce infarct size (Saito, Rodger et al. 2000; Saito, Rodger et al. 2004; Abbate, Limana et al. 2006). The Cox-2 inhibitor DFU, when administered 30 minutes prior to the ischemic period and continued for three months, was found to significantly reduce infarct size compared to a control group (Saito, Rodger et al. 2004). Similarly, 24 hours after the onset of ischemia, administration of parecoxib reduced significantly infarct size in a mice model (Abbate, Limana et al. 2006). However, in presence of a reperfused infarction, the Cox-2 inhibitor Celecoxib had no effect on myocardial infarct size (Alcindor, Krolikowski et al. 2004). This last result is in agreement with the present findings and suggests that a protective effect induced by Cox-2 inhibitor during the ischemic period may be attenuated by the reperfusion period. The loss of cardioprotective effect of Cox-2 during reperfusion probably involves inflammatory processes but this needs to be further investigated.

Three days after myocardial ischemia, we observed a reduction of Cox-2 expression in the amygdala in the group treated with Celecoxib compared to the control group. These

results can be explained by experimental evidence indicating that the Cox-2 pathway exerts a regulatory feedback action on the expression of its biosynthesizing enzyme. In an inflammatory model, for example, indomethacin was shown to block Cox-2 expression, suggesting that prostaglandins produced at sites of inflammation may potentiate Cox-2 expression via a positive feedback loop (Nantel, Denis et al. 1999). Moreover prostaglandin E2 (PGE2), a major Cox-2 product, has been shown to up-regulate Cox-2 expression by virtue of its cAMP-elevating capacity in a variety of cell types (for review (Hinz and Brune 2002)). Thus, diminution of Cox2 expression can be due to a reduction of cAMP synthesis induced by low levels of PGE2. In the present study, however, measures were taken in the amygdala, a structure that is known to constitutively express Cox-2 (for review (Hewett, Bell et al. 2006)). Therefore, the changes in protein expression reported here could also be due to *de novo* synthesis in microglia or other cell types, a possibility that was not evaluated in our model.

One of our earlier study documented the presence of an apoptotic process in the amygdala following myocardial infarct (Boucher, Wann et al. 2006). The present study confirms this phenomenon and now shows that this apoptotic process can be attenuated by the Cox-2 inhibitor Celecoxib. The mechanism by which Cox-2 inhibitors can reduce apoptosis is not well-defined. In a recent study, it has been reported that the presence of parecoxib reduced apoptosis in acute myocardial infarction but the mechanism remains unknown (Abbate, Limana et al. 2006). We hypothesize that the presence of apoptosis can be related to the release of cytokines by the ischemic myocardium. Circulating cytokines

induced by ischemic myocardium trigger the transcription of genes in cells of the blood-brain barrier including NF- κ B and Cox-2, the limiting enzyme for the formation of prostaglandins (Laflamme and Rivest 1999). Prostaglandins such as PGE₂ can diffuse itself across the brain parenchyma and stimulate the Hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and Corticotropin-releasing-hormone (CRF) activity (Rivest 2001; Zhang and Rivest 2003). Moreover, it has been reported that Cox-2 expression is associated with increased PGE₂ tissue levels and neuronal apoptosis (Li, Row et al. 2003; Sasaki, Kitagawa et al. 2004). In another study, it has been observed that PGE₂ can induce caspase-dependent apoptosis in rat cortical cells (Takadera, Yumoto et al. 2002). A reduction of the PGE₂ production induced by Cox-2 inhibition may result in a smaller apoptotic process observed in the amygdala evaluated by TUNEL and caspase-3 activation.

The fact that the Caspase-3 activation is reduced in amygdala by Celecoxib indicated that Cox-2 is involved in a caspase-dependent cell death. The reduction of the Caspase-3 activation in presence of celecoxib is not unique since other group has reported this effect in a different model (Sinn, Lee et al. 2007). We have previously determined that an A_{2A} adenosine receptor agonist can reduce the caspase-3 activation as well as the presence of membrane-bound TNF α suggesting that the extrinsic (cell death receptor) must be involved in our experimental model (Boucher, Wann et al. 2006). Attenuation of inflammatory process by Cox-2 may thus lead to a reduction of cell death receptor activation and ultimately to a limiting caspase-3 activation.

Celecoxib was not found to affect the Bax/Bcl-2 ratio which, in any case, does not necessarily influence the apoptotic process. Many cell types use a mitochondrial death amplification loop, which may only have a minor role in presence of insufficient amount of active caspases or abundance of active inhibitors such as Akt (Kutuk and Basaga 2006). In any case, we should point out that changes in Bax/Bcl-2 ratios may also be involved in other cell death processes which were not been evaluated in this model, including paraptosis or autophagy (Broker, Kruyt et al. 2005).

We also observed in the present study that Akt activation in the lateral amygdala was whigher in the Celecoxib group, which could contribute to the reduction of the apoptotic process observed. According to some authors, the presence of PGE2 induces caspase-dependent apoptosis that is mediated by Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) (Takadera and Ohyashiki 2006). Akt may attenuate the apoptotic process by the phosphorylation of GSK-3 on serine-9, which in turn leads to a suppression of its activity (Takadera and Ohyashiki 2006). The difference between results obtained in the lateral (significantly increased) and medial (no change) amygdala in Akt activation levels suggest that the lateral portion of the amygdala must be more sensitive than the medial one, or that both parts have different activation kinetics. We hypothesize that, in our model, apoptotic process occurs with a different kinetic and affect different portion of the limbic system by a time-dependent mechanism, but this needs further investigations. Furthermore, this dissociation stresses the fact that analyses of whole brain structures need to be broken down into neuroanatomical subcompartments.

It is interesting to note that Cox-2 inhibition generally induces apoptosis in cancer studies(Zhang, Lai et al. 2004; Schroeder, Kadara et al. 2006) whereas it prevents apoptosis in acute myocardial infarction(Abbate, Limana et al. 2006). We believe that Celecoxib can induce different effects depending of the primary signal. In our study the signal was induced by myocardial infarction and the release of inflammatory substances resulted in apoptosis in the amygdala. Reduction of inflammatory substances, directly and indirectly by Cox-2 inhibition, is beneficial for the amygdala following myocardial infarction.

In conclusion, the present study demonstrated that the Cox-2 inhibitor Celecoxib administered 10 minutes after the onset of reperfusion can reduce apoptosis in the amygdala three days after myocardial infarction.

Acknowledgments

The authors want to thank Pierre Fortier and Caroline Bouchard for technical assistance and Stéphane Dion for the critical reading of the manuscript. G.R. is a scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). S.K. is recipient of the J.A. DeSève Ph.D. scholarship. T. M. Bah is recipient of a FRSQ Ph.D. scholarship. Celecoxib was generously provided by Pfizer Canada.

Tables

	Positive TUNEL cells	Total	% of positive cells
MI	41	3,103	1,32
MI + Celecoxib	31	3,995	0,78*

*p< 0,005

Table 1. TUNEL positive and total cell counts in the lateral amygdala

	Positive TUNEL cells	Total	% of positive cells
MI	42	2,930	1,43
MI + Celecoxib	21	2,594	0,81*

*p< 0,005

Table 2. TUNEL positive and total cell counts in the median amygdala

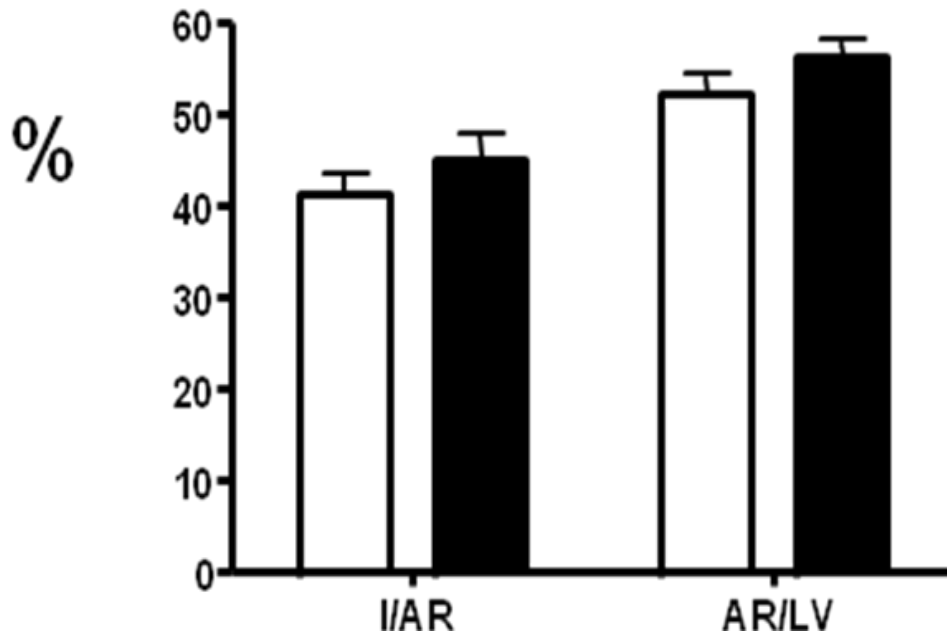
Figures

Figure 1. Myocardial infarct size (I) expressed as a percentage of the area at risk (AR) showed no difference between both groups. Area at risk (AR) expressed as a percentage of the left ventricle (LV) was similar between groups (n=10; □ Untreated, ■ Celecoxib).

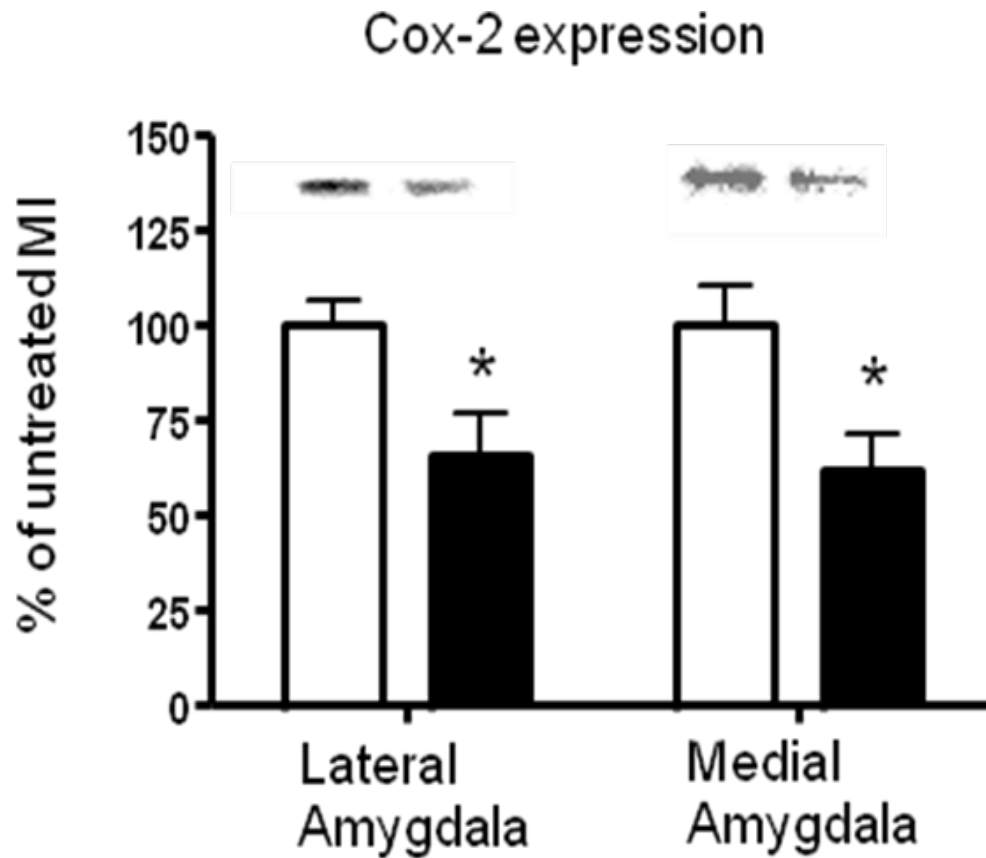


Figure 2. Cox-2 expression assessed by western blotting in lateral and medial amygdala. Cox-2 expression was reduced significantly in the Celecoxib group compared to untreated group in the lateral ($p = 0.034$ vs untreated) and in the medial amygdala ($p = 0.030$; $n=5$ /group; $*p<0.05$ vs. untreated group; \square Untreated, \blacksquare Celecoxib). Inset : Representative example of a western blot for Cox-2 expression.

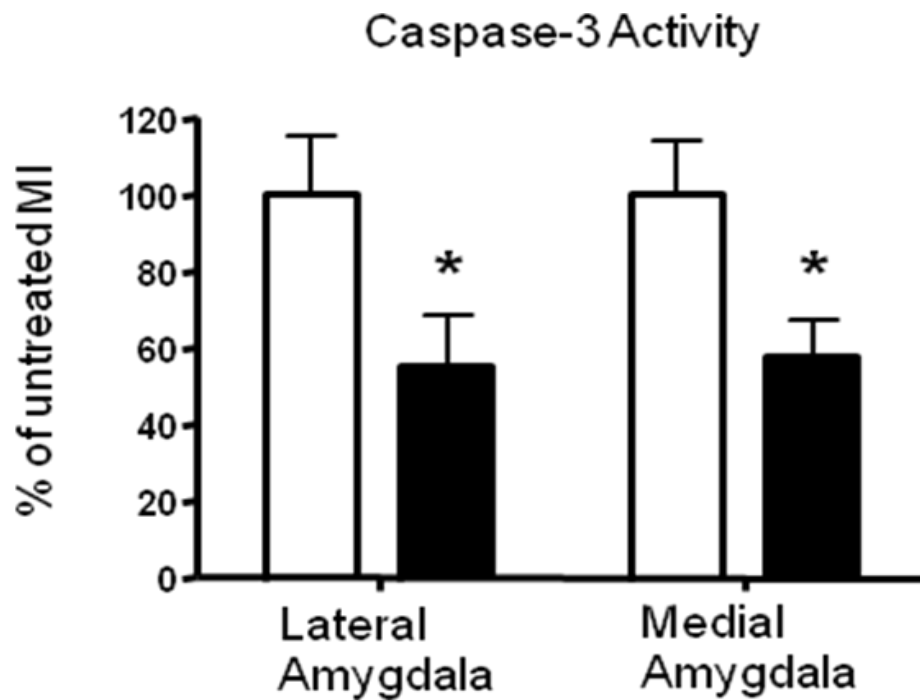


Figure 3. Caspase-3 activity in the amygdala assessed by *in vitro* spectrofluorescence. Activity was reduced significantly in the lateral ($p = 0.048$) and medial amygdala ($p=0.025$) of the Celecoxib group compared to untreated ($n=6-8/\text{group}$; $*p<0.05$ vs. Untreated group; □ Untreated, ■ Celecoxib).

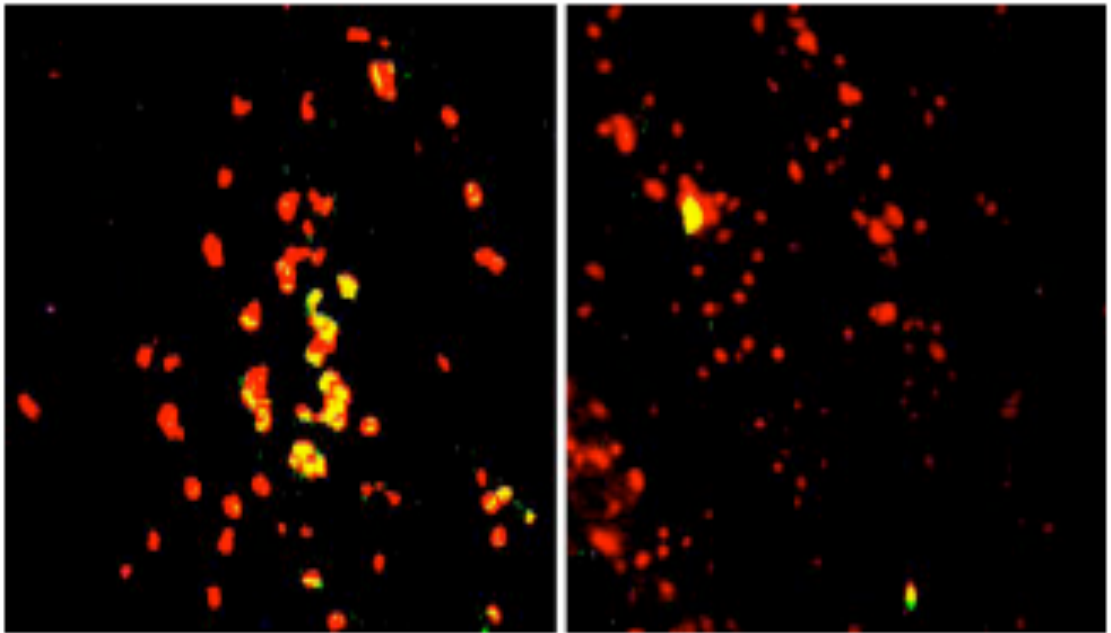


Figure 4: Typical example of positive cells in amygdala. Red spots correspond to the nucleus of negative cells and the yellow spots correspond to the nucleus of positive cells.

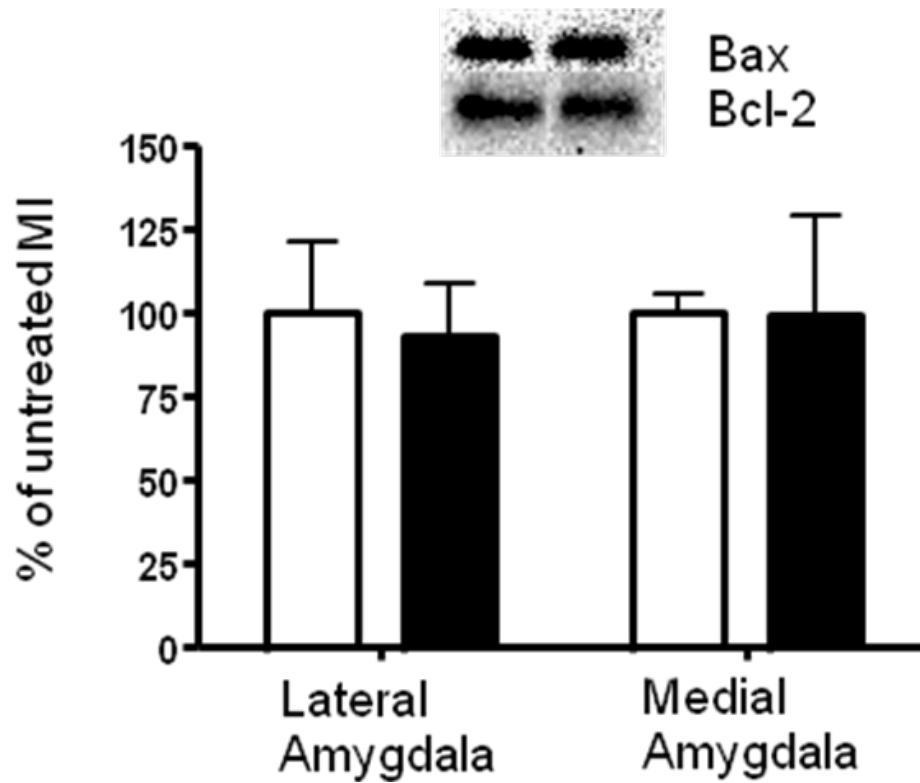


Figure 5. Bax/Bcl-2 ratio assessed by western blotting. No significant change was observed in between groups in both regions (n=6-8/group; □ Untreated, ■ Celecoxib). Inset :Representative example of a western blot for Bax and Bcl-2.

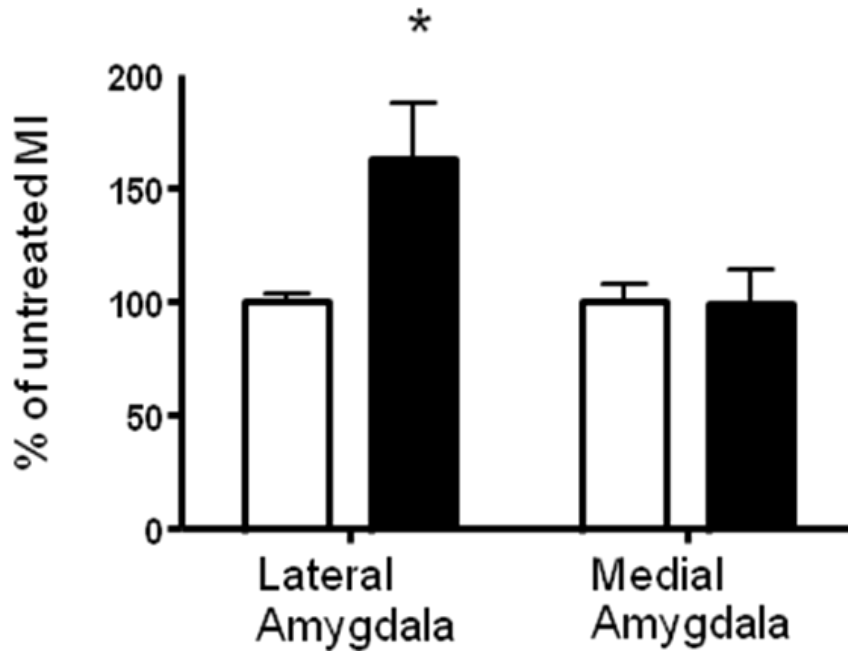


Figure 6. Akt activation assessed by western blotting as a ratio of phosphorylated form on total form of the protein. Activation was enhanced significantly in the Celecoxib group compared to untreated group in the lateral amygdala ($p = 0.024$ vs untreated) but not in the medial amygdala. No difference was observed in the medial amygdala between groups ($n=7-8$ /group; $*p<0.05$ vs. untreated group; \square Untreated, \blacksquare Celecoxib). Inset :Representative example of a western blot for phosphorylated and total Akt expression.

References

1. Guck TP, Kavan MG, Elsasser GN, Barone EJ. Assessment and treatment of depression following myocardial infarction. *Am Fam Physician* 2001; 64: 641-8
2. Nieuwenhuys R. The greater limbic system, the emotional motor system and the brain. *Prog Brain Res* 1996; 107: 551-80
3. Wann BP, Boucher M, Kaloustian S, et al. Apoptosis detected in the amygdala following myocardial infarction in the rat. *Biological Psychiatry* 2006; 59: 430-3
4. Zhang J, Rivest S. Is survival possible without arachidonate metabolites in the brain during systemic infection? *News Physiol Sci* 2003; 18: 137-42
5. Hewett SJ, Bell SC, Hewett JA. Contributions of cyclooxygenase-2 to neuroplasticity and neuropathology of the central nervous system. *Pharmacol Ther* 2006; 112: 335-57. Epub 2006 Jun 5.
6. Chu K, Jeong SW, Jung KH, et al. Celecoxib induces functional recovery after intracerebral hemorrhage with reduction of brain edema and perihematoma cell death. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004; 24: 926-33.
7. Sinn DI, Lee ST, Chu K, et al. Combined neuroprotective effects of celecoxib and memantine in experimental intracerebral hemorrhage. *Neurosci Lett* 2007; 411: 238-42. Epub 2006 Nov 22.
8. Arnaud C, Joyeux-Faure M, Godin-Ribuot D, Ribouot C. Cox-2: an in vivo evidence of its participation in heat stress-induced myocardial preconditioning. *Cardiovasc Res* 2003; 58: 582-8.

