



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

~~S/Mz~~ S/Mz
96/55
UNIVERSITE DE METZ

Centre des Sciences de l'Environnement



Thèse pour l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE

Mention: PHARMACOLOGIE

***EFFET DE LA FLUOXETINE SUR CERTAINS COMPOSES
SEROTONINERGIQUES ET CATECHOLAMINERGIQUES, DOSES PAR
CLHP, LORS D'UNE ETUDE CLINIQUE CHEZ DES PATIENTS
MELANCOLIQUES ET D'UNE DEPRESSION PROVOQUEE CHEZ
LE RAT.***

Soutenue

le 27 novembre 1996

par

Roland BOURDEAUX

JURY

M. R. LEHR	Directeur de Recherche CNRS, Nancy (Président)
M. B. CAPOLAGHI	Chef de Service au CHR de Metz-Thionville
M. D. D	es, Université de Nancy I
M. F. M	NPL, Nancy (Rapporteur)
M. A. N	té de Nancy I (Rapporteur)
M. C. YOUNOS	Professeur, Université de Metz (Directeur de thèse)

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE DE METZ



022 420564 7

14/62/11

UNIVERSITE DE METZ

Centre des Sciences de l'Environnement

Thèse pour l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE

Mention: PHARMACOLOGIE

***EFFET DE LA FLUOXETINE SUR CERTAINS COMPOSES
SEROTONINERGIQUES ET CATECHOLAMINERGIQUES, DOSES PAR
CLHP, LORS D'UNE ETUDE CLINIQUE CHEZ DES PATIENTS
MELANCOLIQUES ET D'UNE DEPRESSION PROVOQUEE CHEZ
LE RAT.***

Soutenue
le 27 novembre 1996
par

Roland BOURDEAUX

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	19961105
Cote	DM3 96/55
Loc	Magasin

JURY

M. R. LEHR

M. B. CAPOLAGHI

M. D. DESOR

M. F. MOLLEYRE

M. A. NICOLAS

M. C. YOUNOS

Directeur de Recherche CNRS, Nancy (Président)

Chef de Service au CHR de Metz-Thionville

Maître de Conférences, Université de Nancy I

Professeur, ENSIC-INPL, Nancy (Rapporteur)

Professeur, Université de Nancy I (Rapporteur)

Professeur, Université de Metz (Directeur de thèse)

AVANT PROPOS

Mr Paul LEHR

Directeur de recherche au CNRS

Président du jury

Nous vous remercions pour vos conseils très précieux et votre bienveillance à notre égard. D'une grande disponibilité et alliant la compétence à la rigueur scientifique, la précision de votre raisonnement nous a permis d'admirer la performance d'un esprit de synthèse clair et structuré. Nous vous prions de considérer ce travail que vous avez guidé avec indulgence comme le témoignage de notre profonde estime.

Mr Chafique YOUNOS

Professeur à l'Université de Metz

Directeur de thèse

Votre gentillesse et l'étendue de vos connaissances vous ont fait accepter de diriger cette thèse avec beaucoup d'indulgence. Tout au long de ce travail, nous avons apprécié votre disponibilité et vos compétences. Vous nous avez toujours accueillis dans votre service avec une continuelle simplicité et bienveillance pendant de nombreux mois. Pour la compréhension et pour l'intérêt que vous avez témoignés à notre travail, recevez nos remerciements les plus sincères.

Mr François MOLLEYRE
Professeur à l'ENSIC-INPL de Nancy
Rapporteur

Vous nous avez accueillis avec bienveillance et nous vous remercions d'avoir accepté d'être juge de notre travail. Vous avez trouvé le temps de vous intéresser à notre sujet, malgré vos nombreuses obligations. Nous vous remercions de votre confiance, pour les conseils éclairés et l'attention bienveillante avec laquelle vous avez corrigé notre travail.

Mr Alain NICOLAS
Professeur à la Faculté de Pharmacie de Nancy
Rapporteur

Vous nous avez fait le grand honneur de siéger dans ce jury. Qu'il nous soit permis de saluer votre gentillesse et votre disponibilité malgré vos nombreuses obligations. Nous vous remercions pour l'intérêt que vous avez porté à notre travail, de vos conseils, de votre compréhension dans la réalisation de cette thèse et l'attention bienveillante avec laquelle vous avez corrigé notre travail.

Mr Daniel DESOR
Maitre de Conférence à l'Université Nancy I

Nous vous remercions d'avoir accepté de juger notre thèse, pour l'aide et le soutien que vous nous avez apportés tout au long de son l'élaboration. Vos compétences et votre complicité nous ont été indispensables pour la réalisation de ce travail, et tout particulièrement dans le traitement statistique de notre thèse. Nous vous en sommes très reconnaissants.

Mr Bernard CAPOLAGHI

Chef de service au CHR de Metz-Thionville

Votre dynamisme, compétence et votre gentillesse nous ont permis de travailler dans les meilleures conditions au sein de votre laboratoire. Travailler dans un service comme le vôtre a été jusqu'à présent d'un grand enrichissement. Vous avez toujours bien voulu nous guider et nous conseiller dans la réalisation de cette thèse. C'est un honneur pour nous de vous avoir dans notre jury; nous vous en remercions sincèrement.

Mr Pascal PANNETIER

Praticien Hospitalier au CHS de Jury

Vous avez été l'investigateur de ce travail et vous nous avez apporté une aide précieuse pour la partie clinique et psychiatrique. Vos conseils et votre amabilité nous ont été très précieux. Nous vous en sommes très reconnaissants.

Mr Michael MESSAOUDI

Directeur de ETAP Ethologie Appliquée, Nancy

Vous nous avez fait l'honneur de nous recevoir au sein de votre équipe pour mener à bien notre travail et plus particulièrement l'étude comportementale. Nous vous remercions pour vos conseils très précieux et votre bienveillance à notre égard. Recevez nos remerciements les plus sincères.

A tous ceux qui, d'une façon ou d'une autre, ont contribué à la réalisation de ce travail.

A toi Sylvie

Sans ton immense compréhension, ce travail n'aurait pas été possible.

A Cécile et Julie

A toute ma famille

Tout le développement analytique, ainsi que les dosages biocliniques ont été réalisés au sein de l'unité de chromatographie du laboratoire de biochimie de l'hôpital Bel Air (Thionville).

Les patients mélancoliques ont été sélectionnés au sein du service de psychiatrie de l'hôpital Bel Air.

Le protocole d'action de la fluoxétine (doses variables) et de la norfluoxétine sur la sérotonine a été réalisé au sein du laboratoire d'éthnobotanique et de pharmacologie du Centre des Sciences de L'Environnement (Metz).

L'étude comportementale a été réalisée au sein de la société ETAP (Ethologie Appliquée) à Nancy.

La mise au point de la technique de dosage du MHPG urinaire a fait l'objet d'une publication dans la revue *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*.

LISTE DES FIGURES

- Figure 1: Synthèse et dégradation de la sérotonine
- Figure 2: Synapse sérotoninergique
- Figure 3: Transmission sérotoninergique lors d'une dépression
- Figure 4: Voie catabolique vers le MHPG
- Figure 5: Schématisation du catabolisme des catécholamines
- Figure 6: Le MHPG et ses conjugués
- Figure 7: Durée de la diminution du 5-HIAA par la FL (10 mg/kg i.p.), comparée aux concentrations cérébrales de FL (blanc), et celles de NFL (gris) à 1,6 et 24 h chez le rat (n = 5)
- Figure 8: Schéma d'extraction de la fluoxétine et de la norfluoxétine dans le sérum chez l'Homme et le Rat.
- Figure 9: Chromatogramme test de séparation de la fluoxétine et de certains composés (1: norfluoxétine; 2: cyamémazine; 3: fluoxétine; 4: fluphénazine; 5: chlorpromazine)
- Figure 10: Chromatogramme type d'un extrait de sérum humain (NFL: 252 µg/l; FL: 133 µg/l)
- Figure 11: Chromatogramme type d'un sérum extrait de rat (NFL: 256 µg/l; FL: 165 µg/l)
- Figure 12: Courbe d'étalonnage de la fluoxétine et de la norfluoxétine (n = 5): NFL (—); FL (---)
- Figure 13: Influence du pH sur la séparation chromatographique de la FL et de la NFL
- Figure 14: Influence de la molarité du tampon sur la séparation chromatographique de la FL et de la NFL
- Figure 15: Influence du % d'acétonitrile sur la séparation chromatographique de la FL et de la NFL
- Figure 16: Schéma d'extraction de la sérotonine plaquettaire
- Figure 17: Chromatogramme type visualisant un extrait de P.R.P contenant 210 µg/l de sérotonine.

- Figure 18: Courbe d'étalonnage de la sérotonine plaquettaire (n = 5)
- Figure 19: Etude du potentiel d'oxydation de la sérotonine
- Figure 20: Schéma d'oxydation électrochimique de la sérotonine
- Figure 21: Influence du pH sur la séparation chromatographique de la sérotonine
- Figure 22: Influence de la molarité du tampon sur la séparation chromatographique de la sérotonine
- Figure 23: Schéma simplifié de la méthode de synthèse de l'ISO-MHPG.
- Figure 24: Extrait brut passé sur colonne préparative
- Figure 25: Spectre de la fraction 2 passée en CG-SM
- Figure 26: Spectre de la fraction 1 passée en CG-SM
- Figure 27: Chromatogramme test contenant le MHPG et l'ISO-MHPG.
- Figure 28: Schéma simplifié du mode d'extraction du MHPG plasmatique et urinaire
- Figure 29: Chromatogrammes types après extraction de a: solution étalon de MHPG-S à 1 mg/l; b: urine contenant 1,2 mg/l de MHPG-S après hydrolyse.
- Figure 30: Chromatogrammes types après extraction de a: solution étalon de MHPG-S à 25 µg/l; b: plasma contenant 13,6 µg/l de MHPG-S après hydrolyse.
- Figure 31a: Gamme étalon du dosage du MHPG-L urinaire (n = 5)
- Figure 32a: Gamme étalon du dosage du MHPG-L plasmatique (n = 5)
- Figure 32b: Gamme étalon du dosage du MHPG-S plasmatique (n = 5)
- Figure 33: Influence du pourcentage d'hexane sur le rendement d'extraction du MHPG
- Figure 34: Variation du contrôle urinaire dans le temps concernant le MHPG libre et conjugué
- Figure 35: Etude par ampérométrie du choix du potentiel d'oxydation de l' ISO-MHPG et MHPG
- Figure 36: Schéma d'oxydation électrochimique du MHPG
- Figure 37: Influence de la température sur la séparation chromatographique du MHPG
- Figure 38: Influence du pH du tampon sur la séparation chromatographique du MHPG et ISO-MHPG
- Figure 39: Influence de la molarité du tampon sur la séparation chromatographique du MHPG et ISO-MHPG

- Figure 40: Schéma d'extraction de la sérotonine, du 5 - HIAA, de la fluoxétine et de la norfluoxétine dans le cerveau de rat.
- Figure 41: Chromatogramme type après extraction de NFL et de FL dans le cerveau de rat (NFL: 22,1 µg/g de cerveau; FL: 19,2 µg/g de cerveau)
- Figure 42: Chromatogrammes types après extraction de 5-HIAA (A) et de 5-HT (B) dans un cerveau de rat.
A: 5-HIAA (8,54 min), EI (11,40 min); (5-HIAA: 0,54 µg/g de cerveau)
B: 5-HT (8,45 min), EI (10,54 min); (5-HT: 0,44 µg/g de cerveau)
- Figure 43: Gamme étalon du dosage de NFL et de FL dans le cerveau de rat (n = 5)
(NFL: — ; FL: - - -)
- Figure 44: Gamme étalon du dosage de 5-HT et 5-HIAA dans le cerveau de rat (n = 5)
(5 - HT: — ; 5 - HIAA: - - -)
- Figure 45: Etude du potentiel d'oxydation du 5-HIAA et du 5-HICA.
- Figure 46: Corrélation de la fluoxétine dans le sang avec la dose administrée.
- Figure 47: Corrélation de la norfluoxétine dans le sang avec la dose administrée.
- Figure 48: Corrélation de la fluoxétine dans le cerveau avec la dose administrée.
- Figure 49: Corrélation de la norfluoxétine dans le cerveau avec la dose administrée.
- Figure 50: Corrélation entre les concentrations de fluoxétine dans le sang et le cerveau
- Figure 51: Corrélation entre les concentrations de norfluoxétine dans le sang et le cerveau

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I:	Affinité de la fluoxétine et d'autres antidépresseurs pour les récepteurs aux neurotransmetteurs marqués par des radioligands sur les membranes de cerveaux de rats.
Tableau II:	Répétabilité du MHPG-L et du MHPG-S urinaire
Tableau III:	Reproductibilité du MHPG-L et du MHPG-S urinaire
Tableau IV:	Répétabilité du MHPG-L et du MHPG-S plasmatiques
Tableau V:	Reproductibilité du MHPG-L et du MHPG-S plasmatiques
Tableau VI:	Corrélation entre MHPG mesuré et calculé dans les urines (mg/l)
Tableau VII:	Répétabilité et reproductibilité des différents composés dans le cerveau
Tableau VIII :	Fiche d'évaluation HDS / MES
Tableau IX :	Etude démographique des patients
Tableau X :	Evaluation des scores psychiatriques
Tableau XI:	Concentrations de sérotonine (PRP) dans le groupe contrôle et chez les patients mélancoliques ($\mu\text{g/l}$)
Tableau XII:	Valeurs de MHPG urinaire trouvées dans la littérature chez des sujets bien portants adultes (Moyenne $\pm$ E.T.: $\mu\text{g}/24\text{h}$)
Tableau XIII:	Concentrations urinaires de MHPG-T et de ses 3 fractions chez les patients mélancoliques et bien portants
Tableau XIV:	Valeurs de MHPG plasmatique ($\mu\text{g/l}$) trouvées dans la littérature chez des sujets bien portants adultes (Moyenne $\pm$ E.T.)
Tableau XV:	Concentrations plasmatiques de MHPG-T et de ses 3 fractions chez les patients mélancoliques et les sujets bien portants.
Tableau XVI:	Concentrations de FL et NFL dans le sérum à J ₂₁ ($\mu\text{g/l}$).
Tableau XVII:	Résultats de l'analyse discriminante avec 8 variables
Tableau XVIII:	Résultats de l'analyse discriminante avec 5 variables
Tableau XIX:	Valeurs de sérotonine plasmatique trouvées dans la littérature chez des rats non traités (moyenne $\pm$ E.T.: $\mu\text{g/ml}$)

- Tableau XX: Valeurs de sérotonine de cerveau de rat non traité, trouvées dans la littérature (moyenne $\pm$ E.T.: $\mu\text{g/g}$)
- Tableau XXI: Valeurs de 5-HIAA dans le cerveau de rat non traité, trouvées dans la littérature (moyenne $\pm$ E.T.: $\mu\text{g/g}$).
- Tableau XXII: Concentrations en sérotonine et 5-HIAA dans le sang et le cerveau de rat
- Tableau XXIII : Concentrations en NFL et FL obtenus dans le sang de rat
- Tableau XXIV : Concentrations en NFL et FL obtenus dans le cerveau de rat
- Tableau XXV: Schématisation du protocole expérimental utilisé lors du test de dépression
- Tableau XXVI: Nombre de leviers actif et inactif dans les tests 2 et 4 (Groupe B: n = 8)
- Tableau XXVII: Nombre de leviers actif et inactif dans les tests 2 et 4 (Groupe C: n = 8)
- Tableau XXVIII: Concentrations de sérotonine dans les cerveaux et plaquettes des rats
- Tableau XXIX: Schématisation du protocole expérimental utilisé lors du test de résignation
- Tableau XXX: Evolution des appuis sur le levier actif (LA) entre les tests 2 et 5.
- Tableau XXXI: Evolution des appuis sur le levier inactif (LI) entre les tests 2 et 5.
- Tableau XXXII: Evolution de la somme des appuis sur le levier actif (LA) et levier inactif (LI) entre les tests 2 et 5.
- Tableau XXXIII: Concentrations cérébrales de sérotonine et 5-HIAA et sérotonine plaquettaire lors du test de comportement de résignation
- Tableau XXXIV: Concentrations de norfluoxétine et de fluoxétine lors du test de comportement de résignation

ABREVIATIONS

A	Absorbance
AMP	Adénosine mono-phosphate
ANOVA	Analyse de variance
ATP	Adénosine tri-phosphate
CG-SM	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
CG-ECD	Chromatographie en phase gazeuse-détection à capture d'électrons
CLHP	Chromatographie liquide à haute performance
CLHP-EC	Chromatographie liquide à haute performance-détection électrochimique
CLHP-UV	Chromatographie liquide à haute performance-détection dans l'ultra-violet.
COMT	Catéchol-O-méthyl-transférase
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
C.V.	Coefficient de variation
DA	Dopamine
DHPG	3-4-dihydroxyphényléthylglycol
DOPA	3-[3,4-dihydroxyphényl) alanine]
DSM-III-R	Diagnostic and statistic manuel of mental disorders (3 ^{eme} édition révisée)
EDM	Etat dépressif majeur
E.I	Etalon interne
E.T	Ecart type
FL	Fluoxétine
5-HIAA	Acide 5-hydroxy-3-indolacétique
5-HICA	Acide 5-hydroxy-2-indolcarboxylique
HDS	Echelle de dépression d'Hamilton
5-HT	Sérotonine

5-HTP	5-hydroxytryptophane
HVA	Acide homovanillique
IMAO	Inhibiteur de la monoamine oxydase
i.p.	Intrapéritonéal
ISO-MHPG	4-Méthoxy-3-hydroxyphényléthylèneglycol
ISO-VMA	Acide 3-hydroxy-4-méthoxymandélique
J0	Avant traitement par la fluoxétine
J21	Après 21 jours de traitement par la fluoxétine
k'	Facteur de capacité
LA	Levier actif
LCR	Liquide céphalo rachidien
LI	Levier inactif
MAO	Monoamine-oxydase
MES	Echelle de mélancolie
MHPG	3-Méthoxy-4-hydroxyphénylglycol
MHPG-G	MHPG glucuronide
MHPG-L	MHPG libre
MHPG-S	MHPG sulfaté
MHPG-T	MHPG total
NA	Noradrénaline
NFL	Norfluoxétine
PMD	Psychose maniaco-dépressive
PRP	Plasma riche en plaquettes
SNC	Système nerveux central
s/s HDS	Sous échelle HDS
TCA	Acide trichloracétique
THF	Tétrahydrofurane
TMS	Triméthyl silyle
TMSI	N-triméthylsilyl-imidazole
Tr (min)	Temps de rétention en minutes
VMA	Acide 3-méthoxy-4-hydroxymandélique

SOMMAIRE

INTRODUCTION

2

PARTIE I: DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE I: FLUOXETINE

1. STRUCTURE CHIMIQUE ET PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

1.1. STRUCTURE CHIMIQUE	5
1.2. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES	5
1.3. RELATION STUCTURE-ACTIVITE	6

2. PHARMACOCINETIQUE

2.1. RESORPTION ET BIODISPONIBILITE	6
2.2. METABOLISME	6
2.2.1. Volume de distribution et liaison protéique	7
2.2.2. Demi-vie plasmatique et élimination	7
2.2.3. Interactions médicamenteuses	8

3. MECANISME D'ACTION

3.1. ACTION SUR LA SEROTONINE	
3.1.1. Inhibition de la recapture de la sérotonine	8
3.1.2. Action sur les plaquettes sanguines	9
3.1.3. Effet d'une administration de fluoxétine	10
3.2. ACTION SUR LES AUTRES NEUROMEDIATEURS	11

4. REVUE DES DIFFERENTES ETUDES CLINIQUES

4.1.	RESULTATS DES ETUDES CONTROLEES	11
4.2.	ANOMALIES BIOCHIMIQUES	12
4.3.	EVALUATION DE LA POSOLOGIE OPTIMALE	12

CHAPITRE II : NEUROMEDIATEURS

1. SEROTONINE

1.1.	METABOLISME DE LA SEROTONINE	13
1.2.	SYNAPSE SEROTONINERGIQUE	14
1.3.	SEROTONINE ET LES TROUBLES PSYCHIATRIQUES	
1.3.1.	Troubles psychiatriques	16
1.3.2.	Traitement de la dépression	17
1.4.	DONNEES CLINIQUES CONCERNANT LE 5-HIAA	18

2. 3-METHOXY-4-HYDROXYPHENYLGLYCOL

2.1.	SYNTHESE	19
2.2.	STRUCTURES CHIMIQUES	20
2.3.	MHPG ET REPONSE AU TRAITEMENT ANTIDEPRESSEUR	21
2.4.	REVUE DES DIFFERENTES ETUDES CLINIQUES	
2.4.1.	MHPG urinaire et antidépresseurs	22
2.4.2.	MHPG et sémiologie clinique	23
2.4.3.	MHPG plasmatique	24
2.4.4.	Relation entre taux de 5-HIAA et de MHPG	24

CHAPITRE III: DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES SUR LE RAT

1.	EFFET DES ANTIDEPRESSEURS CHEZ LE RAT	26
2.	ETUDES DE LA FLUOXETINE CHEZ LE RAT	
2.1.	AUGMENTATION DE LA FONCTION SEROTONINERGIQUE COMME CONSEQUENCE DE L'INHIBITION DE LA CAPTURE	28
2.2.	EFFICACITE DE LA FLUOXETINE SUR UN CERTAIN NOMBRE DE TESTS CHEZ L'ANIMAL	30
2.3.	CHANGEMENTS ADAPTATIFS DES RECEPTEURS AUX NEUROTRANSMETTEURS	31
3.	LA FLUOXETINE: UN INHIBITEUR SELECTIF DE RECAPTURE DE SEROTONINE LORS D'ETUDES SUR ANIMAL	32
	BUT DU TRAVAIL	33

PARTIE II: DEVELOPPEMENT ANALYTIQUE

1. MATERIELS

1.1.	REACTIFS	35
1.2.	SOLVANTS	35
1.3.	MATERIEL DIVERS	36
1.4.	MATERIEL CHROMATOGRAPHIQUE	
1.4.1.	CLHP	36
1.4.2.	CPG-MS	37
1.5.	DIVERS	
1.5.1.	Eau	37
1.5.2.	Mode d'extraction	37
1.5.3.	Centrifugation	37
1.5.4.	Filtration des phases mobiles	38
1.5.5.	Utilisation de la résine AG 1X4	38

2. DOSAGE DE LA FLUOXETINE

2.1.	PRINCIPE DE LA METHODE	39
2.2.	PRELEVEMENT	39
2.3.	SOLUTIONS ETALONS	39
2.4.	EXTRACTION	40
2.5.	CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES	42
2.6.	VALIDATION DE LA METHODE	44
2.7.	COMMENTAIRES SUR LA METHODE ANALYTIQUE	50

3. DOSAGE DE LA SEROTONINE

3.1.	PRINCIPE DE LA METHODE	55
3.2.	PREPARATION DES REACTIFS	55
3.3.	PRELEVEMENT	56
3.4.	EXTRACTION	57
3.5.	CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES	58
3.6.	VALIDATION DE LA METHODE	60
3.7.	EFFICACITE DE L'EXTRACTION - RENDEMENT	62

3.8.	DIVERS	62
3.9.	COMMENTAIRES SUR LA METHODE ANALYTIQUE	62
4.	DOSAGE DU MHPG LIBRE ET CONJUGUE	
4.1.	PRINCIPE DE LA METHODE	67
4.2.	SOLUTIONS ETALONS	67
4.3.	PREPARATION DE L' ISO-MHPG	69
4.4.	MODE DE PRELEVEMENT ET CONSERVATION	74
4.5.	EXTRACTION DU MHPG	
4.5.1.	MHPG-L urinaire	74
4.5.2.	MHPG conjugué urinaire	75
4.5.3.	MHPG-L plasmatique	75
4.5.4.	MHPG conjugué plasmatique	76
4.5.5.	Protocole opératoire	76
4.6.	CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES	78
4.7.	VALIDATION DE LA METHODE	
4.7.1.	MHPG urinaire	82
4.7.2.	MHPG plasmatique	85
4.8.	DISCUSSION SUR LA METHODE ANALYTIQUE	
4.8.1.	Etalon interne	89
4.8.2.	Choix de l'extraction	89
4.8.3.	Conditions chromatographiques	96
5.	METHODES DE DOSAGE DANS LE CERVEAU DE RAT	
5.1.	SOLUTIONS ETALONS	100
5.2.	SOLUTIONS D'EXTRACTION ET LAVAGE	100
5.3.	AUTRES SOLUTIONS	100
5.4.	EXTRACTION DES DIFFERENTS COMPOSES	
5.4.1.	Dans le cerveau	101
5.4.2.	Extraction de la fluoxétine et de son métabolite	102
5.4.3.	Extraction de la sérotonine	102
5.4.4.	Extraction du 5-HIAA	102

5.5.	CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES	104
5.6.	VALIDATION DE LA METHODE	106
5.7.	DISCUSSIONS SUR LA METHODE ANALYTIQUE	
5.7.1.	Extraction de la fluoxétine	110
5.7.2.	Extraction des neuromédiateurs	111

PARTIE III ETUDE CLINIQUE

CHAPITRE I : RESULTATS BIOCLINIQUES

1. RAPPELS SUR LA DEPRESSION ENDOGENE

1.1.	LA MELANCOLIE	115
1.2.	LA MANIE	116
1.3.	LES DEPRESSIONS DANS LE CADRE DE LA PMD	116

2. PROTOCOLE

2.1.	EXPERIMENTATION	117
2.2.	POSOLOGIE	117
2.3.	SURVEILLANCE ET ECHELLE D'EVALUATION	
2.3.1.	Protocole	118
2.3.2.	Echelle d'évaluation HDS/MES	119
2.4.	ETUDE STATISTIQUE	122

3. RESULTATS CLINIQUES

3.1.	PATIENTS	123
3.2.	SEROTONINE	
3.2.1.	Groupe de contrôle	125
3.2.2.	Résultats plaquettaires (PRP)	126
3.3.	MHPG URINAIRE	
3.3.1.	Groupe de contrôle	126
3.3.2.	MHPG urinaire chez les patients	128
3.4.	CREATININE URINAIRE	129
3.5.	MHPG PLASMATIQUE	
3.5.1.	Groupe de contrôle	129
3.5.2.	MHPG plasmatique chez les patients	132
3.6.	FLUOXETINE ET NORFLUOXETINE	133

CHAPITRE II : DISCUSSION

PARTIE I V

ETUDE EXPERIMENTALE SUR LE RAT

CHAPITRE I: ACTION DE LA FLUOXETINE (DOSES VARIABLES) ET DE LA NORFLUOXETINE (10 MG/KG) SUR LA SEROTONINE ET 5-HIAA.