9. Shinmura K, Tang XL, Wang Y, et al. Cyclooxygenase-2 mediates the cardioprotective effects of the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 10197-202.
10. Boucher M, Wann BP, Kaloustian S, et al. Reduction of apoptosis in the amygdala by an A2A adenosine receptor agonist following myocardial infarction. *Apoptosis* 2006; 11: 1067-74
11. Wann BP, Bah TM, Boucher M, 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: 11-6.
12. Abbate A, Limana F, Capogrossi MC, et al. Cyclo-oxygenase-2 (Cox-2) inhibition reduces apoptosis in acute myocardial infarction. *Apoptosis* 2006; 11: 1061-3
13. Saito T, Rodger IW, Hu F, et al. Inhibition of COX pathway in experimental myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 37: 71-7.
14. Saito T, Rodger IW, Hu F, Shennib H, Giaid A. Inhibition of cyclooxygenase-2 improves cardiac function in myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 273: 772-5.
15. Alcindor D, Krolikowski JG, Pagel PS, Warltier DC, Kersten JR. Cyclooxygenase-2 mediates ischemic, anesthetic, and pharmacologic preconditioning in vivo. *Anesthesiology* 2004; 100: 547-54.
16. Nantel F, Denis D, Gordon R, et al. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *Br J Pharmacol* 1999; 128: 853-9

17. Hinz B, Brune K. Cyclooxygenase-2--10 years later. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300: 367-75
18. Laflamme N, Rivest S. An essential role of interleukin-1 β in mediating NF-KB 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 Neuroscience* 1999; 19: 10923-30
19. Rivest S. How circulating cytokines trigger the neural circuits that control the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology* 2001; 26: 761-88
20. Sasaki T, Kitagawa K, Yamagata K, et al. Amelioration of hippocampal neuronal damage after transient forebrain ischemia in cyclooxygenase-2-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004; 24: 107-13
21. Li RC, Row BW, Gozal E, et al. Cyclooxygenase 2 and intermittent hypoxia-induced spatial deficits in the rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 469-75
22. Takadera T, Yumoto H, Tozuka Y, Ohyashiki T. Prostaglandin E2 induces caspase-dependent apoptosis in rat cortical cells. *Neurosciences Letters* 2002; 317: 61-4
23. Kutuk O, Basaga H. Bcl-2 protein family: implications in vascular apoptosis and atherosclerosis. *Apoptosis* 2006; 11: 1661-75.
24. Broker LE, Kruyt FA, Giaccone G. Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3155-62.

25. Takadera T, Ohyashiki T. Prevention of rat cortical neurons from prostaglandin E₂-induced apoptosis by glycogen synthase kinase-3 inhibitors. *Neurosci Lett* 2006; 400: 105-9. Epub 2006 Feb 28.
26. Schroeder CP, Kadara H, Lotan D, et al. Involvement of mitochondrial and akt signaling pathways in augmented apoptosis induced by a combination of low doses of celecoxib and N-(4-hydroxyphenyl) retinamide in premalignant human bronchial epithelial cells. *Cancer Res* 2006; 66: 9762-70.
27. Zhang Z, Lai GH, Sirica AE. Celecoxib-induced apoptosis in rat cholangiocarcinoma cells mediated by Akt inactivation and Bax translocation. *Hepatology* 2004; 39: 1028-37

11 Chapitre 11 : Apoptosis (2009)

Kaloustian S, Bah TM, Rondeau I, Mathieu S, Lada-Moldovan L, Ryvlin P, Godbout R,

Rousseau G

Article accepté à *Apoptosis* (sous presse)

2009

Tumor necrosis factor-alpha participates in apoptosis in the limbic system after myocardial
infarction

Sévan Kaloustian est le principal auteur de cet article

Tumor necrosis factor-alpha participates in apoptosis in the limbic system after myocardial
infarction

Kaloustian S^{1,3,4}, Bah TM³, Rondeau I^{1,3}, Mathieu S³, Lada-Moldovan L^{1,3}, Ryvlin P⁴,
Godbout R^{2,3},
Rousseau G^{1,3}

¹Département de pharmacologie, ²Département de psychiatrie, Université de Montréal,

³Centre de biomédecine, Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, Montreal, Quebec, Canada,

⁴Département de Neurologie Fonctionnelle et Épileptologie, Hospices Civils de Lyon et
Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

Number of pages: 21

Number of figures: 8

Number of tables: 2

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

Abstract

This study was designed to determine the role of tumor necrosis factor-alpha (TNF α) in apoptosis observed in the myocardium and limbic system after myocardial ischemia. PEG sTNFR1, a recombinant, human, soluble p55 Type 1 TNF receptor (3 mg/kg) or vehicle (saline) was administered s.c. to male Sprague-Dawley rats on days 5, 3 and 1 before myocardial ischemia. The animals were then subjected, under anesthesia, to left anterior descending coronary artery occlusion for 40 min, followed by 15-min or 72-h reperfusion. Caspase-3 and -8 activities as well as terminal dUTP nick-end labelling-positive cells were examined in the myocardium (subendocardial and subepicardial regions), lateral (LA) and medial amygdala (MA) and hippocampus (CA1, CA3, dentate gyrus (DG)).

After 15 min of reperfusion, the subendocardial and CA1 regions presented an increase in caspase-3 activity, whereas caspase-8 activity appeared to be augmented in the DG. PEG sTNFR1 inhibited caspase-8 activation in the DG. After 72 h of reperfusion, plasma TNF α levels were reduced in the treated groups. The DG, CA1, CA3 and MA showed an increment of caspase-8 activity which was reversed by PEG sTNFR1, except in the MA. Furthermore, caspase-3 activity was increased in the CA1, DG, LA and MA.

These results indicate that TNF α contributes to apoptosis via activation of the extrinsic pathway in the limbic system after myocardial infarction, which is not the case in the myocardium.

Keywords: Myocardial infarction, Apoptosis, Caspase-3, Caspase-8, Hippocampus, Amygdala, TNF- α , PEG sTNFR1

Introduction

The presence of apoptotic cells has been documented in the myocardium and limbic system during the reperfusion phase of myocardial infarction (MI). This kind of cell death is important since it contributes to infarct size, which is significantly decreased by apoptosis inhibition (Mocanu, Baxter et al. 2000). Contemporarily, apoptosis has also been documented in different regions of the limbic system, such as the amygdala and hippocampus (Wann, Boucher et al. 2006; Kaloustian, Wann et al. 2008). Although it is still speculative, treatment leading to a reduction of early apoptosis in the limbic system has been shown to also attenuate subsequently observed depressive behavior, suggesting a link between both events (Wann, Bah et al. 2009).

Apoptosis can be initiated by intrinsic or extrinsic signaling pathways. The intrinsic or mitochondria-dependent pathway can be activated by chemicals, drugs, irradiation and cell stress, such as hypoxia (Jeong and Seol 2008). Independently of signals that trigger the intrinsic pathway, all appear to converge at the mitochondria, resulting in cytochrome C release, with activation of caspase-9 and, ultimately, caspase-3. The extrinsic pathway of apoptosis is initiated by ligand binding to death receptors, such as tumor necrosis factor (TNF), Fas or TNF-related apoptosis-inducing factor receptors (Thorburn 2004). The formation of death-inducing signaling complexes recruits pro-caspase-8, culminating in auto-cleavage and caspase-8 activation (Wang and El-Deiry 2003). Activated caspase-8, in turn, cleaves and activates downstream effector caspases, such as caspase-3, eliciting the cleavage of cellular proteins and cell death.

Pro-inflammatory cytokines, such as TNF α , are released during the reperfusion phase (Gu, Yang et al. 2006), when apoptosis occurs (Freude, Masters et al. 2000). Interestingly, the role of TNF α in myocardial ischemia appears to be controversial. Some studies have reported that inhibition of TNF α induces a significant reduction of infarct size (Maekawa, Wada et al. 2002; Gu, Yang et al. 2006), whereas others have been unable to document this beneficial effect (Dawn, Guo et al. 2004; Deuchar, Opie et al. 2007).

The role of TNF α in limbic system apoptosis, observed after MI, has never been investigated, but it has been shown that myocardial ischemia evokes an elevation of TNF α in the brain (Francis, Chu et al. 2004), and attenuation of pro-inflammatory cytokine synthesis by pentoxifylline significantly decreases apoptosis in the limbic system (Wann, Boucher et al. 2006).

With that in mind, we postulated that TNF α contributes to apoptosis in the myocardium and limbic system during the reperfusion phase of MI. To verify our hypothesis, TNF α concentrations were modulated by PEG sTNFR1, a recombinant, human, soluble p55 Type 1 TNF receptor, that has a relatively long half-life and low immunogenicity properties (Edwards, Martin et al. 2003).

Materials & Methods

Experimental groups

Male Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, Saint-Constant, Quebec, Canada), weighing between 350 and 450 g, were handled in compliance with Canadian Council on Animal Care guidelines. The animals were randomly assigned to 1 of 4 groups: Sham+vehicle, Sham+PEG, MI+vehicle and MI+PEG. They received 70 μ L of either the vehicle or PEG sTNFRI (3 mg/kg s.c. Amgen, Seattle, WA), on days 5, 3 and 1 before myocardial ischemia induction. The last dose was given the day before surgery. The animals were sacrificed after 15 min or 72 h of reperfusion.

In vivo surgical procedure and brain region preparation

Anesthesia was induced with ketamine/xylazine (50 mg/kg and 5 mg/kg i.m., respectively). The animals were then intubated, and anesthesia was maintained with isoflurane (1%) ventilation in a small animal respirator. Body temperature was monitored throughout surgery with a rectal probe. Electrodes placed on paws recorded ECG and heart rate. After left thoracotomy, the left anterior descending coronary artery was occluded by 4-0 silk suture with a plastic snare. Ischemia was confirmed by ST segment alterations and ventricular epicardial cyanosis. After 40 min of occlusion (ischemia), the ligature was loosened so that the myocardial tissue could be reperfused. Reperfusion was confirmed by the disappearance of cyanosis. In both the 15-min and 72-h perfusion protocols, Sham

animals were subjected to the same procedures with the exception that myocardial ischemia was not induced.

In the 15-min reperfusion protocol, the rats were sacrificed by decapitation. Then, their hearts were removed and dissected into 4 regions: the subepicardial area at risk (AR), the subepicardial non-ischemic area, the subendocardial AR, and the subendocardial non-ischemic area. The brain was immediately placed in a dish standing on crushed ice, to dissect out the following areas according to the atlas of Paxinos and Watson (Paxinos and Watson 1986): hippocampus (CA1, CA3 and dentate gyrus, DG), medial (MA) and lateral amygdala (LA). Tissues were snap-frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until required.

In the 72-h reperfusion protocol, after surgery and reperfusion initiation, the thorax was closed and the animals were returned to their cages upon receiving an antibiotic (15,000 IU penicillin G) and analgesic (2 mg/kg of butorphanol). After 3 days of reperfusion, they were secured in a restraint cone bag and rapidly decapitated. This route was chosen to avoid alteration of the biochemical pathways associated with techniques such as anesthesia or CO₂ exposure. The heart was removed, and the brain was treated exactly the same way as in the 15-min protocol.

Measurements of heart AR and MI size

The AR and actual infarct size were measured in the following manner in a subset of animals after 72 h of reperfusion: upon sacrifice, the hearts of MI rats were removed, and

the left anterior descending coronary artery occluded at the original site. To demarcate the AR, Evans Blue (0.5%) was infused into the aorta by retrograde perfusion. The heart was then frozen (-80°C for 5 min), and 4 2-mm transverse sections were obtained. Each section was bathed at 37°C for 5 min in 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride solution (1%, pH 7.4) to mark necrotic tissue surfaces (I). MI was expressed as a percentage of the necrotic AR ($[I/AR] \times 100$). The AR was further expressed as a percentage of the left ventricle (LV) area ($[AR/LV] \times 100$). Other animals in which MI size was not measured were used for biochemical assessment.

Caspase-3 and -8 activity

Caspase-3 activity was quantified as described previously (Wann, Boucher et al. 2006). Briefly, cytosolic proteins were extracted 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 g/mL Aprotinin). Enzymatic reactions were performed in reaction buffer (50 mM Tris (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.1% CHAPS, 1 mM DTT) with 25 µg of proteins and the fluorogenic substrate Ac-DEVD-AMC (40 µM; Cedarlane, Burlington, Ontario, Canada). The reactions were incubated at 37°C for 3 h and stopped by the addition of 0.4 M NaOH and 0.4 M glycine buffer. Fluorescence was measured with a spectrofluorometer (Photon Technology International, Lawrenceville, NJ) at an excitation wavelength of 365 nm and an emission wavelength of 465 nm. A similar approach, to quantify caspase-8 activity, was taken with minor modifications: Ac-

IETD-AMC (40 μ M; Cedarlane, Burlington, Ontario, Canada) was used as substrate, and the excitation wavelength was 365 nm and the emission wavelength was 430 nm.

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

TUNEL was undertaken (Wann, Boucher et al. 2006) according to the protocol provided by the manufacturer (Oncogene Science Inc., Uniondale, NY). In summary, cryostat sections were fixed in paraformaldehyde (4%) and rinsed, then permeabilized and, after washing, the labelling reaction was performed for 1 h at 37°C. The reaction was stopped, and all nuclei were stained with propidium iodide (1 μ M). The sample was viewed in a Leica epiillumination microscope with a filter for DAPI (330-380 nm). All sections were photographed at the same magnification (400 \times) with a Nikon Coolpix 995 camera. A total of 20-25 pictures were taken of each sample, with quantitation of positive cells on total number.

Protein extraction

Protein was extracted as described elsewhere (Boucher, Pesant et al. 2004; Boucher, Wann et al. 2006). Tissue samples were homogenized in lysis buffer (50 mM Tris (pH 7.5), 20 mM β -glycerophosphate, 20 mM NaF, 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1 mM Na_3VO_4 , 10 mM benzamidine, 0.5 mM PMSF, 10 μ g/mL Leupeptin, 5 mM DTT, 1 μ M microcystin LR, and 1% Triton X-100). The homogenate was incubated for 30 min at 4°C, and centrifuged for 15 min at 10,000 \times g at 4°C. Protein content was assessed by the Lowry method (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Western blotting

For Western blotting (Boucher, Pesant et al. 2004; Boucher, Wann et al. 2006), 50-100 µg aliquots of extracted tissue proteins were subjected to 15% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis in a mini-gel apparatus (Bio-Rad). They were transferred to Trans-Blot semi-dry transfer cells (Bio-Rad) on Protran nitrocellulose membranes (Mandel, Montreal, Quebec, Canada). Protein transfer efficiency was assessed with Ponceau red S dye. Non-specific sites were blocked by 5% non-fat dry milk in TBS-T (10 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl and 0.05% Tween 20), and the membranes were incubated overnight at 4°C with caspase-8 antibody (diluted 1:1,000 in 5% non-fat dry milk in TBS-T, Santa-Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA). Subsequently, the membranes were washed and incubated for 45 min at room temperature with secondary antibody (diluted 1:5,000 in 5% non-fat dry milk in TBS-T) conjugated to horseradish peroxidase. The membranes were then washed and exposed on Scientific Imaging Film (Perkin Elmer Life Sciences, Mississauga, Ontario, Canada) or Kodak ImageStation 440CF with Enhanced Chemiluminescence Reagent (Perkin Elmer Life Sciences). Band intensities were analyzed by Kodak 1D v.3.5.5 Scientific Imaging Software.

Plasma TNF α levels

Plasma was isolated from blood samples taken at 72 h of reperfusion. Plasma TNF α levels were analyzed with ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, cat. #DY-510) according to specifications.

Statistical analysis

The results were expressed as mean (\pm standard error of the mean). Plasma levels of TNF α , caspase-3 and -8 activities were analyzed by 2X2 ANOVA (MI X treatment). TUNEL staining data were evaluated by χ^2 statistical testing, followed by portioning according to Siegel and Castellan (Siegel and Castellan 1988). $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Infarct size and AR

Left anterior descending coronary artery occlusion produced an AR that represented around 60% of the LV. Forty min of ischemia, followed by 3 days of reperfusion, induced MI size, representing approximately 50-55% of the AR in both groups (Figure 1). No significant difference was observed between groups, indicating that treatment had no protective effect on the ischemic myocardium.

Plasma TNF α levels

Plasma TNF α levels were increased in the MI groups ($F(1,24) = 21.3$, $p < 0.001$) at 72 h of reperfusion. In the presence of PEG sTNFRI, they were significantly decreased ($F(1,24) = 4.21$, $p < 0.05$). No significant interaction was observed (Figure 2).

Myocardial tissue after 15-min reperfusion

Caspase-8: Western blotting demonstrated that MI evoked no significant increase in caspase-8 activity in the ischemic region, whether treatment was administered or not.

Caspase-3: Caspase-3 activity was significantly augmented in MI of the ischemic subendocardial region ($F(1,25) = 8.34$, $p < 0.05$). No interaction or treatment effect was seen in this or the other regions (Figure 3).

TUNEL: After 15 min, a significant increase in the number of TUNEL-positive cells was detected in the MI+vehicle compared to the Sham groups, in the ischemic part of

the subendocardial region. No significant changes were found in the other regions (Table 1).

Brain after 15-min reperfusion

Caspase-8: Western blotting revealed a significant MI X treatment interaction on caspase-8 in the DG ($F(1,24) = 4.41, p < 0.05$). This parameter was not affected in all other analyzed regions of the different groups (Figure 4). To confirm these results, caspase-8 activity was measured by spectrofluorometry and indicated a significant interaction in the DG ($F(1,8) = 11.574, p < 0.01$).

Caspase-3: Caspase-3 showed a significant rise in the CA1 region for the MI variable ($F(1,23) = 4.33, p < 0.05$), indicating that MI leads to heightened caspase-3 activity in this region. No significant effect was found for the treatment variable or for MI X treatment interaction in any of the regions analyzed (Figure 5).

TUNEL: After 15-min reperfusion, no significant change was seen in the number of TUNEL-positive cells in any region between groups.

Brain after 72-h reperfusion

Caspase-8: Western blotting revealed that 4 regions experienced an increase of caspase-8 activity at 72 h post-MI: CA1, CA3, DG and MA. Interaction between 2 factors (MI and treatment) was significant for CA1 ($F(1,17) = 4.73, p < 0.05$), CA3 ($F(1,17) = 4.43, p < 0.05$) and DG ($F(1,19) = 4.55, p < 0.05$), whereas the MI factor was significant for

the MA ($F(1,22) = 6.33, p < 0.05$). No significant change was apparent in the LA (Figure 6). To confirm these results, caspase-8 activity was assessed by spectrofluorometry. Interactions between 2 factors were significant for CA1 ($F(1,12) = 4.926, p < 0.05$), CA3 ($F(1,5) = 4.923, p < 0.05$), and DG ($F(1,13) = 6.882, p < 0.05$), whereas the MI factor was significant for the MA ($F(1,14) = 8.656, p < 0.02$). Again, no significant result was observed for the LA (Figure 7).

Caspase-3: Caspase-3 activity presented a significant elevation in the 4 regions (CA1, DG, MA and LA). In 3 of them (DG, MA and LA), we noted significant interaction between MI and treatment: DG ($F(1,24) = 13.46, p < 0.05$), MA ($F(1,16) = 6.84, p < 0.05$), LA ($F(1,24) = 13.46, p < 0.05$), whereas the MI factor was significant for CA1 ($F(1,30) = 6.25, p < 0.05$). No significant change was apparent in CA3 (Figure 8).

TUNEL: After 72-h reperfusion, TUNEL confirmed a significant increase in the MI+vehicle group compared to other groups for the same regions, in concordance with significantly heightened caspase-3 activity in the CA1, DG, MA and LA. No significant changes were noted in CA3 (Table 2).

Discussion

Myocardial reperfusion is associated with a significant inflammatory response that can modulate infarct size (de Lorgeril, Rousseau et al. 1990; Vinten-Johansen 2004). The present study indicates that TNF α plays a minor role in the modulation of reperfused MI size, confirming the data obtained in earlier experiments showing that pentoxifylline, a cytokine synthesis inhibitor, has no effect on infarct size (Wann, Boucher et al. 2006). In the literature, however, the influence of cytokines on MI size is still controversial. Indeed, some research reports suggest that TNF α reduction is necessary to induce cardioprotection by preconditioning (Lecour, Smith et al. 2002; Deuchar, Opie et al. 2007; Flaherty, Guo et al. 2008) while others indicate that it has a beneficial outcome on infarct size (Maekawa, Wada et al. 2002; Gu, Yang et al. 2006) or not (Dawn, Guo et al. 2004; Deuchar, Opie et al. 2007). The latter contradictory results could be due to the length of the reperfusion period since beneficial effects were observed with shorter reperfusion periods, suggesting that TNF α may account for a transient beneficial effect. It has also been proposed that, depending on the receptor activated (TNFR1 or TNFR2), TNF α may have a toxic or protective effect (Monden, Kubota et al. 2007) but this could not be verified in our protocol.

The absence of caspase-8 activity in the reperfused MI reinforces the fact that TNF α is a minor player in myocardial cell death. However, despite an impact on MI size, we cannot rule out that TNF α must have an influence on other myocardial pathologies, such as heart failure. Indeed, it has been reported that TNF α contributes to the development of

heart failure after MI (Feldman, Combes et al. 2000) and may thus be important in the evolution of MI.

In contrast, caspase-3 activity was increased in the ischemic part of the subendocardial region, whereas PEG sTNFR1 had no effect on the modulation of caspase-3 activity. These results suggest that apoptosis occurs in the subendocardial layer of the ischemic myocardium by a mechanism involving the intrinsic pathway. Indeed, it has been demonstrated that ischemia can trigger apoptosis through intrinsic pathway activation (Weidman, Shaw et al. 2008). Susceptibility of the subendocardium to ischemia, as indicated by the wavefront phenomenon (Reimer, Lowe et al. 1977), may explain the presence of apoptosis as early as 15 min after reperfusion, at a time when energy is available for apoptosis (Holleyman and Larson 2001). Apoptosis was not measured in the myocardium at 72 h since we reported previously that no sign of it was detected after 5 h of reperfusion (Boucher, Pesant et al. 2004). Overall, these results show that apoptosis occurs rapidly after the onset of reperfusion by activation of the intrinsic pathway without any significant role of TNF α .

In the limbic system, our results demonstrate that both pathways are involved in apoptosis. After 15 min, we noted increased caspase-8 activity in the DG of the MI group, with its prevention by treatment. On the other hand, the lack of significant caspase-3 activation suggests that it is involved in a later phase of apoptosis (Kermer, Liman et al. 2004). The TUNEL data also indicate an early phase of apoptosis in that region.

Rapid induction of the extrinsic pathway in the DG by TNF α may be due to the stimulation of subepicardial afferent nerves by ischemia (Francis, Zhang et al. 2004). Destruction of afferent nerves with phenol prevents the induction of brain cytokine expression, such as of TNF α , as early as 30 min after the onset of myocardial ischemia, pointing to rapid communication between these organs. One unresolved issue is whether reduction of plasma TNF α levels is reflected in brain tissues. PEG sTNFR1 is not expected to cross the blood-brain barrier in normal physiological conditions (Hui, Boado et al. 2009) but we have observed increased permeability after myocardial infarction (Wann, Béland et al. 2004), suggesting that a pathologic condition may be necessary for PEG sTNFR1 to act on brain tissue. This hypothesis needs to be verified.

In contrast, in the CA1 region, we observed a significant increase of caspase-3 activity in the MI groups without any change in caspase-8 activity. This finding can be explained by the region's susceptibility to hypoxia (Sugawara, Fujimura et al. 1999). Unpublished data suggest that cerebral blood flow is reduced by infarct size and may thus be the reason why CA1 presents heightened caspase-3 activity. However, the mechanism of CA1 susceptibility to hypoxia is unknown.

In accordance with our previous report (Wann, Bah et al. 2009), we noted increased caspase-3 activity in the limbic system 72 h after MI in the CA1, DG, MA and LA, whereas no significant caspase-3 activity was detected in CA3 (Kaloustian, Wann et al. 2008; Wann, Bah et al. 2009). In 3 of these regions (CA1, DG and MA), we also discerned an elevation of caspase-8 activity, indicating that the extrinsic pathway contributes to apoptosis. Its

activation in these regions was reversed by treatment, emphasizing the involvement of TNF α , although significant results were obtained only in CA1 and DG.

Interestingly, the LA exhibited an increase in caspase-3 activity without any significant increment of caspase-8 activity, suggesting that apoptosis in this region is due to the intrinsic pathway and may be related to hypoxia. However, this finding needs to be investigated further to determine if indeed hypoxia or other stress stimuli may be involved.

An unexpected finding was that LA levels of caspase-3 were inhibited in the presence of PEG sTNFRI, without any change in caspase-8 activity. This apparent discrepancy can be explained by the fact that TNFRI modulates apoptosis through 2 signaling complexes acting in sequence, the first being anti-apoptotic, and the second, pro-apoptotic (Micheau and Tschopp 2003). The first step involves TNF binding to TNFRI (present in the limbic system (Nadeau and Rivest 1999)), which yields a protein complex that can activate NF- κ B (Haudek, Taffet et al. 2007), and ultimately increase anti-apoptotic proteins from the Bcl family (Saile, Matthes et al. 2001; Zhao, Iskandar et al. 2007; Tun-Kyi, Qin et al. 2008). In our protocol, treatment was stopped before MI was induced, and it is thus possible that, after 72 h of reperfusion, TNF levels began to rise in the treated MI group, leading to the formation of complex I and an anti-apoptotic effect (Haudek, Taffet et al. 2007), which could explain the reduction in caspase-3 activity without any change in caspase-8. The anti-apoptotic action was not observed in the MI group at 72 h but could occur earlier in the time course of MI which could not be verified with our protocol.

For the first time, with this model, we noted that the extrinsic pathway of apoptosis

is activated in CA3 after 72 h of reperfusion (Kaloustian, Wann et al. 2008; Wann, Bah et al. 2009) without any significant caspase-3 activity or an increase in the number of TUNEL-positive cells. These data indicate that apoptosis is initiated at a later stage in this compared to other regions, and the signal that triggers apoptosis is extrinsic. Caspase-8 induction can be reversed by PEG sTNFRI, suggesting that TNF α is responsible for its activation.

We thus conclude that extrinsic and intrinsic pathways are involved in MI-induced apoptosis in the limbic system, that activation of the extrinsic pathway is associated with the presence of TNF α , and can be blocked by treatment with PEG sTNFRI.

Acknowledgments

The authors thank Pierre Fortier and Caroline Bouchard for their skillful assistance and technical expertise. They also thank Amgen for generously providing PEG sTNFRI. G.R. is a scholar of “*Fonds de la recherche en santé du Québec*” (FRSQ). S.K. and T.M.B. hold studentships from the FRSQ. This study was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). The editorial assistance of Ovid Da Silva is acknowledged.

Figure Legends

Figure 1. A) Myocardial infarct size (I), expressed as a percentage of the area at risk (AR), shows no difference between groups at 72 h after reperfusion. AR, expressed as a percentage of the left ventricle (LV), is similar between groups. n=10; ■ MI, ▨ MI-PEG.

Figure 2. Plasma TNF α levels in the different groups at 72 h of reperfusion. “*” = significantly different from Sham (MI factor); “+” = significantly different from No Treatment (Treatment factor). * or + p < 0.05.

Figure 3. Caspase-3 activity in different heart regions assessed by spectrofluorometry after 15-min reperfusion. n=5-8/group: *p<0.05 between the Sham and MI groups; □ Sham, ◻ Sham + PEG, ■ MI, ▨ MI-PEG. Endo: endocardium; Epi: epicardium.

Figure 4. Caspase-8 activity in different limbic regions assessed by Western blotting after 15-min reperfusion. CA1: hippocampal CA1; CA3: hippocampal CA3; DG: dentate gyrus; LA: lateral amygdala; MA: medial amygdala. n=5-8/group: *indicates significant interaction between MI X treatment; p < 0.05: □ Sham, ◻ Sham + PEG, ■ MI, ▨ MI-PEG). Inset: Western blotting of caspase-8 in the DG of the 4 different groups.

Figure 5. Caspase-3 activity in different limbic regions assessed by spectrofluorometry after 15-min reperfusion. CA1: hippocampal CA1; CA3: hippocampal CA3; DG: dentate gyrus; LA: lateral amygdala; MA: medial amygdala. n=5-8/group: *p<0.05 between the Sham and MI groups; □ Sham, ◻ Sham + PEG, ■ MI, ▨ MI-PEG.

Figure 6. Caspase-8 activity in different limbic regions assessed by Western blotting after 72-h reperfusion. CA1: hippocampal CA1; CA3: hippocampal CA3; DG: dentate gyrus; LA: lateral amygdala; MA: medial amygdala. n=5-8/group: *indicates significant interaction between MI X

treatment; $p < 0.05$; # $p < 0.05$ between the Sham and MI groups. □ Sham, ◻ Sham + PEG, ■ MI, ◻ MI-PEG. Inset: Western blotting of caspase-8 in CA1 of the 4 different groups.

Figure 7. Caspase-8 activity in the different limbic regions assessed by spectrofluorometry after 72-h reperfusion. CA1: hippocampal CA1; CA3: hippocampal CA3; DG: dentate gyrus; LA: lateral amygdala; MA: medial amygdala. $n=5-8$ /group: *indicates significant interaction between MI X treatment: $p < 0.05$; # $p < 0.05$ between the sham and MI groups; □ Sham, ◻ Sham + PEG, ■ MI, ◻ MI-PEG).

Figure 8. Caspase-3 activity in the different limbic regions assessed by spectrofluorometry after 72-h reperfusion. CA1: hippocampal CA1; CA3: hippocampal CA3; DG: dentate gyrus; LA: lateral amygdala; MA: medial amygdala. $n=5-8$ /group: *indicates significant interaction between MI X treatment: $p < 0.05$; # $p < 0.05$ between the Sham and MI groups; □ Sham, ◻ Sham + PEG, ■ MI, ◻ MI-PEG).

References

1. Mocanu MM, Baxter GF, Yellon DM. Caspase inhibition and limitation of myocardial infarct size: protection against lethal reperfusion injury. *Br J Pharmacol.* 2000;130(2):197-200.
2. Kaloustian S, Wann BP, Bah TM, Girard SA, Apostolakis A, Ishak S, Mathieu S, Ryvlin P, Godbout R, Rousseau G. Apoptosis time course in the limbic system after myocardial infarction in the rat. *Brain Res.* 2008;1216:87-91.
3. 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(5):430-433.
4. Wann BP, Bah TM, Kaloustian S, Boucher M, Dufort AM, Le Marec N, Godbout R, Rousseau G. Behavioural signs of depression and apoptosis in the limbic system following myocardial infarction: effects of sertraline. *J Psychopharmacol.* 2009;23(4):451-459.
5. Jeong SY, Seol DW. The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Rep.* 2008;41(1):11-22.
6. Thorburn A. Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal.* 2004;16(2):139-144.
7. Wang S, El-Deiry WS. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene.* 2003;22(53):8628-8633.
8. Gu Q, Yang XP, Bonde P, DiPaula A, Fox-Talbot K, Becker LC. Inhibition of TNF-alpha reduces myocardial injury and proinflammatory pathways following ischemia-reperfusion in the dog. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006;48(6):320-328.
9. Freude B, Masters TN, Robicsek F, Fokin A, Kostin S, Zimmermann R, Ullmann C, Lorenz-Meyer S, Schaper J. Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32:197-208.
10. Maekawa N, Wada H, Kanda T, Niwa T, Yamada Y, Saito K, Fujiwara H, Sekikawa K, Seishima M. Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor-alpha. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39(7):1229-1235.
11. Deuchar GA, Opie LH, Lecour S. TNFalpha is required to confer protection in an in vivo model of classical ischaemic preconditioning. *Life Sci.* 2007;80(18):1686-1691.
12. Dawn B, Guo Y, Rezazadeh A, Wang OL, Stein AB, Hunt G, Varma J, Xuan YT, Wu WJ, Tan W, Zhu X, Bolli R. Tumor necrosis factor-alpha does not modulate ischemia/reperfusion injury in naive myocardium but is essential for the development of late preconditioning. *J Mol Cell Cardiol.* 2004;37(1):51-61.
13. Francis J, Chu Y, Johnson AK, Weiss RM, Felder RB. Acute myocardial infarction induces hypothalamic cytokine synthesis. *Am J Physiol.* 2004;286:H2264-H2271.
14. Edwards CK, 3rd, Martin SW, Seely J, Kinstler O, Buckel S, Bendele AM, Ellen Cosenza M, Feige U, Kohno T. Design of PEGylated soluble tumor necrosis factor

- receptor type I (PEG sTNF-RI) for chronic inflammatory diseases. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;55(10):1315-1336.
15. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press; 1986.
 16. Boucher M, Pesant S, Falcao S, de Montigny C, Schampaert E, Cardinal R, Rousseau G. Post-ischemic cardioprotection by A2A adenosine receptors: dependent of phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004;43(3):416-422.
 17. 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(7):1067-1074.
 18. Siegel S, Castellan NJJ. *Nonparametric statistics*, 2nd ed. Boston, MA: McGraw-Hill; 1988.
 19. de Lorgeril M, Rousseau G, Basmadjian A, St-Jean G, Tran D, Latour J. Spacial and temporal profiles of neutrophil accumulation in the reperfused ischemic myocardium. *Am J Cardiovasc. Path.* 1990;3:143-154.
 20. Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2004;61:481-497.
 21. Flaherty MP, Guo Y, Tiwari S, Rezazadeh A, Hunt G, Sanganalmath SK, Tang XL, Bolli R, Dawn B. The role of TNF-alpha receptors p55 and p75 in acute myocardial ischemia/reperfusion injury and late preconditioning. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;45(6):735-741.
 22. Lecour S, Smith RM, Woodward B, Opie LH, Rochette L, Sack MN. Identification of a novel role for sphingolipid signaling in TNF alpha and ischemic preconditioning mediated cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34(5):509-518.
 23. Monden Y, Kubota T, Inoue T, Tsutsumi T, Kawano S, Ide T, Tsutsui H, Sunagawa K. Tumor necrosis factor-alpha is toxic via receptor 1 and protective via receptor 2 in a murine model of myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293(1):H743-H753.
 24. Feldman AM, Combes A, Wagner D, Kadakomi T, Kubota T, Li YY, McTiernan C. The role of tumor necrosis factor in the pathophysiology of heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35(3):537-544.
 25. Weidman D, Shaw J, Bednarczyk J, Regula KM, Yurkova N, Zhang T, Aguilar F, Kirshenbaum LA. Chapter 16: Dissecting apoptosis and intrinsic death pathways in the heart. *Methods Enzymol.* 2008;446:277-285.
 26. Reimer K, Lowe J, Ramussen M, Jennings R. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1-Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation.* 1977;56:786-794.
 27. Holleyman CR, Larson DF. Apoptosis in the ischemic reperfused myocardium. *Perfusion.* 2001;16(6):491-502.

28. Kermer P, Liman J, Weishaupt JH, Bahr M. Neuronal apoptosis in neurodegenerative diseases: from basic research to clinical application. *Neurodegener Dis.* 2004;1(1):9-19.
29. Francis J, Zhang Z-H, Weiss RM, Felder RB. Neural regulation of the proinflammatory cytokine response to acute myocardial infarction. *Am J Physiol.* 2004;287:H791-H797.
30. Hui EK, Boado RJ, Pardridge W. Tumor necrosis factor receptor-IgG fusion protein for targeted-drug delivery across the human blood-brain barrier. *Mol Pharm.* 2009 Jul 30 [Epub ahead of print].
31. Wann BP, Béland SG, Rousseau G, Godbout RG Permeability in the limbic system following myocardial infarction in the rat. *34th Annual Meeting of the Society for Neuroscience* 2004:#568.564.
32. 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(22):RC39.
33. Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell.* 2003;114(2):181-190.
34. Nadeau S, Rivest S. Effects of circulating tumor necrosis factor on the neuronal activity and expression of the genes encoding the tumor necrosis factor receptors (p55 and p75) in the rat brain: a view from the blood-brain barrier. *Neuroscience.* 1999;93(4):1449-1464.
35. Haudek SB, Taffet GE, Schneider MD, Mann DL. TNF provokes cardiomyocyte apoptosis and cardiac remodeling through activation of multiple cell death pathways. *J Clin Invest.* 2007;117(9):2692-2701.
36. Saile B, Matthes N, El Armouche H, Neubauer K, Ramadori G. The bcl, NFkappaB and p53/p21WAF1 systems are involved in spontaneous apoptosis and in the anti-apoptotic effect of TGF-beta or TNF-alpha on activated hepatic stellate cells. *Eur J Cell Biol.* 2001;80(8):554-561.
37. Zhao W, Iskandar S, Kooshki M, Sharpe JG, Payne V, Robbins ME. Knocking out peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha inhibits radiation-induced apoptosis in the mouse kidney through activation of NF-kappaB and increased expression of IAPs. *Radiat Res.* 2007;167(5):581-591.
38. Tun-Kyi A, Qin JZ, Oberholzer PA, Navarini AA, Hassel JC, Dummer R, Dobbeling U. Arsenic trioxide down-regulates antiapoptotic genes and induces cell death in mycosis fungoides tumors in a mouse model. *Ann Oncol.* 2008;19(8):1488-1494.

	Sham	Sham+PEG	MI	MI+PEG
Subendocardial layer of the non-ischemic region	3/3,291	6/3,224	4/3,766	8/3,336
Subepicardial layer of the non-ischemic region	8/2,878	5/2,906	13/3,338	3/2,986
Subendocardial layer of the ischemic region	5/3,485	5/2,264	41/2,627*	9/2,806
Subepicardial layer of the ischemic region	3/1,911	3/2,682	9/3,697	4/2,820

Table 1. Number of TUNEL-positive cells on total cell count in different regions analyzed at 15 min after reperfusion. *p < 0.05 for the MI group versus the 3 other groups.

	Sham	Sham+PEG	MI	MI+PEG
CA1	6/2,979	11/3,545	32/3,907*	5/3,714
CA3	7/3,235	8/3,336	4/3,454	7/3,321
DG	7/2,333	7/2,063	33/4,008*	13/4,363
LA	6/3,941	5/3,611	23/3,279*	8/4,229
MA	3/4,478	6/3,712	26/3,395*	6/4,954

Table 2. Number of TUNEL-positive cells on total cell count in different regions analyzed at 72 h post-MI. *p < 0.05 for the MI group versus the 3 other groups.