1. PROTOCOLE	
1.1. EXPERIMENTATION	143
1.2. ANIMAUX	143
1.3. ADMINISTRATION DE LA FLUOXETINE	144
2. RESULTATS ANALYTIQUES	
2.1. GROUPES DE CONTROLE	
2.1.1. Sérotonine	144
2.1.2. 5-HIAA	146
2.2. SEROTONINE ET 5-HIAA	146
2.3. NORFLUOXETINE ET FLUOXETINE	
2.3.1. Sang	148
2.3.2. Cerveau	150
2.3.3. Prétraitement par le proadifen	151
2.3.4. Corrélation sang - cerveau	151
3. DISCUSSION	153

CHAPITRE II: EFFET "CURATIF" DE LA FLUOXETINE SUR LA DEPRESSION DANS LE TEST DU STIMULUS LUMINEUX AVERSIF INEVITABLE CHEZ LE RAT MALE WISTAR.

1. PROTOCOLE	
1.1. ANIMAUX	155
1.2. MATERIEL	156
1.2.1. Dispositif TESLA	156
1.2.2. Description technique de TESLA	156
1.2.3. Matériel	157
2. ANALYSES STATISTIQUES	158
3. DEFICIT COMPORTEMENTAL ET DEPLETION SEROTONINERGIQUE	
3.1. PROTOCOLE EXPERIMENTAL	158
3.2. RESULTATS	
3.2.1. Test d'évitement du stimulus lumineux aversif	159
3.2.2. Dosages biochimiques de la sérotonine	163
3.2.3. Discussion	164
4. EFFET DE LA FLUOXETINE SUR LE COMPOTEMENT DE RESIGNATION	
4.1. PROTOCOLE EXPERIMENTAL	165
4.2. RESULTATS	
4.2.1. Test d'évitement du stimulus lumineux aversif	166
4.2.2. Dosages biochimiques	171
4.2.3. Discussion	172

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

DEVELOPPEMENT ANALYTIQUE	176
ASPECTS CLINIQUES	177
EXPERIMENTATION SUR LE RAT	178
PUBLICATION	180
BIBLIOGRAPHIE	188

INTRODUCTION

De nombreuses études s'intéressent au domaine de la "psychiatrie biologique" en étudiant d'éventuelles relations entre les troubles dépressifs de l'humeur et une perturbation des neurotransmetteurs. Ceci a conduit à l'apparition de nouveaux traitements antidépresseurs, dont le mécanisme d'action est de plus en plus ciblé.

C'est ainsi que les travaux concernant la relation éventuelle entre une perturbation du métabolisme central de la sérotonine et la dépression, semblent aboutir à l'hypothèse la plus répandue " d'hyposérotoninergie" dans les troubles dépressifs de l'humeur, les comportements suicidaires, impulsifs, agressifs, compulsifs, bien que celle-ci soit controversée par certains auteurs. Toute une série de nouveaux antidépresseurs a été ainsi mise sur le marché et plus particulièrement des inhibiteurs de recapture de la sérotonine dont le chlorhydrate de fluoxétine (Prozac^R 20 mg; Laboratoires Lilly) fait partie. L'hétérogénéité symptomatique des syndromes dépressifs implique qu'un seul neuromédiateur ne puisse à lui seul, expliquer la physionomie clinique d'une dépression. De ce fait, il était particulièrement intéressant d'examiner les corrélations éventuelles entre la voie noradrénergique et les inhibiteurs de recapture de la sérotonine.

Depuis plus de dix ans, plusieurs molécules antidépressives dites "de nouvelle génération" ou "nouveaux antidépresseurs" ont été développées. Ces molécules sont le plus souvent aussi efficaces que les antidépresseurs classiques, mais contrairement à ceux-ci, n'ont pas d'effets secondaires.

Les molécules inhibitrices de la recapture de la sérotonine, constituent une classe relativement intéressante, au sein de laquelle la fluoxétine mérite tout particulièrement l'attention des cliniciens par une efficacité reconnue, une tolérance habituellement très bonne et une grande facilité d'emploi. En raison de la variabilité interindividuelle de la plupart des médicaments antidépresseurs, cette molécule n'est efficace que chez deux patients déprimés sur trois en moyenne.

Aussi est-il intéressant d'étudier la cause de cette variabilité et de savoir s'il existe un élément clinique permettant d'orienter le choix de la prescription. La fluoxétine étant essentiellement un antidépresseur sérotoninergique, agissant par inhibition sélective de la recapture de la sérotonine, dénué d'action sur les autres

systèmes de neurotransmission, il est intéressant d'envisager l'implication de la sérotonine dans la genèse des états dépressifs.

Les explorations monoaminergiques dans les dépressions sont essentiellement de trois types:

- études des monoamines et de leurs métabolites à travers leur dosage dans le sang, les urines, et le LCR (5-HIAA dans le LCR et sérotonine plaquettaire pour la sérotonine; MHPG, DHPG et noradrénaline pour la noradrénaline).
- études des activités enzymatiques du métabolisme monoaminergique (COMT et MAO)
- études des récepteurs ou des sites de liaison en rapport avec les systèmes monoaminergiques.

Les activités COMT et MAO semblent actuellement un mauvais indice biologique pour le diagnostic ou la compréhension de la dépression (Lûo et Colonna, 1988). De même la fluoxétine est pratiquement dénuée de toute action au niveau des récepteurs spécifiques des neurotransmetteurs.

Il est particulièrement intéressant d'examiner les corrélations éventuelles entre les taux de MHPG et les inhibiteurs spécifiques de la recapture de la sérotonine.

Un grand axe de recherche, concerne les systèmes sérotoninergiques. L'utilisation de molécules agissant spécifiquement sur ces systèmes reste jusqu'à présent relativement peu développée. Les inhibiteurs de la capture de la sérotonine qui sont étudiés, testés sur animal s'avèrent être relativement complexes à manier, notamment dans les modèles comportementaux.

PARTIE I

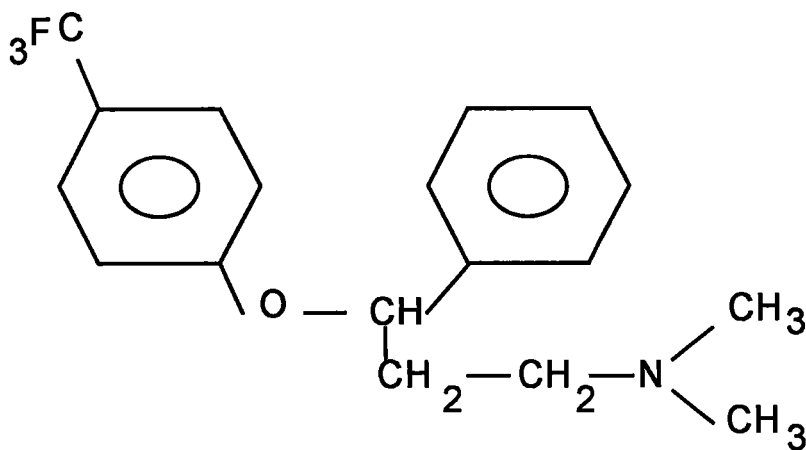
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE I : FLUOXETINE

1. STRUCTURE CHIMIQUE ET PROPRIETES PHYSICO - CHIMIQUES

1.1 STRUCTURE CHIMIQUE

La formule chimique ($C_{17}H_{18}F_3NO$) de la fluoxétine est la suivante:



Il s'agit de: (±)-N-méthyl-3,phényl-3,[(α,α,α-trifluoro-p-tolyl)-oxy]-propylamine].

C'est une phénylpropylamine à chaîne linéaire de masse moléculaire 345,79, sans rapport de structure avec les antidépresseurs tricycliques, tétracycliques ou les autres antidépresseurs précédemment commercialisés.

1.2 PROPRIETES PHYSICO - CHIMIQUES

Le chlorhydrate de fluoxétine est une poudre cristalline blanche ou blanc cassé, soluble dans l'eau à la concentration de 50 mg/ml, dans le méthanol à 250 mg/ml, dans le chloroforme à 125 mg/ml. Il est insoluble dans l'hexane, l'acétate d'éthyle et le benzène. Son pKa est de 9,5 dans 66 % de diméthylformamide pour 34 % d'eau. Son pH, en solution aqueuse saturée, est de 4,35. Son point de fusion est à 157,5 -

158,7 °C. Le chlorhydrate de fluoxétine reste stable pendant cinq ans à température ambiante.

1.3 RELATION STRUCTURE - ACTIVITE

La spécificité d'action de la fluoxétine sur la recapture de la sérotonine est surtout liée à la présence du substituant trifluorométhyl en para sur le reste phénoxy. Un analogue qui possède un substituant o-trifluorométhyl sur ce cycle est cent fois moins puissant que la fluoxétine (Wong et coll., 1975).

2. PHARMACOCINETIQUE

2.1 RESORPTION ET BIODISPONIBILITE

La fluoxétine est bien absorbée par voie orale. Les concentrations plasmatiques maximales sont atteintes environ six heures après la première administration.

La prise d'aliments, même si elle entraîne un léger retard d'absorption, n'affecte pas la biodisponibilité de la fluoxétine; il s'en suit que la fluoxétine peut être administrée indifféremment pendant ou en dehors des repas (Laboratoires Lilly France, 1989).

2.2 METABOLISME

La fluoxétine est essentiellement métabolisée par le foie. Elle est partiellement transformée par déméthylation en un métabolite actif, la norfluoxétine (desméthylfluoxétine) qui est elle aussi un inhibiteur puissant et spécifique de la recapture de la sérotonine.

La formation de norfluoxétine ne modifie pas la puissance ou la spécificité mais prolonge la durée d'inhibition de la capture de sérotonine après administration de fluoxétine (Schmidt et coll., 1988; Laboratoires Lilly France, 1989). Ceci est le cas pour la fluoxétine mais ne l'est pas pour d'autres molécules antidépressives. En effet, la clomipramine est un inhibiteur hautement sélectif de la capture de sérotonine alors que la desméthylclomipramine, son métabolite actif, est un inhibiteur sélectif de la capture en noradrénaline. La norziméldine est un inhibiteur plus puissant de la capture que la

zimélidine, les deux composés inhibent préférentiellement la capture de sérotonine. Dans tous les cas, le métabolisme est nécessaire pour une efficacité maximum *in vivo*. L'activité antidépressive est diminuée si le métabolisme est inhibé.

2.2.1 Volume de distribution et liaison protéique

La fluoxétine et son métabolite la norfluoxétine ont tous deux un volume de distribution compris entre 20 et 40 l/kg et une clairance plasmatique d'environ 20 l/heure pour la fluoxétine et 9 l/heure pour la norfluoxétine. Le pourcentage de liaison *in vitro* aux protéines plasmatiques, y compris à l'albumine et à l' α_1 -glycoprotéine acide, est d'environ 94 % (Laboratoires Lilly France, 1989).

2.2.2 Demi-vie plasmatique et élimination

Après administration orale à dose unique, la demi-vie de la fluoxétine est relativement longue: 2 à 3 jours pour la fluoxétine et 7 jours pour la norfluoxétine. Après administrations répétées, la demi-vie moyenne de la fluoxétine atteint 4 jours et reste toujours d'environ 7 jours pour la norfluoxétine (Laboratoires Lilly France, 1989). Les taux plasmatiques de fluoxétine et norfluoxétine augmentent jusqu'à l'obtention après deux à trois semaines d'un état d'équilibre. Lorsque la posologie est régulière et constante, les plateaux d'équilibre restent stables. Lorsque l'on modifie fortement le schéma thérapeutique, il faut attendre deux à trois semaines avant d'atteindre un nouvel état stationnaire. L'omission d'une prise de fluoxétine n'a pas de répercussion clinique significative. Malgré la longue demi-vie, il n'existe pas de phénomène d'accumulation (Laboratoires Lilly France, 1989).

L'étude des métabolites de la fluoxétine dans les urines a montré qu'environ 11% de la dose de ^{14}C étaient excrétés sous forme de fluoxétine (produit d'origine), 7 % environ sous forme de norfluoxétine, alors que 7 % et 8 % de la dose de ^{14}C étaient excrétés respectivement sous forme de fluoxétine et norfluoxétine conjuguées. Plus de 20 % de la radioactivité étaient excrétés dans les urines sous forme d'acide hippurique, un conjugué glyciné de l'acide benzoïque (Laboratoires Lilly France, 1989).

Chez des sujets âgés en bonne santé (65 à 77 ans), l'administration d'une prise unique n'a pas montré de différence pharmacocinétique avec des volontaires plus jeunes.

Chez l'insuffisant rénal, la pharmacocinétique de la fluoxétine et de la norfluoxétine n'est pas modifiée. Toutefois, en cas d'administration chronique, il peut se produire des phénomènes d'accumulation chez les insuffisants rénaux. Chez les sujets fonctionnellement anuriques, l'hémodialyse ne modifie pas l'élimination de la fluoxétine et de la norfluoxétine; elle est donc peu utile pour modifier à la baisse les taux sériques accidentellement élevés.

Chez l'insuffisant hépatique, les affections hépatiques ont tendance à ralentir le métabolisme de la fluoxétine et de la norfluoxétine. L'administration régulière chez les cirrhotiques montre que les demi-vies d'élimination moyennes de la fluoxétine et norfluoxétine passent respectivement de 4 à 7 jours et de 7 à 12 jours. Chez de tels patients, la dose de fluoxétine devrait être diminuée au moins de moitié, en l'administrant par exemple un jour sur deux (Laboratoires Lilly France, 1989).

2.2.3 Interactions médicamenteuses

La fluoxétine ne doit pas être utilisée en association avec les IMAO; un délai de quinze jours à trois semaines doit être respecté entre l'arrêt de l'IMAO et le début du traitement par la fluoxétine. En raison de la longue demi-vie de la fluoxétine et de son métabolite actif, il est impératif de respecter un délai de cinq semaines entre l'arrêt du traitement par la fluoxétine et l'instauration d'un traitement aux IMAO. L'examen des effets secondaires rapportés par les patients prenant de la fluoxétine seule ou en association ne permet pas de mettre en évidence d'interactions avec les analgésiques, les sédatifs, le lithium, les antibiotiques, les antiacides, les antihistaminiques, les diurétiques, les anti-H₂, les antihypertenseurs ou les hormones (Laboratoires Lilly France, 1989).

La fluoxétine inhibe la métabolisation des antidépresseurs tricycliques et éventuellement des neuroleptiques, pouvant ainsi augmenter leur toxicité. Des effets indésirables sur le comportement et le système nerveux se sont produits quand la fluoxétine était administrée avec du lithium, de l'halopéridol, du tryptophane ou de la carbamazépine. Comme la fluoxétine est fortement liée aux protéines, la warfarine et la digoxine peuvent être déplacées de leur site de liaison; la surveillance du temps de prothrombine et des concentrations de digoxine est recommandée, surtout au début et à l'arrêt d'un traitement à la fluoxétine (Laboratoires Lilly France, 1989).

3. MECANISME D'ACTION

3.1 ACTION SUR LA SÉROTONINE

3.1.1 Inhibition de la recapture de la sérotonine

Les études de pharmacologie précliniques de la fluoxétine ont montré que ce produit était un inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Seulement à des concentrations élevées, *in vivo*, la fluoxétine inhibe la recapture des catécholamines; par contre, *in vivo*, aux doses habituellement utilisées pour inhiber la recapture de la sérotonine, elle n'a aucun effet sur celle des catécholamines. Dans la mesure où elle inhibe la recapture de la sérotonine, la fluoxétine renforce la neurotransmission. Contrairement à de nombreux antidépresseurs, la fluoxétine n'a pas d'affinité pour d'autres neurorécepteurs, en particulier pour les récepteurs cholinergiques muscariniques, α -adrénergiques ou les récepteurs à l'histamine de type H_1 ; elle n'a pas d'action directe sur le cœur (Wong et coll., 1975; Fuller et Wong, 1977).

La fluoxétine agit sur la neurotransmission sérotoninergique en bloquant la pompe de la recapture. Cette inhibition entraîne une augmentation de la quantité de sérotonine active au niveau de la fente synaptique et des récepteurs sérotoninergiques. Cette augmentation de concentration provoque à son tour une stimulation accrue des récepteurs sérotoninergiques (Laboratoires Lilly France, 1989).

3.1.2 Action sur les plaquettes sanguines

Les plaquettes sanguines possèdent également un système de recapture de sérotonine identique à celui observé au niveau du système nerveux central (Bergstrom et coll., 1988). Les inhibiteurs de la recapture de sérotonine, dont la fluoxétine, se lient au niveau des molécules protéiques des transporteurs de sérotonine des membranes plaquettaires et inhibent cette recapture, indépendamment de la source plaquettaire. En effet une étude rapportée par Bergstrom et coll., (1988) a montré qu'un plasma libre de plaquettes obtenu à partir de sujets traités par la fluoxétine a la possibilité d'inhiber la recapture de sérotonine tritiée dans les plaquettes de sujets non traités. Cette propriété de recapture de sérotonine par les plaquettes peut être mise à profit pour mesurer le degré d'inhibition de recapture des antidépresseurs.

La fluoxétine inhibe la capture de la sérotonine dans les plaquettes sanguines sans inhiber le transporteur de capture de la noradrénaline. Etant donné que la sérotonine plaquettaire est obtenue entièrement par recapture et non par synthèse, l'inhibition de la recapture entraîne une baisse du taux de sérotonine dans les plaquettes (Fuller et Wong, 1987).

3.1.3 Effet d'une administration de fluoxétine

Des dosages plasmatiques de fluoxétine et norfluoxétine ont été réalisés dans le cadre de plusieurs essais cliniques. Il n'a pas été permis d'établir de rapport entre les concentrations en fluoxétine et l'efficacité clinique, ni de seuil de concentrations thérapeutiques (Lemberger et coll., 1985; Kelly et coll., 1989; Beasley et coll., 1990; Montgomery et coll., 1990; Fava et coll., 1992).

La fluoxétine a une cinétique non linéaire en ce sens que les plus fortes doses entraînent des augmentations de concentrations plasmatiques de fluoxétine et norfluoxétine qui ne sont pas proportionnelles (Bergstrom et coll., 1988). Chez l'Homme, les concentrations de norfluoxétine dans le plasma sont comparables à celles de la fluoxétine à l'état d'équilibre (Lemberger et coll., 1978; Feighner et Cohn, 1985). Ainsi la norfluoxétine contribue à l'inhibition de la capture de la sérotonine.

La fluoxétine (30 mg/jour pendant 7 jours) inhibe *ex vivo* la capture de sérotonine tritiée dans les plaquettes humaines (Lemberger et coll., 1978); comparée à la capture pendant la période de placebo, on a pu constater une inhibition de la capture d'environ 25% après la dose initiale, alors que les doses suivantes de fluoxétine entraînaient des inhibitions encore bien supérieures. Des inhibitions de 50% et 60% de la capture ont été mesurées respectivement après la troisième et la septième dose du produit. Les concentrations plasmatiques de fluoxétine et le degré d'inhibition de la capture étaient hautement corrélés.

Les études sur une grande échelle et à des doses fixes, suggèrent l'efficacité pratique d'une dose de 20 mg/jour de fluoxétine avec une diminution très appréciable d'effets secondaires si l'on compare avec des doses quotidiennes de 40 mg ou plus (Hall, 1988).

3.2 ACTION SUR LES AUTRES NEUROMEDIATEURS

L'action de la fluoxétine est très sélective: contrairement à la majorité des antidépresseurs, très peu d'effets sont observés sur la recapture des autres neurotransmetteurs au niveau des autres sites récepteurs (dopaminergiques, α -noradrénergiques).

4. REVUE DES DIFFERENTES ETUDES CLINIQUES

4.1 RESULTATS DES ETUDES CONTROLEES

La preuve de l'efficacité de la fluoxétine comme antidépresseur est largement démontrée et convaincante.

4.1.1 Fluoxétine versus placebo

Des essais multicentriques contrôles contre placebo (Cohn et Wilcox, 1985; Stark et Hardison, 1985; Fabre et Crismon, 1985; Rickels et coll., 1986; Wernicke et coll., 1987) ont pu démontrer que la fluoxétine et les antidépresseurs de référence étaient significativement supérieurs au placebo et qu'ils avaient à peu près le même niveau d'efficacité chez les patients.

4.1.2 Fluoxétine versus autres antidépresseurs

Amitriptyline: La plupart des études (Feighner, 1985; Chouinard, 1985; Young et coll., 1987; Ropert, 1989) concluent que la fluoxétine a un effet antidépresseur comparable à celui de l'amitriptyline avec une meilleure tolérance (absence d'effet anti-cholinergique) et une moindre incidence d'effets secondaires.

Imipramine: La comparaison avec l'imipramine a également été étudiée; Stark et Hardison (1985), Cohn et Wilcox (1985), concluent également à l'équivalence globale d'efficacité entre les deux produits.

Clomipramine: La comparaison avec la clomipramine (Ginestet, 1989; Ropert,

1989) a donné des résultats tout aussi comparables aussi bien en ce qui concerne l'efficacité globale des deux produits qu'en ce qui concerne leur tolérance.

L'ensemble de ces résultats confirme l'activité de la fluoxétine non seulement sur la composante dépressive, mais aussi sur la symptomatologie associée. Ils appellent cependant de nouveaux travaux de recherche propres à mieux définir le profil d'action original de cet antidépresseur.

4.2 ANOMALIES BIOCHIMIQUES

Les travaux concernant les anomalies biochimiques dans les dépressions sont multiples et nous ne pouvons pas les énumérer tous. Ces travaux dont il existe d'excellentes synthèses (Schildkraut, 1965; Tissot, 1975; Lipton et coll., 1978; Maas, 1978; Moussaoui, 1978; Zarifian et Cuche, 1980), visent essentiellement à la compréhension et à l'objectivation des mécanismes accompagnant ou sous-entendant le processus dépressif. L'étude des monoamines comme facteur prédictif de la réponse au traitement est essentiellement focalisé sur le dosage du 5-hydroxy-3-indolacétique (5-HIAA) dans le liquide céphalo rachidien (LCR), du 3-méthoxy-4-hydroxyphénylglycol (MHPG) dans les urines dont la majeure partie semble provenir de la noradrénaline cérébrale.

4.3 EVALUATION DE LA POSOLOGIE OPTIMALE QUOTIDIENNE

Les premières études ont utilisé des posologies qui allaient jusqu'à 80 mg, mais les essais suivants ont montré que celles-ci étaient inutilement élevées; les études à doses fixes de fluoxétine ont en fait démontré que les posologies les plus basses de 20 mg étaient efficaces avec l'avantage supplémentaire d'un minimum d'effets secondaires (Altamura et coll., 1988). Il se pourrait bien que le rapport optimum bénéfices/risques pour la plupart des patients se trouve dans une posologie quotidienne de 20 mg, et que seulement un tout petit nombre d'entre eux nécessitent des posologies supérieures (un seul cas à 40 mg dans notre étude lors d'une rechute).