Figure 1

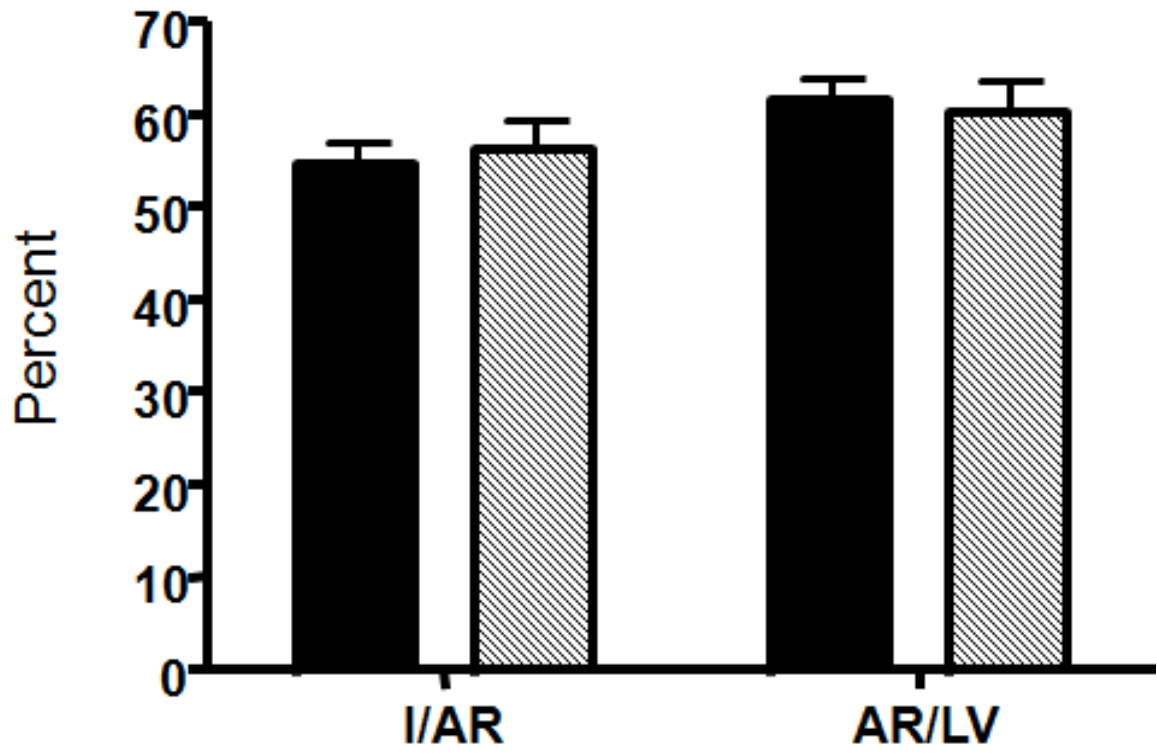


Figure 2

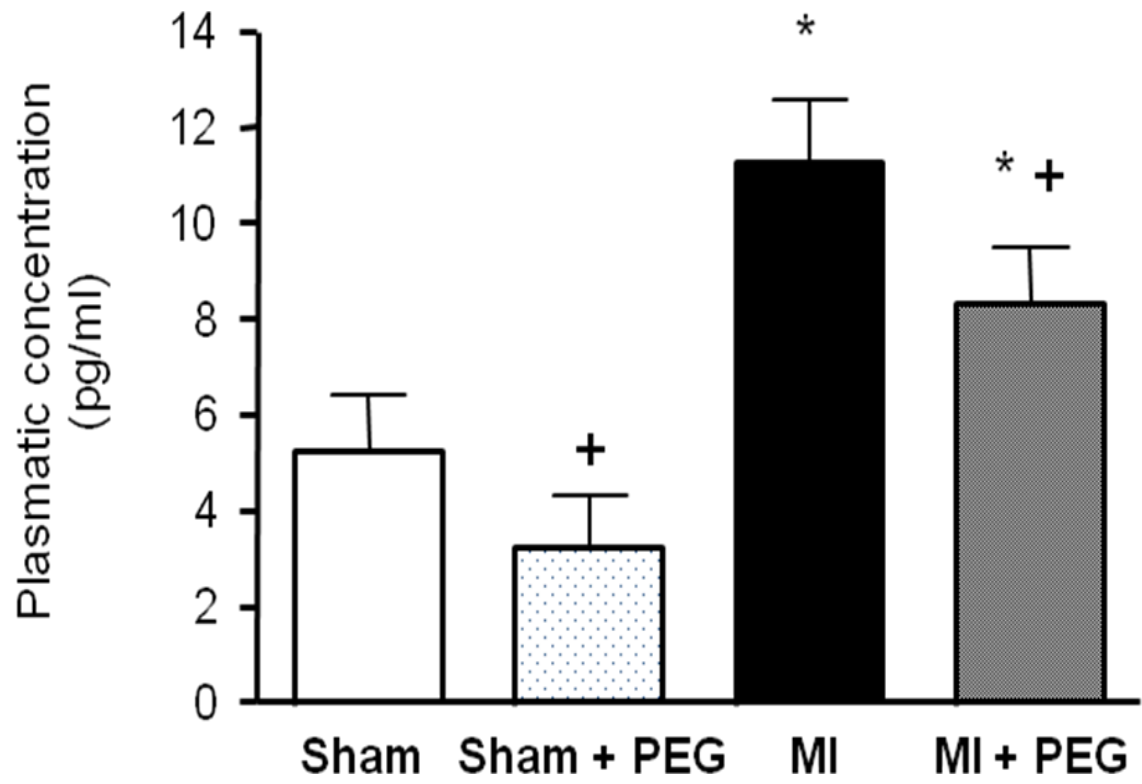


Figure 3

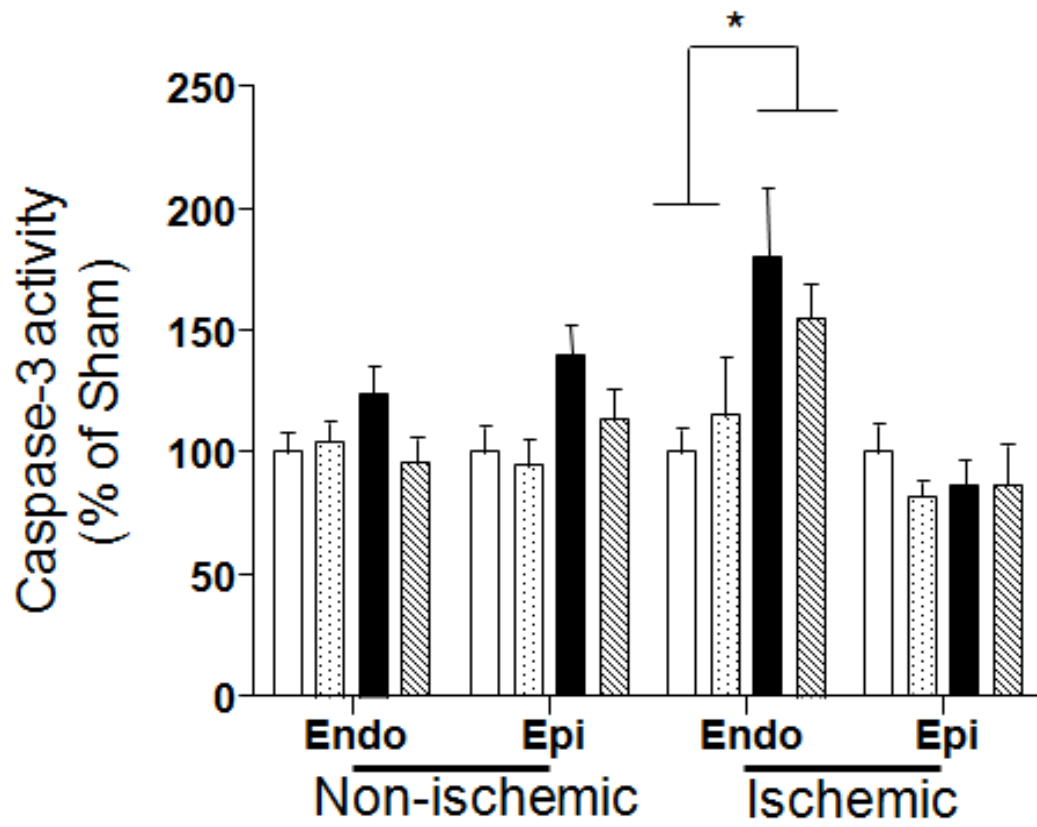


Figure 4

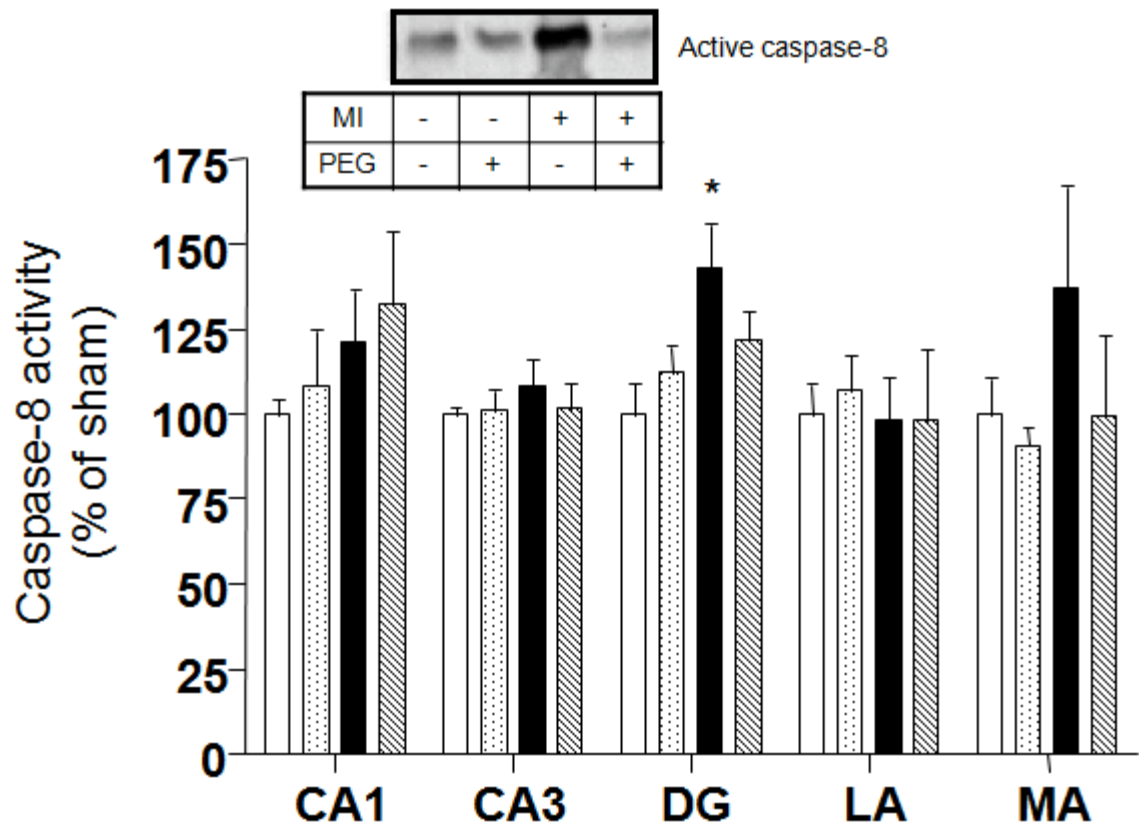


Figure 5

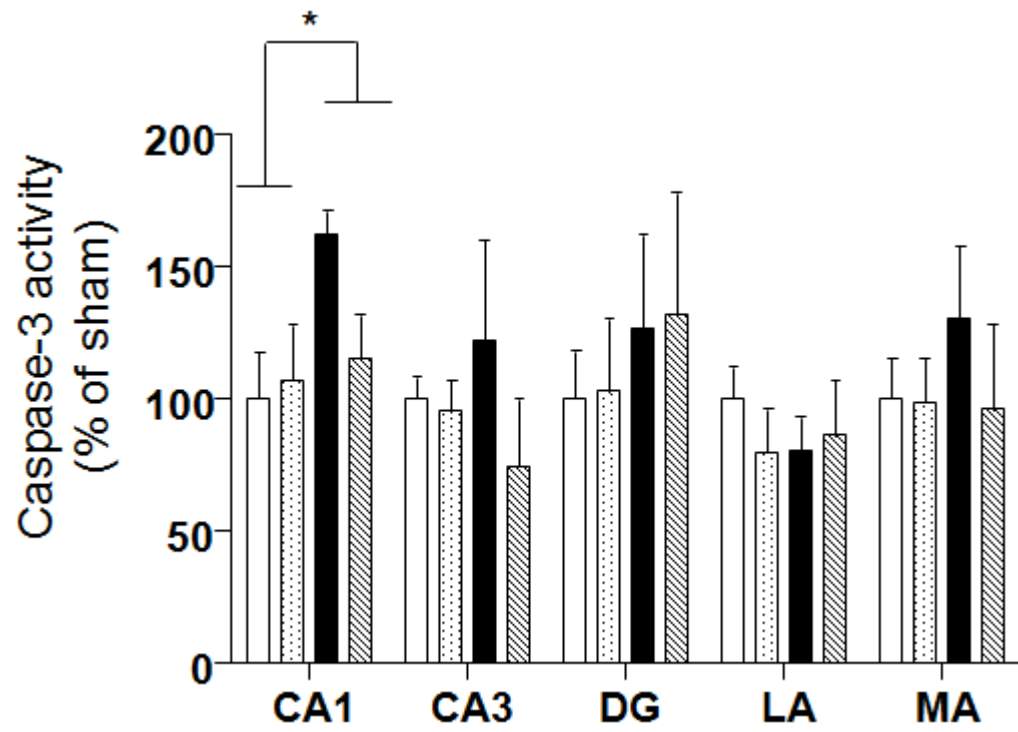


Figure 6

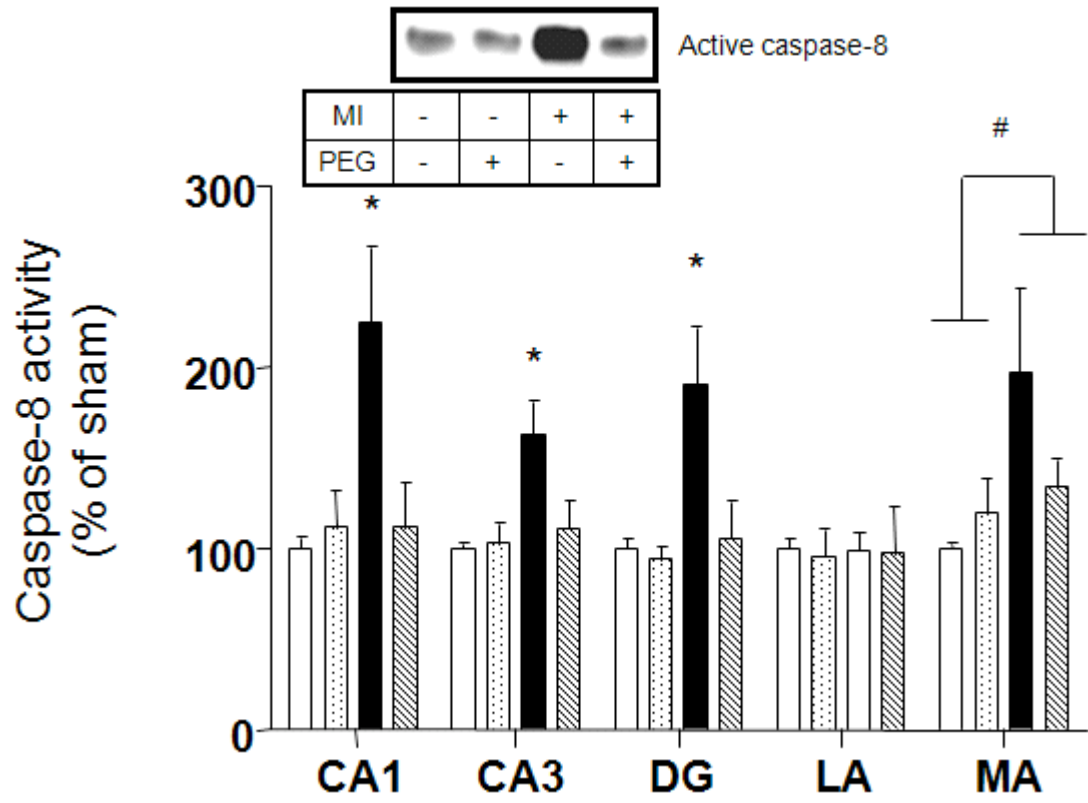


Figure 7

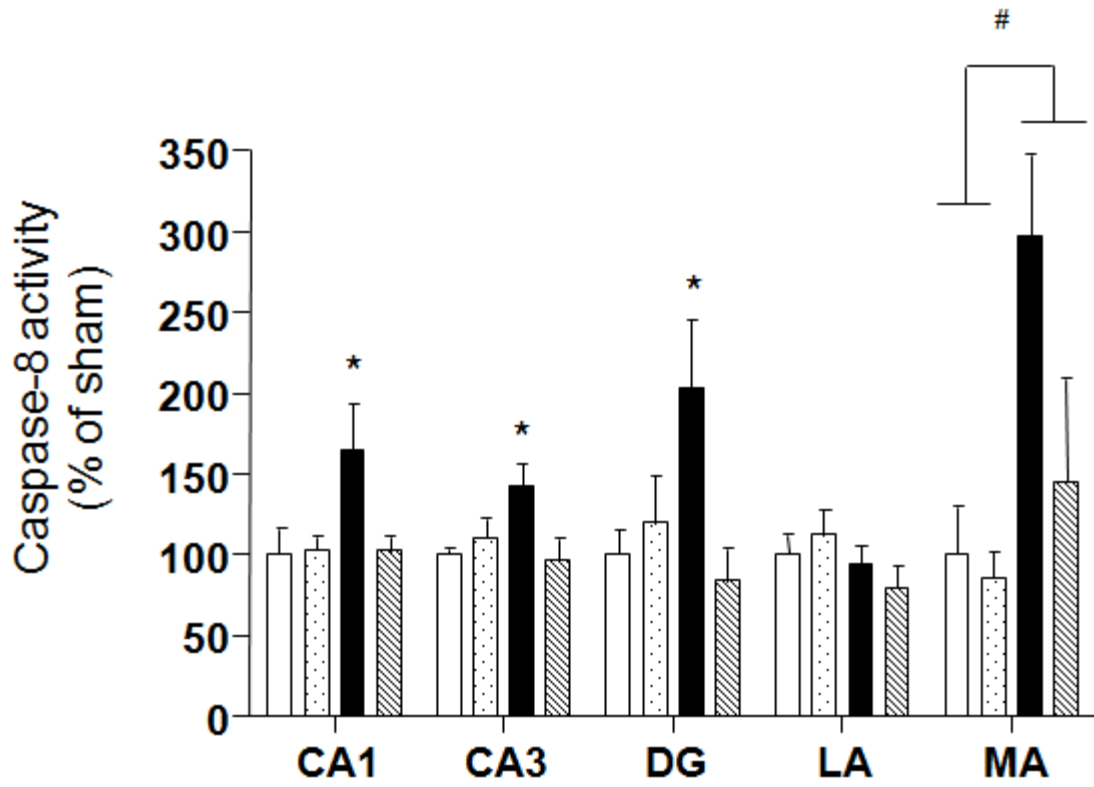
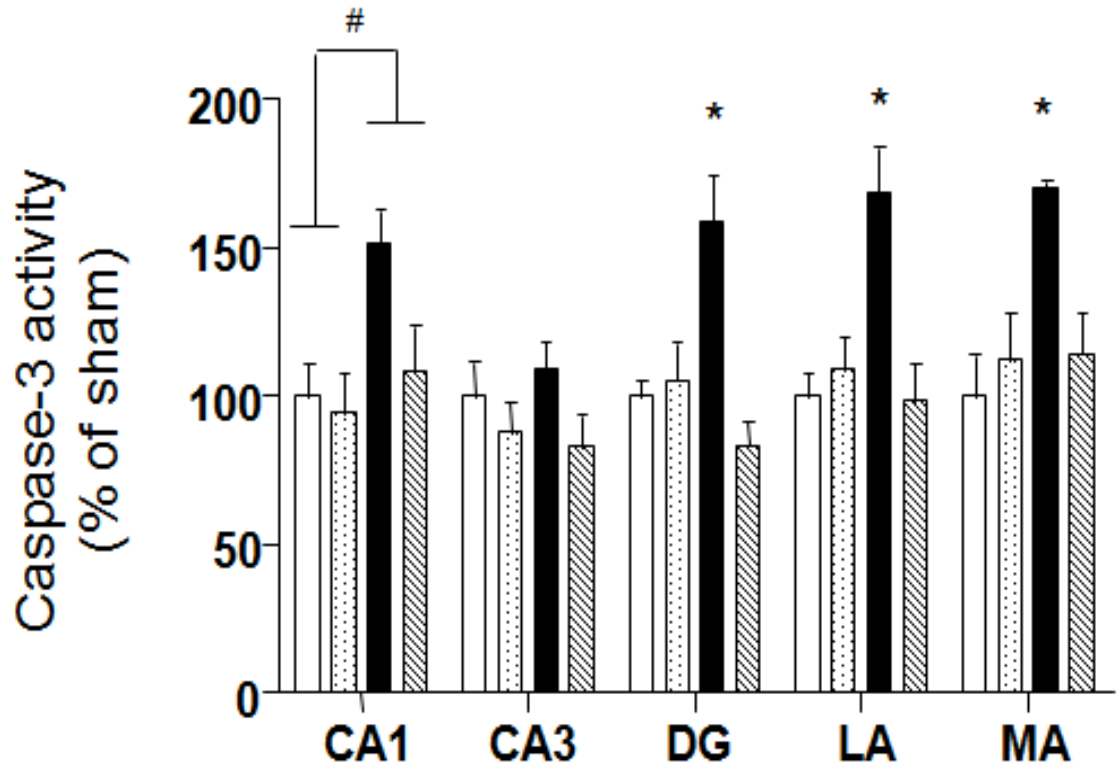


Figure 8



12 Chapitre 12 : Discussion

12.1 Modèle expérimental

Afin d'étudier l'une des conséquences importantes de l'infarctus du myocarde, soit la dépression post-infarctus, nous avons développé un modèle expérimental chez le rat. Notre choix s'est arrêté sur cet animal pour diverses raisons. Premièrement, nous devions avoir un animal sur lequel il était possible de provoquer un infarctus. Deuxièmement, nous devions pouvoir isoler les différentes régions du cerveau en quantité suffisante et troisièmement parce que, pour évaluer la dépression, nous devions disposer d'un animal pour lequel des tests de comportement bien documentés pouvaient être utilisés. Bien que le rat constitue un modèle fortement documenté sous de nombreux aspects, il est important d'être conscient des limites de ce modèle animal en cas d'extrapolation de nos résultats à la physiopathologie humaine. Cependant, au regard de la difficulté à conduire ce type de recherche chez l'Homme nous pensons que ce modèle animal offre de belles opportunités de recherche fondamentale.

Dans ce modèle, Wann et coll. ont observé la présence d'apoptose au niveau du système limbique après 72 heures de reperfusion (Wann, Boucher et al. 2006) et des comportements apparentés à la dépression après 15 jours de reperfusion (Wann, Bah et al. 2007). Ces comportements de type dépressif avaient été renversés par l'administration de sertraline. Cet antidépresseur a renversé l'apoptose dans le système limbique à 72 heures postreperfusion, suggérant que cette mort cellulaire pourrait avoir un lien avec le développement des comportements dépressifs.

D'autres études réalisées avec ce modèle ont démontré que le processus apoptotique observé dans l'amygdale après 72 heures de reperfusion est renversé par l'administration de pentoxifylline (un inhibiteur de la synthèse des cytokines), ce qui soulève la mise en cause de l'inflammation et des cytokines pro-inflammatoires dans ce processus (Wann, Boucher et al. 2006). Ce modèle expérimental est très intéressant, car il permet l'étude de l'interrelation entre les systèmes nerveux et cardiovasculaire. Les travaux de cette thèse ont donc été conduits sur la base de ce modèle.

Lors de cette thèse, nous avons poursuivi la caractérisation de ce modèle de dépression post-infarctus d'un point de vue biochimique. De ce travail, trois articles ont vu le jour. Le premier travail nous a permis de montrer que l'apoptose observée au niveau du système limbique était un processus dynamique, structure dépendant et indépendant du BDNF (Kaloustian, Wann et al. 2008). Le deuxième article nous a permis de démontrer l'implication de la réaction inflammatoire, plus particulièrement de la COX-2, dans le phénomène apoptotique au niveau de l'amygdale (Wann, Bah et al. 2007). Enfin, le troisième article nous a permis, dans la continuité du travail sur la pentoxyfiline (Wann, Boucher et al. 2006), de démontrer l'implication du TNF- α dans le processus de mort cellulaire et également de révéler l'activation des voies intrinsèque et extrinsèque dans le système limbique à la suite d'un infarctus du myocarde.

Cependant, nous n'avons pas été en mesure de déterminer spécifiquement le signal qui déclenche l'apoptose dans le système limbique. En effet, bien que l'infarctus du myocarde soit le signal de départ, nous ne savons pas si l'apoptose est déclenchée par un signal neuronal, hypoxique, systémique ou tout à la fois. Au terme de ce travail doctoral, il apparaît que de plus amples travaux seront nécessaires afin de pouvoir répondre à cette question.

Enfin, malgré le fait que nous ayons clairement établi, dans ce modèle, la présence de cellules apoptotiques dans le système limbique consécutivement à l'infarctus du myocarde, nous ne savons toujours pas si elles jouent un rôle dans la dépression post-infarctus. En effet, tant que des études démontrant que l'inhibition ou l'activation de l'apoptose influence les comportements, il sera difficile de la relier à la dépression post-infarctus.

12.2 Distribution spatiale et temporelle

En accord avec les travaux de Wann et coll (Wann, Bah et al. 2009), l'apoptose a été observée dans certaines structures du système limbique, plus précisément dans le CA1

et le gyrus dentelé, après 15 minutes de reperfusion ; dans l'amygdale médiane (AM) après 1 jour de reperfusion ; dans le CA1 et l'amygdale latérale (AL) après 2 jours de reperfusion ; dans l'AM, l'AL, le CA1 et le gyrus dentelé (GD) après 3 jours de reperfusion et enfin dans le cortex frontal après 7 jours. Ainsi, ces travaux nous apportent une carte plus complète de la distribution de l'apoptose et de sa dynamique, et ce, au cours de la première semaine suivant un infarctus du myocarde.

Bien que les jours 4, 5 et 6 de reperfusion n'aient pas été analysés, il apparaît que le troisième jour de reperfusion est la fenêtre temporelle où le processus apoptotique atteint son apogée. De plus, au septième jour de reperfusion il ne reste qu'une seule région (cortex frontal) qui présente des caractéristiques apoptotiques et aucune région au quatorzième jour (Wann, Bah et al. 2007). D'après ces résultats, l'étude de l'apoptose devrait se concentrer plus particulièrement sur la première semaine suivant le début de la reperfusion.

De ces travaux, il est intéressant de souligner, à propos de la survenue de ce phénomène apoptotique, qu'il est rapidement mis en place dès les premières minutes qui suivent le début de la reperfusion dans l'hippocampe et qu'il est suivi de près par l'amygdale.

L'apoptose au niveau de l'hippocampe et de l'amygdale concorde avec la diminution de volume de ces structures observée chez certains patients dépressifs (Sheline, Gado et al. 1998). Toutefois, ceci reste de la spéculation à ce moment-ci, car il n'existe aucune étude qui démontre directement l'implication de l'apoptose dans la réduction du volume de ces structures. Afin d'établir cette relation, il faudrait intervenir par le biais d'agents pharmacologiques ou d'autres techniques pour inhiber l'apoptose et ainsi, voir son effet sur le volume de ces structures. Ou encore, induire l'apoptose, sans infarctus du myocarde, pour déterminer son effet sur le volume.

Selon nos résultats, l'hippocampe est la première structure à présenter des signes d'apoptose après un infarctus du myocarde et plus particulièrement dans deux régions distinctes, soit le CA1 et le gyrus dentelé. En accord avec les données observées dans la

littérature, la présence d'apoptose dans le CA1 peut s'expliquer par sa sensibilité à l'hypoxie. En effet, selon les données de notre laboratoire, nous savons que la présence d'un infarctus du myocarde induit une baisse significative de la perfusion cérébrale, baisse qui a été documentée à l'aide de microsphères radioactives. Toutefois, ces résultats ne sont pas publiés, car il reste quelques expériences à compléter afin de finaliser l'ensemble.

Il est intéressant de constater que le gyrus dentelé présente également une apoptose précoce et que celle-ci, semble être dépendante de la voie extrinsèque et plus particulièrement du $TNF\alpha$. On peut émettre l'hypothèse que cette région présente une plus grande affinité pour cette cytokine, que le nombre de récepteurs est plus élevé dans cette région ou que la transmission du signal induit par le $TNF\alpha$ soit plus efficace dans cette région. Ceci reste toutefois à confirmer. Avec ce troisième travail nous avons été en mesure de démontrer l'activation des voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose. Toutefois, nous ne savons pas leur degré d'implication respectif. Par exemple, si l'apoptose déclenchée par l'hypoxie est le signal de départ, l'utilisation d'inhibiteurs de la caspase-8 serait inadéquate alors que des inhibiteurs de la caspase-9 ou -3 seraient plus efficaces au début du processus.

Pour la région de l'amygdale, il est intéressant de noter que ce processus apoptotique, dans les 48 premières heures, se déplace de sa zone médiane à sa zone latérale, pour enfin être présent dans les deux régions après trois jours de reperfusion, ce qui représente bien le caractère dynamique de l'apoptose dans le cadre de notre modèle.

Afin de proposer une explication à cette observation, il faut souligner que le noyau central (AM) du complexe amygdaloïde centromédian envoie des projections sur le noyau du faisceau solitaire (NFS), site médullaire de la première synapse pour les fibres afférentes provenant des barorécepteurs, des chémorécepteurs et du cœur. De plus, la dysfonction du groupe nucléaire centromédian (AM) perturberait les fonctions cardiovasculaires (Ter Horst 1999). Cette relation directe entre le cœur l'AM pourrait expliquer la rapidité sélective avec laquelle l'apoptose s'observe dans cette sous-région à 24 heures, comparativement à l'AL à 48 heures. Enfin, la diminution de l'apoptose dans cette sous-région (AM) au jour 2 et sa

réapparition au jour 3, restent à ce jour inexplicables, mais nous laisse penser que certains facteurs prennent la relève pour induire une seconde vague d'apoptose dans ces régions. Egalement, concernant cette observation, il est envisageable que les limites liées à l'observation et la mesure de l'apoptose *in vivo* (soulevées section 4.4) participent à cette observation. En effet, d'un point de vue technique, l'observation des cellules apoptotiques dans les sections de tissulaires est très rare des études ont montré que la mort cellulaire était détectable pour uniquement 72 heures (Hu, Yuri et al. 1997). Donc la chance de détecter l'apoptose dans une fine section de tissu tirée d'un model chronique est très faible. D'autre part, les caractéristiques propres à l'apoptose font que les cellules traversent différentes étapes menant à la mort cellulaire. Donc, dans un même tissu, toutes les cellules ne subissent pas l'apoptose au même moment. Les résultats obtenus lors de l'étude de l'apoptose ne représentent, donc, qu'une situation à un moment donné dans une section de tissu. D'autres travaux seront donc nécessaires afin de mieux comprendre ces observations réalisées au niveau de l'amygdale.

Il est fort probable que ce mécanisme, de type vague apoptotique, soit sujet à de multiples forces de régulation. En ce sens, nous avons investigué la présence du facteur neurotrophique BDNF dans les différentes structures cérébrales consécutivement à l'infarctus du myocarde. De manière surprenante, le mécanisme apoptotique semble indépendant de ce facteur. Bien que ce dernier soit impliqué dans de nombreuses voies de signalisation (Tapia-Arancibia, Rage et al. 2004) dont celle de l'apoptose, l'étude du facteur neurotrophique BDNF dans différentes régions cérébrales a montré que ses niveaux tissulaires prenaient 48 heures à se modifier et que ces modifications étaient indépendantes des marqueurs de l'apoptose (caspase 3, TUNEL) utilisés. Pourtant, de hautes concentrations de BDNF ont été rapportées chez les patients dépressifs, particulièrement dans l'hippocampe (Chen, Dowlathshahi et al. 2001). Le BDNF est également connu pour promouvoir la survie cellulaire en activant les protéines de signalisation cellulaire de type Akt et MAPK (Tapia-Arancibia, Rage et al. 2004). Les résultats observés ici suggèrent que

le BDNF aurait un effet limité dans les premiers jours de reperfusion. Cependant, d'autres études seront nécessaires afin de déterminer son implication à plus long terme.

Bien que l'étude des mécanismes *in vivo* est complexe et plus particulièrement lorsque plusieurs systèmes et organes sont impliqués, il aurait été intéressant d'étudier les niveaux de cortisol sur notre modèle, ainsi que le système de l'axe HPA de manière générale afin de vérifier cette voie dans notre modèle (Pepin, Govindan et al. 1992). En effet, il aurait été intéressant de déterminer le rôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire (HPA) dans la présence d'apoptose. L'axe HPA comprend de nombreuses hormones impliquées dans la réponse au stress. Ces hormones incluent la CRH (*corticotropin releasing hormone*) produite par l'hypothalamus, l'ACTH (*adrenocorticotropic hormone*) produite par le lobe antérieur de l'hypophyse et le cortisol (corticostérone chez le rat), un glucocorticoïde périphérique sécrété par le cortex de la glande surrénale.

Sous des conditions physiologiques normales, la sécrétion de glucocorticoïdes (GC) est maintenue par la sécrétion au niveau de l'hypothalamus, du peptide CRH, qui à son tour stimule la sécrétion d'ACTH et ultimement de corticostéroïde. À moins de dépasser un certain niveau seuil, le rétrocontrôle des corticostéroïdes sur le cerveau et l'hypophyse restreint le signal de production au niveau de la glande surrénale. Ce rétrocontrôle s'effectue via deux récepteurs nucléaires : le récepteur des minéralocorticoïdes (RM) de haute affinité et le récepteur des glucocorticoïdes (RG) de basse affinité.

Il apparaît que les MR sont occupés dans des conditions où règnent de bas niveaux (basaux) de GC, alors que les RG seraient activés avec l'augmentation de la concentration de GC, par exemple après un stress (Abraham, Meerlo et al. 2006). RM et RG activent apparemment différents gènes et entraînent différentes actions, pouvant parfois être opposées (Herr, Gassler et al. 2007). En effet, des études ont révélé que l'activation des RG serait impliquée dans la mort neuronale par apoptose (voies intrinsèque et extrinsèque) observée au niveau de cellules de l'hippocampe, alors que la stimulation des RM est responsable d'une signalisation de survie cellulaire (Crochemore, Lu et al. 2005). En effet,

les RM abolissent l'action neurodégénérative du dexaméthasone (agoniste des RG). Les RM présentent donc une fonction neuroprotectrice.

La réduction de la corticostérone produite par une ablation de la glande surrénale, induit de l'apoptose au niveau du gyrus dentelé de l'hippocampe (Andres, Cardenas et al. 2006). De manière intéressante, chez des rats dont la glande surrénale a été retirée, un remplacement in vivo de corticostérone à des niveaux qui activent les RM, a inhibé l'apoptose consécutive à cette ablation (Krugers, van der Linden et al. 2007). À l'opposé, le dexaméthasone, un agoniste des RG, stimule la mort cellulaire par apoptose au niveau des neurones. Enfin, la mort cellulaire était inhibée par l'aldostérone (ALDO), un agoniste des RM (Crochemore, Lu et al. 2005).