CHAPITRE II : NEUROMEDIEATEURS

1. SEROTONINE

Il existe des arguments pour penser que la sérotonine (5-HT) est impliquée à la fois dans un grand nombre de troubles psychiatriques et dans certains comportements spécifiques qui, en eux-mêmes, ne peuvent pas être considérés comme pathologiques.

1.1 METABOLISME DE LA SEROTONINE

Le métabolisme de la sérotonine est schématisé sur la figure 1.

Le tryptophane, précurseur de la synthèse de la sérotonine provient exclusivement de l'alimentation. Il n'y a pas de synthèse de tryptophane dans le SNC. Le tryptophane est fortement lié à la sérum albumine (90 %) chez un individu normal, ceci pour un rôle particulier dans le contrôle de la biosynthèse de la sérotonine au niveau central. Seule la fraction libre, non liée, sert de précurseur à la biosynthèse de la sérotonine. Le tryptophane, apporté par la circulation sanguine, est transformé en 5-hydroxy-tryptophane (5-HTP) par la tryptophane hydroxylase qui est hautement spécifique. Le 5-HTP est rapidement décarboxylé en sérotonine par la décarboxylase. La sérotonine est dégradée par la MAO en 5-hydroxyindolacétaldéhyde puis en acide 5-hydroxyindolacétique (5-HIAA) par l'aldéhyde deshydrogénase.

La demi-vie de la sérotonine est variable d'un milieu biologique à l'autre; elle est de 33 heures dans les plaquettes, de 13 heures dans l'intestin et seulement de quelques minutes dans le cerveau. La sérotonine étant stockée dans les vésicules synaptiques, l'arrivée d'un potentiel d'action au niveau de la terminaison nerveuse provoque l'entrée d'ions calcium, qui par un mécanisme encore très largement inconnu, entraîne la libération du contenu vésiculaire en sérotonine qui se retrouve dans la fente synaptique. La sérotonine est également libérée à partir des corps cellulaires des neurones sérotoninergiques; cette libération est indépendante de l'activité électrique du neurone.

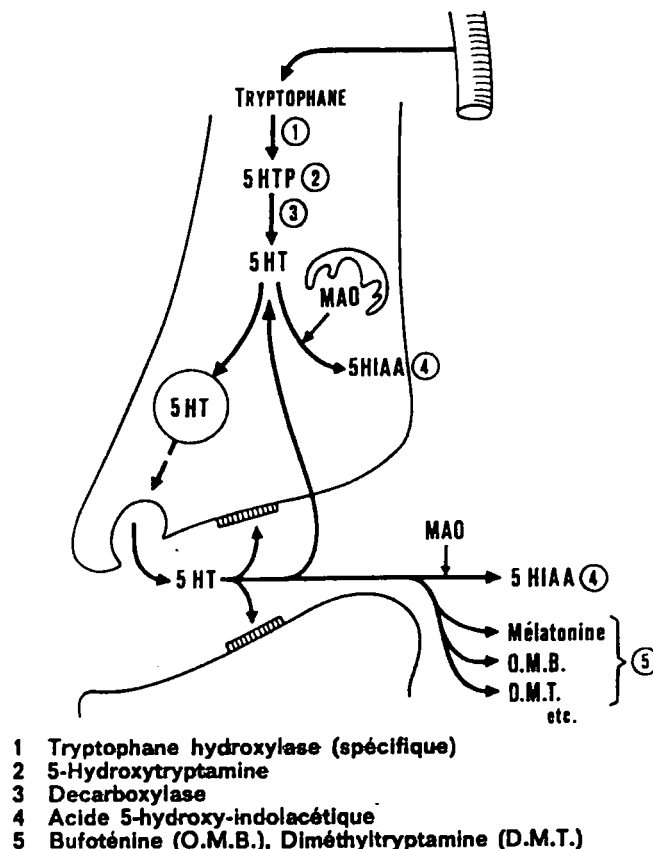


Figure 1. Synthèse et dégradation de la sérotonine (Hamon M., 1983)

1.2 SYNAPSE SEROTONINERGIQUE

La sérotonine libérée a plusieurs destinées possibles (figure 2):

- une partie peut se lier à un récepteur spécifique post-synaptique; la fixation de la sérotonine sur ce récepteur provoque des modifications de la perméabilité ionique de la membrane du neurone post-synaptique. Les changements de la perméabilité ionique entraînent des changements du potentiel membranaire et, éventuellement, l'apparition d'un nouvel influx dans le neurone post-synaptique ou, au contraire, le blocage de l'influx qui pourrait être généré par l'intermédiaire d'un autre neurone présynaptique non sérotoninergique.

- une partie peut être recaptée par la fibre synaptique. C'est un processus d'élimination de la sérotonine de la fente synaptique qui est effectué à 80 % environ par une pompe qui dépend du sodium et consomme de l'énergie. Cette pompe est

capable finalement de recapter la sérotonine libérée et permet son restockage dans les vésicules.

- enfin, une partie est dégradée.

Le produit du catabolisme intra ou extra-neuronal, le 5-HIAA, est éliminé du tissu par un processus actif et se retrouve dans la circulation sanguine où il est finalement éliminé par les reins.

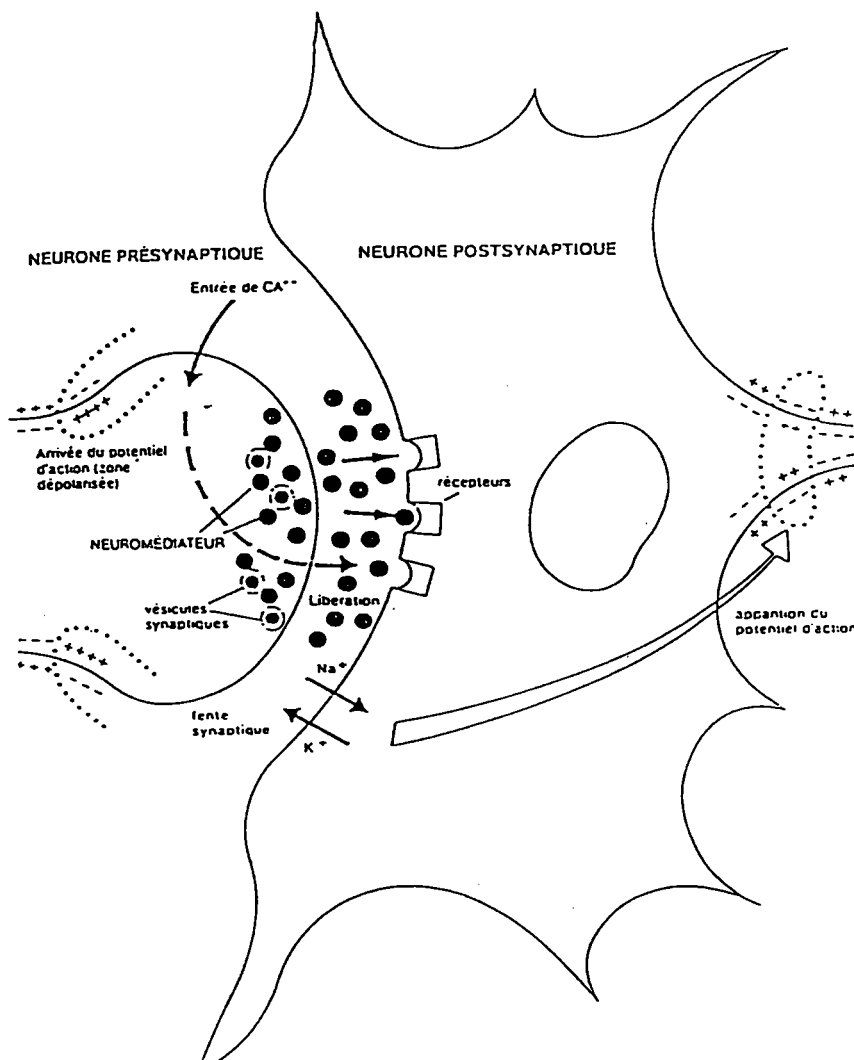


Figure 2. Synapse sérotoninergique (Laboratoires Lilly)

1.3 SEROTONINE ET TROUBLES PSYCHIATRIQUES

1.3.1 Troubles psychiatriques

En cas de troubles de l'humeur, l'ensemble du métabolisme de la sérotonine SYNTHÈSE-LIBÉRATION-DEGRADATION, est ralenti. Dans le but de rétablir une activité normale, il est donc nécessaire d'augmenter la quantité de sérotonine présente dans la synapse.

Pour ce faire, on peut:

- augmenter la synthèse de sérotonine en donnant des précurseurs (tryptophane ou 5-hydroxy-tryptophane), mais ce choix implique de donner de grandes quantités (1% de ces précurseurs est utilisé pour la synthèse de la sérotonine cérébrale).
- activer la libération de sérotonine (ex: amphétamines).
- stimuler directement les récepteurs post-synaptiques (effet de type hallucinogène).
- inhiber la dégradation de sérotonine (IMAO).
- inhiber le restockage vésiculaire (augmenter la sérotonine cytoplasmique donc l'activité de la MAO d'où un effet rapidement hyposérotinique).
- inhiber la recapture de sérotonine.

Cette dernière solution apparaît comme la meilleure. La recapture présynaptique est en effet la voie principale d'inactivation de la sérotonine. Son inhibition laisse donc espérer une action très efficace et de surcroît physiologique, puisqu'un système de régulation module la quantité de neuromédiateur disponible en regard du récepteur, la limitant à la quantité dont il a besoin.

On a proposé de nombreux rôles à l'implication de la sérotonine dans les fonctions du SNC. Bien que les études *post-mortem* aient conduit à des découvertes importantes dans ce domaine, la plupart des espoirs de progrès futurs résident dans la recherche clinique.

Chez l'être humain, l'évaluation du métabolisme de la sérotonine *in vivo* peut seulement être réalisée en utilisant des stratégies indirectes.

Quatre approches sont principalement envisagées:

1) pendant longtemps la ponction lombaire a été la voie royale pour de telles recherches, à la fois dans des conditions basales, ou lors de stratégies comme la technique du probénécide (Goodwin et coll., 1973; Van Praag et coll., 1973; Van Praag et Korf, 1974a et 1974b; Pichot et coll., 1976; Léo et Gay, 1983; Petit et Colonna, 1986; Lopez-Ibor, 1988).

2) la deuxième approche consiste à étudier des modèles périphériques de cellules sérotoninergiques tels que les plaquettes sanguines (Dreux, 1983; Butler et Leonard, 1988; McIntyre et Norman, 1989). Pour ces auteurs, la plaquette serait un bon modèle périphérique du neurone sérotoninergique présynaptique car elle a la même origine embryologique et un équipement enzymatique voisin.

3) une troisième stratégie est l'évaluation des modifications de l'activité sérotoninergique induite par des médicaments psychotropes, c'est à dire des bloqueurs de récepteurs comme le methysergide, des précurseurs de la synthèse de la sérotonine comme le tryptophane et le 5-hydroxytryptophane, les IMAO ou les bloqueurs de la recapture comme les tricycliques ou les antidépresseurs apparentés.

4) une quatrième approche extrêmement prometteuse, est celle des sondes sérotoninergiques. Elle consiste à administrer des substances qui interfèrent avec l'activité sérotoninergique et à mesurer ensuite la modification dans le sang périphérique, de la concentration d'hormones dont la sécrétion est contrôlée par des facteurs hypothalamiques sous la dépendance de la sérotonine.

Ces techniques ne permettent pas une identification des marqueurs du trouble ou d'une situation métabolique, mais constituent plutôt des sondes d'un état métabolique.

1.3.2 Traitement de la dépression

On traite la dépression par des substances qui augmentent la concentration de la sérotonine dans le cerveau. Pour ce faire, on utilise des inhibiteurs de la recapture de la sérotonine comme la fluoxétine. Un inhibiteur de la recapture augmente la concentration extracellulaire en sérotonine, laquelle agit d'abord sur l'autorécepteur 5-HT_{1A} porté par le corps cellulaire du neurone présynaptique. Toutefois, ce récepteur est inhibiteur du système sérotoninergique, de sorte que la libération de la sérotonine est bloquée (figure 3a). Ainsi, dans un premier temps, un inhibiteur de la

recapture de la sérotonine empêche la libération du neuromédiateur dont la concentration n'augmente pas. Toutefois, au bout de quelques jours, l'autorécepteur est désensibilisé, le neurone présynaptique est activé et la sérotonine est libérée dans la fente synaptique (figure 3b). La transmission sérotoninergique est alors fortement augmentée.

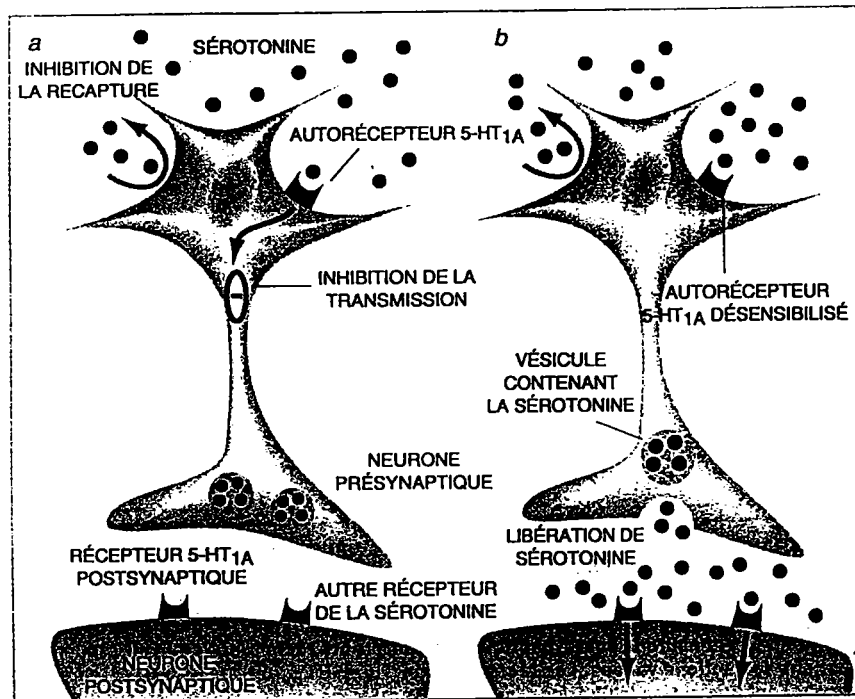


Figure 3 (a et b). Transmission sérotoninergique lors d'une dépression (Thiébot et Hamon, 1996)

1.4 DONNEES CLINIQUES CONCERNANT LE 5-HIAA

Différents travaux (Van Praag et coll., 1970, 1972, 1973; Asberg et coll., 1973, 1976; Van Praag et Korf, 1974a, 1974b; Van Praag 1977, 1981; Goodwin et coll., 1978; Van Praag et Dehann 1979; Traskman et coll., 1979), montrent que la concentration de 5-HIAA dans le LCR est abaissée chez certains déprimés ou que son accumulation dans le LCR sous probénécide est diminuée (les doses élevées du probénécide bloquent le passage du 5-HIAA cérébral vers le sang et déterminent ainsi une accumulation de ce métabolite qui reflète sa production). Mais la baisse de 5-HIAA ne

s'observe pas chez tous les déprimés. Les résultats les plus marquants concernent en fait les perturbations des systèmes sérotoninergiques chez les patients déprimés suicidaires ou violents avec baisse des taux de 5-HIAA dans le LCR.

La détermination du 5-HIAA dans le LCR, qu'il s'agisse des valeurs de base ou de l'accumulation sous probénécide, n'est pas dépourvue d'intérêt théorique. Mais le bénéfice thérapeutique d'un tel procédé, ni anodin, ni facile, n'est pas démontré de façon assez large et unanime.

2. 3-METHOXY-4-HYDROXYPHENYLGLYCOL

2.1 SYNTHÈSE

La voie catabolique de la noradrénaline vers le 3-METHOXY-4-HYDROXY-PHENYLGLYCOL (MHPG) se fait à l'aide de deux enzymes qui dégradent soit le groupement catéchol, la catéchol- o - méthyl transférase (COMT) soit le groupe amine, la mono-amine-oxydase (MAO) (figure 4).

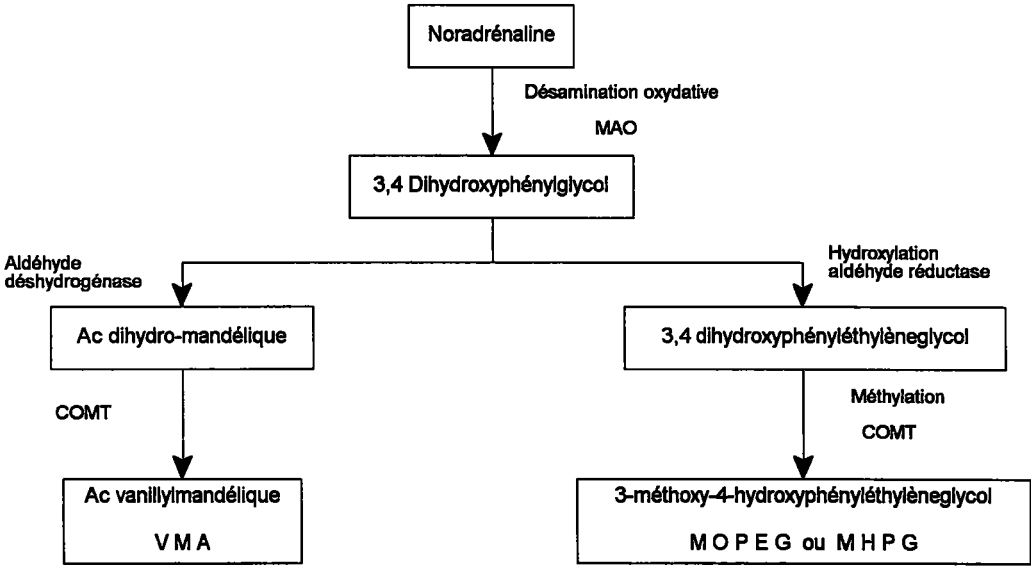


Figure 4. Voie catabolique vers le MHPG (Lêo et Granger, 1986)

Le produit terminal de dégradation de la noradrénaline est le VMA (acide vanillylmandélique). En principe c'est lui que l'on devrait mesurer si l'on voulait mesurer une activité noradrénergique en utilisant les métabolites comme indice.

En fait après la MAO, un passage par un radical aldéhyde réduit en alcool, donne naissance au MHPG. Ce produit va ensuite être sulfaté (MHPG-SULFATE), et il est considéré par les cliniciens comme étant le meilleur indice de l'activité noradrénergique dans le SNC (figure 5). C'est ce produit que l'on doit mesurer si l'on veut avoir une idée de l'activité des systèmes noradrénergiques, et non pas, comme on pouvait le penser le VMA qui en fait est extrêmement faible en concentration (Lêo et Granger, 1986).

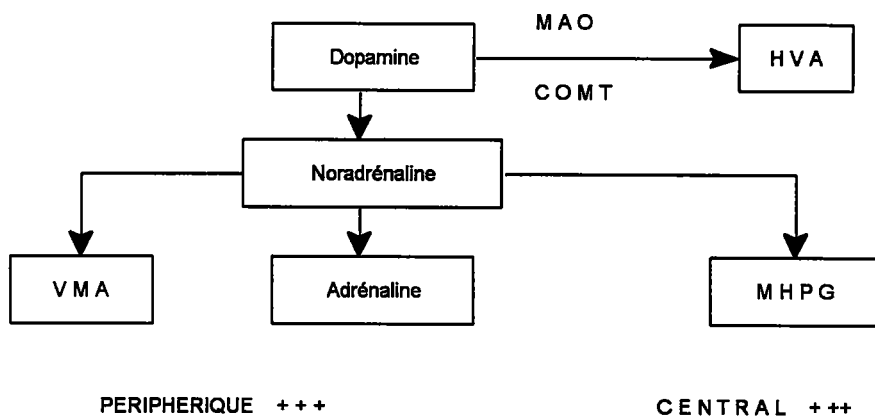


Figure 5. Schématisation du catabolisme des catécholamines (Lêo et Granger, 1986)

2.2 STRUCTURES CHIMIQUES

Le MHPG est présent sous deux formes dans les liquides biologiques: libre et conjugué (figure 6).

Il existe deux types de dérivés conjugués:

- le dérivé sulfaté est surtout formé au niveau cérébral
- le dérivé glucuronide est surtout produit en périphérie.

Souvent la détermination porte sur le MHPG total, mais le dérivé sulfaté semble refléter avec plus de précision le métabolisme de la noradrénaline cérébrale. Pour le MHPG urinaire, le pourcentage des différentes formes selon Peyrin et Péquinot (1983) est le suivant:

- libre 8%
- sulfaté 40%
- glucuronide 52%

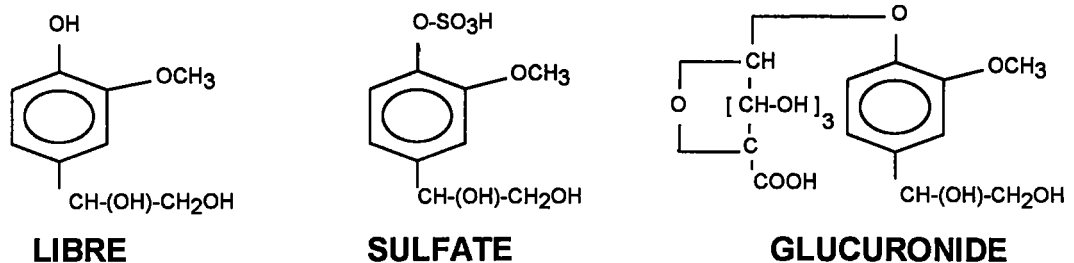


Figure 6. Le MHPG et ses conjugués

Différents travaux expérimentaux chez l'animal et des investigations chez l'Homme ont tenté de préciser la valeur des principaux catabolites de la noradrénaline mesurés dans les affections psychiatriques pour refléter le métabolisme de la noradrénaline centrale. Environ 50% du MHPG urinaire proviendrait du métabolisme de la noradrénaline cérébrale, mais les différentes formes cliniques n'ont pas toutes le même devenir.

2.3 MHPG ET REPONSE AU TRAITEMENT ANTIDEPRESSEUR

En fonction de l'hypothèse hypocatécholaminergique des dépressions et du mécanisme d'action monoaminergique des antidépresseurs favorisant la transmission sérotoninergique ou noradrénergique, de nombreux travaux ont recherché si les taux de MHPG, reflet indirect d'une éventuelle insuffisance centrale en noradrénaline, pouvaient constituer un facteur prédictif de la réponse aux antidépresseurs en fonction de leur activité monoaminergique centrale et étaient capables de guider le choix de la prescription pour augmenter les chances de succès thérapeutique.

En fonction des travaux effectués (Maas et coll., 1971, Maas 1975; Beckmann et Goodwin, 1975, 1980; Petit et Dollfus, 1986), la prescription thérapeutique en

référence au MHPG urinaire dans les dépressions peut être ainsi schématisée:

1. Les déprimés à taux bas de MHPG urinaire

- répondent mieux aux antidépresseurs agissant préférentiellement sur le métabolisme noradrénergique
- résistent plutôt aux antidépresseurs dont l'action est surtout sérotoninergique
- montrent un MHPG urinaire stable ou augmentant sous antidépresseur.

2. Les déprimés à taux normal ou élevé de MHPG urinaire

- répondent plutôt aux antidépresseurs sérotoninergiques
- résistent aux antidépresseurs noradrénergiques
- montrent une diminution de l'excrétion urinaire de MHPG sous antidépresseur.

2.4 REVUE DES DIFFERENTES ETUDES CLINIQUES

2.4.1 MHPG urinaire et antidépresseurs

La détermination de l'excrétion urinaire de MHPG paraît un facteur plus valable d'orientation que le VMA pour le choix thérapeutique et de prédiction pour la réponse au traitement.

Les principaux travaux sur la valeur thérapeutique de la détermination du MHPG urinaire sont dus à Fawcett et coll. (1972), à Maas (1975, 1983), à Goodwin et coll. (1978), à Schildkraut et coll. (1978, 1983), à Rosenbaum et coll. (1980), à Beckmann et Goodwin (1980), à Peyrin et Pequinot (1983); Peyrin et coll. (1985, 1987), et Peyrin (1990).

La détermination du taux d'excrétion du MHPG dans les urines de 24h procède de l'assertion que ce catabolite reflète le métabolisme de la noradrénaline d'origine cérébrale.