L'axe HPA a été étudié de manière intensive dans la dépression, où son hyperactivité est l'un des éléments neurobiologiques les mieux confirmés parmi les patients psychiatriques (Holsboer 2000). Tous les témoins de cette hyperactivité de l'axe HPA tendent à se stabiliser lors du succès des traitements antidépressifs. Cependant, il devrait être noté que, parmi la population, il existe un très grand degré de variation dans l'hyperactivation de l'axe HPA (Raadsheer, van Heerikhuizen et al. 1995). En effet, bien que souvent observée, cette hyperactivité de l'axe HPA ne se retrouve pas dans l'intégralité de la population dépressive, mais une dans une portion de patients seulement.

La cortisolémie, retrouvée élevée chez les patients avec infarctus du myocarde (IM), peut servir de marqueur de mortalité cardiaque (Nito, Waspadji et al. 2004). De manière intéressante, dès les premiers jours suivant l'IM, des symptômes dépressifs sont observés chez 65 % de ces patients (Frasure-Smith, Lesperance et al. 2000; Guck, Kavan et al. 2001). L'existence de cette corrélation, chez les patients avec IM, entre la cortisolémie, l'apoptose dans le système limbique et le développement de la dépression, est à ce jour inconnue, mais il semble possible d'émettre l'hypothèse que cette présence d'apoptose dans le système limbique soit due, en partie, à l'élévation de la corticostérone. D'autres travaux seront donc nécessaires afin de pouvoir répondre complètement à cette question.

13 Conclusion

Dans le contexte de la pathologie clinique de la dépression post-infarctus et à l'aide de ce modèle chez le rat, nous avons caractérisé de manière plus précise le phénomène apoptotique observé dans le système limbique du rat suite à un infarctus du myocarde

Nous avons établi que ce processus est dynamique, qu'il varie d'une structure à l'autre et que le BDNF n'a que peu d'effet sur ce phénomène durant la première semaine suivant le début de la reperfusion. Cette relation cœur/cerveau implique également, comme agent de communication, les cytokines pro-inflammatoires périphériques de type TNF- α ainsi que la COX-2 au niveau central. Enfin, les voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose sont impliquées dans ce processus.

Ces résultats laissent ouvertes de nombreuses possibilités d'investigation qui pourraient compléter ce qui n'a pas pu être réalisé dans ce travail doctoral : 1) établir de manière plus spécifique le lien entre l'apoptose au niveau du système limbique et les comportements proches de ceux observés dans la pathologie dépressive; 2) Déterminer le phénotype de la population cellulaire subissant cette apoptose au niveau du système limbique; 3) Etudier l'activité de l'enzyme IDO (indoleamine 2, 3-dioxygénase) impliquée dans le métabolisme du tryptophane (précurseur du sérotonine).

Ces nouveaux éléments permettront une meilleure connaissance de la physiopathologie de la dépression post-infarctus et d'envisager des stratégies thérapeutiques complémentaires et différentes des antidépresseurs.

14 Bibliographie

- Abbate, A., F. Limana, et al. (2006). "Cyclo-oxygenase-2 (COX-2) inhibition reduces apoptosis in acute myocardial infarction." Apoptosis **11**: 1061-1063.
- Abraham, I. M., P. Meerlo, et al. (2006). "Concentration dependent actions of glucocorticoids on neuronal viability and survival." Dose Response **4**(1): 38-54.
- Acton, R. D., P. S. Dahlberg, et al. (1996). "Differential sensitivity to Escherichia coli infection in mice lacking tumor necrosis factor p55 or interleukin-1 p80 receptors." Archives of Surgery **131**(11): 1216-21.
- Adams, J. M. and S. Cory (1998). "The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival." Science **281**(5381): 1322-6.
- Adolphs, R., D. Tranel, et al. (1998). "The human amygdala in social judgment." Nature **393**(6684): 470-4.
- Afifi, A. K., Bergman, R.A (1998). Hypothalamus. Functional neuroanatomy: text and atlas.
- Aggleton, J. P. (1986). "A description of the amygdalo-hippocampal interconnections in the macaque monkey." Experimental Brain Research **64**(3): 515-26.
- Aggleton, J. P. and M. Mishkin (1984). "Projections of the amygdala to the thalamus in the cynomolgus monkey." J Comp Neurol **222**(1): 56-68.
- Alcindor, D., J. G. Krolkowski, et al. (2004). "Cyclooxygenase-2 mediates ischemic, anesthetic, and pharmacologic preconditioning in vivo." Anesthesiology **100**(3): 547-54.
- Aloe, L. (2004). "Rita Levi-Montalcini: the discovery of nerve growth factor and modern neurobiology." Trends in Cell Biology **14**(7): 395-9.
- Amaral, D. G. (1986). "Amygdalohippocampal and amygdalocortical projections in the primate brain." Advances in Experimental Medicine and Biology **203**: 3-17.
- Amaral, D. G. and W. M. Cowan (1980). "Subcortical afferents to the hippocampal formation in the monkey." J Comp Neurol **189**(4): 573-91.
- Amaral, D. G. and R. Insausti (1992). "Retrograde transport of D-[3H]-aspartate injected into the monkey amygdaloid complex." Experimental Brain Research **88**(2): 375-88.
- Amaral, D. G. and J. L. Price (1984). "Amygdalo-cortical projections in the monkey (Macaca fascicularis)." J Comp Neurol **230**(4): 465-96.

- Amaral, D. G., R. B. Veazey, et al. (1982). "Some observations on hypothalamo-amygdaloid connections in the monkey." Brain Res **252**(1): 13-27.
- Amaral, D. G. and M. P. Witter (1989). "The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data." Neuroscience **31**(3): 571-91.
- Anand, A., Y. Li, et al. (2005). "Activity and connectivity of brain mood regulating circuit in depression: a functional magnetic resonance study." Biol Psychiatry **57**(10): 1079-88.
- Andersen, P., T. V. Bliss, et al. (1971). "Unit analysis of hippocampal population spikes." Exp Brain Res **13**(2): 208-21.
- Andres, S., S. Cardenas, et al. (2006). "Effects of long-term adrenalectomy on apoptosis and neuroprotection in the rat hippocampus." Endocrine **29**(2): 299-307.
- Antman, E. and E. Braunwald (2001). Acute myocardial infarction. Heart Disease: A textbook of cardiovascular medicine. W. B. S. Company. Philadelphia.
- Appels, A. and P. Mulder (1989). "Fatigue and heart disease. The association between 'vital exhaustion' and past, present and future coronary heart disease." J Psychosom Res **33**(6): 727-38.
- Ardehali, A. and T. A. Ports (1990). "Myocardial oxygen supply and demand." Chest **98**(3): 699-705.
- Arnaud, C., M. Joyeux-Faure, et al. (2003). "COX-2: an in vivo evidence of its participation in heat stress-induced myocardial preconditioning." Cardiovasc Res **58**(3): 582-8.
- Arzt, E. S., S. Fernandez-Castelo, et al. (1988). "Immunomodulation by indoleamines: serotonin and melatonin action on DNA and interferon-gamma synthesis by human peripheral blood mononuclear cells." Journal of Clinical Immunology **8**(6): 513-20.
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1998). "Death receptors: signaling and modulation." Science **281**(5381): 1305-8.
- Bachelor, M. A., S. J. Cooper, et al. (2005). "Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase decreases UVB-induced activator protein-1 and cyclooxygenase-2 in a SKH-1 hairless mouse model." Mol Cancer Res **3**(2): 90-9.

- Banks, W. A., A. J. Kastin, et al. (1989). "Bidirectional transport of interleukin-1 alpha across the blood-brain barrier." Brain Research Bulletin **23**(6): 433-7.
- Banks, W. A., L. Ortiz, et al. (1991). "Human interleukin (IL) 1 alpha, murine IL-1 alpha and murine IL-1 beta are transported from blood to brain in the mouse by a shared saturable mechanism." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **259**(3): 988-96.
- Barbas, H. and J. De Olmos (1990). "Projections from the amygdala to basoventral and mediodorsal prefrontal regions in the rhesus monkey." J Comp Neurol **300**(4): 549-71.
- Barde, Y. A. (1990). "The nerve growth factor family." Prog Growth Factor Res **2**(4): 237-48.
- Barden, N. (1996). "Modulation of glucocorticoid receptor gene expression by antidepressant drugs." Pharmacopsychiatry **29**(1): 12-22.
- Barden, N. (2004). "Implication of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the physiopathology of depression." J Psychiatry Neurosci **29**(3): 185-93.
- Bayliss, W. M. (1902). "On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure." J Physiol **28**(3): 220-31.
- Beard, T., D. Carrie, et al. (1994). "[Production of oxygen free radicals in myocardial infarction treated by thrombolysis. Analysis of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and malondialdehyde]." Arch Mal Coeur Vaiss **87**(10): 1289-96.
- Bednar, M., B. Smith, et al. (1985). "Neutrophil depletion suppresses ¹¹¹In-labeled platelet accumulation in infarcted myocardium." J Cardiovasc Pharmacol **7**(5): 906-12.
- Beer, M., G. A. Kennett, et al. (1990). "A single dose of 8-OH-DPAT reduces raphe binding of [³H]8-OH-DPAT and increases the effect of raphe stimulation on 5-HT metabolism." European Journal of Pharmacology **178**(2): 179-87.
- Benbernou, N., S. Esnault, et al. (1997). "Differential regulation of IFN-gamma, IL-10 and inducible nitric oxide synthase in human T cells by cyclic AMP-dependent signal transduction pathway." Immunology **91**(3): 361-8.
- Beniamini, Y., J. J. Rubenstein, et al. (1997). "Effects of high-intensity strength training on quality-of-life parameters in cardiac rehabilitation patients." Am J Cardiol **80**(7): 841-6.

- Bennett, M., K. Macdonald, et al. (1998). "Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis." Science **282**(5387): 290-3.
- Bernardi, P., A. Krauskopf, et al. (2006). "The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target." FEBS J **273**(10): 2077-99.
- Berne, R. M. (1980). "The role of adenosine in the regulation of coronary blood flow." Circ Res **47**(6): 807-13.
- Besedovsky, H., A. del Rey, et al. (1986). "Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones." Science **233**(4764): 652-4.
- Beutler, B. A. (1999). "The role of tumor necrosis factor in health and disease." Journal of Rheumatology. Supplement **57**: 16-21.
- Beyaert, R. and W. Fiers (1994). "Molecular mechanisms of tumor necrosis factor-induced cytotoxicity. What we do understand and what we do not." FEBS Letters **340**(1-2): 9-16.
- Beyar, R. and S. Sideman (1986). "Left ventricular mechanics related to the local distribution of oxygen demand throughout the wall." Circ Res **58**(5): 664-77.
- Biggs, W. H., 3rd, J. Meisenhelder, et al. (1999). "Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(13): 7421-6.
- Blatteis, C. M. and E. Sehic (1997). "Circulating pyrogen signaling of the brain. A new working hypothesis." Ann N Y Acad Sci **813**: 445-7.
- Blier, P. (2003). "The pharmacology of putative early-onset antidepressant strategies." European Neuropsychopharmacology **13**(2): 57-66.
- Blier, P. and C. de Montigny (1994). "Current advances and trends in the treatment of depression." Trends in Pharmacological Sciences **15**(7): 220-6.
- Bolli, R. (1990). "Mechanism of myocardial "stunning"." Circulation **82**(3): 723-38.
- Bolli, R. (1992). Postischemic Myocardial "Stunning". Myocardial Protection: The pathophysiology of reperfusion and reperfusion injury. R. B. Jennings and D. M. Yellon. New York, Raven Press: 105.
- Bolli, R. and E. Marban (1999). "Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning." Physiol Rev **79**(2): 609-34.

- Borutaite, V., A. Jekabsone, et al. (2003). "Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents mitochondrial dysfunction, cytochrome c release and apoptosis induced by heart ischemia." J Mol Cell Cardiol **35**(4): 357-66.
- Bottomley, M. J., K. Salim, et al. (1998). "Phospholipid-binding protein domains." Biochim Biophys Acta **1436**(1-2): 165-83.
- Boucher, M., S. Pesant, et al. (2004). "Post-ischemic cardioprotection by A2A adenosine receptors: dependent of phosphatidylinositol 3-kinase pathway." J Cardiovasc Pharmacol **43**(3): 416-22.
- Boucher, M., B. P. Wann, et al. (2006). "Reduction of apoptosis in the amygdala by an A2A adenosine receptor agonist following myocardial infarction." Apoptosis **11**(7): 1067-74.
- Boucher, M., B. P. Wann, et al. (2005). "Sustained cardioprotection afforded by A2A adenosine receptor stimulation after 72 hours of myocardial reperfusion." J Cardiovasc Pharmacol **45**(5): 439-46.
- Bowen-Pope, D. F. and F. J. Schaub (2001). "Apoptosis of smooth muscle cells is not silent: Fas/FADD initiates a program of inflammatory gene expression." Trends in Cardiovascular Medicine **11**(1): 42-5.
- Brazil, D. P., Z. Z. Yang, et al. (2004). "Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts." Trends in Biochemical Sciences **29**(5): 233-42.
- Breder, C. D., D. Dewitt, et al. (1995). "Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain." J Comp Neurol **355**(2): 296-315.
- Breder, C. D., C. A. Dinarello, et al. (1988). "Interleukin-1 immunoreactive innervation of the human hypothalamus." Science **240**(4850): 321-4.
- Bresalier, R. S., R. S. Sandler, et al. (2005). "Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial." New England Journal of Medicine **352**(11): 1092-102.
- Broker, L. E., F. A. Kruyt, et al. (2005). "Cell death independent of caspases: a review." Clin Cancer Res **11**(9): 3155-62.
- Brooks, P. M. and R. O. Day (2000). "COX-2 inhibitors." Medical Journal of Australia **173**(8): 433-6.

- Bruce, M. L., T. E. Seeman, et al. (1994). "The impact of depressive symptomatology on physical disability: MacArthur Studies of Successful Aging." Am J Public Health **84**(11): 1796-9.
- Buja, L. M. (1998). "Modulation of the myocardial response to ischemia." Lab Invest **78**(11): 1345-73.
- Burlacu, A. (2003). "Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins." J Cell Mol Med **7**(3): 249-57.
- Burleigh, M. E., V. R. Babaev, et al. (2005). "Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in ApoE-deficient and C57BL/6 mice." J Mol Cell Cardiol **39**(3): 443-52.
- Bush, D. E., R. C. Ziegelstein, et al. (2005). "Post-myocardial infarction depression." Evid Rep Technol Assess (Summ)(123): 1-8.
- Cairncross, K. D., B. Cox, et al. (1979). "Olfactory projection systems, drugs and behaviour: a review." Psychoneuroendocrinology **4**(3): 253-72.
- Cannon, W. B. (1987). "The James-Lange theory of emotions: a critical examination and an alternative theory. By Walter B. Cannon, 1927." Am J Psychol **100**(3-4): 567-86.
- Cao, C., K. Matsumura, et al. (1996). "Endothelial cells of the rat brain vasculature express cyclooxygenase-2 mRNA in response to systemic interleukin-1 beta: a possible site of prostaglandin synthesis responsible for fever." Brain Res **733**(2): 263-72.
- Capuron, L., C. L. Raison, et al. (2003). "Association of exaggerated HPA axis response to the initial injection of interferon-alpha with development of depression during interferon-alpha therapy." Am J Psychiatry **160**(7): 1342-5.
- Carmichael, S. T. and J. L. Price (1995). "Limbic connections of the orbital and medial prefrontal cortex in macaque monkeys." J Comp Neurol **363**(4): 615-641.
- Carney, R. M., K. E. Freedland, et al. (2005). "Depression, the autonomic nervous system, and coronary heart disease." Psychosom Med **67 Suppl 1**: S29-33.
- Carroll, B. J., G. C. Curtis, et al. (1976). "Neuroendocrine regulation in depression. II. Discrimination of depressed from nondepressed patients." Arch Gen Psychiatry **33**(9): 1051-8.
- Carswell, E. A., L. J. Old, et al. (1975). "An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(9): 3666-70.

- Castren, E., H. Thoenen, et al. (1995). "Brain-derived neurotrophic factor messenger RNA is expressed in the septum, hypothalamus and in adrenergic brain stem nuclei of adult rat brain and is increased by osmotic stimulation in the paraventricular nucleus." Neuroscience **64**(1): 71-80.
- Castren, E., V. Voikar, et al. (2007). "Role of neurotrophic factors in depression." Curr Opin Pharmacol **7**(1): 18-21.
- Cecconi, F., G. Alvarez-Bolado, et al. (1998). "Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development." Cell **94**(6): 727-37.
- Cerrito, F., M. P. Lazzaro, et al. (1993). "5HT₂-receptors and serotonin release: their role in human platelet aggregation." Life Sci **53**(3): 209-15.
- Chao, M. V. (2003). "Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways." Nat Rev Neurosci **4**(4): 299-309.
- Charlat, M. I., P. G. O'Neill, et al. (1987). "Evidence for a pathogenetic role of xanthine oxidase in the "stunned" myocardium." Am J Physiol **252**(3 Pt 2): H566-77.
- Charney, D. S., D. B. Menkes, et al. (1981). "Receptor sensitivity and the mechanism of action of antidepressant treatment. Implications for the etiology and therapy of depression." Arch Gen Psychiatry **38**(10): 1160-80.
- Chattipakorn, N., T. Incharoen, et al. (2007). "Heart rate variability in myocardial infarction and heart failure." Int J Cardiol **120**(3): 289-96.
- Chen, B., D. Dowlatshahi, et al. (2001). "Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication." Biol Psychiatry **50**(4): 260-5.
- Chen, Z. Y., D. Jing, et al. (2006). "Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior." Science **314**(5796): 140-3.
- Chowdhury, I., B. Tharakan, et al. (2006). "Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited." Cell Mol Biol Lett **11**(4): 506-25.
- Christian, T. F., R. S. Schwartz, et al. (1992). "Determinants of infarct size in reperfusion therapy for acute myocardial infarction." Circulation **86**(1): 81-90.
- Chu, K., S. W. Jeong, et al. (2004). "Celecoxib induces functional recovery after intracerebral hemorrhage with reduction of brain edema and perihematomal cell death." J Cereb Blood Flow Metab **24**(8): 926-33.

- Chun, K. S. and Y. J. Surh (2004). "Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention." Biochemical Pharmacology **68**(6): 1089-100.
- Cohen, M. and K. P. Rentrop (1986). "Limitation of myocardial ischemia by collateral circulation during sudden controlled coronary artery occlusion in human subjects: a prospective study." Circulation **74**(3): 469-76.
- Coker, S. J., J. R. Parratt, et al. (1981). "Thromboxane and prostacyclin release from ischaemic myocardium in relation to arrhythmias." Nature **291**(5813): 323-4.
- Collaboration, A. T. (1994). "Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy--I: Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. Antiplatelet Trialists' Collaboration." Bmj **308**(6921): 81-106.
- Collins, H. L. and S. E. DiCarlo (1997). "Daily exercise attenuates the sympathetic component of the arterial baroreflex control of heart rate." Am J Physiol **273**(6 Pt 2): H2613-9.
- Connor, T. J., J. P. Kelly, et al. (1998). "Forced swim test-induced endocrine and immune changes in the rat: effect of subacute desipramine treatment." Pharmacol Biochem Behav **59**(1): 171-7.
- Connor, T. J. and B. E. Leonard (1998). "Depression, stress and immunological activation: the role of cytokines in depressive disorders." Life Sci **62**(7): 583-606.
- Cooper, A. L., M. A. Horan, et al. (1992). "Metabolic and febrile responses to typhoid vaccine in humans: effect of beta-adrenergic blockade." Journal of Applied Physiology **72**(6): 2322-8.
- Coppen, A. and K. Wood (1978). "Tryptophan and depressive illness." Psychological Medicine **8**(1): 49-57.
- Cosi, C., P. E. Spoerri, et al. (1993). "Glucocorticoids depress activity-dependent expression of BDNF mRNA in hippocampal neurones." Neuroreport **4**(5): 527-30.
- Crochemore, C., J. Lu, et al. (2005). "Direct targeting of hippocampal neurons for apoptosis by glucocorticoids is reversible by mineralocorticoid receptor activation." Mol Psychiatry **10**(8): 790-8.

- Czeh, B. and P. J. Lucassen (2007). "What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated?" European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience **257**(5): 250-60.
- Dantzer, R. (1994). "How do cytokines say hello to the brain? Neural versus humoral mediation." European Cytokine Network **5**(3): 271-3.
- Dantzer, R. and K. W. Kelley (2007). "Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior." Brain Behav Immun **21**(2): 153-60.
- Davidson, R. J., D. Pizzagalli, et al. (2002). "Depression: perspectives from affective neuroscience." Annual Review of Psychology **53**: 545-74.
- Davis, M. W., U. Feige, et al. (2000). "Treatment of rheumatoid arthritis with PEGylated recombinant human soluble tumour necrosis factor receptor type I: a clinical update." Ann Rheum Dis **59 Suppl 1**: i41-3.
- Dawn, B., Y. Guo, et al. (2004). "Tumor necrosis factor-alpha does not modulate ischemia/reperfusion injury in naive myocardium but is essential for the development of late preconditioning." J Mol Cell Cardiol **37**(1): 51-61.
- de Beaurepaire, R., Swiergiel, A.H., Dunn, A.J. (2005). Neuroimmune mediators: are cytokines mediators of depression? Biology of Depression. Weinheim. **Vol. 2**.
- de Lorgeril, M., A. Basmadjian, et al. (1990). "Influence of reflow ventricular fibrillation and electrical defibrillation on infarct size in a canine preparation of myocardial infarction." Cardiovasc Res **24**(2): 151-5.
- de Lorgeril, M., G. Rousseau, et al. (1990). "Spatial and temporal profiles of neutrophil accumulation in the reperfused ischemic myocardium." Am J Cardiovasc Pathol **3**(2): 143-54.
- De Simoni, M. G., A. De Luigi, et al. (1993). "Modulation of systemic interleukin-6 induction by central interleukin-1." Am J Physiol **265**(4 Pt 2): R739-42.
- Deisher, T. A., I. Garcia, et al. (1993). "Cytokine-induced adhesion molecule expression on human umbilical vein endothelial cells is not regulated by cyclic adenosine monophosphate accumulation." Life Sci **53**(4): 365-70.
- Del Maestro, R., H. H. Thaw, et al. (1980). "Free radicals as mediators of tissue injury." Acta Physiol Scand Suppl **492**: 43-57.

- Delgado, P. L., H. L. Miller, et al. (1999). "Tryptophan-depletion challenge in depressed patients treated with desipramine or fluoxetine: implications for the role of serotonin in the mechanism of antidepressant action." Biol Psychiatry **46**(2): 212-20.
- Dembic, Z., H. Loetscher, et al. (1990). "Two human TNF receptors have similar extracellular, but distinct intracellular, domain sequences." Cytokine **2**(4): 231-7.
- Desagher, S., A. Osen-Sand, et al. (1999). "Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis." Journal of Cell Biology **144**(5): 891-901.
- Deuchar, G. A., L. H. Opie, et al. (2007). "TNFalpha is required to confer protection in an in vivo model of classical ischaemic preconditioning." Life Sci **80**(18): 1686-91.
- Deussen, A., M. Brand, et al. (2006). "Metabolic coronary flow regulation--current concepts." Basic Res Cardiol **101**(6): 453-64.
- Deveraux, Q. L. and J. C. Reed (1999). "IAP family proteins--suppressors of apoptosis." Genes and Development **13**(3): 239-52.
- Dias, B. G., S. B. Banerjee, et al. (2003). "Differential regulation of brain derived neurotrophic factor transcripts by antidepressant treatments in the adult rat brain." Neuropharmacology **45**(4): 553-63.
- Dickens, C., L. McGowan, et al. (2002). "Depression in rheumatoid arthritis: a systematic review of the literature with meta-analysis." Psychosom Med **64**(1): 52-60.
- Ding, Y. H., M. Mrizek, et al. (2006). "Exercise preconditioning reduces brain damage and inhibits TNF-alpha receptor expression after hypoxia/reoxygenation: an in vivo and in vitro study." Curr Neurovasc Res **3**(4): 263-71.
- Doevendans, P. A., M. J. Daemen, et al. (1998). "Cardiovascular phenotyping in mice." Cardiovasc Res **39**(1): 34-49.
- Downey, J. M. and E. S. Kirk (1974). "Distribution of the coronary blood flow across the canine heart wall during systole." Circ Res **34**(2): 251-7.
- Downey, J. M. and E. S. Kirk (1975). "Inhibition of coronary blood flow by a vascular waterfall mechanism." Circ Res **36**(6): 753-60.

- Drago, S., S. Bergerone, et al. (2007). "Depression in patients with acute myocardial infarction: influence on autonomic nervous system and prognostic role. Results of a five-year follow-up study." Int J Cardiol **115**(1): 46-51.
- Dranovsky, A. and R. Hen (2006). "Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants." Biol Psychiatry **59**(12): 1136-43.
- Drevets, W. C. (1998). "Functional neuroimaging studies of depression: the anatomy of melancholia." Annu Rev Med **49**: 341-61.
- Drevets, W. C. (1999). "Prefrontal cortical-amygdalar metabolism in major depression." Ann N Y Acad Sci **877**: 614-37.
- Drevets, W. C., W. Bogers, et al. (2002). "Functional anatomical correlates of antidepressant drug treatment assessed using PET measures of regional glucose metabolism." Eur Neuropsychopharmacol **12**(6): 527-44.
- Drevets, W. C., T. O. Videen, et al. (1992). "A functional anatomical study of unipolar depression." J Neurosci **12**(9): 3628-41.
- Du, K., H. Asahara, et al. (2000). "Characterization of a CREB gain-of-function mutant with constitutive transcriptional activity in vivo." Molecular and Cellular Biology **20**(12): 4320-7.
- Duffy, S. J., S. F. Castle, et al. (1999). "Contribution of vasodilator prostanoids and nitric oxide to resting flow, metabolic vasodilation, and flow-mediated dilation in human coronary circulation." Circulation **100**(19): 1951-7.
- Duman, R. S., G. R. Heninger, et al. (1997). "A molecular and cellular theory of depression." Arch Gen Psychiatry **54**(7): 597-606.
- Duman, R. S. and L. M. Monteggia (2006). "A neurotrophic model for stress-related mood disorders." Biol Psychiatry **59**(12): 1116-27.
- Dumonde, D. C., R. A. Wolstencroft, et al. (1969). "'Lymphokines': non-antibody mediators of cellular immunity generated by lymphocyte activation." Nature **224**(5214): 38-42.
- Dunlop, D. D., J. S. Lyons, et al. (2004). "Arthritis and heart disease as risk factors for major depression: the role of functional limitation." Med Care **42**(6): 502-11.

- Dunn, A. J., A. H. Swiergiel, et al. (2005). "Cytokines as mediators of depression: what can we learn from animal studies?" Neuroscience and Biobehavioral Reviews **29**(4-5): 891-909.
- Edwards, C. K., 3rd, S. W. Martin, et al. (2003). "Design of PEGylated soluble tumor necrosis factor receptor type I (PEG sTNF-RI) for chronic inflammatory diseases." Adv Drug Deliv Rev **55**(10): 1315-36.
- Eefting, F., B. Rensing, et al. (2004). "Role of apoptosis in reperfusion injury." Cardiovasc Res **61**(3): 414-26.
- Effat, M. A. (1995). "Pathophysiology of ischemic heart disease: an overview." AACN Clin Issues **6**(3): 369-74.
- Eilat, E., S. Mendlovic, et al. (1999). "Increased apoptosis in patients with major depression: A preliminary study." Journal of Immunology **163**(1): 533-4.
- Elhwuegi, A. S. (2004). "Central monoamines and their role in major depression." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **28**(3): 435-51.
- Ellis, S. G., C. I. Henschke, et al. (1983). "Time course of functional and biochemical recovery of myocardium salvaged by reperfusion." J Am Coll Cardiol **1**(4): 1047-55.
- Elmqvist, J. K., C. D. Breder, et al. (1997). "Intravenous lipopolysaccharide induces cyclooxygenase 2-like immunoreactivity in rat brain perivascular microglia and meningeal macrophages." J Comp Neurol **381**(2): 119-29.
- Ezaki, T., P. Baluk, et al. (2001). "Time course of endothelial cell proliferation and microvascular remodeling in chronic inflammation." Am J Pathol **158**(6): 2043-55.
- Fadeel, B. (2003). "Programmed cell clearance." Cell Mol Life Sci **60**(12): 2575-85.
- Feigl, E. O. (1998). "Neural control of coronary blood flow." J Vasc Res **35**(2): 85-92.
- Feldman, A. M., A. Combes, et al. (2000). "The role of tumor necrosis factor in the pathophysiology of heart failure." J Am Coll Cardiol **35**(3): 537-44.
- Fiers, W. (1991). "Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level." FEBS Letters **285**(2): 199-212.

- Finucane, D. M., E. Bossy-Wetzel, et al. (1999). "Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL." J Biol Chem **274**(4): 2225-33.
- Flaherty, M. P., Y. Guo, et al. (2008). "The role of TNF-alpha receptors p55 and p75 in acute myocardial ischemia/reperfusion injury and late preconditioning." J Mol Cell Cardiol **45**(6): 735-41.
- Fleshner, M., L. E. Goehler, et al. (1995). "Interleukin-1 beta induced corticosterone elevation and hypothalamic NE depletion is vagally mediated." Brain Research Bulletin **37**(6): 605-10.
- Fliss, H. and D. Gatteringer (1996). "Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium." Circ Res **79**(5): 949-56.
- Foster, F. M., C. J. Traer, et al. (2003). "The phosphoinositide (PI) 3-kinase family." Journal of Cell Science **116**(Pt 15): 3037-40.
- Francis, J., Y. Chu, et al. (2004). "Acute myocardial infarction induces hypothalamic cytokine synthesis." Am J Physiol Heart Circ Physiol **286**(6): H2264-71.
- Francis, J., Z.-H. Zhang, et al. (2004). "Neural regulation of the proinflammatory cytokine response to acute myocardial infarction." Am. J. Physiol. **287**: H791-H797.
- Frasure-Smith, N., F. Lesperance, et al. (2000). "Depression and health-care costs during the first year following myocardial infarction." J Psychosom Res **48**(4-5): 471-8.
- Frasure-Smith, N., F. Lesperance, et al. (2007). "Depression, C-reactive protein and two-year major adverse cardiac events in men after acute coronary syndromes." Biol Psychiatry **62**(4): 302-8.
- Frasure-Smith, N., F. Lesperance, et al. (1993). "Depression following myocardial infarction. Impact on 6-month survival." Jama **270**(15): 1819-25.
- Frasure-Smith, N., F. Lesperance, et al. (1995). "Depression and 18-month prognosis after myocardial infarction." Circulation **91**(4): 999-1005.
- Freese, J. L. and D. G. Amaral (2005). "The organization of projections from the amygdala to visual cortical areas TE and V1 in the macaque monkey." J Comp Neurol **486**(4): 295-317.
- Freude, B., T. N. Masters, et al. (2000). "Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion." J. Mol. Cell. Cardiol. **32**: 197-208.

- Friedewald, V. E., L. W. Arnold, et al. (2007). "The Editor's Roundtable: major depression in patients with coronary heart disease." Am J Cardiol **99**(4): 519-29.
- Fuchs, E., B. Czeh, et al. (2004). "Alterations of neuroplasticity in depression: the hippocampus and beyond." Eur Neuropsychopharmacol **14 Suppl 5**: S481-90.
- Fudge, J. L., K. Kunishio, et al. (2002). "Amygdaloid projections to ventromedial striatal subterritories in the primate." Neuroscience **110**(2): 257-75.
- Fujiwara, N. and K. Kobayashi (2005). "Macrophages in inflammation." Curr Drug Targets Inflamm Allergy **4**(3): 281-6.
- Furie, M. B., M. C. Tancinco, et al. (1991). "Monoclonal antibodies to leukocyte integrins CD11a/CD18 and CD11b/CD18 or intercellular adhesion molecule-1 inhibit chemoattractant-stimulated neutrophil transendothelial migration in vitro." Blood **78**(8): 2089-97.
- Fuster, J. (1996). The prefrontal cortex. New York, Raven Press.
- Gao, W. D., D. Atar, et al. (1995). "Relationship between intracellular calcium and contractile force in stunned myocardium. Direct evidence for decreased myofilament Ca²⁺ responsiveness and altered diastolic function in intact ventricular muscle." Circ Res **76**(6): 1036-48.
- Garavito, R. M. and A. M. Mulichak (2003). "The structure of mammalian cyclooxygenases." Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure **32**: 183-206.
- Garg, S., L. Hofstra, et al. (2003). "Apoptosis as a therapeutic target in acutely ischemic myocardium." Curr Opin Cardiol **18**(5): 372-7.
- Ghashghaei, H. T. and H. Barbas (2002). "Pathways for emotion: interactions of prefrontal and anterior temporal pathways in the amygdala of the rhesus monkey." Neuroscience **115**(4): 1261-79.
- Gierse, J. K., J. J. McDonald, et al. (1996). "A single amino acid difference between cyclooxygenase-1 (COX-1) and -2 (COX-2) reverses the selectivity of COX-2 specific inhibitors." J Biol Chem **271**(26): 15810-4.
- Goldberg, S., A. J. Greenspon, et al. (1983). "Reperfusion arrhythmia: a marker of restoration of antegrade flow during intracoronary thrombolysis for acute myocardial infarction." Am Heart J **105**(1): 26-32.

- Gonul, A. S., F. Akdeniz, et al. (2005). "Effect of treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients." Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci **255**(6): 381-6.
- Gottlieb, R. A., K. O. Burlison, et al. (1994). "Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes." J Clin Invest **94**(4): 1621-8.
- Goutan, E., E. Marti, et al. (1998). "BDNF, and full length and truncated TrkB expression in the hippocampus of the rat following kainic acid excitotoxic damage. Evidence of complex time-dependent and cell-specific responses." Brain Res Mol Brain Res **59**(2): 154-64.
- Gowda, R. M., I. A. Khan, et al. (2004). "Reversible myocardial dysfunction: basics and evaluation." Int J Cardiol **97**(3): 349-53.
- Granger, G. A. and T. W. Williams (1968). "Lymphocyte cytotoxicity in vitro: activation and release of a cytotoxic factor." Nature **218**(5148): 1253-4.
- Grell, M., H. Wajant, et al. (1998). "The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(2): 570-5.
- Gresele, P. and G. Agnelli (2002). "Novel approaches to the treatment of thrombosis." Trends in Pharmacological Sciences **23**(1): 25-32.
- Grimm, S. and D. Brdiczka (2007). "The permeability transition pore in cell death." Apoptosis **12**(5): 841-55.
- Grippo, A. J. and A. K. Johnson (2002). "Biological mechanisms in the relationship between depression and heart disease." Neurosci Biobehav Rev **26**(8): 941-62.
- Gross, A., J. M. McDonnell, et al. (1999). "BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis." Genes and Development **13**(15): 1899-911.
- Gross, G. J., J. R. Kersten, et al. (1999). "Mechanisms of postischemic contractile dysfunction." Ann Thorac Surg **68**(5): 1898-904.
- Grutz, G. (2005). "New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression." Journal of Leukocyte Biology **77**(1): 3-15.
- Gu, Q., X. P. Yang, et al. (2006). "Inhibition of TNF-alpha reduces myocardial injury and proinflammatory pathways following ischemia-reperfusion in the dog." J Cardiovasc Pharmacol **48**(6): 320-8.

- Guck, T. P., M. G. Kavan, et al. (2001). "Assessment and treatment of depression following myocardial infarction." Am Fam Physician **64**(4): 641-8.
- Gunter, T. E., L. Buntinas, et al. (2000). "Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions." Cell Calcium **28**(5-6): 285-96.
- Guth, B. D., J. F. Martin, et al. (1987). "Regional myocardial blood flow, function and metabolism using phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy during ischemia and reperfusion in dogs." J Am Coll Cardiol **10**(3): 673-81.
- Gutierrez, E. G., W. A. Banks, et al. (1993). "Murine tumor necrosis factor alpha is transported from blood to brain in the mouse." J Neuroimmunol **47**(2): 169-76.
- Haerem, J. W. (1978). "Sudden, unexpected coronary death. The occurrence of platelet aggregates in the epicardial and myocardial vessels of man." Acta Pathol Microbiol Scand Suppl(265): 1-47.
- Halestrap, A. P. (2006). "Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die." Biochem Soc Trans **34**(Pt 2): 232-7.
- Halestrap, A. P., S. J. Clarke, et al. (2004). "Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection." Cardiovasc Res **61**(3): 372-85.
- Halestrap, A. P., G. P. McStay, et al. (2002). "The permeability transition pore complex: another view." Biochimie **84**(2-3): 153-66.
- Harris, R. C., J. A. McKanna, et al. (1994). "Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction." Journal of Clinical Investigation **94**(6): 2504-10.
- Hart, B. L. (1988). "Biological basis of the behavior of sick animals." Neuroscience and Biobehavioral Reviews **12**(2): 123-37.
- Haudek, S. B., G. E. Taffet, et al. (2007). "TNF provokes cardiomyocyte apoptosis and cardiac remodeling through activation of multiple cell death pathways." J Clin Invest **117**(9): 2692-701.
- Hearse, D. J. (1991). "Stunning: a radical re-view." Cardiovasc Drugs Ther **5**(5): 853-76.
- Hellstrand, K., C. Czerkinsky, et al. (1993). "Role of serotonin in the regulation of interferon-gamma production by human natural killer cells." Journal of Interferon Research **13**(1): 33-8.

- Hengartner, M. O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." Nature **407**(6805): 770-6.
- Herbert, T. B. and S. Cohen (1993). "Depression and immunity: a meta-analytic review." Psychological Bulletin **113**(3): 472-86.
- Herr, I., N. Gassler, et al. (2007). "Regulation of differential pro- and anti-apoptotic signaling by glucocorticoids." Apoptosis **12**(2): 271-91.
- Heumann, R. (1994). "Neurotrophin signalling." Curr Opin Neurobiol **4**(5): 668-79.
- Hewett, S. J., S. C. Bell, et al. (2006). "Contributions of cyclooxygenase-2 to neuroplasticity and neuropathology of the central nervous system." Pharmacol Ther **112**(2): 335-57. Epub 2006 Jun 5.
- Hicks, R. R., L. Zhang, et al. (1998). "Expression of trkB mRNA is altered in rat hippocampus after experimental brain trauma." Brain Res Mol Brain Res **59**(2): 264-8.
- Hindmarch, I. (2002). "Beyond the monoamine hypothesis: mechanisms, molecules and methods." Eur Psychiatry **17 Suppl 3**: 294-9.
- Hinz, B. and K. Brune (2002). "Cyclooxygenase-2--10 years later." J Pharmacol Exp Ther **300**(2): 367-75.
- Hock, C., K. Heese, et al. (2000). "Region-specific neurotrophin imbalances in Alzheimer disease: decreased levels of brain-derived neurotrophic factor and increased levels of nerve growth factor in hippocampus and cortical areas." Arch Neurol **57**(6): 846-51.
- Hoffman, J. I. and G. D. Buckberg (1978). "The myocardial supply:demand ratio--a critical review." Am J Cardiol **41**(2): 327-32.
- Holleyman, C. R. and D. F. Larson (2001). "Apoptosis in the ischemic reperfused myocardium." Perfusion **16**(6): 491-502.
- Holsboer, F. (2000). "The stress hormone system is back on the map." Curr Psychiatry Rep **2**(6): 454-6.
- Hoozemans, J. J. and M. K. O'Banion (2005). "The role of COX-1 and COX-2 in Alzheimer's disease pathology and the therapeutic potentials of non-steroidal anti-inflammatory drugs." Curr Drug Targets CNS Neurol Disord **4**(3): 307-15.

- Hopkins, S. J. (2003). "The pathophysiological role of cytokines." Leg Med (Tokyo) **5 Suppl 1**: S45-57.
- Hopkins, S. J. and N. J. Rothwell (1995). "Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition." Trends Neurosci **18**(2): 83-8.
- Hosoi, T., Y. Okuma, et al. (2002). "The mechanisms of immune-to-brain communication in inflammation as a drug target." Curr Drug Targets Inflamm Allergy **1**(3): 257-62.
- Hu, Z., K. Yuri, et al. (1997). "The in vivo time course for elimination of adrenalectomy-induced apoptotic profiles from the granule cell layer of the rat hippocampus." J Neurosci **17**(11): 3981-9.
- Hui, E. K., R. J. Boado, et al. (2009). "Tumor necrosis factor receptor-IgG fusion protein for targeted-drug delivery across the human blood-brain barrier." Mol Pharm.
- Idriss, H. T. and J. H. Naismith (2000). "TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s)." Microscopy Research and Technique **50**(3): 184-95.
- Isackson, P. J., M. M. Huntsman, et al. (1991). "BDNF mRNA expression is increased in adult rat forebrain after limbic seizures: temporal patterns of induction distinct from NGF." Neuron **6**(6): 937-48.
- Ivanova, S. A., V. Y. Semke, et al. (2007). "Signs of apoptosis of immunocompetent cells in patients with depression." Neuroscience and Behavioral Physiology **37**(5): 527-30.
- Jennings, R. B., H. K. Hawkins, et al. (1978). "Relation between high energy phosphate and lethal injury in myocardial ischemia in the dog." Am J Pathol **92**(1): 187-214.
- Jennings, R. B., J. Schaper, et al. (1985). "Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury. Changes in cell volume, electrolytes, metabolites, and ultrastructure." Circ Res **56**(2): 262-78.
- Jeong, S. Y. and D. W. Seol (2008). "The role of mitochondria in apoptosis." BMB Rep **41**(1): 11-22.
- Jewett, S. L., L. J. Eddy, et al. (1989). "Is the autoxidation of catecholamines involved in ischemia-reperfusion injury?" Free Radic Biol Med **6**(2): 185-8.
- Johnson, L. R., C. Farb, et al. (2005). "Localization of glucocorticoid receptors at postsynaptic membranes in the lateral amygdala." Neuroscience **136**(1): 289-99.

- Jolly, S. R., W. J. Kane, et al. (1984). "Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase." Circ Res **54**(3): 277-85.
- Jolly, S. R., W. A. Schumacher, et al. (1985). "Platelet depletion in experimental myocardial infarction." Basic Res Cardiol **80**(3): 269-79.
- Juruena, M. F., A. J. Cleare, et al. (2004). "[The hypothalamic pituitary adrenal axis, glucocorticoid receptor function and relevance to depression]." Rev Bras Psiquiatr **26**(3): 189-201.
- Kaloustian, S., B. P. Wann, et al. (2008). "Apoptosis time course in the limbic system after myocardial infarction in the rat." Brain Res **1216C**: 87-91.
- Karege, F., G. Perret, et al. (2002). "Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients." Psychiatry Res **109**(2): 143-8.
- Karmazyn, M. (1996). Myocardial ischemia: mechanisms, reperfusion, protection, Birkhäuser.
- Katoh-Semba, R., I. K. Takeuchi, et al. (1997). "Distribution of brain-derived neurotrophic factor in rats and its changes with development in the brain." J Neurochem **69**(1): 34-42.
- Kawamoto, Y., S. Nakamura, et al. (1996). "Immunohistochemical localization of brain-derived neurotrophic factor in adult rat brain." Neuroscience **74**(4): 1209-26.
- Kelly, J. P., A. S. Wrynn, et al. (1997). "The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: an update." Pharmacol Ther **74**(3): 299-316.
- Kempermann, G. (2002). "Regulation of adult hippocampal neurogenesis - implications for novel theories of major depression." Bipolar Disord **4**(1): 17-33.
- Kenis, G. and M. Maes (2002). "Effects of antidepressants on the production of cytokines." Int J Neuropsychopharmacol **5**(4): 401-12.
- Kent, S., R. M. Bluthe, et al. (1992). "Sickness behavior as a new target for drug development." Trends in Pharmacological Sciences **13**(1): 24-8.
- Kermer, P., J. Liman, et al. (2004). "Neuronal apoptosis in neurodegenerative diseases: from basic research to clinical application." Neurodegener Dis **1**(1): 9-19.

- Kerr, J. F. (1965). "A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes." Journal of Pathology and Bacteriology **90**(2): 419-35.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." British Journal of Cancer **26**(4): 239-57.
- Kessler, R. C. (1997). "The effects of stressful life events on depression." Annu Rev Psychol **48**: 191-214.
- Kim, K. B., H. H. Chung, et al. (1994). "Changes in the antioxidative defensive system during open heart operations in humans." Ann Thorac Surg **58**(1): 170-5.
- Kischkel, F. C., S. Hellbardt, et al. (1995). "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor." EMBO Journal **14**(22): 5579-88.
- Klimas, N. G. and A. O. Koneru (2007). "Chronic fatigue syndrome: inflammation, immune function, and neuroendocrine interactions." Curr Rheumatol Rep **9**(6): 482-7.
- Kluger, M. J. (1991). "Fever: role of pyrogens and cryogens." Physiol Rev **71**(1): 93-127.
- Kluver, H. and P. C. Bucy (1997). "Preliminary analysis of functions of the temporal lobes in monkeys. 1939." J Neuropsychiatry Clin Neurosci **9**(4): 606-20.
- Komaki, G., A. Arimura, et al. (1992). "Effect of intravenous injection of IL-1 beta on PGE2 levels in several brain areas as determined by microdialysis." Am J Physiol **262**(2 Pt 1): E246-51.
- Kosmala, W., M. Przewlocka-Kosmala, et al. (2005). "Proinflammatory cytokines and myocardial viability in patients after acute myocardial infarction." Int J Cardiol **101**(3): 449-56.
- Krawczyk, D. C. (2002). "Contributions of the prefrontal cortex to the neural basis of human decision making." Neurosci Biobehav Rev **26**(6): 631-64.
- Krettek, J. E. and J. L. Price (1978). "A description of the amygdaloid complex in the rat and cat with observations on intra-amygdaloid axonal connections." J Comp Neurol **178**(2): 255-80.

- Kroemer, G., N. Zamzami, et al. (1997). "Mitochondrial control of apoptosis." Immunology Today **18**(1): 44-51.
- Krugers, H. J., S. van der Linden, et al. (2007). "Dissociation between apoptosis, neurogenesis, and synaptic potentiation in the dentate gyrus of adrenalectomized rats." Synapse **61**(4): 221-30.
- Kubera, M., G. Kenis, et al. (2000). "Effects of serotonin and serotonergic agonists and antagonists on the production of interferon-gamma and interleukin-10." Neuropsychopharmacology **23**(1): 89-98.
- Kuikka, J. T., A. Pitkanen, et al. (1995). "Abnormal regional benzodiazepine receptor uptake in the prefrontal cortex in patients with panic disorder." Nucl Med Commun **16**(4): 273-80.
- Kutuk, O. and H. Basaga (2006). "Bcl-2 protein family: implications in vascular apoptosis and atherosclerosis." Apoptosis **11**(10): 1661-75.
- Ladwig, K. H., M. Kieser, et al. (1991). "Affective disorders and survival after acute myocardial infarction. Results from the post-infarction late potential study." Eur Heart J **12**(9): 959-64.
- Laflamme, N. and S. Rivest (1999). "An essential role of interleukin-1 β in mediating NF- κ B 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. Neuroscience **19**: 10923-10930.
- Laghriissi-Thode, F., W. R. Wagner, et al. (1997). "Elevated platelet factor 4 and beta-thromboglobulin plasma levels in depressed patients with ischemic heart disease." Biol Psychiatry **42**(4): 290-5.
- Landino, L. M., B. C. Crews, et al. (1996). "Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(26): 15069-74.
- Lang, P. J., M. Davis, et al. (2000). "Fear and anxiety: animal models and human cognitive psychophysiology." J Affect Disord **61**(3): 137-59.
- Launer, L. J. (2003). "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and Alzheimer disease: what's next?" Jama **289**(21): 2865-7.
- Lautsch, E. V. (1979). "Morphological factors of clinical significance in myocardial infarction - a review." Tex Rep Biol Med **39**: 371-86.