En effet, il semble acquis que plus de 50% du MHPG urinaire proviennent de la noradrénaline d'origine centrale (Beckmann et Goodwin, 1975; Maas, 1975; Schildkraut, 1978), alors que l'acide 3-méthoxy-4-hydroxymandélique (VMA) et la normétanéphrine sont surtout issus du métabolisme périphérique (Maas et coll., 1971).

Maas et coll. (1971) et De Leon Jones et coll. (1975) ont comparé un groupe de patients dépressifs à des témoins de même âge. Les déprimés ont des taux de MHPG

significativement plus bas que les sujets contrôles, alors qu'il n'existe pas de différence significative dans les concentrations des autres catabolites de la noradrénaline (normétanéphrine, métanéphrine ou VMA) entre les deux groupes; cette constatation paraît justifier que la baisse de MHPG ne puisse pas être attribuée à une réduction de l'activité adrénergique ou noradrénergique au seul niveau périphérique.

De nombreux travaux suggèrent l'existence de deux groupes de déprimés: à taux bas de MHPG urinaire et à taux normal ou élevé: (Maas et coll., 1971; Fawcett et coll., 1972; Pickar et coll., 1974; Beckmann et Goodwin, 1975, 1980; Maas, 1975, 1983; Goodwin et coll., 1978; Schildkraut, 1978; Schildkraut et coll., 1978; Agreen, 1982; Schildkraut et coll., 1983; Muscettola et coll., 1984; Joseph et coll., 1985; Petit et Dollfus, 1986; Llo, 1987).

Ces deux groupes ne répondraient pas identiquement à un même antidépresseur; pour chacune des catégories biochimiques ainsi définies, chaque antidépresseur paraît avoir plus ou moins de chance d'efficacité.

Rosenbaum et coll. (1980) démontrent que les sujets avec des taux bas de MHPG urinaire avant traitement, répondent mieux à deux antidépresseurs réputés agir sur la voie noradrénergique (imipramine, maprotiline) que les sujets avec taux élevés.

Pour Schildkraut (1978), les sujets à taux élevés de MHPG répondent mieux à l'amitriptyline que les autres, mais l'auteur remarque que ces sujets sont plus vieux et que l'amitriptyline est réputée plus efficace chez les déprimés de plus de 50 ans.

2.4.2 MHPG et sémiologie clinique

La détermination du taux de MHPG urinaire tend donc à définir des sous-groupes biochimiques à l'intérieur des dépressions. Des corrélations ont été établies entre les taux de MHPG urinaire et la nature bipolaire ou unipolaire des dépressions, entre son caractère endogène ou non endogène (De Leon Jones et coll., 1975; Schildkraut, 1978; Ridges, 1980).

Concernant les dosages urinaires, il existe un consensus sur les résultats des patients bipolaires (alternance d'accès de dépression et d'excitation) qui présentent des taux bas de MHPG en phase dépressive, élevés en phase maniaque (ou excitation) et normaux en phase de rémission (Llo, 1987).

Les résultats chez les déprimés unipolaires (accès dépressifs successifs) sont en revanche très variables, voire contradictoires. Pour Maas (1983), Muscettola et coll.

(1984) et Joseph et coll. (1985), les taux sont abaissés. Mais pour Agreen (1982), ils sont identiques à ceux des témoins et pour Beckmann et Goodwin (1980), Schildkraut et coll. (1983) ils sont plus élevés chez certains déprimés.

Cependant ces derniers auteurs reconnaissent trois sous-groupes de déprimés, à taux bas, normaux et élevés.

Les nombreux facteurs qui sont éventuellement susceptibles d'agir sur l'excrétion urinaire de MHPG (Schildkraut, 1978; Beckmann et Goodwin, 1975; Ridges, 1980; Maas, 1978; Post et Goodwin, 1974) rendent peut être difficile la caractérisation clinique des dépressions.

De plus, la frontière entre taux hauts et taux bas de MHPG est établie de façon arbitraire dans les travaux.

2.4.3 MHPG plasmatique

Lors des dosages plasmatiques, alors que certains auteurs comme Maas (1983) ne notent pas de différence entre sujets déprimés et les contrôles, le travail de Valli et coll. (1987) sur le dosage du MHPG plasmatique total, tend à objectiver une baisse moyenne de MHPG plasmatique des déprimés comparativement à des sujets contrôles, et cette différence est significative pour les dépressions majeures unipolaires. Cependant les auteurs trouvent une répartition bimodale des taux de MHPG plasmatique qui pourrait être rapprochée de la répartition entre déprimés hauts excréteurs et déprimés bas excréteurs de MHPG urinaires, décrite notamment par Léo et Granger (1986), Karege et coll. (1989), Garvey et coll. (1990). Cette baisse significative des taux de MHPG plasmatique dans les dépressions majeures concorde avec les données de la littérature évoquées par Schildkraut et coll. (1983) concernant la diminution de l'excrétion urinaire du MHPG dans les dépressions bipolaires et certaines dépressions unipolaires.

2.4.4 Relation entre taux de 5-HIAA et de MHPG

En souscrivant au schéma d'une déficience sérotoninergique ou noradrénergique dans la dépression, des rapports pourraient être établis entre les taux des catabolites monoaminergiques en fonction de la voie métabolique éventuellement concernée et la réponse aux antidépresseurs selon leur mécanisme d'action.

Cette vision abusivement simpliste et réductrice a été critiquée (Zarifian, 1979; Le Fur, 1981). Ce sont essentiellement le MHPG ou le 5-HIAA qui ont été étudiés pour orienter la description des antidépresseurs.

Goodwin et coll. (1978) ont mesuré les deux catabolites chez les mêmes déprimés; ils ont souligné la possible relation entre les taux de 5-HIAA dans le LCR et l'excrétion urinaire de MHPG et suggèrent l'existence éventuelle de deux sous-groupes de déprimés caractérisés par:

- bas 5-HIAA : haut MHPG
- haut 5-HIAA : bas MHPG

Ridges (1980) mesurant l'excrétion urinaire de MHPG et de 5-HIAA n'établit pas de relation entre les taux de ces catabolites.

Pour Rafaelsen (1980), le taux de MHPG dans le LCR est plus élevé chez les déprimés uni et bipolaires en comparaison des contrôles; mais il n'existe pas de différence significative si l'ensemble des déprimés est comparé aux contrôles. Le taux de 5-HIAA dans le LCR chez les déprimés, quelle que soit leur appartenance nosographique, ne diffère pas de celui des contrôles. En périodes maniaques, 5-HIAA et MHPG montrent des valeurs normales. De telles recherches méritent des développements en raison de la découverte d'antidépresseurs à mode d'action plus spécifique; surtout si le travail de Goodwin et coll. (1978) trouvait une confirmation; un seul indicateur biochimique suffirait alors pour orienter la prescription.

CHAPITRE III : DONNEES

BIBLIOGRAPHIQUES SUR LE RAT

1. EFFET DES ANTIDEPRESSEURS CHEZ LE RAT

Bien souvent, les effets d'un médicament sur le SNC ont été assimilés aux mécanismes de ses effets thérapeutiques. Or, une étape manque: celle de démontrer que l'action des antidépresseurs sur les systèmes neuronaux, noradrénergiques ou sérotoninergiques par exemple, détermine leur activité thérapeutique (Martin, 1990).

Cette étape étant difficile à réaliser chez l'Homme, l'animal est pris comme sujet, ce qui pose alors le problème du modèle utilisé pour révéler l'effet thérapeutique envisagé.

En effet, on peut:

- placer les animaux dans une situation aversive incontrôlable et inévitable entraînant des perturbations biochimiques, physiologiques, hormonales et comportementales durables, retrouvées chez des sujets déprimés;
- effectuer un traitement chronique;
- supprimer de manière relativement sélective par des substances antidépresseurs chez l'homme, l'incapacité qu'ont ces animaux à effectuer une tâche comportementale;
- rechercher par quels mécanismes d'action les antidépresseurs pourraient agir.

Cette stratégie d'investigation qui réunit comportement, biochimie et pharmacologie permet d'entreprendre un certain nombre de travaux où l'élément central est la compréhension des mécanismes de l'action thérapeutique des médicaments et/ou de la physiopathologie de certaines affections mentales et plus précisément la dépression.

Les antidépresseurs ont des points d'impact neurochimiques extrêmement différents et le mécanisme d'action de ces substances peut passer non pas par un seul système, mais par plusieurs.

La plupart du temps, ces molécules sont étudiées à des doses relativement fortes, semblables à celles des imipraminiques. En fait, ces substances présentent la particularité d'exercer chez l'animal une action biphasique en fonction de la dose. Or, chez l'Homme, il semble exister pour certaines substances, une fourchette de doses actives et lorsque les doses sont trop fortes, l'effet est diminué. Pour ces agents sérotoninergiques on peut se demander s'il n'en est pas de même, également chez l'Homme.

Toujours en ce qui concerne ces systèmes, nous savons qu'il existe à l'heure actuelle plusieurs types de récepteurs sérotoninergiques centraux (5-HT1: subdivisés en 1A, 1B, 1C, 1D; 5-HT2 et 5-HT3). La fonction et l'implication de ces récepteurs même si elles commencent à être définies sont loin d'être élucidées. Toutefois, un certain nombre de substances agonistes des récepteurs 5-HT1A comme la buspirone, la gépironne ou l'ipsapirone exercent dans ce modèle un effet de type antidépresseur. Il semble en être de même avec des antagonistes des récepteurs 5-HT2 et 5-HT3.

Beaucoup de facteurs peuvent participer à la résistance et au délai d'action des antidépresseurs (mauvaise indication, doses inadéquates pour le sujet traité, co-prescription, etc...) (Martin, 1990).

Certaines pathologies associées endocrino-métaboliques peuvent également jouer un rôle dans ces phénomènes. L'influence du diabète, de l'hypothyroïdie et de la perte de poids a été établie (Martin, 1990).

Contrairement aux imipraminiques, les inhibiteurs de la capture de sérotonine (citalopram, fluvoxamine, fluoxétine) restent efficaces chez le rat diabétique. De même, les agonistes des récepteurs 5-HT1A (buspirone, ipsapirone...) restent également actifs. Cette différence de résultats obtenus entre antidépresseurs spécifiques des systèmes sérotoninergiques et antidépresseurs imipraminiques suggère qu'il serait préférable de prescrire ces derniers chez des patients déprimés et diabétiques.

Un facteur de résistance ou de retard à l'action des antidépresseurs peut être obtenu chez des animaux à qui l'on a restreint la nourriture pendant le déroulement de l'expérience. Chez ces rats qui présentent une différence de poids d'environ 8 à 12 % par rapport aux rats nourris *ad libitum*, les imipraminiques voient leurs effets nettement diminués, voire supprimés. La question que l'on peut se poser est de savoir si les antidépresseurs ne sont pas, à pathologie psychiatrique égale, plus rapidement actifs chez des sujets qui n'ont pas perdu de poids.

2. ETUDES DE LA FLUOXETINE CHEZ LE RAT

2.1 AUGMENTATION DE LA FONCTION SEROTONINERGIQUE COMME CONSEQUENCE DE L'INHIBITION DE LA CAPTURE

Il n'existe aucune méthodologie permettant de mesurer les concentrations en sérotonine directement dans la fente synaptique, mais trois méthodes indirectes montrent que la fluoxétine augmente les concentrations extra-neuronales de sérotonine, ce qui est vraisemblablement un reflet de l'augmentation de la concentration dans la fente synaptique. Geyer et coll. (1978) utilisant une technique cytofluorométrie ont pu mettre en évidence que la fluoxétine augmente les concentrations en sérotonine en dehors du péricaryon dans la zone du raphé du cerveau de rat. Marsden et coll. (1979) ont utilisé la voltamétrie *in vivo* pour suivre les concentrations extra-neuronales de sérotonine dans le striatum du rat, et ont montré que la fluoxétine entraînait une augmentation modérée du signal mais qui durait très longtemps. Guan et McBride (1986) ont mesuré les concentrations de sérotonine dans le LCR et ils ont pu montrer une augmentation de sept fois des valeurs de la concentration en sérotonine pendant la première heure suivant l'injection intrapéritonéale (i.p.) de fluoxétine. Des preuves supplémentaires que la fluoxétine augmente bien les concentrations de sérotonine dans la fente synaptique, conduisant à augmenter l'activation des récepteurs synaptiques de la sérotonine ont été obtenues grâce à des études fonctionnelles (Schmidt et coll., 1988). Une des conséquences de cette activation est la réduction de la vitesse de renouvellement de la sérotonine.

C'est ainsi que l'on peut observer:

- une diminution des concentrations du 5-HIAA à l'état d'équilibre dans le cerveau du rat
- une diminution de l'accumulation du 5-HTP (substrat de la sérotonine) après inhibition de la décarboxylase
- une diminution de l'incorporation du tryptophane radioactif au sein de la sérotonine et du 5-HIAA.

L'augmentation de la concentration sérotoninergique dans la fente synaptique est donc bien une conséquence du blocage du transporteur.

La diminution de la concentration de 5-HIAA est une mesure utile pour évaluer la durée d'action de la fluoxétine. La figure 7 montre que la concentration de 5-HIAA

dans le cerveau du rat est toujours diminuée au bout de 24 heures après une dose unique de 10 mg/kg i.p. de fluoxétine, indiquant ainsi que la capture de sérotonine a été inhibée durant cette période de temps.

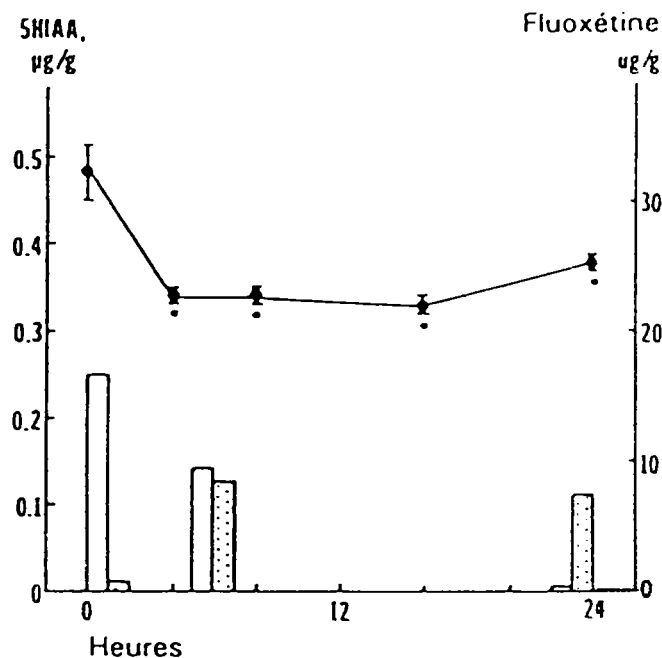


Figure 7: Durée de la diminution du 5-HIAA par la FL (10 mg/kg i.p.), comparée aux concentrations cérébrales de FL (blanc), et celles de NFL (gris) à 1, 6 et 24 h chez le rat (n = 5) (d'après Schmidt et coll., 1988)

La norfluoxétine (NFL) est semblable à la fluoxétine (FL) dans sa puissance et sa sélectivité pour inhiber la capture de sérotonine *in vitro* (Wong et coll, 1975; Fuller et Wong, 1977).

Chez le rat, la fluoxétine elle-même semble jouer un rôle essentiel dans l'inhibition de la capture de la sérotonine précocément après l'administration de fluoxétine, mais la norfluoxétine compte probablement largement dans l'inhibition de capture de la sérotonine sur des périodes de temps plus longues, par exemple 24 heures. Au bout de 24 heures, il reste très peu de fluoxétine, et c'est probablement la norfluoxétine qui joue le rôle majeur dans l'inhibition de la capture de sérotonine. La capture de noradrénaline n'est inhibée à aucun de ces moments. Ainsi la formation de

norfluoxétine ne modifie pas la puissance ou la spécificité, mais prolonge la durée d'inhibition de la capture de sérotonine après administration de fluoxétine.

Parmi les changements fonctionnels qui sont la conséquence de l'augmentation de l'activation des récepteurs sérotoninergiques post-synaptiques après inhibition de la capture de la fluoxétine chez le rat, il faut noter un certain nombre de modifications neuroendocriniennes.

La fluoxétine augmente le cortico-tropin-releasing factor (CRF) dans le plasma du système porte de l'hypophyse, et augmente l'hormone corticotrope (ACTH) dans le plasma périphérique (Gibbs et Vale, 1983), entraînant ainsi une augmentation des concentrations de corticostérone dans le sérum (Fuller et coll., 1975). Un pré-traitement par la fluoxétine potentialise l'élévation de la corticostérone sérique par le 5-HTP (Fuller et coll., 1975), antagonise l'augmentation de corticostérone par la p-chloroamphétamine (Fuller et Snoody, 1980), et ne modifie pas l'élévation des concentrations sériques de corticostérone par la quizapine, un agoniste direct de la sérotonine (Fuller et Snoody, 1980).

Tous ces résultats sont parfaitement explicables, en se fondant sur la capacité de la fluoxétine, à bloquer le transporteur membranaire de capture sur les neurones sérotoninergiques (Fuller et Snoody, 1980). La sérotonine formée à partir du 5-HTP a une action majorée sur les récepteurs sérotoninergiques post-synaptiques lorsque son inactivation par la recapture est bloquée. La p-chloroamphétamine libère la sérotonine grâce à un mécanisme dépendant d'un transporteur, ce qui fait que la libération et les conséquences fonctionnelles de cette libération peuvent être prévenues par un pré-traitement par la fluoxétine (Fuller, 1980).

2.2 EFFICACITE DE LA FLUOXETINE SUR UN CERTAIN NOMBRE DE TESTS CHEZ L'ANIMAL

La fluoxétine n'est pas efficace sur un certain nombre de tests chez l'animal, qui ont été utilisés en vue de sélectionner de possibles antidépresseurs. Par exemple, la fluoxétine n'antagonise pas l'hypothermie induite par la résérpine ou par l'apomorphine chez la souris (Slater et coll., 1978; Maj et coll., 1983) et elle ne diminue pas l'immobilité dans le test de la nage forcée chez le rat (Porsolt et coll., 1979). La fluoxétine antagonise le comportement muricide du rat, un effet caractéristique de beaucoup d'antidépresseurs (Stark et Hardison, 1985). Comme d'autres substances

sérotoninergiques, la fluoxétine bloque le comportement muricide induit par l'isolement ou par l'ablation des bulbes olfactifs (Molina et coll., 1986), ainsi que par la déplétion partielle de sérotonine cérébrale sous l'influence de la p-chloroamphétamine ou par des lésions du raphé (Berezsényi et coll., 1983; Molina et coll., 1987).

2.3 CHANGEMENTS ADAPTATIFS DES RECEPTEURS AUX NEUROTRANSMETTEURS

Au cours de ces dernières années, les recherches se sont centrées sur les changements adaptatifs des récepteurs aux neurotransmetteurs qui surviennent chez le rat après administration chronique de différents traitements antidépresseurs. L'administration chronique de fluoxétine chez le rat entraîne une diminution du nombre des sites de liaison de 5-HT₁ dans le cortex cérébral (marqué par de la sérotonine tritiée) (Wong et Bymaster, 1981; Dumbrille-Ross et Tang, 1983; Wong et coll., 1985); ces changements peuvent être détectés dès la 49^{ème} heure après une seule injection quotidienne de fluoxétine (Wong et coll., 1985). L'administration quotidienne de fluoxétine aux rats ne change pas la liaison du radioligand au niveau des récepteurs α_1 , α_2 , β , des récepteurs muscariniques cholinergiques, histaminergiques H₁, ou des récepteurs opiacés (Wong et coll., 1985), suggérant ainsi qu'il n'y a pas de perturbation chronique dans le fonctionnement de ces systèmes (tableau 1).

Tableau 1: Affinité de la fluoxétine et d'autres antidépresseurs pour les récepteurs aux neurotransmetteurs marqués par des radioligands sur les membranes de cerveaux de rats; N= pas d'affinité significative pour le récepteur, c'est à dire que la valeur de l'IC₅₀ (concentration inhibant 50 % de la liaison spécifique) est supérieure à 1000 nmol (Wong et coll., 1983).

Molécules	Valeurs des IC ₅₀ (nmol)				
	MUSC	H ₁	α_1	α_2	5-HT ₂
Amitriptyline	43	4	60	680	18
Doxépine	190	4	60	N	37
Miansérine	N	7	210	90	6
Trazodone	N	N	250	N	25
Fluoxétine	N	N	N	N	N

3. LA FLUOXÉTINE: UN INHIBITEUR SELECTIF DE RECAPTURE DE SÉROTONINE LORS D'ETUDES SUR ANIMAL

De nombreuses études montrent que la fluoxétine produit divers changements fonctionnels chez les animaux mettant en valeur le rôle de la fonction sérotoninergique. Elle potentialise les précurseurs de la sérotonine (tryptophane et 5-HTP):

- effet anorexique sur la prise d'aliments et mise en évidence du rôle de la sérotonine cérébrale dans cette régulation alimentaire (Fuller et Owen , 1981)
- prise d'aliments et modèle de sélection sur des rats traités par trois agonistes sérotoninergiques (dexfenfluramine, fluoxétine, RU 24969); il a été constaté une chute sélective d'aliments à fort pourcentage de carbohydrates et faible pourcentage protéinique et une perte de poids identique (Luo et Li, 1991)
- diminution de la prise de lait chez les rats (Fuller et Owen , 1981)
- effets de la fluoxétine sur le comportement lors de stimulations dans les régions dorsales et ventrales de l'hypothalamus latéral chez la souris (Cazala, 1980)
- renforcement du processus de mémorisation chez la souris (Flood et Cherkin, 1987)
- suppression du sommeil REM (Rapid Eye Movement; phase des mouvements oculaires chez les anglo-saxons) chez les rats et les chats (Slater et coll., 1978), chez les rats mâles (Pastel et Fernstrom, 1987)
- effet d'antihypertension chez les rats (Fuller et coll., 1979)

Ces interactions entre fluoxétine et 5-HTP, montrent de façon évidente que tous ces effets sont influencés par la connexion synaptique sérotoninergique.

BUT DU TRAVAIL

Après quelques rappels bibliographiques, nous allons préciser les éléments pharmacologiques que nous voulons étudier, ainsi que les outils nécessaires à leur étude.

La fluoxétine agissant sélectivement sur la recapture de la sérotonine il était intéressant d'étudier l'implication de la sérotonine dans les troubles de l'humeur. Sachant que les syndromes dépressifs n'impliquent pas uniquement un seul neuromédiateur, nous avons également examiné les corrélations éventuelles entre la voie noradrénergique et un inhibiteur de la recapture de la sérotonine comme la fluoxétine, afin de tester l'hypothèse noradrénergique ou sérotoninergique de la dépression.

Suite aux observations cliniques, nous avons observé les conséquences de l'action de la fluoxétine et de la norfluoxétine sur la sérotonine et de son métabolite chez le Rat.

Enfin, nous avons étudié l'effet curatif de la fluoxétine sur la dépression ainsi que son effet sur le comportement de résignation provoqué chez le Rat.

A cet effet, nous avons été amené à développer différentes techniques d'analyse par CLHP afin de doser:

- la sérotonine plaquettaire, le MHPG plasmatique, le MHPG urinaire (Bourdeaux et coll., 1995), la fluoxétine et norfluoxétine plasmatique chez l'Homme
- la sérotonine et son métabolite (5-HIAA), la fluoxétine et son métabolite chez le Rat.

PARTIE II

DEVELOPPEMENT

ANALYTIQUE

1. MATERIELS

1.1 REACTIFS

Réactifs provenant de la Société Merck (Nogent sur Marne, France)

Acétate d'ammonium, acétate de sodium, acide acétique cristallisable, acide borique, acide chlorhydrique fumant 37%, acide perchlorique 70-72%, acide phosphorique, chlorure de sodium, dihydrogénophosphate de potassium, hydroxyde de sodium, métabisulfite de sodium, sulfate de sodium anhydre, , tritriplex III (EDTA).

Réactifs provenant de la Société Sigma et Aldrich (St Quentin Fallavier, France)

Acide 5-hydroxy-3-indolacétique, acide 5-hydroxy-2-indolcarboxylique, acide 3-hydroxy-4-méthoxymandélique, aluminium hydrure, β glucuronidase purifiée 25000 UI, glusulase (β glucuronidase + sulfatase), 4-hydroxy-3-méthoxy-phénylglycol, 4-hydroxy -3-méthoxyphénylglycol-4-sulfate, N-méthylsérotonine, proadifen hydrochloride (SK&F 525A), sérotonine créatinine sulfate, sulfatase 50 UI, triméthylsilylimidazole (TMSI).