- Lechin, F., B. van der Dijs, et al. (1995). "Plasma neurotransmitters, blood pressure, and heart rate during supine-resting, orthostasis, and moderate exercise conditions in major depressed patients." Biol Psychiatry **38**(3): 166-73.
- Lecour, S., R. M. Smith, et al. (2002). "Identification of a novel role for sphingolipid signaling in TNF alpha and ischemic preconditioning mediated cardioprotection." J Mol Cell Cardiol **34**(5): 509-18.
- Lee, A., M. K. Whyte, et al. (1993). "Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators." Journal of Leukocyte Biology **54**(4): 283-8.
- Lee, F. S., A. H. Kim, et al. (2001). "The uniqueness of being a neurotrophin receptor." Curr Opin Neurobiol **11**(3): 281-6.
- Lee, S. H., E. Soyoola, et al. (1992). "Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide." J Biol Chem **267**(36): 25934-8.
- Leevers, S. J., B. Vanhaesebroeck, et al. (1999). "Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage." Current Opinion in Cell Biology **11**(2): 219-25.
- Lefkovits, J., E. F. Plow, et al. (1995). "Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine." N Engl J Med **332**(23): 1553-9.
- Leinberger, H., G. T. Suehiro, et al. (1979). "Myocardial platelet trapping after coronary ligation in primates (*Papio anubis*)." J Surg Res **27**(1): 36-40.
- LeMay, L. G., A. J. Vander, et al. (1990). "The effects of pentoxifylline on lipopolysaccharide (LPS) fever, plasma interleukin 6 (IL 6), and tumor necrosis factor (TNF) in the rat." Cytokine **2**(4): 300-6.
- Lesperance, F. and N. Frasure-Smith (2007). "Depression and heart disease." Cleve Clin J Med **74 Suppl 1**: S63-6.
- Lesperance, F., N. Frasure-Smith, et al. (2002). "Five-year risk of cardiac mortality in relation to initial severity and one-year changes in depression symptoms after myocardial infarction." Circulation **105**(9): 1049-53.
- Levi-Montalcini, R. (1987). "The nerve growth factor 35 years later." Science **237**(4819): 1154-62.

- Levi-Montalcini, R. and V. Hamburger (1951). "Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo." Journal of Experimental Zoology **116**(2): 321-61.
- Levine, J., Y. Barak, et al. (1999). "Cerebrospinal cytokine levels in patients with acute depression." Neuropsychobiology **40**(4): 171-6.
- Li, R. C., B. W. Row, et al. (2003). "Cyclooxygenase 2 and intermittent hypoxia-induced spatial deficits in the rats." Am. J. Respir Crit. Care Med. **168**: 469-475.
- Licinio, J., M. L. Wong, et al. (1991). "Localization of interleukin-1 receptor antagonist mRNA in rat brain." Endocrinology **129**(1): 562-4.
- Lieb, J., R. Karmali, et al. (1983). "Elevated levels of prostaglandin E2 and thromboxane B2 in depression." Prostaglandins, Leukotrienes and Medicine **10**(4): 361-7.
- Linnoila, M., F. Karoum, et al. (1982). "Alteration of norepinephrine metabolism with desipramine and zimelidine in depressed patients." Arch Gen Psychiatry **39**(9): 1025-8.
- Liu, X., C. N. Kim, et al. (1996). "Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c." Cell **86**(1): 147-57.
- Liu, Y., G. L. Borchert, et al. (2004). "Polyoma enhancer activator 3, an ets transcription factor, mediates the induction of cyclooxygenase-2 by nitric oxide in colorectal cancer cells." J Biol Chem **279**(18): 18694-700.
- Loetscher, H., R. Gentz, et al. (1991). "Recombinant 55-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor. Stoichiometry of binding to TNF alpha and TNF beta and inhibition of TNF activity." J Biol Chem **266**(27): 18324-9.
- Lown, B., R. A. DeSilva, et al. (1980). "Psychophysiologic factors in sudden cardiac death." Am J Psychiatry **137**(11): 1325-35.
- Lown, B. and R. L. Verrier (1976). "Neural activity and ventricular fibrillation." N Engl J Med **294**(21): 1165-70.
- Lucassen, P. J., E. Fuchs, et al. (2004). "Antidepressant treatment with tianeptine reduces apoptosis in the hippocampal dentate gyrus and temporal cortex." Biol Psychiatry **55**(8): 789-96.
- Lucassen, P. J., V. M. Heine, et al. (2006). "Stress, depression and hippocampal apoptosis." CNS Neurol Disord Drug Targets **5**(5): 531-46.

- Lucassen, P. J., M. B. Muller, et al. (2001). "Hippocampal apoptosis in major depression is a minor event and absent from subareas at risk for glucocorticoid overexposure." Am J Pathol **158**(2): 453-68.
- Lucki, I. (2001). "A prescription to resist proscriptions for murine models of depression." Psychopharmacology (Berl) **153**(3): 395-8.
- Luo, X., I. Budihardjo, et al. (1998). "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors." Cell **94**(4): 481-90.
- Luster, A. D., R. Alon, et al. (2005). "Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets." Nat Immunol **6**(12): 1182-90.
- Lustman, P. J., R. E. Clouse, et al. (1998). "Management of Major Depression in Adults With Diabetes: Implications of Recent Clinical Trials." Semin Clin Neuropsychiatry **3**(2): 102-114.
- MacDonald, A. W., 3rd, J. D. Cohen, et al. (2000). "Dissociating the role of the dorsolateral prefrontal and anterior cingulate cortex in cognitive control." Science **288**(5472): 1835-8.
- MacQueen, G. M., K. Ramakrishnan, et al. (2003). "Desipramine treatment reduces the long-term behavioural and neurochemical sequelae of early-life maternal separation." Int J Neuropsychopharmacol **6**(4): 391-6.
- Maekawa, N., H. Wada, et al. (2002). "Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor-alpha." J Am Coll Cardiol **39**(7): 1229-35.
- Maes, M. (1995). "Evidence for an immune response in major depression: a review and hypothesis." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **19**(1): 11-38.
- Maes, M., E. Bosmans, et al. (1993). "Interleukin-1 beta: a putative mediator of HPA axis hyperactivity in major depression?" Am J Psychiatry **150**(8): 1189-93.
- Maier, S. F., L. E. Goehler, et al. (1998). "The role of the vagus nerve in cytokine-to-brain communication." Ann N Y Acad Sci **840**: 289-300.
- Maier, S. F. and L. R. Watkins (1998). "Cytokines for psychologists: implications of bidirectional immune-to-brain communication for understanding behavior, mood, and cognition." Psychological Review **105**(1): 83-107.

- Maini, R., E. W. St Clair, et al. (1999). "Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. ATTRACT Study Group." Lancet **354**(9194): 1932-9.
- Majno, G. and I. Joris (1995). "Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death." Am J Pathol **146**(1): 3-15.
- Malberg, J. E., A. J. Eisch, et al. (2000). "Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus." J Neurosci **20**(24): 9104-10.
- Maletic, V., M. Robinson, et al. (2007). "Neurobiology of depression: an integrated view of key findings." Int J Clin Pract **61**(12): 2030-40.
- Manji, H. K., W. C. Drevets, et al. (2001). "The cellular neurobiology of depression." Nat Med **7**(5): 541-7.
- Manji, H. K., J. A. Quiroz, et al. (2003). "Enhancing neuronal plasticity and cellular resilience to develop novel, improved therapeutics for difficult-to-treat depression." Biol Psychiatry **53**(8): 707-42.
- Manning, B. D. and L. C. Cantley (2007). "AKT/PKB signaling: navigating downstream." Cell **129**(7): 1261-74.
- Markovitz, J. H. and K. A. Matthews (1991). "Platelets and coronary heart disease: potential psychophysiologic mechanisms." Psychosom Med **53**(6): 643-68.
- Markovitz, J. H., J. L. Shuster, et al. (2000). "Platelet activation in depression and effects of sertraline treatment: An open-label study." Am J Psychiatry **157**(6): 1006-8.
- Marnett, L. J., S. W. Rowlinson, et al. (1999). "Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition." J Biol Chem **274**(33): 22903-6.
- Martinon, F. and J. Tschopp (2004). "Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases." Cell **117**(5): 561-74.
- Maurer-Spurej, E. (2005). "Serotonin reuptake inhibitors and cardiovascular diseases: a platelet connection." Cell Mol Life Sci **62**(2): 159-70.
- Mayberg, H. S. (2003). "Modulating dysfunctional limbic-cortical circuits in depression: towards development of brain-based algorithms for diagnosis and optimised treatment." Br Med Bull **65**: 193-207.

- McColl, B. W., N. J. Rothwell, et al. (2008). "Systemic inflammation alters the kinetics of cerebrovascular tight junction disruption after experimental stroke in mice." J Neurosci **28**(38): 9451-62.
- McDonald, A. J. (1998). "Cortical pathways to the mammalian amygdala." Prog Neurobiol **55**(3): 257-332.
- McEvoy, A. N., B. Bresnihan, et al. (2004). "Cyclooxygenase 2-derived prostaglandin E2 production by corticotropin-releasing hormone contributes to the activated cAMP response element binding protein content in rheumatoid arthritis synovial tissue." Arthritis and Rheumatism **50**(4): 1132-45.
- McFarlane, A., M. V. Kamath, et al. (2001). "Effect of sertraline on the recovery rate of cardiac autonomic function in depressed patients after acute myocardial infarction." Am Heart J **142**(4): 617-23.
- McGaugh, J. L., L. Cahill, et al. (1996). "Involvement of the amygdala in memory storage: interaction with other brain systems." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(24): 13508-14.
- McGinty, V. B. and A. A. Grace (2009). "Activity-dependent depression of medial prefrontal cortex inputs to accumbens neurons by the basolateral amygdala." Neuroscience.
- McKinney, W. T. (2001). "Overview of the past contributions of animal models and their changing place in psychiatry." Seminars in Clinical Neuropsychiatry **6**(1): 68-78.
- Mehler, M., F. H. Goldstein, et al. (1996.). Effects of cytokines on CNS cells: neurons. Cytokines and the CNS. R. Ransohoff, M., and E. Benveniste, N.,. Boca Raton, CRC Press: 115-50.
- Mehta, J. L. and D. Y. Li (1999). "Inflammation in ischemic heart disease: response to tissue injury or a pathogenetic villain?" Cardiovascular Research **43**(2): 291-9.
- Meininger, G. A. and M. J. Davis (1992). "Cellular mechanisms involved in the vascular myogenic response." Am J Physiol **263**(3 Pt 2): H647-59.
- Merrill, J. E. (1992). "Tumor necrosis factor alpha, interleukin 1 and related cytokines in brain development: normal and pathological." Dev Neurosci **14**(1): 1-10.
- Metherate, R. and J. H. Ashe (1991). "Basal forebrain stimulation modifies auditory cortex responsiveness by an action at muscarinic receptors." Brain Res **559**(1): 163-7.

- Micheau, O. and J. Tschopp (2003). "Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes." Cell **114**(2): 181-90.
- Mignotte, B. and J. L. Vayssiere (1998). "Mitochondria and apoptosis." European Journal of Biochemistry **252**(1): 1-15.
- Miller, E. K. and J. D. Cohen (2001). "An integrative theory of prefrontal cortex function." Annual Review of Neuroscience **24**: 167-202.
- Minn, A. J., P. Velez, et al. (1997). "Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes." Nature **385**(6614): 353-7.
- Mitchell, J. A., P. Akarasereenont, et al. (1993). "Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(24): 11693-7.
- Mocanu, M. M., G. F. Baxter, et al. (2000). "Caspase inhibition and limitation of myocardial infarct size: protection against lethal reperfusion injury." Br J Pharmacol **130**(2): 197-200.
- Moens, A. L., M. J. Claeys, et al. (2005). "Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process." Int J Cardiol **100**(2): 179-90.
- Mogi, M., A. Togari, et al. (1999). "Brain-derived growth factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease." Neurosci Lett **270**(1): 45-8.
- Moncada, S., R. Gryglewski, et al. (1976). "An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation." Nature **263**(5579): 663-5.
- Monden, Y., T. Kubota, et al. (2007). "Tumor necrosis factor-alpha is toxic via receptor 1 and protective via receptor 2 in a murine model of myocardial infarction." Am J Physiol Heart Circ Physiol **293**(1): H743-53.
- Moore, K. W., A. O'Garra, et al. (1993). "Interleukin-10." Annual Review of Immunology **11**: 165-90.
- Mowla, S. J., H. F. Farhadi, et al. (2001). "Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor." J Biol Chem **276**(16): 12660-6.

- Muller, J. M., P. R. Myers, et al. (1993). "Exercise training alters myogenic responses in porcine coronary resistance arteries." J Appl Physiol **75**(6): 2677-82.
- Musselman, D. L., D. L. Evans, et al. (1998). "The relationship of depression to cardiovascular disease: epidemiology, biology, and treatment." Arch Gen Psychiatry **55**(7): 580-92.
- Musselman, D. L., U. M. Marzec, et al. (2000). "Platelet reactivity in depressed patients treated with paroxetine: preliminary findings." Arch Gen Psychiatry **57**(9): 875-82.
- Musselman, D. L., A. Tomer, et al. (1996). "Exaggerated platelet reactivity in major depression." Am J Psychiatry **153**(10): 1313-7.
- Nadeau, S. and S. Rivest (1999). "Effects of circulating tumor necrosis factor on the neuronal activity and expression of the genes encoding the tumor necrosis factor receptors (p55 and p75) in the rat brain: a view from the blood-brain barrier." Neuroscience **93**(4): 1449-64.
- Nagano, Y. and Y. Kojima (1954). "[Immunizing property of vaccinia virus inactivated by ultraviolet rays.]." Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales **148**(19-20): 1700-2.
- Nagata, S. (2000). "Apoptotic DNA fragmentation." Experimental Cell Research **256**(1): 12-8.
- Nantel, F., D. Denis, et al. (1999). "Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation." Br J Pharmacol **128**(4): 853-9.
- Nathan, C. (2002). "Points of control in inflammation." Nature **420**(6917): 846-52.
- Nathan, C. and M. Sporn (1991). "Cytokines in context." Journal of Cell Biology **113**(5): 981-6.
- Nauta, W. J. (1962). "Neural associations of the amygdaloid complex in the monkey." Brain **85**: 505-20.
- Nemeroff, C. B., E. Widerlov, et al. (1984). "Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients." Science **226**(4680): 1342-4.
- Nestler, E. J., E. Gould, et al. (2002). "Preclinical models: status of basic research in depression." Biol Psychiatry **52**(6): 503-28.

- Neumeister, A., S. Wood, et al. (2005). "Reduced hippocampal volume in unmedicated, remitted patients with major depression versus control subjects." Biol Psychiatry **57**(8): 935-7.
- Neuss, M., M. T. Crow, et al. (2001). "Apoptosis in cardiac disease--what is it--how does it occur." Cardiovascular Drugs and Therapy **15**(6): 507-23.
- Nguyen, M., D. G. Millar, et al. (1993). "Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence." J Biol Chem **268**(34): 25265-8.
- Nibuya, M., S. Morinobu, et al. (1995). "Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments." J Neurosci **15**(11): 7539-47.
- Nibuya, M., M. Takahashi, et al. (1999). "Repeated stress increases catalytic TrkB mRNA in rat hippocampus." Neurosci Lett **267**(2): 81-4.
- Nieuwenhuys, R. (1996). "The greater limbic system, the emotional motor system and the brain." Prog Brain Res **107**: 551-80.
- Nijijima, A. (1996). "The afferent discharges from sensors for interleukin 1 beta in the hepatoportal system in the anesthetized rat." Journal of the Autonomic Nervous System **61**(3): 287-91.
- Nito, I., S. Waspadji, et al. (2004). "Correlation between cortisol levels and myocardial infarction mortality among intensive coronary care unit patients during first seven days in hospital." Acta Med Indones **36**(1): 8-14.
- Nussmeier, N. A., A. A. Whelton, et al. (2005). "Complications of the COX-2 inhibitors parecoxib and valdecoxib after cardiac surgery." New England Journal of Medicine **352**(11): 1081-91.
- Nutt, D. J. (2002). "The neuropharmacology of serotonin and noradrenaline in depression." Int Clin Psychopharmacol **17 Suppl 1**: S1-12.
- Ongur, D. and J. L. Price (2000). "The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans." Cerebral Cortex **10**(3): 206-19.
- Onoe, Y., C. Miyaura, et al. (1996). "IL-13 and IL-4 inhibit bone resorption by suppressing cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin synthesis in osteoblasts." Journal of Immunology **156**(2): 758-64.

- Opie, L. H. (1971). "Acute metabolic response in myocardial infarction." Br Heart J **33**: Suppl:129-37.
- Opie, L. H. (1992). Stunning, hibernation, and calcium in myocardial ischemia and reperfusion. Michigan, Kluwer Academic.
- Opp, M. R. and J. M. Krueger (1994). "Anti-interleukin-1 beta reduces sleep and sleep rebound after sleep deprivation in rats." Am J Physiol **266**(3 Pt 2): R688-95.
- Owens, M. J. and C. B. Nemeroff (1994). "Role of serotonin in the pathophysiology of depression: focus on the serotonin transporter." Clin Chem **40**(2): 288-95.
- Paganelli, F., C. Frachebois, et al. (2003). "Hypothalamo-pituitary-adrenal axis in acute myocardial infarction treated by percutaneous transluminal coronary angioplasty: effect of time of presentation." J Endocrinol Invest **26**(5): 407-13.
- Parcellier, A., L. A. Tintignac, et al. (2008). "PKB and the mitochondria: AKTing on apoptosis." Cellular Signalling **20**(1): 21-30.
- Pariante, C. M. (2003). "Depression, stress and the adrenal axis." Journal of Neuroendocrinology **15**(8): 811-2.
- Park, J. L. and B. R. Lucchesi (1999). "Mechanisms of myocardial reperfusion injury." Ann Thorac Surg **68**(5): 1905-12.
- Pass, H. I., D. Mew, et al. (1995). "The macrophage, TNF, and other cytokines." Chest Surg Clin N Am **5**(1): 73-90.
- Pastorino, J. G., S. T. Chen, et al. (1998). "The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition." J Biol Chem **273**(13): 7770-5.
- Patapoutian, A. and L. F. Reichardt (2001). "Trk receptors: mediators of neurotrophin action." Curr Opin Neurobiol **11**(3): 272-80.
- Patterson, P. H. and H. Nawa (1993). "Neuronal differentiation factors/cytokines and synaptic plasticity." Cell **72** **Suppl**: 123-37.
- Paxinos, G. and C. Watson (1986). The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego, Academic Press.
- Pepin, M. C., M. V. Govindan, et al. (1992). "Increased glucocorticoid receptor gene promoter activity after antidepressant treatment." Mol Pharmacol **41**(6): 1016-22.

- Petrich, E. R. and O. F. Schanne (1996). Electrophysiological responses to ischemia and reperfusion. Myocardial Ischemia: Mechanisms, Reperfusion, Protection. M. Karmazyn. Basel-Boston- Berlin, Birkhäuser: 87.
- Pettus, B. J., J. Bielawski, et al. (2003). "The sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate pathway mediates COX-2 induction and PGE2 production in response to TNF-alpha." FASEB Journal **17**(11): 1411-21.
- Piletz, J. E., H. Zhu, et al. (2000). "Elevated P-selectin on platelets in depression: response to bupropion." J Psychiatr Res **34**(6): 397-404.
- Pitkanen, A., M. Pikkarainen, et al. (2000). "Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review." Ann N Y Acad Sci **911**: 369-91.
- Pitkanen, A., V. Savander, et al. (1997). "Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala." Trends Neurosci **20**(11): 517-23.
- Pitzalis, M. V., M. Iacoviello, et al. (2001). "Depression but not anxiety influences the autonomic control of heart rate after myocardial infarction." Am Heart J **141**(5): 765-71.
- Porrino, L. J., A. M. Crane, et al. (1981). "Direct and indirect pathways from the amygdala to the frontal lobe in rhesus monkeys." J Comp Neurol **198**(1): 121-36.
- Porsolt, R. D. (2000). "Animal models of depression: utility for transgenic research." Reviews in the Neurosciences **11**(1): 53-8.
- Potter, W. Z. (1996). "Adrenoceptors and serotonin receptor function: relevance to antidepressant mechanisms of action." J Clin Psychiatry **57 Suppl 4**: 4-8.
- Price, J. L. (1986). "Subcortical projections from the amygdaloid complex." Advances in Experimental Medicine and Biology **203**: 19-33.
- Price, J. L. and D. G. Amaral (1981). "An autoradiographic study of the projections of the central nucleus of the monkey amygdala." J Neurosci **1**(11): 1242-59.
- Puffer, J. C. and J. M. McShane (1992). "Depression and chronic fatigue in athletes." Clin Sports Med **11**(2): 327-38.

- Puthalakath, H. and A. Strasser (2002). "Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins." Cell Death and Differentiation **9**(5): 505-12.
- Quyyumi, A. A., N. Dakak, et al. (1995). "Contribution of nitric oxide to metabolic coronary vasodilation in the human heart." Circulation **92**(3): 320-6.
- Raadsheer, F. C., J. J. van Heerikhuize, et al. (1995). "Corticotropin-releasing hormone mRNA levels in the paraventricular nucleus of patients with Alzheimer's disease and depression." Am J Psychiatry **152**(9): 1372-6.
- Raff, M. C. (1992). "Social controls on cell survival and cell death." Nature **356**(6368): 397-400.
- Raisman, R., M. S. Briley, et al. (1982). "3H-imipramine binding and serotonin uptake in platelets from untreated depressed patients and control volunteers." Psychopharmacology (Berl) **77**(4): 332-5.
- Raison, C. L., L. Capuron, et al. (2006). "Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression." Trends Immunol **27**(1): 24-31.
- Raison, C. L. and A. H. Miller (2003). "When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders." Am J Psychiatry **160**(9): 1554-65.
- Rajkowska, G. (2000). "Postmortem studies in mood disorders indicate altered numbers of neurons and glial cells." Biol Psychiatry **48**(8): 766-77.
- Rajkowska, G. and J. J. Miguel-Hidalgo (2007). "Gliogenesis and glial pathology in depression." CNS Neurol Disord Drug Targets **6**(3): 219-33.
- Rankin, J. A. (2004). "Biological mediators of acute inflammation." AACN Clinical Issues **15**(1): 3-17.
- Rathaus, M. and J. Bernheim (2002). "Oxygen species in the microvascular environment: regulation of vascular tone and the development of hypertension." Nephrol Dial Transplant **17**(2): 216-21.
- Rauch, S. L., B. A. van der Kolk, et al. (1996). "A symptom provocation study of posttraumatic stress disorder using positron emission tomography and script-driven imagery." Arch Gen Psychiatry **53**(5): 380-7.

- Reimer, K., J. Lowe, et al. (1977). "The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1- Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs." Circulation **56**: 786-794.
- Reimer, K. A., R. B. Jennings, et al. (1985). "Animal models for protecting ischemic myocardium: results of the NHLBI Cooperative Study. Comparison of unconscious and conscious dog models." Circ Res **56**(5): 651-65.
- Reimer, K. A., J. E. Lowe, et al. (1977). "The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs." Circulation **56**(5): 786-94.
- Ridker, P. M. (2001). "High-sensitivity C-reactive protein: potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease." Circulation **103**(13): 1813-8.
- Ridker, P. M., E. Danielson, et al. (2008). "Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein." New England Journal of Medicine **359**(21): 2195-207.
- Ridker, P. M., N. Rifai, et al. (2000). "Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men." Circulation **101**(15): 1767-72.
- Rivest, S. (2001). "How circulating cytokines trigger the neural circuits that control the hypothalamic-pituitary-adrenal axis." Psychoneuroendocrinology **26**(8): 761-88.
- Rivier, C. and S. Rivest (1993). "Mechanisms mediating the effects of cytokines on neuroendocrine functions in the rat." Ciba Foundation Symposium **172**: 204-20; discussion 220-5.
- Robbie, L. and P. Libby (2001). "Inflammation and atherothrombosis." Ann N Y Acad Sci **947**: 167-79; discussion 179-80.
- Roberts, M. J., I. S. Young, et al. (1990). "Transient release of lipid peroxides after coronary artery balloon angioplasty." Lancet **336**(8708): 143-5.
- Rodriguez, J. and Y. Lazebnik (1999). "Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme." Genes and Development **13**(24): 3179-84.
- Rogatsky, I., J. M. Trowbridge, et al. (1997). "Glucocorticoid receptor-mediated cell cycle arrest is achieved through distinct cell-specific transcriptional regulatory mechanisms." Mol Cell Biol **17**(6): 3181-93.