Molécules

Fluoxétine et norfluoxétine (Laboratoires LILLY, St Cloud, France), fluphénazine (Laboratoires SQUIBB, Neuilly sur Seine, France), prozac (Laboratoires DISTA, France).

Autres réactifs

Colonne Econobiorad et résine AG 1X4 100X200 Mesh (Biorad, Ivry sur Seine, France)

1.2 SOLVANTS

Tous les solvants utilisés pour la séparation chromatographique et pour les différentes extractions proviennent de la société Merck (Nogent sur Marne, France):

acétate d'éthyle, acétone, acétonitrile (Hipersolv), alcool n-amyle, butanol-1, chloroforme, dichlorométhane, éthanol, heptane, hexane, isopropanol, méthanol pour chromatographie, tétrahydrofurane.

1.3 MATERIEL DIVERS

Agitateur à secousses latérales: Agitelec S.L 201 (Jean Toulemonde, Paris), agitateur de type vortex (Polylabo Block, Strasbourg, France), appareil de filtration en verre 47 / 50 mm [250 ml de contenance, support de filtre en verre fritté, filtres en cellulose régénérée] (Sartorius , France), centrifugeuse centra 8R et homogénéiseur Virtis type 23 (OSI, France), tubes borosilicatés à usage unique (100 x 16 mm, 98 x 34 mm, 145 x 18 mm) (Polylabo Block, Strasbourg, France), tubes coniques à col rodé de 15 ml (Descharmes, Nancy, France), tubes à hémolyse (Gosselin, Borre, France).

Tubes Vacutainer (Hemogard) à prélèvement de sang sous vide, 13 x 100 mm, 7 ml; tubes Vacutainer (Brand SST) à séparateur de sérum, 13 x 70 mm, 5 ml (Becton Dickinson, Meylan, France).

1.4 MATERIEL CHROMATOGRAPHIQUE

1.4.1 CLHP

- Système GOLD (Beckman, Gagny, France) comprenant:
 - détecteur UV 166 à longueur d'onde programmable
 - pompe 126 à gradient
 - logiciel Gold
 - imprimante Epson LQ 850
- Pompe Waters modèle 510 (St Quentin, France)
- Atténuateur de pulsation à diaphragme (Alltech, Templeuve, France)
- Four pour colonne type Timberline (Alltech)
- Détecteur électrochimique BAS type LC 4B (Biochrom, Angoulême, France)
 - cellule de travail en carbone vitreux TL5
 - électrode de référence Ag/AgCl
- Vannes rhéodynes type 7125 (Interchim, Montluçon, France)
- Intégrateur SP 4270 (Spectra Physics, Les Ullis, France)
- Colonne SUPERSPHER 100 RP 18 (250 x 4 mm I.D., 4 µm) équipée d'une précolonne Lichrospher 100 RP 18 (4 x 4 mm I.D., 7 µm) (Merck)
- Colonne SUPERSPHER 100 RP 8 (125 x 4 mm I.D., 4 µm) équipée d'une précolonne Lichrospher 100 RP 8 (4 x 4 mm I.D., 7 µm) (Merck)

- Colonne CAPCELL C₁₈ (250 x 4.6 mm I.D., 5 µm) (Interchim, Montluçon, France), équipée d'une précolonne Alltech (15 x 4 mm I.D., 7 µm)
- Colonne Biorad RP 18 (150 x 4.6 mm I.D., 5 µm) équipée d'une précolonne Biorad (40 x 4.6 mm I.D.)
- Colonne préparative RP 18 (250 x 6 mm I.D., 25 µm) sans précolonne (Alltech)

1.4.2 CPG - MS

- Spectromètre de masse quadripolaire: Ribermag R-10-10 C (Delsi Nermag, Argenteuil, France)
- Chromatographe en phase gazeuse Delsi DI 700 (Delsi Instruments, Suresnes, France)
- Injecteur solide (Spiral, Dijon, France)
- Colonne capillaire BPX5, 25 x 0.25 mm (0.25 µm) (SGE, Villeneuve St Georges, France)

1.5 DIVERS

1.5.1 Eau

Toutes les solutions sont préparées avec une eau ultrapure (MILLI-Q) . Cette eau est filtrée (0,22 µm) et possède une résistivité de 18,2 Meg-ohms/cm.

1.5.2 Mode d'extraction

Les extractions des différentes molécules se font dans des tubes borosilicatés à usage unique (100 x 16 mm).

L'agitation automatique de tous les tubes est faite sur un agitateur à secousses latérales. Les agitations de 1 min sont réalisées sur un agitateur de type vortex.

1.5.3 Centrifugation

La centrifugation de tous les prélèvements a été réalisée à 3000 g durant 5 min (sauf pour le prélèvement des plaquettes: 15 min à 150 g), et à une température de 10 °C.

1.5.4 Filtration des phases mobiles

Les différentes phases mobiles sont filtrées sur un filtre de cellulose régénérée de 0,45 µm et dégazées 10 min à l'hélium avant leur utilisation.

1.5.5 Utilisation de la résine AG 1 X 4

La résine AG 1 est un échangeur anionique fort avec groupement fonctionnel ammonium quaternaire attaché à une matrice " Copolymère styrène - divinylbenzene ". La résine est capable d'échanger des anions de sels acides, basiques ou neutres. 1 ml de résine en suspension est déposée en haut de chaque colonne, ce qui après élimination de la phase aqueuse donne une hauteur de résine dans chaque colonne de 2 cm. Toutes les colonnes sont rincées par 1 ml d'eau pure avant chaque utilisation. Après utilisation, ces colonnes nécessitent un simple lavage et séchage avant une utilisation ultérieure

2. DOSAGE DE LA FLUOXÉTINE

2.1 PRINCIPE DE LA METHODE

La fluoxétine et son métabolite sont extraits à partir du sérum par un mélange hexane / alcool n-amyle (98/2, v/v) en milieu alcalin (NaOH 4 M). La phase organique est réextraite par une phase aqueuse HCl 0.01 M. En effet la basicité de ces molécules leur confère certaines propriétés. Avec certains acides, elles forment des paires d'ions qui permettent leur réextraction et donnent des extraits plus propres qu'en évaporant la phase organique. La quantification est faite par rapport à une molécule de propriété voisine, prise comme étalon interne (fluphénazine). La fluoxétine et son métabolite déméthylé sont dosés simultanément.

2.2 PRELEVEMENT

Le sang est prélevé sur tube Vacutainer (Brand SST) de 5 ml avec séparateur. Chaque tube est centrifugé 5 min à 3000 g puis congelé à - 20 °C si le dosage est différé.

2.3 SOLUTIONS ETALONS

2.3.1 Solutions mères

2.3.1.1 Fluoxétine et norfluoxétine

Les solutions mères sont préparées à 100 mg/l (exprimé en base) dans HCl 0,1 M et congelées en aliquotes de 5 ml à - 20 °C.

Quantité à peser pour 100 ml:

- Fluoxétine sous forme chlorhydrate : 11,2 mg
- Norfluoxétine sous forme maléate : 13,9 mg

2.3.1.2 Solution de contrôle de fluoxétine à 200 mg/l

Une gélule dosée à 20 mg est diluée dans 100 ml HCl 0,1 M. La solution est filtrée puis congelée en aliquotes de 5 ml à - 20 °C.

2.3.1.3 Etalon interne (Fluphénazine)

La solution mère est préparée à 250 mg/l (exprimé en base) dans HCl 0,1 M puis congelée en aliquotes de 5 ml à - 20 °C.

Fluphénazine dichlorhydrate : 29,2 mg pour 100 ml

2.3.2 Solutions de travail

2.3.2.1 Fluoxétine et norfluoxétine à 2 mg/l

La solution mère à 100 mg/l est diluée au 1/50 dans HCl 0,1 M.

2.3.2.2 Solution contrôle de fluoxétine à 2 mg/l

La solution de travail à 2 mg/l est préparée à partir de la solution mère (200 mg/l) dans HCl 0,1 M (dilution au 1/100).

2.3.2.3 Etalon interne

La solution de travail à 5 mg/l est préparée à partir de la solution mère (250 mg/l) dans HCl 0,1 M (dilution au 1/50).

2.3.3 Divers

2.3.3.1 Tampon phosphate de la phase mobile

Il s'agit d'un tampon phosphate 0,012 M ajusté à pH $3,0 \pm 0,1$. Pour cela 1,6 g de dihydrogénophosphate de potassium et 2 ml d'acide phosphorique 2 M sont dissous dans 1 l d'eau.

2.3.3.2 Solvant d'extraction

Il consiste en un mélange hexane / alcool n-amylique (98 / 2, v / v).

2.4 EXTRACTION

L'extraction est identique pour l'étude clinique et animale (mêmes conditions opératoires et mêmes quantités).

Le pool sérum est constitué d'un mélange provenant du centre de transfusion sanguine de l'hôpital Bel Air (Thionville). Il a été testé et trouvé négatif pour l'antigène de surface du virus de l'hépatite B, pour les anticorps anti-HIV-1. Ce pool a été testé dans les conditions décrites par notre méthode d'analyse et est dénué de tout médicament pouvant interférer avec nos dosages.

	GAMME ETALON (µg / l)				SERUM	
	20	50	100	200	Contrôle	Patient
Pool sérum	1 ml					
Sérum patient ou rat						1 ml
Solution étalon: 2 mg/l	10 µl	25 µl	50 µl	100 µl		
Solution de contrôle: 2 mg/l					50 µl	
Solution étalon interne: 5 mg/l	50 µl					
Soude 4N	200 µl					
Solvant d'extraction	8 ml					

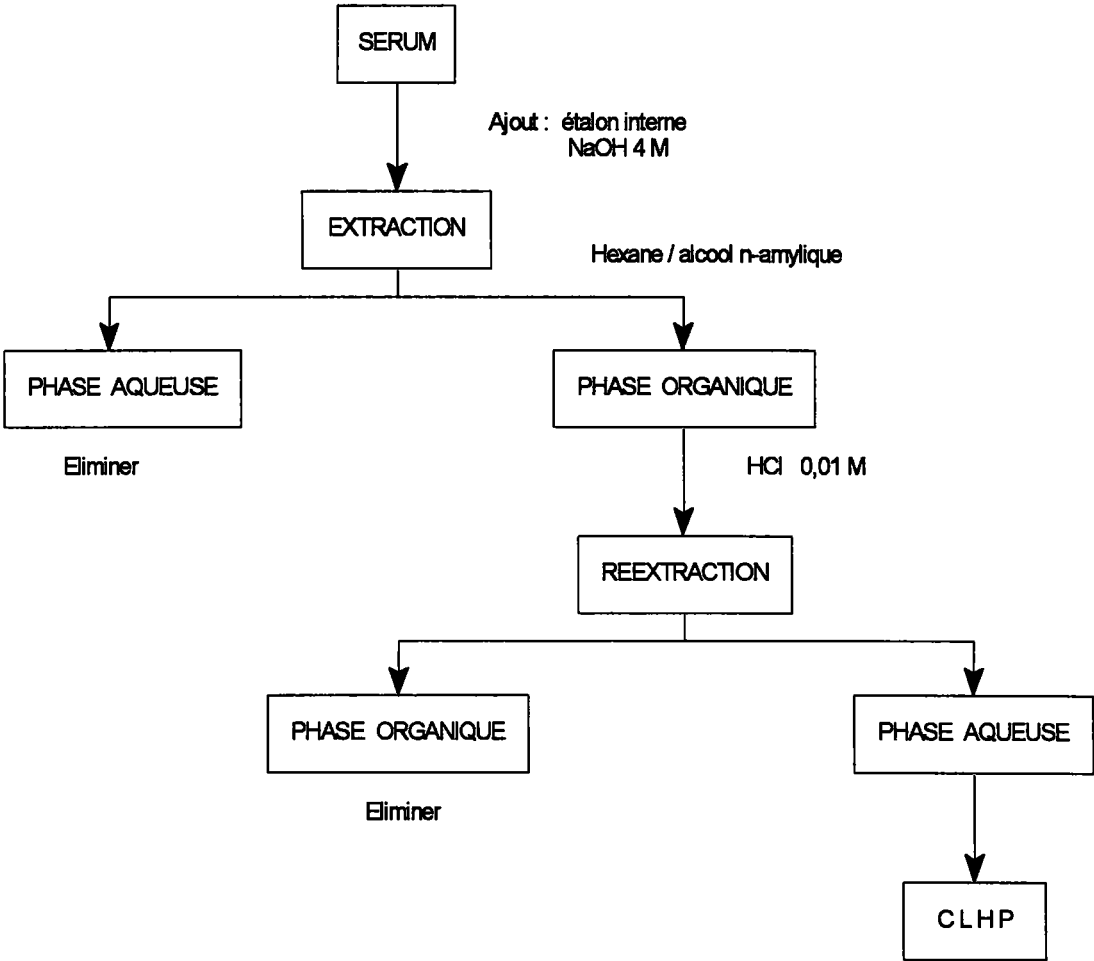


Figure 8: Schéma d'extraction de la fluoxétine et de la norfluoxétine dans le sérum chez l'Homme et le Rat.

La figure 8 schématise l'extraction de la fluoxétine et de la norfluoxétine dans le sérum chez l'Homme et le Rat. L'extraction est réalisée dans des tubes de 12 ml avec bouchons hermétiques. La gamme d'étalonnage est faite en utilisant un pool de sérum exempt de toute substance médicamenteuse. Les tubes sont agités de façon automatique durant 15 min, puis centrifugés 5 min à 3000 *g*.

La phase organique (7 ml) est reprise dans des tubes à fond conique. A la phase organique est ajoutée 200 µl de solution HCl 0,01 M. Après agitation durant 1 min, puis centrifugation 5 min à 3000 *g*, la phase organique supérieure est éliminée, et 50 µl de phase acide sont injectés.

2.5 CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES

2.5.1 Sérum humain

- **Colonne chromatographique :** Superspher RP 8 (4 µm)
- **Phase mobile (v/v) :**
 - Tampon KH_2PO_4 : 43 %
 - Acétonitrile : 57 %
- **Débit :** 1,5 ml / min
- **Longueur d'onde :** 226 nm
- **Température de la colonne :** 45°C
- **Pression de la colonne :** 120 bars
- **Sensibilité du détecteur :** 0,006 pleine échelle
- **Injection :** 50 µl

Solution test

La solution test contient des composés couramment prescrits aux patients et nécessitant une séparation suffisante pour un dosage quantitatif. La figure 9 montre un profil de séparation chromatographique entre la fluoxétine et certains des composés [norfluoxétine, cyamémazine, fluphénazine (E.I) et chlorpromazine] pouvant interférer avec celle-ci.

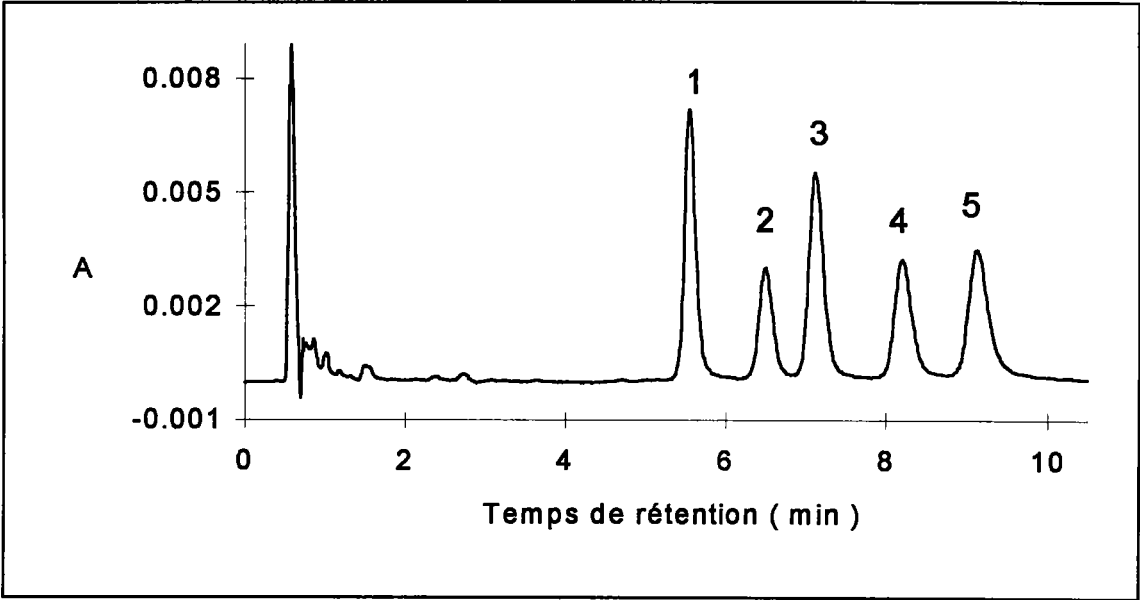


Figure 9. Chromatogramme test de séparation de la fluoxétine et de certains composés (1: norfluoxétine; 2: cyamémazine; 3: fluoxétine; 4: fluphénazine; 5: chlorpromazine)

Le profil chromatographique d'un extrait de sérum humain est visualisé sur la figure 10.

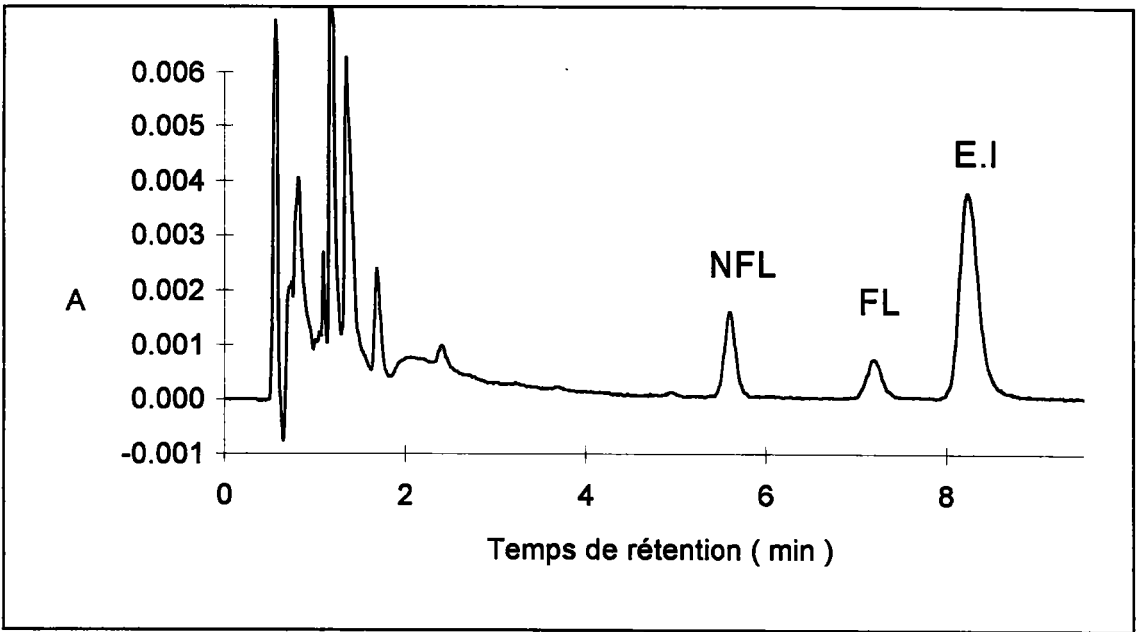


Figure 10. Chromatogramme type d'un extrait de sérum humain (NFL: 252 µg/l; FL: 133 µg/l)

2.5.2 Sérum de rat

Les conditions chromatographiques sont identiques à celles du sérum humain. Le profil chromatographique d'un extrait de sérum de rat est visualisé sur la figure 11.

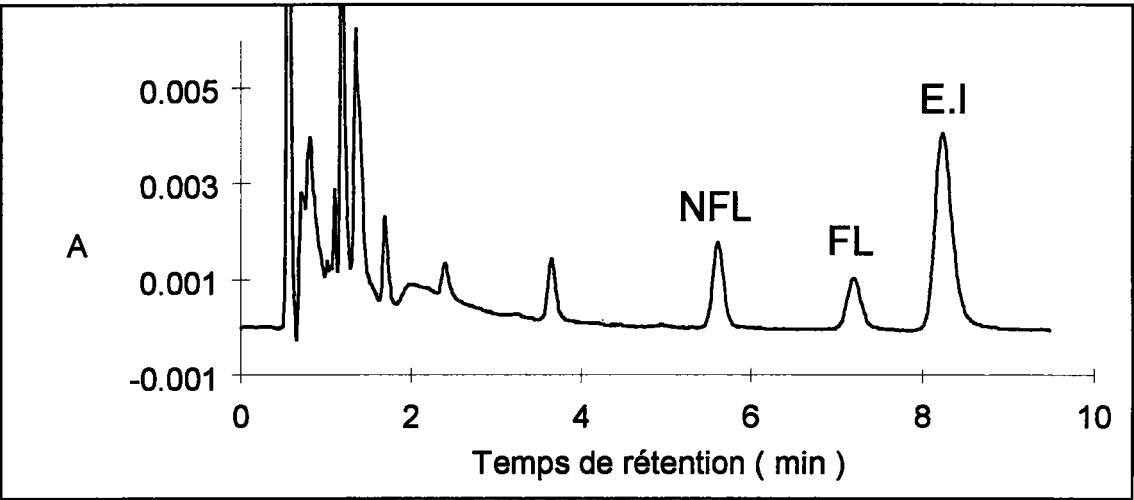


Figure 11. Chromatogramme type d'un sérum extrait de rat (NFL: 256 µg/l; FL: 165 µg/l)

2.6 VALIDATION DE LA METHODE

2.6.1 Linéarité

Les valeurs expérimentales (x = concentration et y = réponse) sont reportées sur un graphe. Elles permettent de tracer une droite de régression qui pourra devenir, si la relation concentration - réponse est une droite, la droite d'étalonnage. La fluoxétine et la norfluoxétine sont linéaires de 10 à 800 µg/l dans les conditions décrites par la méthode (figure 12). 5 mesures ont été réalisées pour chaque niveau. Les coefficients de détermination (r^2) entre rapport de hauteur de pic et concentration en fluoxétine et norfluoxétine, et les équations des droites sont les suivants:

	Norfluoxétine	Fluoxétine
Coefficient de détermination (r^2)	0,999	0,999
Equation de la droite	$y = 0,0050x - 0,0046$	$y = 0,0048x + 0,0133$

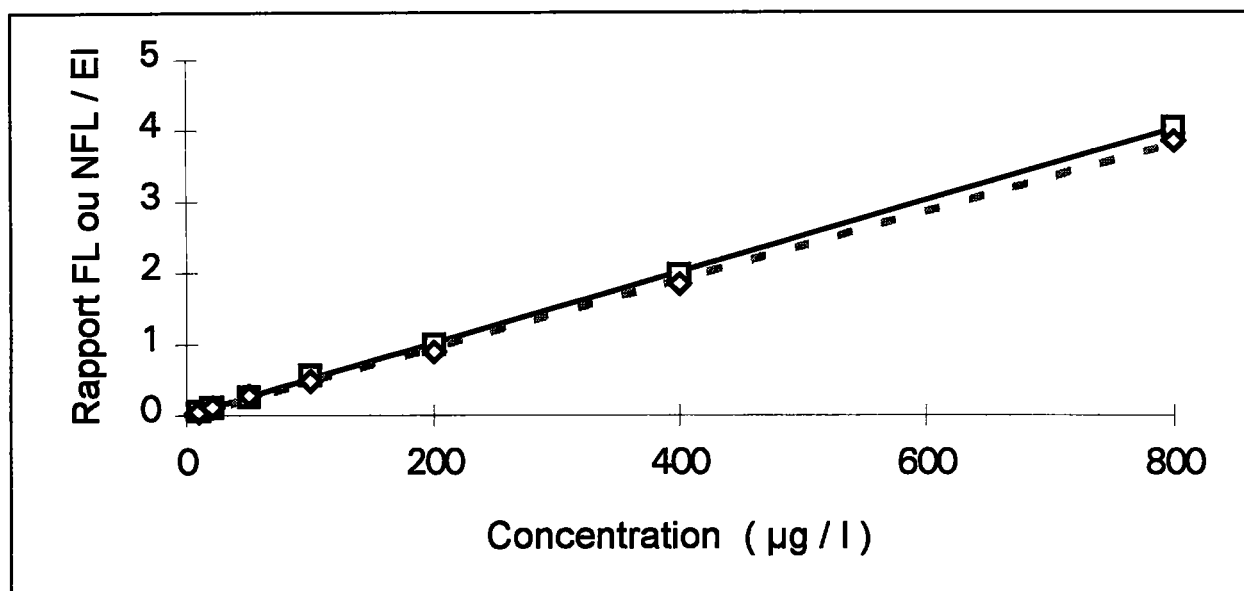


Figure 12. : Courbe d'étalonnage de la fluoxétine et de la norfluoxétine ($n = 5$):
NFL (—); FL (- - -)

2.6.2 Exactitude

L'exactitude ou justesse de la méthode représente la qualité de l'accord entre une valeur mesurée et la valeur vraie ou conventionnellement vraie. Sur le plan statistique, l'exactitude s'apprécie par la différence entre une moyenne observée (x_i) et une valeur théorique (x): $x_i - x$ (Touratier et Pradeau, 1992).

La valeur vraie peut être approchée par une distribution de valeurs. Cette approche dépend des moyens mis en oeuvre par l'observateur grâce à une méthode appelée « méthode conventionnellement vraie ». Malheureusement, il n'existe pas de telles méthodes en ce qui concerne les dosages par chromatographie. Par conséquent, il est impossible de se baser sur une valeur « méthode conventionnellement vraie » pour juger de l'exactitude d'une technique analytique.

Plusieurs procédures permettent d'approcher l'exactitude d'une méthode:

- comparaison des résultats fournis par plusieurs méthodes
- utilisation d'une moyenne générale lors d'un contrôle de qualité
- utilisation d'une concentration théorique d'après une pesée.

Nous utiliserons cette dernière approche pour apprécier *l'inexactitude* qu'exprime la différence ΔC entre la moyenne d'une série de mesures répétées et la valeur théorique (C).

Nous avons apprécié l'inexactitude relative $\Delta C/C$ sur deux niveaux de mesure (surcharge de 50 ng et 400 ng de fluoxétine à 1 ml de sérum exempt de tout médicament).

Nous avons obtenu les résultats suivants (n = 10):

$$\Delta C_{50}/C = 1,4 \%$$

$$\Delta C_{400}/C = 1,5 \%$$

2.6.3 Précision

La précision représente la qualité de l'accord entre les différentes mesures d'un même spécimen dans des conditions déterminées. Suivant les conditions opératoires, la précision sera la mesure de la répétabilité ou de la reproductibilité.

2.6.3.1 Répétabilité

La répétabilité a été réalisée à partir d'un point de la gamme (100 µg/l) sur 10 échantillons.

	Moyenne (µg/l)	C.V. %
Norfluoxétine	99,5 ± 2,2	2,2
Fluoxétine	99,9 ± 1,6	1,6

2.6.3.2 Reproductibilité

Celle-ci a été réalisée à partir du contrôle de fluoxétine calibré à 100 µg/l et testé lors de 15 séries différentes à des jours différents.

Moyenne:	99,1 ± 4,2 (µg/l)
C.V. :	4,2 %

2.6.4 Sensibilité et limite de détection

2.6.4.1 Sensibilité

Une méthode est dite sensible si une faible variation de concentration (c)

entraîne une variation importante de la réponse instrumentale (y). C’est le cas quand la dérivée dy/dc est grande. La sensibilité (S) est donc définie comme la pente de la droite d’étalonnage (à condition que celle-ci soit linéaire), elle peut donc être mesurée sur n’importe quel point de la droite d’étalonnage.

Les résultats obtenus sont les suivants:

	S
Norfluoxétine	0,0050
Fluoxétine	0,0048

2.6.4.2 Limite de détection

La limite de détection d’une méthode est le plus petit signal exprimé en quantité (ou concentration) qui peut être distingué avec une probabilité connue d’un blanc réalisé dans les mêmes conditions. Elle est calculée à l’aide de l’écart type exprimant la fidélité des mesures du blanc (Touratier et Pradeau, 1992).

X: valeur la plus petite du signal déterminée de façon acceptable par la méthode

Xb: moyenne des mesures déterminées sur un blanc

σ : écart type de la distribution des blancs

$$X = Xb \pm 3\sigma$$

L’évaluation de la quantité minimale fournissant un signal mesurable a été obtenue après ajout de 2 ng à 1 ml d’un pool de sérum exempt de tout médicament. Pour $n = 10$, les moyennes des mesures effectuées sont les suivantes:

	Moyennes $\pm$ E.T.	Limite de détection ($\mu\text{g/l}$)
Norfluoxétine	2,04 $\pm$ 0,12	2,40
Fluoxétine	2,02 $\pm$ 0,14	2,44

La limite de détection de la norfluoxétine est de: 2,40 $\mu\text{g/l}$; celle de la fluoxétine étant de 2,44 $\mu\text{g/l}$.

2.6.5 Spécificité et sélectivité

Une méthode est spécifique si dans un système à plusieurs constituants, elle ne fournit un signal que pour le seul constituant à mesurer.

Une méthode est sélective si dans un système à plusieurs constituants, elle fournit un signal pour certains constituants à l'exclusion d'autres.

Tous les médicaments susceptibles d'être détectés ou qui interfèrent avec le dosage ont été répertoriés en fonction de leur facteur de capacité (k') pour plus de commodité de lecture. Pour caractériser la rétention d'un composé, on utilise le facteur de capacité, défini comme le rapport de la quantité de soluté dans la phase stationnaire à la quantité de soluté dans la phase mobile ou en pratique le rapport des temps de rétention des composants retenus et non retenus.

Molécules testées	Facteur de capacité
Bromazépam	1,0
Desméthyl diazépam	1,4
Flunitrazépam	1,6
Diazépam	3,0
Dibenzépine	4,6
Lévomépromazine	4,6
Miansérine	7,4
Loxapine	8,2
Norfluoxétine	8,4
Halopéridol	8,4 *
Concordine	9,0
Dosulépine	9,6
Cyamémazine	10,0
Fluoxétine	11,0
Chlorhalopéridol	12,3
Fluphénazine (E.I)	13,0
Amitriptyline	13,8
Trimipramine	14,2
Chlorpromazine	14,6
Clomipramine	16,6

Aucune molécule n'est susceptible d'interférer avec les dosages à l'exception de l'halopéridol. Mais l'halopéridol (*) (à 226 nm et 0,006 d'absorbance pleine échelle) n'est pas détecté dans les conditions d'extraction de la fluoxétine. De plus, les taux thérapeutiques de l'halopéridol sont faibles: 5-15 µg/l.

2.6.6 Efficacité de l' extraction - Rendement

L'étude du rendement d'extraction ou de l'efficacité de l'extraction est très utile pour tester les différentes étapes d'une méthode analytique et permet d'évaluer les pertes du constituant à doser lors des différentes étapes de l'extraction.

Le rendement absolu a été obtenu en utilisant la méthode suivante:

- matrices surchargées d'une quantité connue et croissante de substance et ayant subi le procédé d'extraction (signal B)
- solutions reconstituées de substances à même concentration et n'ayant pas subi le processus d'extraction (signal A)

Le rapport des 2 signaux B/A donne le rendement pour chaque concentration analysée. Le résultat du rendement d'extraction est alors rendu en terme de moyenne $\pm$ l'écart type de la distribution (Touratier et Pradeau, 1992).

Le rendement d'extraction a été évalué en ajoutant des doses croissantes (50, 100, 200, 400, 800 ng/ml) de fluoxétine, norfluoxétine et fluphénazine (étalon interne) à un pool de sérum exempt de tout médicament.

Le rendement moyen d'extraction pour la fluoxétine, norfluoxétine et fluphénazine est de $89,8 \pm 0,8$, $83,6 \pm 1,3$ et $92,8 \pm 0,8$ % respectivement.

Quantité ajoutée (ng/ml)	Rendement obtenu (%)		
	Norfluoxétine	Fluoxétine	Fluphénazine (E.I)
50	83	91	94
100	85	90	93
200	85	89	92
400	83	90	93
800	82	89	92

2.7 COMMENTAIRES SUR LA METHODE ANALYTIQUE

2.7.1 Propriétés analytiques

Les méthodes mises en oeuvre pour le dosage de la fluoxétine ont suivi l'évolution de la technologie pour tendre vers une plus grande spécificité imposée par les structures très proches des molécules à doser. La plupart des auteurs utilisent soit la chromatographie en phase gazeuse avec détecteur à capture d'électrons (Nash et coll., 1982; Caccia et coll., 1990), ou en phase liquide avec détection U.V (Orsulak et coll., 1988a, 1988b; Kelly et coll., 1989). Nous avons opté pour la CLHP avec détection UV, du fait de sa mise en oeuvre assez simple, et parce que nous avons à notre disposition un détecteur très sensible (10^{-3} A). En CPG, les détecteurs thermoioniques ou à capture d'électrons sont toujours d'un maniement délicat et peu recommandés pour les dosages en routine: les molécules doivent souvent être dérivées pour une meilleure détection chromatographique.

La fluoxétine possède une chaîne latérale aminopropyle substituée. Cette substance est une base dont la force est en relation avec le degré de substitution de l'azote de la chaîne aminopropyle. La fluoxétine est moins basique que la norfluoxétine. La solubilité de la fluoxétine en milieu aqueux n'est possible qu'à l'état de sels, mais en revanche elle est soluble dans certains solvants organiques tels que: hexane, éther, dichlorométhane.

Son spectre d'absorption dans l'UV est peu spécifique (longueur d'onde maximale : 226 nm). Sa basicité lui confère une propriété qui trouve une application dans la technique d'extraction; avec certains acides, elle forme une paire d'ions qui est mise à profit pour réaliser son extraction.

Son extraction s'effectue donc en milieu alcalin à l'aide d'hexane (nous aurions pu également utiliser l'heptane). D'autres solvants utilisés quelquefois pour l'extraction des antidépresseurs tricycliques donnent de très mauvais rendements (acétate d'éthyle, chloroforme, dichlorométhane).

2.7.2 Extraction

La spécificité et la sélectivité de la méthode exigent que l'extraction de la fluoxétine et de son métabolite puisse permettre une concentration suffisante de la substance à doser dans l'extrait final et une détection suffisante (tout en cherchant à

éliminer les interférences éventuelles de substances présentes).

Les conditions chromatographiques choisies pour notre étude ont permis de séparer les substances habituellement prises par le malade durant son traitement en complément du chlorhydrate de fluoxétine, à savoir la cyamémazine (k' : 10) et la chlorpromazine (k' : 14,6). Seul l'halopéridol peut interférer dans nos conditions de séparation avec le métabolite; mais vu sa faible concentration plasmatique (5-15 $\mu\text{g/l}$), nos conditions d'extraction et sa très faible absorption à 226 nm, l'halopéridol n'est pas détecté dans les conditions d'extraction de la fluoxétine.

Notre étude ayant un but quantitatif, un étalon interne (fluphénazine) est introduit dans chaque prélèvement.

La norfluoxétine et la fluoxétine sont extraites sous forme non ionisées (en se plaçant en milieu alcalin à l'aide d'hydroxyde de sodium) par un solvant organique non miscible avec le sérum. Un milieu trop alcalin peut provoquer l'altération du métabolite. Nous aurions pu choisir comme solvant l'éther, mais sa grande polarité entraîne de nombreuses impuretés. Nous avons donc choisi un solvant apolaire comme l'hexane additionné d'agent mouillant (2 % d'alcool n-amylique) pour diminuer l'absorption des amines sur le verre. La concentration des extraits s'effectue soit par évaporation à la température ambiante sous courant d'azote, soit par réextraction en milieu acide (HCl 0,01 M). Nous avons choisi la deuxième méthode car elle est assez rapide et de plus donne des extraits plus propres.

2.7.3 Conditions chromatographiques

Les séparations sur colonne de silice ont été les premières mises en oeuvre, mais elles présentent des inconvénients liés à la courte durée de vie des colonnes et aux interférences dues aux adsorptions de produits polaires présents dans les extraits biologiques (Trouvin et coll., 1983). La détermination des concentrations plasmatiques se fait surtout actuellement sur de la silice greffée [les plus connues et les plus utilisées étant l'octylsilice (C8) et l'octadécylsilice (C18)] avec comme phase éluante des mélanges binaires acétonitrile-eau, méthanol-eau tamponnée à pH acide par différents sels dont la molarité varie entre 0,01 M et 0,1 M. Des mélanges ternaires comme méthanol-eau-tétrahydrofurane ou acétonitrile-eau-tétrahydrofurane sont parfois envisagés (Trouvin et coll., 1983). Si la traînée des pics est trop importante, on peut ajouter soit une faible quantité d'amine (triéthylamine) ou un contre-ion

(ammonium quaternaire). Les composés ont été séparés sur une colonne Superspher 100 RP 8 (125 x 4 mm I.D., 4 μ m) avec un mélange acétonitrile-tampon phosphate pH 3,0 et à une longueur d'onde de 226 nm. En effet, plutôt que de choisir une colonne de 25 cm et une granulométrie de 5 μ m, nous avons opté pour une colonne plus courte et une granulométrie de 4 μ m; la durée d'analyse est plus courte pour une pression pratiquement identique. De plus nous obtenons une efficacité bien plus grande ainsi qu'une meilleure résolution entre les différents composés avec ce type de colonne.

2.7.4 Discussion sur la séparation

2.7.4.1 Influence du pH

La fluoxétine comme la plupart des antidépresseurs possède un pKa situé entre 9 et 11. Elle est chromatographiée à pH acide. Sur la phase stationnaire retenue, en imposant une molarité proche de 0,01 M au tampon et une proportion de 60 % en acétonitrile, nous constatons que pour des valeurs de pH comprises entre 2,5 et 3,5 les facteurs de capacité varient peu. Au delà de 3,5 les facteurs de capacité augmentent, les temps de rétention deviennent plus importants et les pics s'élargissent. Pour cette raison, nous avons choisi un pH à $3,0 \pm 0,1$, et cela présente de plus l'avantage d'améliorer la durée de vie de la colonne (figure 13).

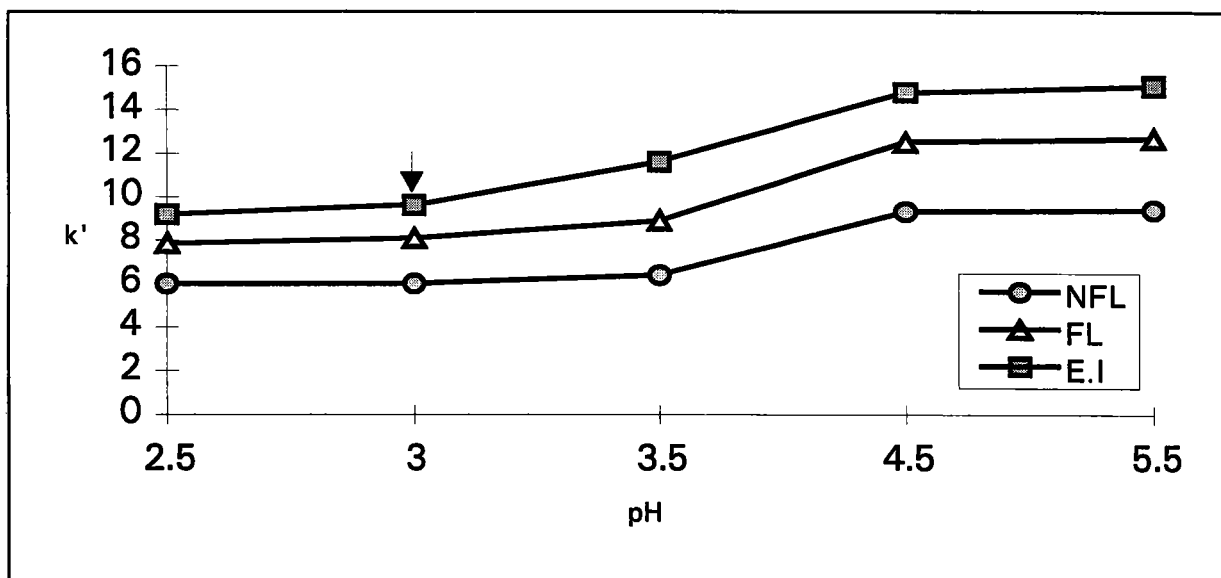


Figure. 13: Influence du pH sur la séparation chromatographique de la FL et de la NFL

2.7.4.2 Influence de la molarité du tampon

Les facteurs de capacité diminuent de manière très importante lorsque la molarité augmente entraînant par là même une meilleure symétrie des pics. A une molarité de 0,012 M (1,6 g/l) et compte tenu du débit de la phase mobile, les temps de rétention n'excèdent pas 20 min et sont surtout compatibles avec de bonnes séparations et permettent d'éviter les interférences médicamenteuses (figure 14).

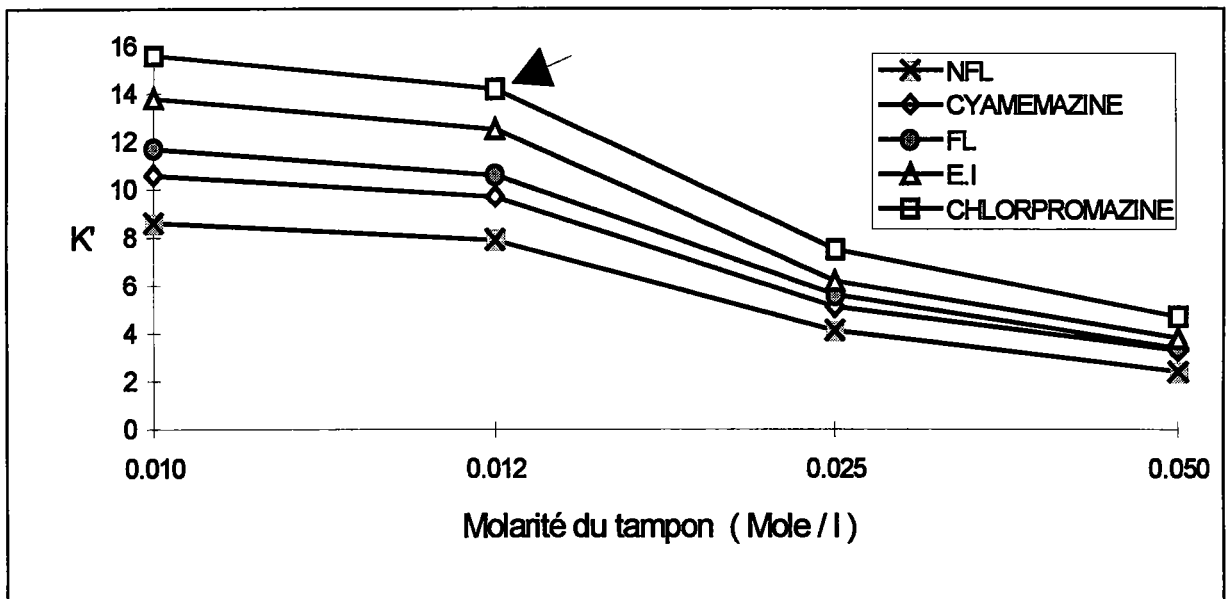


Figure 14: Influence de la molarité du tampon sur la séparation chromatographique de la FL et de la NFL

2.7.4.3 Influence de la teneur en acétonitrile

Le pH de la phase mobile étant fixé à 3,0 pour une solution tamponnée à 0,012 M, nous avons fait varier la proportion d'acétonitrile entre 50% et 70%. L'interférence possible de la cyamémazine et de la chlorpromazine nous oblige à nous maintenir à 60 % avec un débit de 1,5 ml/min pour le dosage du sérum humain (figure 15).

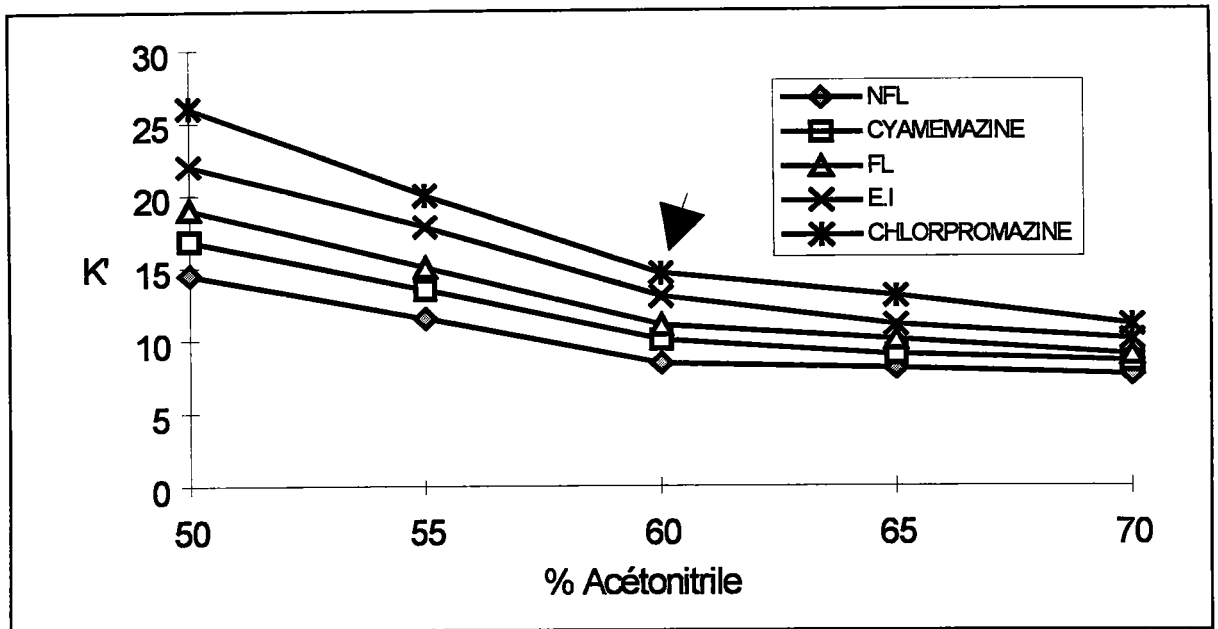


Figure 15 : Influence du % d'acétonitrile sur la séparation chromatographique de la FL et de la NFL

3. DOSAGE DE LA SÉROTONINE

3.1 PRINCIPE DE LA METHODE

La sérotonine existe dans le sang total et le sérum, mais ne se retrouve pratiquement pas dans le plasma vigoureusement centrifugé. Parmi les éléments figurés du sang, seules les plaquettes contiennent de la sérotonine.

La sérotonine totale est donc dosée dans le plasma riche en plaquettes (PRP). La sérotonine est extraite du PRP en milieu basique (tampon borate 0,2 M, pH 10,0) par un mélange dichlorométhane - n-butanol (75-25, v/v), puis réextraite en milieu acide (HCl 0,01 M).

3.2 PREPARATION DES REACTIFS

3.2.1 Solutions aqueuses de HClO_4 et HCl

Les solutions étalons sont diluées dans des solutions d' HClO_4 0,1 M (4,3 ml HClO_4 70% dans une fiole de 500 ml avec de l'eau pure).

La solution de HCl 0,01M est préparée à partir d'une solution mère HCl 1M (8,3 ml de HCl concentré dans une fiole de 100 ml complétée avec de l'eau pure) en diluant au 1/100 cette dernière.

3.2.2 Préparation des solutions d'étalonnage

3.2.2.1 Sérotonine à 100 mg/l

23 mg de sérotonine créatinine sulfate sont dissous dans 100 ml d'une solution HClO_4 0,1 M.

3.2.2.2 Etalon interne à 100 mg/l

2 mg de N-méthylsérotonine sont dissous dans 20 ml de HClO_4 0,1 M.

3.2.2.3 Solutions de travail

Les solutions de sérotonine et d'étalon interne à 100 mg/l sont diluées au 1/20 dans HClO_4 0,1 M.

3.2.3 Solutions diverses

3.2.3.1 Solution tampon borate 0,5 M

6,3 grammes d'acide borique sont dissous dans 200 ml d'eau. Le pH est ajusté à $\text{pH } 10 \pm 0,2$ avec des pastilles d'hydroxyde de sodium. La solution est saturée par du chlorure de sodium.

3.2.3.2 Solution tampon acétate d'ammonium 0,2 M

15,4 grammes d'acétate d'ammonium sont dissous dans un litre d'eau. Le pH est ajusté à $5,1 \pm 0,1$ avec 4,5 ml d'acide acétique concentré.

3.2.3.3 Solvant d'extraction

Il s'agit d'un mélange dichlorométhane / n-butanol (75 / 25, v / v).

3.2.4 Pool de contrôle

Chaque pool de contrôle élaboré au sein du laboratoire est constitué d'un mélange de différents P.R.P recueillis au cours d'une même journée. Le pool ainsi constitué est congelé en aliquotes à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3 PRELEVEMENT

Le sang des sujets humains et des rats est recueilli dans des tubes Vacutainer (Hemogard) de 7 ml contenant de l'EDTA. Les tubes sont apportés au laboratoire dans de la glace et centrifugés immédiatement à 150 g pendant 15 min. Le surnageant est congelé à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ si le dosage est différé.