- Rolls, E., Treves, A. (1998). Neural networks and brain function. Oxford, Oxford University.
- Roose, S. P., A. H. Glassman, et al. (1989). "Depression, heart disease, and tricyclic antidepressants." J Clin Psychiatry **50 Suppl**: 12-6; discussion 17.
- Roth, K. A. (2001). "Caspases, apoptosis, and Alzheimer disease: causation, correlation, and confusion." Journal of Neuropathology and Experimental Neurology **60**(9): 829-38.
- Rothwell, N. J. and S. J. Hopkins (1995). "Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action." Trends Neurosci **18**(3): 130-6.
- Rousseau, G., D. Hebert, et al. (1993). "Importance of platelets in myocardial injury after reperfusion in the presence of residual coronary stenosis in dogs." Am Heart J **125**(6): 1553-63.
- Rugulies, R. (2002). "Depression as a predictor for coronary heart disease. a review and meta-analysis." Am J Prev Med **23**(1): 51-61.
- Russchen, F. T., D. G. Amaral, et al. (1987). "The afferent input to the magnocellular division of the mediodorsal thalamic nucleus in the monkey, *Macaca fascicularis*." J Comp Neurol **256**(2): 175-210.
- Russchen, F. T., I. Bakst, et al. (1985). "The amygdalostriatal projections in the monkey. An anterograde tracing study." Brain Res **329**(1-2): 241-57.
- Saarelainen, T., P. Hendolin, et al. (2003). "Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects." J Neurosci **23**(1): 349-57.
- Sah, P., E. S. Faber, et al. (2003). "The amygdaloid complex: anatomy and physiology." Physiol Rev **83**(3): 803-34.
- Saile, B., N. Matthes, et al. (2001). "The bcl, NFkappaB and p53/p21WAF1 systems are involved in spontaneous apoptosis and in the anti-apoptotic effect of TGF-beta or TNF-alpha on activated hepatic stellate cells." Eur J Cell Biol **80**(8): 554-61.
- Sairanen, M., G. Lucas, et al. (2005). "Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus." J Neurosci **25**(5): 1089-94.

- Saito, T., I. W. Rodger, et al. (2004). "Inhibition of COX pathway in experimental myocardial infarction." J Mol Cell Cardiol **37**(1): 71-7.
- Saito, T., I. W. Rodger, et al. (2000). "Inhibition of cyclooxygenase-2 improves cardiac function in myocardial infarction." Biochem Biophys Res Commun **273**(2): 772-5.
- Sale, E. M. and G. J. Sale (2008). "Protein kinase B: signalling roles and therapeutic targeting." Cell Mol Life Sci **65**(1): 113-27.
- Salvesen, G. S. and V. M. Dixit (1997). "Caspases: intracellular signaling by proteolysis." Cell **91**(4): 443-6.
- Samet, J. M., W. Reed, et al. (1996). "Induction of prostaglandin H synthase 2 in human airway epithelial cells exposed to residual oil fly ash." Toxicology and Applied Pharmacology **141**(1): 159-68.
- Santarelli, L., M. Saxe, et al. (2003). "Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants." Science **301**(5634): 805-9.
- Saper, C. B. and C. D. Breder (1992). "Endogenous pyrogens in the CNS: role in the febrile response." Prog Brain Res **93**: 419-28; discussion 428-9.
- Sartorius, N. (2001). "Concepts of depression: sporadic revolutions of continuous evolution." Hum Psychopharmacol **16**(S1): S3-S6.
- Sasaki, T., K. Kitagawa, et al. (2004). "Amelioration of hippocampal neuronal damage after transient forebrain ischemia in cyclooxygenase-2-deficient mice." J. Cereb Blood Flow Metab. **24**: 107-113.
- Saunders, R. C., D. L. Rosene, et al. (1988). "Comparison of the efferents of the amygdala and the hippocampal formation in the rhesus monkey: II. Reciprocal and non-reciprocal connections." J Comp Neurol **271**(2): 185-207.
- Savill, J. (1997). "Apoptosis in resolution of inflammation." Journal of Leukocyte Biology **61**(4): 375-80.
- Scalia, F. and S. S. Winans (1975). "The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals." J Comp Neurol **161**(1): 31-55.
- Schafer, A. I. and R. I. Handin (1979). "The role of platelets in thrombotic and vascular disease." Prog Cardiovasc Dis **22**(1): 31-52.

- Schall, T. J., M. Lewis, et al. (1990). "Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor." Cell **61**(2): 361-70.
- Schiepers, O. J., M. C. Wichers, et al. (2005). "Cytokines and major depression." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **29**(2): 201-17.
- Schildkraut, J. J. (1965). "The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence." Am J Psychiatry **122**(5): 509-22.
- Schlesinger, P. H., A. Gross, et al. (1997). "Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(21): 11357-62.
- Schmid-Schonbein, G. W. (2006). "Analysis of inflammation." Annu Rev Biomed Eng **8**: 93-131.
- Schroeder, C. P., H. Kadara, et al. (2006). "Involvement of mitochondrial and akt signaling pathways in augmented apoptosis induced by a combination of low doses of celecoxib and N-(4-hydroxyphenyl) retinamide in premalignant human bronchial epithelial cells." Cancer Res **66**(19): 9762-70.
- Schulze-Osthoff, K., A. C. Bakker, et al. (1992). "Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation." J Biol Chem **267**(8): 5317-23.
- Schulze-Osthoff, K., R. Beyaert, et al. (1993). "Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effects of TNF." EMBO Journal **12**(8): 3095-104.
- Schwartz, D. W. and C. P. Barry (1994). "Cellular communication through signal transduction: the background." Journal of Cardiovascular Nursing **8**(3): 1-27.
- Serhan, C. N. and J. Savill (2005). "Resolution of inflammation: the beginning programs the end." Nat Immunol **6**(12): 1191-7.
- Sheline, Y. I. (2003). "Neuroimaging studies of mood disorder effects on the brain." Biol Psychiatry **54**(3): 338-52.
- Sheline, Y. I., M. H. Gado, et al. (1998). "Amygdala core nuclei volumes are decreased in recurrent major depression." Neuroreport **9**(9): 2023-8.
- Sheline, Y. I., P. W. Wang, et al. (1996). "Hippocampal atrophy in recurrent major depression." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(9): 3908-13.

- Shen, A. C. and R. B. Jennings (1972). "Myocardial calcium and magnesium in acute ischemic injury." Am J Pathol **67**(3): 417-40.
- Shen, Y., T. J. Connor, et al. (1999). "Differential effect of chronic antidepressant treatments on lipopolysaccharide-induced depressive-like behavioural symptoms in the rat." Life Sci **65**(17): 1773-86.
- Sheng, H., J. Shao, et al. (1997). "Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2." Journal of Clinical Investigation **99**(9): 2254-9.
- Shi, C. J. and M. D. Cassell (1998). "Cascade projections from somatosensory cortex to the rat basolateral amygdala via the parietal insular cortex." J Comp Neurol **399**(4): 469-91.
- Shi, Y. (2002). "Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis." Molecular Cell **9**(3): 459-70.
- Shields, R. W., Jr. (1993). "Functional anatomy of the autonomic nervous system." J Clin Neurophysiol **10**(1): 2-13.
- Shimizu, E., K. Hashimoto, et al. (2003). "Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants." Biol Psychiatry **54**(1): 70-5.
- Shinmura, K., X. L. Tang, et al. (2000). "Cyclooxygenase-2 mediates the cardioprotective effects of the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(18): 10197-202.
- Siegel, S. and N. J. J. Castellan (1988). Nonparametric statistics. Boston, Mass, McGraw-Hill.
- Sinn, D. I., S. T. Lee, et al. (2007). "Combined neuroprotective effects of celecoxib and memantine in experimental intracerebral hemorrhage." Neurosci Lett **411**(3): 238-242. Epub 2006 Nov 22.
- Smith, R. A. and C. Baglioni (1987). "The active form of tumor necrosis factor is a trimer." J Biol Chem **262**(15): 6951-4.
- Smith, R. S. (1991). "The macrophage theory of depression." Medical Hypotheses **35**(4): 298-306.
- Smith, W. L., D. L. DeWitt, et al. (2000). "Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology." Annual Review of Biochemistry **69**: 145-82.

- Smucker, M. L., C. L. Tedesco, et al. (1988). "Demonstration of an imbalance between coronary perfusion and excessive load as a mechanism of ischemia during stress in patients with aortic stenosis." Circulation **78**(3): 573-82.
- Snyderman, R. and E. J. Goetzl (1981). "Molecular and cellular mechanisms of leukocyte chemotaxis." Science **213**(4510): 830-7.
- Solomon, S. D., J. J. McMurray, et al. (2005). "Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention." New England Journal of Medicine **352**(11): 1071-80.
- Spriggs, D. R., M. L. Sherman, et al. (1988). "Recombinant human tumor necrosis factor administered as a 24-hour intravenous infusion. A phase I and pharmacologic study." J Natl Cancer Inst **80**(13): 1039-44.
- Steele, J. D., J. Currie, et al. (2007). "Prefrontal cortical functional abnormality in major depressive disorder: a stereotactic meta-analysis." J Affect Disord **101**(1-3): 1-11.
- Suda, T., T. Takahashi, et al. (1993). "Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family." Cell **75**(6): 1169-78.
- Sugawara, T., M. Fujimura, et al. (1999). "Mitochondrial release of cytochrome c corresponds to the selective vulnerability of hippocampal CA1 neurons in rats after transient global cerebral ischemia." J Neurosci **19**(22): RC39.
- Sundar, S. K., M. A. Cierpial, et al. (1990). "Brain IL-1-induced immunosuppression occurs through activation of both pituitary-adrenal axis and sympathetic nervous system by corticotropin-releasing factor." J Neurosci **10**(11): 3701-6.
- Susin, S. A., H. K. Lorenzo, et al. (1999). "Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor." Nature **397**(6718): 441-6.
- Suzuki, E., F. Shintani, et al. (1996). "Induction of interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist mRNA by chronic treatment with various psychotropics in widespread area of rat brain." Neurosci Lett **215**(3): 201-4.
- Suzuki, S., M. Kaneko, et al. (1991). "Alterations in cardiac contractile proteins due to oxygen free radicals." Biochim Biophys Acta **1074**(1): 95-100.
- Svendsen, J. H. and P. J. Bjerrum (1992). "Effects of exogenous oxygen derived free radicals on myocardial capillary permeability, vascular tone, and incidence of ventricular arrhythmias in the canine heart." Cardiovasc Res **26**(12): 1181-8.

- Swaab, D. F., A. M. Bao, et al. (2005). "The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration." Ageing Res Rev **4**(2): 141-94.
- Swanson, L. W. and W. M. Cowan (1977). "An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat." J Comp Neurol **172**(1): 49-84.
- Swanson, L. W. and P. E. Sawchenko (1983). "Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei." Annual Review of Neuroscience **6**: 269-324.
- Swanson, L. W., P. E. Sawchenko, et al. (1983). "Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study." Neuroendocrinology **36**(3): 165-86.
- Swies, J., E. K. Omogbai, et al. (1990). "Occlusion and reperfusion-induced arrhythmias in rats: involvement of platelets and effects of calcium antagonists." J Cardiovasc Pharmacol **15**(5): 816-25.
- Takadera, T. and T. Ohyashiki (2006). "Prevention of rat cortical neurons from prostaglandin E2-induced apoptosis by glycogen synthase kinase-3 inhibitors." Neurosci Lett **400**(1-2): 105-9. Epub 2006 Feb 28.
- Takadera, T., H. Yumoto, et al. (2002). "Prostaglandin E2 induces caspase-dependent apoptosis in rat cortical cells." Neurosciences Letters **317**: 61-64.
- Tapia-Arancibia, L., F. Rage, et al. (2004). "Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function." Front Neuroendocrinol **25**(2): 77-107.
- Tavazzi, L., A. M. Zotti, et al. (1986). "The role of psychologic stress in the genesis of lethal arrhythmias in patients with coronary artery disease." Eur Heart J **7 Suppl A**: 99-106.
- Ter Horst, G. J. (1999). "Central autonomic control of the heart, angina, and pathogenic mechanisms of post-myocardial infarction depression." Eur J Morphol **37**(4-5): 257-66.
- Theroux, P., B. R. Chaitman, et al. (2000). "Inhibition of the sodium-hydrogen exchanger with cariporide to prevent myocardial infarction in high-risk ischemic situations. Main results of the GUARDIAN trial. Guard during ischemia against necrosis (GUARDIAN) Investigators." Circulation **102**(25): 3032-8.

- Thomas, C. C., M. Deak, et al. (2002). "High-resolution structure of the pleckstrin homology domain of protein kinase b/akt bound to phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate." Current Biology **12**(14): 1256-62.
- Thombs, B. D., E. B. Bass, et al. (2006). "Prevalence of depression in survivors of acute myocardial infarction." J Gen Intern Med **21**(1): 30-8.
- Thorburn, A. (2004). "Death receptor-induced cell killing." Cell Signal **16**(2): 139-44.
- Tsatsanis, C., A. Androulidaki, et al. (2006). "Signalling networks regulating cyclooxygenase-2." International Journal of Biochemistry and Cell Biology **38**(10): 1654-61.
- Tsirogianni, A. K., N. M. Moutsopoulos, et al. (2006). "Wound healing: immunological aspects." Injury **37 Suppl 1**: S5-12.
- Tsujimoto, Y., J. Cossman, et al. (1985). "Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma." Science **228**(4706): 1440-3.
- Tun-Kyi, A., J. Z. Qin, et al. (2008). "Arsenic trioxide down-regulates antiapoptotic genes and induces cell death in mycosis fungoides tumors in a mouse model." Ann Oncol **19**(8): 1488-94.
- Tune, J. D., M. W. Gorman, et al. (2004). "Matching coronary blood flow to myocardial oxygen consumption." J Appl Physiol **97**(1): 404-15.
- Tuomisto, T. T., M. S. Riekkinen, et al. (2005). "Analysis of gene and protein expression during monocyte-macrophage differentiation and cholesterol loading--cDNA and protein array study." Atherosclerosis **180**(2): 283-91.
- Turner, B. H., K. C. Gupta, et al. (1978). "The locus and cytoarchitecture of the projection areas of the olfactory bulb in *Macaca mulatta*." J Comp Neurol **177**(3): 381-96.
- Valentine, A. D., C. A. Meyers, et al. (1998). "Mood and cognitive side effects of interferon-alpha therapy." Seminars in Oncology **25**(1 Suppl 1): 39-47.
- van Heerde, W. L., S. Robert-Offerman, et al. (2000). "Markers of apoptosis in cardiovascular tissues: focus on Annexin V." Cardiovasc Res **45**(3): 549-59.
- Van Ostade, X., P. Vandenabeele, et al. (1993). "Human TNF mutants with selective activity on the p55 receptor." Nature **361**(6409): 266-9.

- Vane, J. and R. Botting (1987). "Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs." FASEB Journal **1**(2): 89-96.
- Vane, J. R. (1971). "Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs." Nat New Biol **231**(25): 232-5.
- Vane, J. R., Y. S. Bakhle, et al. (1998). "Cyclooxygenases 1 and 2." Annual Review of Pharmacology and Toxicology **38**: 97-120.
- Vane, J. R. and R. M. Botting (1998). "Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action." Inflammation Research **47 Suppl 2**: S78-87.
- Vaugeois, J. M., M. El Yacoubi, et al. (2004). "[Comments on an animal model of depression]." Annales Pharmaceutiques Francaises **62**(5): 332-42.
- Vaux, D. L. and A. Strasser (1996). "The molecular biology of apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(6): 2239-44.
- Verhagen, A. M., P. G. Ekert, et al. (2000). "Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins." Cell **102**(1): 43-53.
- Verma, S., A. Maitland, et al. (2002). "Novel cardioprotective effects of tetrahydrobiopterin after anoxia and reoxygenation: Identifying cellular targets for pharmacologic manipulation." J Thorac Cardiovasc Surg **123**(6): 1074-83.
- Verrier, R. (1990). Behavioral stress, myocardial ischemia, and arrhythmias. Cardiac electrophysiology from cell to bedside. D. Zipes and J. Jalife. Philadelphia, Sanders Co: 343-352.
- Videbech, P. and B. Ravnkilde (2004). "Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies." Am J Psychiatry **161**(11): 1957-66.
- Videbech, P., B. Ravnkilde, et al. (2001). "The Danish PET/depression project: PET findings in patients with major depression." Psychol Med **31**(7): 1147-58.
- Videbech, P., B. Ravnkilde, et al. (2002). "The Danish PET/depression project: clinical symptoms and cerebral blood flow. A regions-of-interest analysis." Acta Psychiatr Scand **106**(1): 35-44.
- Vilcek, J. and T. H. Lee (1991). "Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions." J Biol Chem **266**(12): 7313-6.

- Vinten-Johansen, J. (2004). "Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury." Cardiovascular Research **61**(3): 481-97.
- Wagdy, H. M. and T. F. Christian (1996). "Determinants of infarct size in acute myocardial infarction in patients treated with reperfusion therapy." Curr Opin Cardiol **11**(4): 369-77.
- Wajant, H., K. Pfizenmaier, et al. (2003). "Tumor necrosis factor signaling." Cell Death and Differentiation **10**(1): 45-65.
- Wan, W., L. Wetmore, et al. (1994). "Neural and biochemical mediators of endotoxin and stress-induced c-fos expression in the rat brain." Brain Research Bulletin **34**(1): 7-14.
- Wang, S. and W. S. El-Deiry (2003). "TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors." Oncogene **22**(53): 8628-33.
- Wann, B. P., T. M. Bah, et al. (2007). "Vulnerability for apoptosis in the limbic system after myocardial infarction in rats: a possible model for human postinfarct major depression." J Psychiatry Neurosci **32**(1): 11-6.
- Wann, B. P., T. M. Bah, et al. (2007). "Vulnerability for apoptosis in the limbic system after myocardial infarction in rats: a possible model for human postinfarct major depression." J Psychiatry Neurosci **32**(1): 11-6.
- Wann, B. P., T. M. Bah, et al. (2008). "Behavioural signs of depression and apoptosis in the limbic system following myocardial infarction: Effects of sertraline." Journal of Psychopharmacology: in press.
- Wann, B. P., T. M. Bah, et al. (2009). "Behavioural signs of depression and apoptosis in the limbic system following myocardial infarction: effects of sertraline." J Psychopharmacol **23**(4): 451-9.
- Wann, B. P., S. G. Béland, et al. (2004). "Permeability in the limbic system following myocardial infarction in the rat." Society for Neuroscience 34th Annual meeting: #568.4.
- Wann, B. P., M. Boucher, et al. (2006). "Apoptosis detected in the amygdala following myocardial infarction in the rat." Biol Psychiatry **59**(5): 430-3.
- Watkins, L. L. and P. Grossman (1999). "Association of depressive symptoms with reduced baroreflex cardiac control in coronary artery disease." Am Heart J **137**(3): 453-7.

- Weber, K. T. and J. S. Janicki (1979). "The metabolic demand and oxygen supply of the heart: physiologic and clinical considerations." Am J Cardiol **44**(4): 722-9.
- Weidman, D., J. Shaw, et al. (2008). "Chapter 16 dissecting apoptosis and intrinsic death pathways in the heart." Methods Enzymol **446**: 277-85.
- Weinblatt, M. E., J. M. Kremer, et al. (1999). "A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate." New England Journal of Medicine **340**(4): 253-9.
- Weiss, J. N., P. Korge, et al. (2003). "Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease." Circ Res **93**(4): 292-301.
- Weissmann, G., J. E. Smolen, et al. (1980). "Release of inflammatory mediators from stimulated neutrophils." N Engl J Med **303**(1): 27-34.
- Welin, C., G. Lappas, et al. (2000). "Independent importance of psychosocial factors for prognosis after myocardial infarction." J Intern Med **247**(6): 629-39.
- Wetmore, C., Y. H. Cao, et al. (1991). "Brain-derived neurotrophic factor: subcellular compartmentalization and interneuronal transfer as visualized with anti-peptide antibodies." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(21): 9843-7.
- Weyrich, A. S., G. A. Solis, et al. (1992). "Platelet amplification of vasospasm." Am J Physiol **263**(2 Pt 2): H349-58.
- Whalen, P. J., S. L. Rauch, et al. (1998). "Masked presentations of emotional facial expressions modulate amygdala activity without explicit knowledge." J Neurosci **18**(1): 411-8.
- Whyte, E. M., B. G. Pollock, et al. (2001). "Influence of serotonin-transporter-linked promoter region polymorphism on platelet activation in geriatric depression." Am J Psychiatry **158**(12): 2074-6.
- Wichers, M. C. and M. Maes (2004). "The role of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in the pathophysiology of interferon-alpha-induced depression." J Psychiatry Neurosci **29**(1): 11-7.
- Wieseler-Frank, J., S. F. Maier, et al. (2005). "Immune-to-brain communication dynamically modulates pain: physiological and pathological consequences." Brain Behav Immun **19**(2): 104-11.

- Wilensky, A. E., G. E. Schafe, et al. (2006). "Rethinking the fear circuit: the central nucleus of the amygdala is required for the acquisition, consolidation, and expression of Pavlovian fear conditioning." J Neurosci **26**(48): 12387-96.
- Williams, T. W. and G. A. Granger (1968). "Lymphocyte in vitro cytotoxicity: lymphotoxins of several mammalian species." Nature **219**(5158): 1076-7.
- Willner, P. (1997). "Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation." Psychopharmacology (Berl) **134**(4): 319-29.
- Willner, P., A. Towell, et al. (1987). "Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant." Psychopharmacology (Berl) **93**(3): 358-64.
- Wolter, K. G., Y. T. Hsu, et al. (1997). "Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis." Journal of Cell Biology **139**(5): 1281-92.
- Wong, E., C. Bayly, et al. (1997). "Conversion of prostaglandin G/H synthase-1 into an enzyme sensitive to PGHS-2-selective inhibitors by a double His513 --> Arg and Ile523 --> val mutation." J Biol Chem **272**(14): 9280-6.
- Wyatt, R. J., B. Portnoy, et al. (1971). "Resting plasma catecholamine concentrations in patients with depression and anxiety." Arch Gen Psychiatry **24**(1): 65-70.
- Xia, Z., J. W. DePierre, et al. (1996). "Tricyclic antidepressants inhibit IL-6, IL-1 beta and TNF-alpha release in human blood monocytes and IL-2 and interferon-gamma in T cells." Immunopharmacology **34**(1): 27-37.
- Yamagata, K., K. I. Andreasson, et al. (1993). "Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids." Neuron **11**(2): 371-86.
- Yan, N. and Y. Shi (2005). "Mechanisms of apoptosis through structural biology." Annual Review of Cell and Developmental Biology **21**: 35-56.
- Yoshida, H., Y. Y. Kong, et al. (1998). "Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development." Cell **94**(6): 739-50.
- Young, L. T. (2002). "Neuroprotective effects of antidepressant and mood stabilizing drugs." J Psychiatry Neurosci **27**(1): 8-9.

- Young, L. T., D. Bakish, et al. (2002). "The neurobiology of treatment response to antidepressants and mood stabilizing medications." J Psychiatry Neurosci **27**(4): 260-5.
- Zakzanis, K. K., L. Leach, et al. (1998). "On the nature and pattern of neurocognitive function in major depressive disorder." Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol **11**(3): 111-9.
- Zamzami, N., C. Brenner, et al. (1998). "Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins." Oncogene **16**(17): 2265-82.
- Zhang, J. and S. Rivest (1999). "Distribution, regulation and colocalization of the genes encoding the EP2- and EP4-PGE2 receptors in the rat brain and neuronal responses to systemic inflammation." European Journal of Neuroscience **11**(8): 2651-68.
- Zhang, J. and S. Rivest (2002). "Is survival possible without arachidonate metabolites in the brain during systemic infection?" News Physiol. Sci **18**: 137-142.
- Zhang, J. and S. Rivest (2003). "Is survival possible without arachidonate metabolites in the brain during systemic infection?" News Physiol Sci **18**: 137-42.
- Zhang, Z., G. H. Lai, et al. (2004). "Celecoxib-induced apoptosis in rat cholangiocarcinoma cells mediated by Akt inactivation and Bax translocation." Hepatology **39**(4): 1028-37.
- Zhao, W., S. Iskandar, et al. (2007). "Knocking out peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha inhibits radiation-induced apoptosis in the mouse kidney through activation of NF-kappaB and increased expression of IAPs." Radiat Res **167**(5): 581-91.
- Zhao, Z. Q., M. Nakamura, et al. (2000). "Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death." Cardiovasc Res **45**(3): 651-60.
- Zhivotovsky, B., S. Orrenius, et al. (1998). "Injected cytochrome c induces apoptosis." Nature **391**(6666): 449-50.
- Zhu, W., A. Cowie, et al. (1996). "Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types." EMBO Journal **15**(16): 4130-41.
- Zidek, Z. (1999). "Adenosine - cyclic AMP pathways and cytokine expression." European Cytokine Network **10**(3): 319-28.