3.4 EXTRACTION

3.4.1 Plasma humain

	Gamme étalon (µg / l)				P.R.P	
	50	100	200	400	Contrôle	Patient
Eau	1 ml					
P.R.P contrôle					1 ml	
P.R.P patient						1 ml
Solution étalon	10 µl	20 µl	40 µl	80 µl		
Sol. étalon interne	50 µl					
Tampon borate	1,5 ml					
Solvant d'extraction	10 ml					

3.4.2 Plasma de rat

	Gamme étalon (mg / l)				P.R.P
	0,5	1,0	1,5	2,0	rat
Eau	0,25 ml				
P.R.P rat					0,25 ml
Solution étalon	25 µl	50 µl	75 µl	100 µl	
Solution étalon interne	50 µl				
Tampon borate	1.5 ml				
Solvant d'extraction	10 ml				

Le protocole d'extraction est schématisé sur la figure 16. Tous les tubes sont agités 10 min de façon automatique puis centrifugés 10 min à 3000 g. Chaque phase organique est passée sur Na₂SO₄ anhydre afin d'éliminer toute trace aqueuse. Dans des tubes à fond conique de 15 ml, 400 µl d'HCl 0,01 M sont ajoutés à chaque phase organique. Tous les tubes sont agités vigoureusement 1 min puis centrifugés 5 min à

3000 g. Dans chaque tube la phase organique est éliminée et 20 µl de phase aqueuse acide de chaque extrait sont injectés.

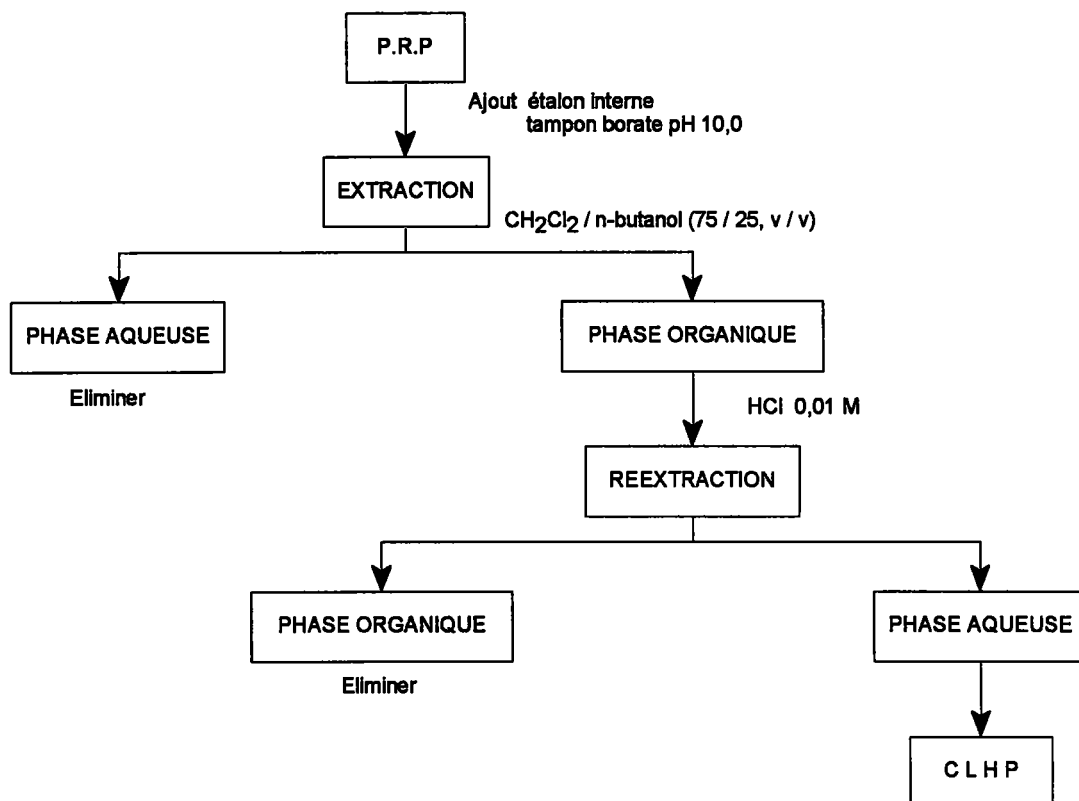


Figure 16: Schéma d'extraction de la sérotonine plaquettaire

3.5 CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES

- **Colonne chromatographique** : Capcell C₁₈
- **Phase mobile (v/v)**:
 - tampon acétate d'ammonium 0,2 M pH 5,1 : 92%
 - méthanol pour chromatographie : 8%
- **Débit**: 1 ml/min
- **Température de la colonne** : 35°C

- **Pression de la colonne :** 100 bars à 35°C
- **Potentiel d'oxydation :** 0,5 V / Ag/AgCl
- **Sensibilité du détecteur :** 50 nA
- **Intégrateur : (atténuation)** 8
- **Défilement du papier :** 0,5 cm/min
- **Injection :** 20 µl

Le profil chromatographique d'un extrait de P.R.P humain est visualisé sur la figure 18. Les temps de rétention ne sont donnés qu'à titre indicatif et fluctuent avec la durée de vie de la colonne.

Pic de sérotonine: 7,1 min
Pic d'étalon interne: 8,1 min

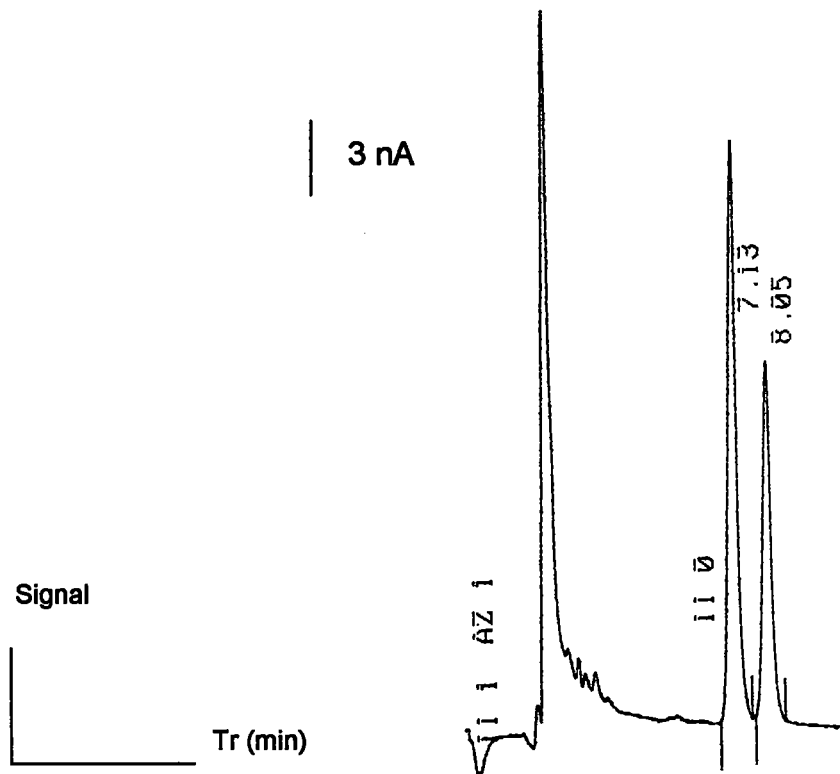


Figure 17: Chromatogramme type visualisant un extrait de P.R.P contenant 210 µg/l de sérotonine.

3.6 VALIDATION DE LA METHODE

3.6.1 Linéarité

La linéarité a été établie à partir de solutions aqueuses sur 6 points. L'étalonnage est linéaire entre 10 et 800 µg/l (figure 17). Chaque niveau représente la moyenne de 5 mesures. Le coefficient de détermination (r^2) entre rapport de hauteur de pic et concentration en sérotonine des étalons est: $r^2 = 0,999$. L'équation de la droite est la suivante: $y = 0,0097 x + 0,0159$.

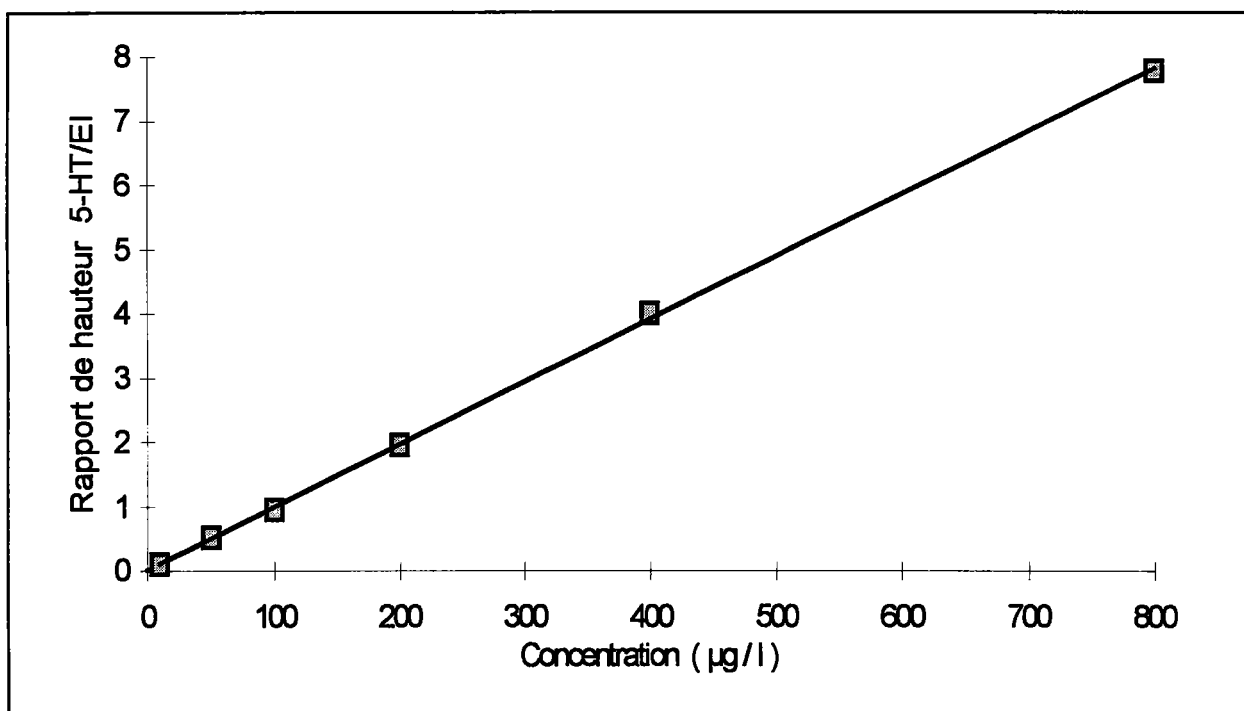


Figure 18: Courbe d'étalonnage de la sérotonine plaquettaire ($n = 5$)

3.6.2 Exactitude

Comme pour la fluoxétine, nous avons apprécié l'inexactitude relative $\Delta C/C$ sur deux niveaux de mesure (surcharge de 50 µg/l et 200 µg/l). Les dosages sont réalisés en surchargeant un P.R.P par une masse connue de sérotonine ($n = 10$).

Nous avons obtenu les résultats suivants:

$$\Delta C_{50}/C = 1,9\%$$

$$\Delta C_{200}/C = 1,8\%$$

3.6.3 Précision

3.6.3.1 Répétabilité

La répétabilité réalisée sur un pool de contrôle élaboré au laboratoire (n = 10)* montre un C.V. de 1,8 %.

Moyenne (µg/l):	209,9
Ecart type:	3,8
Coefficient de variation :	1,8 %

* n: nombre de prélèvements

3.6.3.2 Reproductibilité

La reproductibilité intersérielle a été effectuée sur 2 pools de contrôle à concentrations différentes. Les résultats pour les différentes séries (n = 15) à des jours différents donnent des C.V. corrects.

	Moyenne	E.T	C.V %
Pool 1	121,3	7,7	6,3
Pool 2	215,3	4,5	2,1

3.6.4 Sensibilité et limite de détection

La sensibilité (S) de la méthode est la suivante: S = 0,0097.

L'évaluation de la quantité minimale fournissant un signal mesurable a été obtenue après ajout de 2 ng à 1 ml d'eau désionisée. Pour n = 10, les moyennes des mesures effectuées pour la sérotonine sont de 2,01 ± 0,16. La limite de détection de la sérotonine est de: 2,49 µg/l.

3.6.5 Spécificité et sélectivité

Aucun composé endogène n'est détecté aux temps de rétention de la sérotonine et de l'étalon interne.

La seule molécule pouvant interférer est le 5-HTP (5-hydroxytryptophane); celui-ci est éliminé en cours d'extraction grâce à l'utilisation de tampon borate.

3.7 EFFICACITE DE L'EXTRACTION - RENDEMENT

Le rendement avec notre méthode a été obtenu en ajoutant des doses croissantes de sérotonine à un plasma exempt de tout composé. Le rendement moyen est le suivant: $91,3 \pm 1,1 \%$

Quantité ajoutée (ng/ml)	Rendement obtenu (%)
20	89,5
50	91,6
100	90,6
200	92,5
400	91,7
800	92,1

3.8 VALEURS USUELLES DE SEROTONINE

Il n'existe pas d'unanimité concernant des valeurs usuelles de sérotonine. A titre indicatif voici les valeurs courantes données par le laboratoire Cerba dans le sang total (Cergy Pontoise, France): 100-300 µg/l.

Aussi, avons nous défini nous mêmes un groupe de contrôle à partir de 42 personnes volontaires non médicalisées et hospitalisées. Les résultats obtenus à partir des différents P.R.P donnent une fourchette allant de 190 µg/l à 330 µg/l (260 ± 70 µg/l).

3.9 COMMENTAIRES SUR LA METHODE ANALYTIQUE

3.9.1 Mode d'extraction

Les échantillons sont extraits à pH 10 par un mélange dichlorométhane / n-butanol (75/25, v/v), puis réextraits en milieu acide. La sérotonine est extraite en même temps que les dérivés basiques par le n-butanol en milieu alcalin (Hardeman et coll.,

1972; Laakso et coll., 1983; Tsuchiya et coll., 1989). Le tampon borate permet d'éliminer le 5-hydroxytryptophane. Il est très important que le pH du tampon borate soit compris entre 9,5 et 10,5 (Hardeman et coll., 1972).

Dans de nombreuses techniques, l'extraction se fait en une ou plusieurs étapes:

- soit par simple déprotéinisation type TCA ou HClO_4 et injection directe du déprotéinisé (Martin et Aldegunde, 1989; Anderson et coll., 1981; Tagari et coll., 1984)
- soit après déprotéinisation, extraction liquide-liquide en milieu organique (n-butanol), puis lavage par du tampon borate pH 10,0 et enfin après ajout de solvant peu polaire (hexane ou heptane) à la phase organique, réextraction finale en milieu acide (Sasa et coll., 1978; Laakso et coll., 1983).

L'ajout de solvant peu polaire permet un meilleur passage en milieu aqueux. Cette technique donne des chromatogrammes exempts d'épaulement, sans interférences. Au contraire, avec la simple déprotéinisation, les pics s'élargissent souvent au bout de quelques injections (problèmes de pH), avec des épaulements dûs certainement à des pics interférents du fait du manque de spécificité de l'extraction.

Dans notre technique, nous regroupons toutes ces étapes en milieu organique en une seule opération grâce au mélange dichlorométhane / n-butanol en milieu basique (tampon borate) (Varoquaux et coll., 1988).

3.9.2 Centrifugation

Nous dosons la sérotonine située dans le plasma riche en plaquettes d'où une centrifugation permettant de recueillir ces plaquettes. Notre propre évaluation nous a conduit à adopter les conditions suivantes: 150 g pendant 15 min.

La plupart des techniques donne un chiffre de même grandeur (Hardeman et coll., 1972; Duggan et coll., 1985; Martin et Aldegunde, 1989).

3.9.3 Choix du potentiel

Nous avons procédé à l'évaluation d'une échelle de potentiel d'oxydation (figure 19). Elle correspond à celle utilisée par les auteurs qui dosent la sérotonine seule (LCEC Application N°34; Kissinger et coll., 1981; Anderson et coll., 1981; Laakso et

coll., 1983; Tagari et coll., 1984). Nous nous sommes placés à une DDP de 0,5 V par rapport à l'électrode de référence (Ag / AgCl) pour effectuer les dosages.

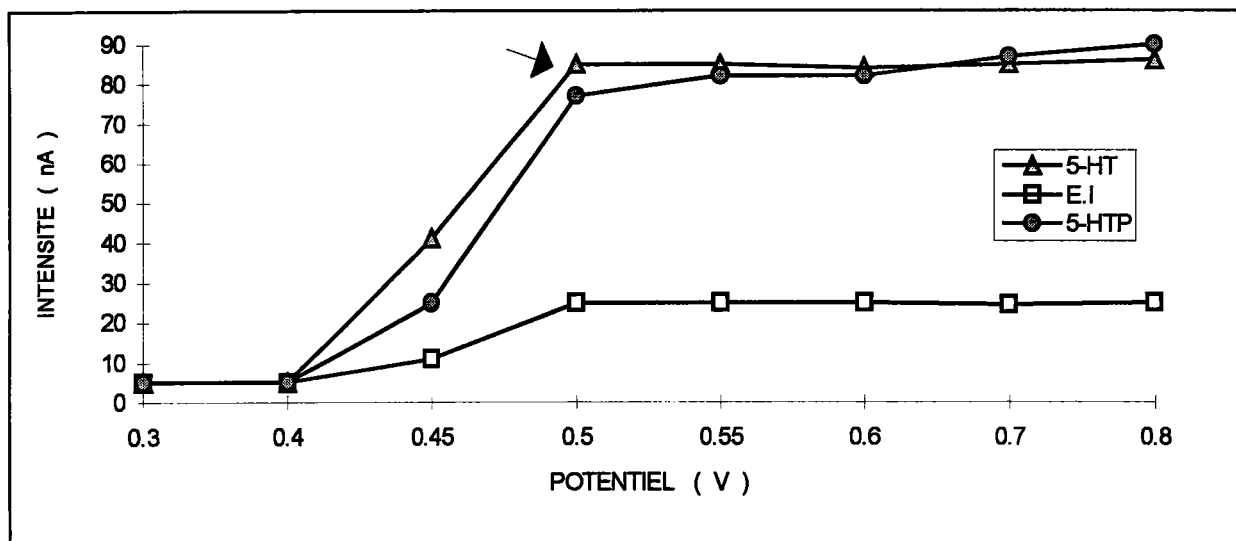


Figure 19: Etude du potentiel d'oxydation de la sérotonine

Le processus d'oxydation est le suivant (figure 20): la sérotonine est convertie en quinone - imine selon l'équation suivante avec perte de 2 électrons (Mefford, 1981).

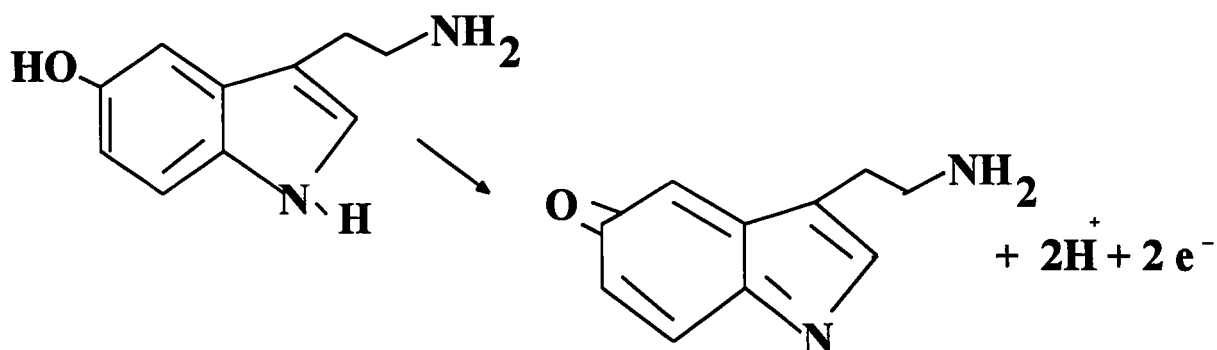


Figure 20: Schéma d'oxydation électrochimique de la sérotonine

Remarque

En effectuant successivement dix fois une injection d'un extrait de P.R.P de patient, il n'a pas été observé de modification des signaux, indiquant par là même la constance de la surface de l'électrode de travail et la non pollution de l'électrode par des molécules de la matrice injectée.

3.9.4 Choix de la colonne analytique

La colonne Capcell est une nouvelle colonne sur le marché, idéale pour l'analyse des composés basiques. Elle se compose de silice de très haute pureté, pratiquement exempte de traces métalliques, recouverte de polymère silicone. Le greffage est ensuite effectué sur le polymère et non pas directement sur la silice, ce qui donne des liaisons Si-R beaucoup plus résistantes que les liaisons Si-O-SiR, assurant une durée de vie beaucoup plus longue aux colonnes. L'utilisation de colonnes RP 18 classiques donnait une asymétrie relativement importante de l'étalon interne, posant problème lors de l'intégration du pic.

3.9.5 Etude de la phase mobile

De nombreux auteurs utilisent un tampon phosphate, acétate, citrate-acétate, ou un tampon avec ajout de contre-ion (dodecylsulfate, octanesulfonate, heptanesulfonate) (Sasa et coll., 1978; Anderson et coll., 1981; Shum et coll., 1982; Laakso et coll., 1983; Tsuchiya et coll., 1989; Martin et Aldegunde, 1989). Nous avons adopté un tampon acétate d'ammonium (LCEC Application N°34) très facile à préparer et moins problématique pour les pompes que les tampons phosphates qui provoquent très facilement des cristallisations dans les tubulures, dans le corps de pompe, et des risques de précipitation avec le méthanol en cas de mauvais rinçage de l'ensemble du système. De plus en utilisant les conditions chromatographiques décrites dans la méthode, la durée d'analyse est assez brève (moins de 12 min), ce qui permet des séries de dosages dans une même journée. Le contre-ion est surtout préconisé dans le cas du dosage de la sérotonine avec d'autres indoles ou catécholes, d'où la nécessité d'une plus grande résolution. Nous avons utilisé un pH de 5,1 et une concentration en tampon de 0,2 M comme le montre les figures 21 et 22.

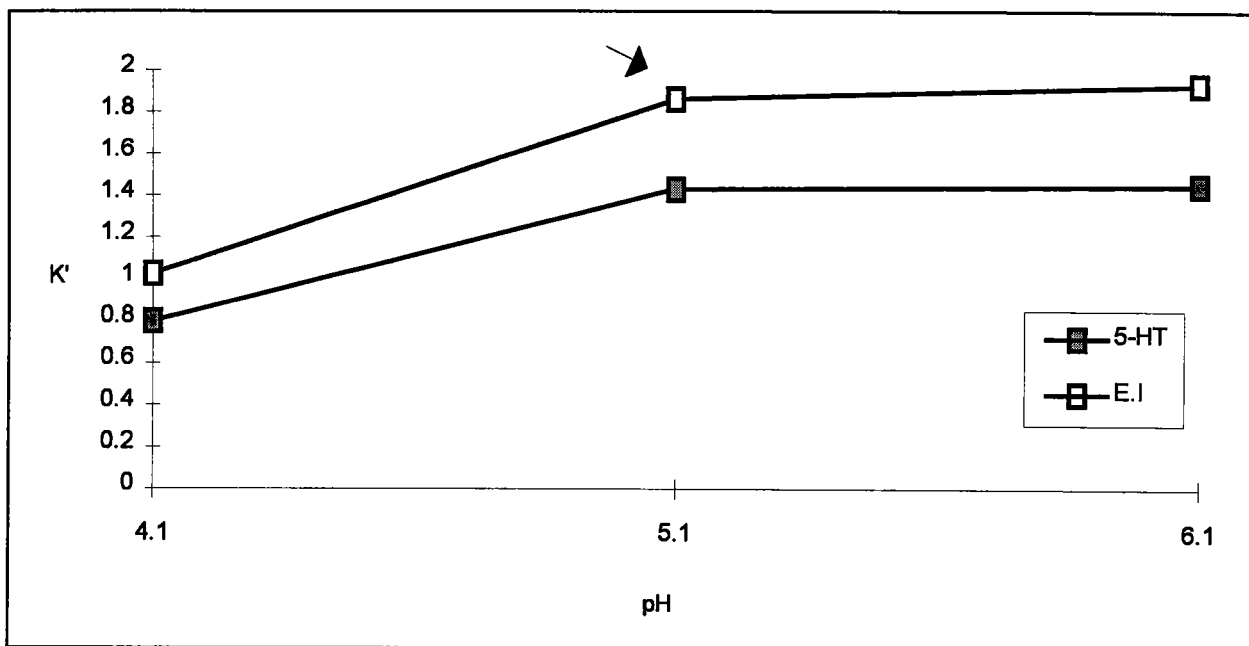


Figure 21: Influence du pH sur la séparation chromatographique de la sérotonine

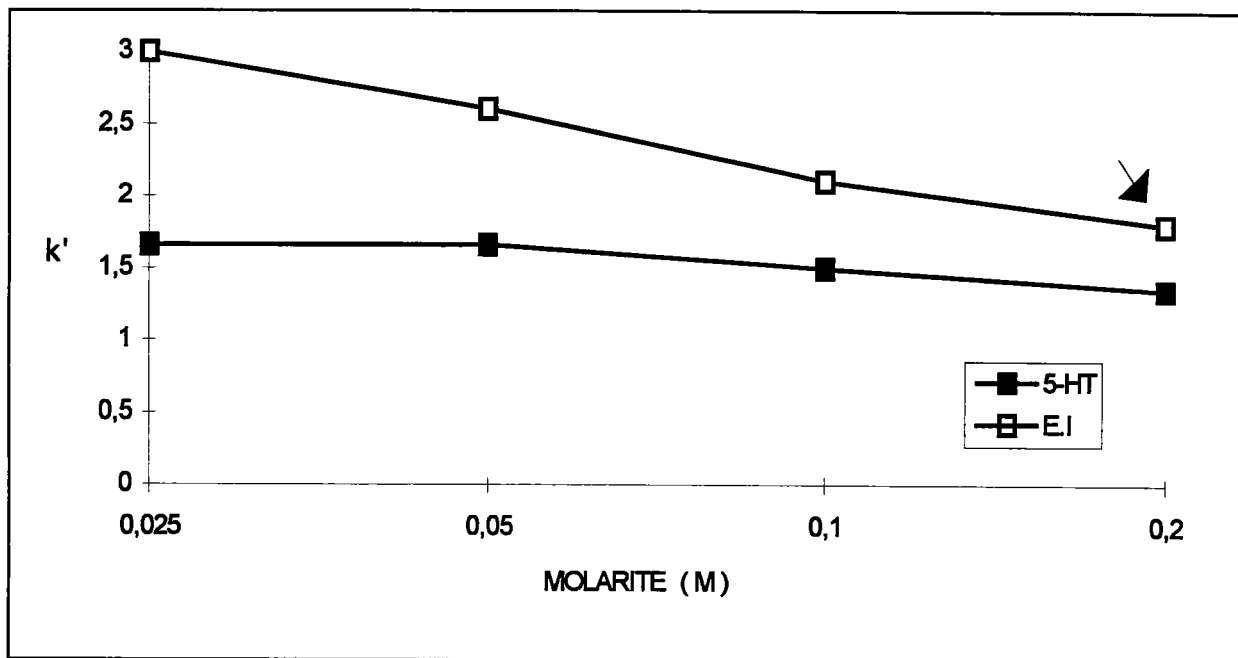


Figure 22: Influence de la molarité du tampon sur la séparation chromatographique de la sérotonine

4. DOSAGE DU MHPG LIBRE ET CONJUGUE

4.1 PRINCIPE DE LA METHODE

Le dosage dans les urines et le plasma se fait par CLHP-EC. Après hydrolyse (pour les dérivés conjugués), le MHPG est extrait par l'acétate d'éthyle puis chromatographié (RP 18) et détecté par électrochimie (ampérométrie).

La méthode d'extraction consiste en une:

- adsorption sur résine AG 1 X 4
- extraction par acétate d'éthyle
- réextraction en milieu acide (acide acétique 0,1 M)

4.2 SOLUTIONS ETALONS

4.2.1 Solution de dilution

Toutes les solutions étalons et dilutions sont préparées à partir de la solution suivante:

- 1 ml HCl concentré
- 0,125 g de métabisulfite de sodium
- QSP 250 ml d'eau

4.2.2 Solutions mères

- MHPG-S : 10 mg dans 100 ml de solution de dilution
- ISO-MHPG : solution congelée (voir étalon interne)
- MHPG : 12,3 mg de MHPG hémipipérazine dans 100 ml de solution de dilution

4.2.3 Solutions de travail

4.2.3.1 MHPG urinaire

- **MHPG-S à 25 mg/l** : dilution au ¼ de la solution mère
- **MHPG à 5 mg/l** : dilution au 1/20 de la solution mère
- **ISO-MHPG** : dilution au 1/400 de la solution congelée

4.2.3.2 MHPG plasmatique

- **MHPG à 0,1 mg/l:** dilution au 1/50 de la solution à 5 mg/l
- **MHPG-S à 1 mg/l:** dilution au 1/25 de la solution à 25 mg/l
- **ISO-MHPG au 1/10000 :** dilution au 1/25 de la solution mère au 1/400.

4.2.4 Solutions diverses

• **Tampon acétate de sodium 1 M pH 6,5 ± 0,1**

Peser 8,2 g dans 100 ml d'eau; ajuster le pH à 6,5 avec 100 µl d'acide acétique concentré.

• **Solution de réextraction: acide acétique 0,1 M**

Pour 500 ml :

- 2,8 ml d'acide acétique concentré
- 250 mg de métabisulfite de sodium
- 250 mg EDTA
- QSP 500 ml d'eau

Le pH est compris entre 3,0 et 3,2.

• **Solution KHCO_3 1 M :** peser 10 g dans 100 ml d'eau.

• **Solution d'élution**

Pour 250 ml :

- 125 ml d'eau
- 125 ml de méthanol
- 0,125 g de métabisulfite de sodium
- 0,125 g EDTA

• **Tampon phosphate de la phase mobile 0.05 M**

6,8 g de KH_2PO_4 sont pesés et dilués avec de l'eau dans une fiole de un litre; 500 µl de H_3PO_4 concentré sont ajoutés afin d'ajuster le pH à $3,0 \pm 0,1$.

4.3 PREPARATION DE L' ISO-MHPG

La validation de la méthode analytique du MHPG a nécessité l'utilisation d'un étalon interne afin de contrôler le comportement du MHPG lors du dosage. Les caractéristiques de l'ISO-MHPG étant similaires à celles du MHPG, tant lors de l'extraction, de la séparation que lors de la détection, font de l'ISO-MHPG l'étalon interne idéal. Ce composé n'étant pas commercialisé, nous avons choisi de le préparer selon la méthode de Muskiet et coll. (1978) modifiée par Shipe et coll. (1984).

4.3.1 Schéma de synthèse

L'étalon interne, 4-méthoxy-3-hydroxyphénylèthylèneglycol (ISO-MHPG) est facilement préparé par réduction en alcool de la fonction acide de l'acide 3-hydroxy-4-méthoxymandélique (ISO-VMA) à l'aide de AlLiH_4 selon la méthode décrite par Muskiet et coll. (1978). Une synthèse est décrite par Shipe et coll., (1984). La figure 23 en schématise le principe.

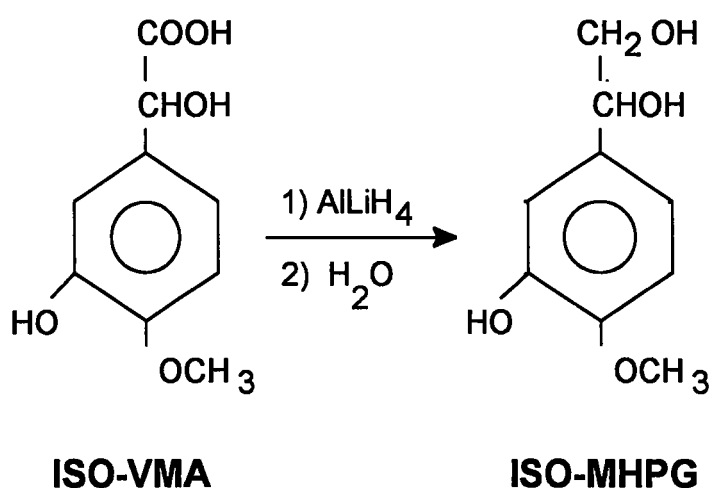


Figure 23: Schéma simplifié de la méthode de synthèse de l'ISO-MHPG.

4.3.2 Synthèse de l'ISO-MHPG

4.3.2.1 Principe de la méthode de synthèse

Dans six tubes à centrifuger en verre borosilicaté (98 x 34 mm) de 40 ml chacun, sont ajoutés 100 mg de ISO-VMA, 10 ml de THF anhydre, enfin 200 mg de AlLiH_4 . Tous les tubes sont agités pendant six heures de façon automatique. Prudemment sous hotte, nous avons ensuite ajouté 10 ml d'eau et agité l'ensemble trois heures de plus. Ce mélange est ensuite ajusté à pH 6,5 avec une solution acide (HCl 1 M) et saturé avec du chlorure de sodium.

Chaque mélange des six tubes est extrait par deux fois 20 ml d'acétate d'éthyle. Après centrifugation, les phases organiques sont réunies et passées sur sulfate de sodium anhydre. Après centrifugation, les phases organiques sont évaporées à 50 °C sous azote. Le résidu sec est repris par 800 μl d'eau.

4.3.2.2 Vérification de l'extraction

5 μl sont d'abord injectés sur la colonne analytique (Superspher, Merck) suivant les conditions chromatographiques de la technique du MHPG, puis 10 μl sur la colonne préparative (RP 18, 250 x 6 mm, 25 μm I.D.), aux mêmes conditions chromatographiques (sauf débit à 3 ml/min) (figure 24). Nous obtenons deux pics chromatographiques [1] et [2].

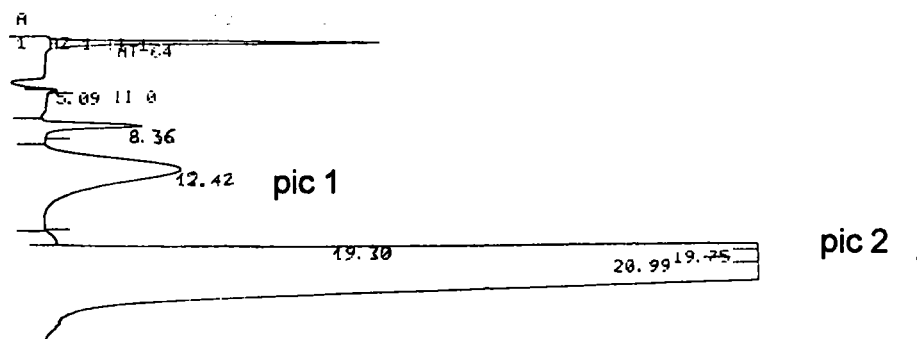


Figure 24: Extrait brut passé sur colonne préparative

Avec une seringue de 1ml, la totalité de l'extrait aqueux est injectée sur la colonne préparative à l'aide d'une boucle de 800 µl et les deux fractions (correspondant aux deux pics) sont recueillies séparément. Après ajustement à pH 6,5 par HCl 1 M et réextraction par l'acétate d'éthyle, celles-ci sont évaporées à sec. Chaque résidu sec est repris par la solution de dilution.

L'identité de ces deux pics a été vérifiée en les analysant par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse, mais le passage en chromatographie en phase gazeuse nécessite une transformation de la molécule à détecter. Afin de rendre celle-ci plus volatile, compatible avec la colonne de séparation, il est possible de modifier ces fonctions par transformation chimique simple (silylation). Pour cela une faible quantité (100µl) est prélevée et réextraite suivant la même méthode que précédemment, et le résidu sec obtenu dérivé. Le but est de fixer un groupement triméthyl silyle (TMS) au niveau d'un hydrogène mobile. Chaque fraction est reprise par 50µl de TMSI (N-triméthylsilyl-imidazole). Il réagit vite et proprement avec les groupements hydroxylés et les acides, mais pas avec les amines.

Les deux tubes sont mis dans un bloc chauffant à 150°C pendant une heure. 0,3 µl sont injectés dans le chromatographe en phase gazeuse à l'aide d'un injecteur solide.

L'ISO-MHPG est contenu dans la **FRACTION 2**; son spectre étant visualisé sur la figure 25. La fraction 1 semble indiquer un dérivé intermédiaire (vanillin triméthylsilyl); la fonction acide de départ se transformant en aldéhyde par réduction incomplète et non pas en fonction alcool, le spectre étant visualisé sur la figure 26.

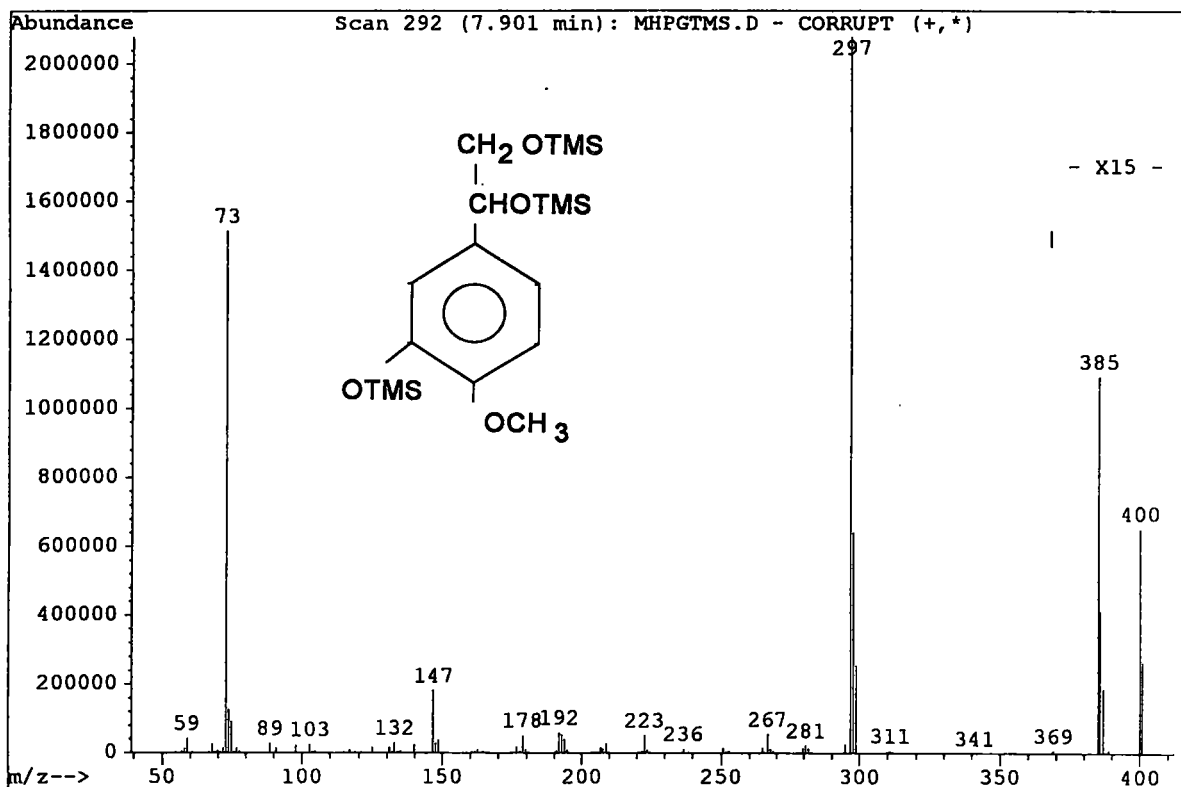


Figure 25: Spectre de la fraction 2 passée en CG-SM

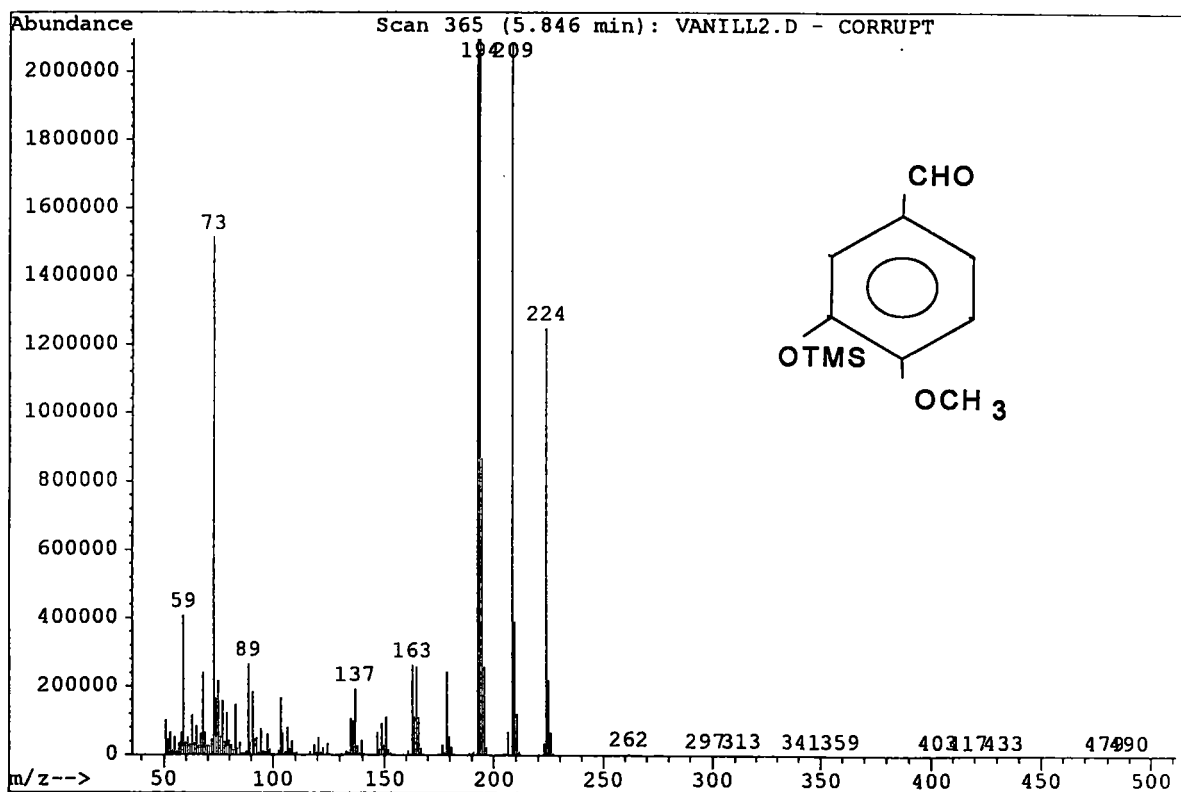


Figure 26 : Spectre de la fraction 1 passée en CG-SM

4.3.2.3 Vérification sur colonne analytique

Le mélange v/v de la fraction 2 et de MHPG donne un profil de chromatogramme visualisé sur la figure 27.

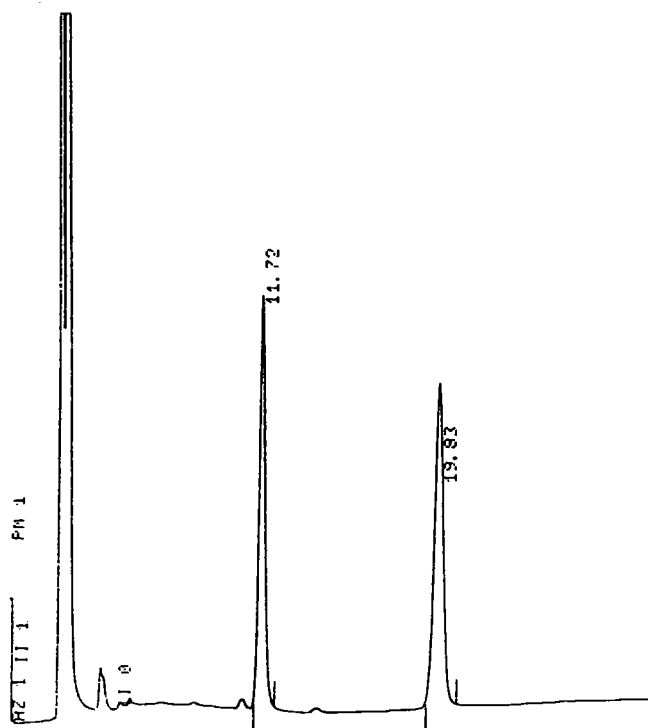


Figure 27 : Chromatogramme test contenant le MHPG (11,7 min) et l'ISO-MHPG (19,8 min).

4.3.2.4 Rendement et concentration de l'extrait

La solution contenant la fraction 2 est congelée en aliquotes de 100 μ l. Ce sont les solutions mères. Ne connaissant pas le rendement de l'extraction et sachant que la molécule réagit à peu près de la même manière que le MHPG (les deux molécules étant très proches l'une de l'autre tant au point de vue propriétés que fonctions chimiques), des dilutions ont été faites à partir de la solution mère jusqu'à l'obtention de pics de même hauteur. Cette dilution est utilisée comme solution de travail d'étalon interne. Dans le cas présent, la solution de travail est diluée au 1/400.

4.4 MODE DE PRELEVEMENT ET CONSERVATION

4.4.1 MHPG urinaire

Les prélèvements urinaires apportés au laboratoire (urines de 24 h non acidifiées), après adjonction d'un antioxydant (1 g/l de métabisulfite de sodium) sont congelés en aliquotes de 10 ml à - 20°C si le dosage est différé.

Les prélèvements se conservent plusieurs mois dans ces conditions. Lors de chaque dosage, la créatinine est également dosée en utilisant la méthode de Jaffé sans déprotéinisation (Bartels et coll., 1972), afin de vérifier si le recueil des urines est correct. Les dosages de créatinine ont été réalisés à l'aide d'un automate Hitachi 704.

4.4.2 MHPG plasmatique

Le sang est prélevé dans un tube Vacutainer (Hémogard) de 7 ml contenant de l'EDTA et apporté le plus rapidement possible au laboratoire dans de la glace. Il est centrifugé 5 min à 3000 g. Le surnageant est prélevé et 50 µl de métabisulfite de sodium (50 g/l) par ml de plasma y sont ajoutés. Le tube est congelé à - 20°C si le dosage est différé.

4.5 EXTRACTION DU MHPG

4.5.1 MHPG-L urinaire

	GAMME ETALON (mg/l)			URINE	
	0,1	0,25	0,5	Contrôle	Patient
Eau	1 ml				
Urine de contrôle				1 ml	
Urine de patient					1 ml
Solution MHPG à 5 mg/l	20 µl	50 µl	100 µl		
Solution E.I au 1/400	25 µl				
Tampon acétate de sodium 1M	500 µl				

4.5.2 MHPG conjugué urinaire

	GAMME ETALON (mg/l)				CONTROLE		PATIENT	
	0,5	1	2	3	MHPG-S	MHPG-T	MHPG-S	MHPG-T
Eau	1 ml							
Urine de contrôle					1 ml			
Urine de patient							1 ml	
Sol. MHPG-S: 25 mg/l	20 µl	40 µl	80 µl	120 µl				
Solution E.I au 1/400	100 µl							
Tampon acétate Na	500 µl							
Vérifier que le pH soit à 6,00 ± 0,05 sinon ajuster avec CH ₃ COOH 1M ou KHCO ₃ 1M. Puis								
Sulfatase 50 UI	100 µl						100 µl	
Glusulase						200 µl		200 µl
Incubation 18H - 24H A 37°C								

4.5.3 MHPG-L plasmatique

	GAMME ETALON (µg/l)				PLASMA	
	2	5	10	20	CONTROLE	PATIENT
Eau	1 ml					
Plasma contrôle					1 ml	
Plasma patient						1 ml
Sol. MHPG: 0,1 mg/l	20 µl	50 µl	100 µl	200 µl		
Sol. E.I au 1/10000	25 µl					
Tampon acétate Na 1M	500 µl					

4.5.4 MHPG conjugué plasmatique

	GAMME ETALON (µg/l)				CONTROLE		PATIENT	
	10	25	50	100	MHPG-S	MHPG-T	MHPG-S	MHPG-T
Eau	1 ml							
Plasma de contrôle					1 ml			
Plasma de patient							1 ml	
Sol. MHPG-S: 1 mg/l	10 µl	25 µl	50 µl	100 µl				
Solution E.I: 1/10000	50 µl							
Tampon Acétate Na	500 µl							
Vérifier que le pH soit à 6,00 ± 0,05 sinon ajuster avec CH ₃ COOH 1M ou KHCO ₃ 1M. Puis								
Sulfatase 50UI	50 µl						50 µl	
Glusulase						100 µl		100 µl
Incubation 18H - 24H à 37°C								

4.5.5 Protocole opératoire

Les extraits hydrolysés ou non (urinaires et plasmatiques) sont ensuite passés sur une colonne d'extraction (AG 1 X 4).

Préparation de la colonne AG 1 X 4

- chaque colonne de type Econobiorad est mise sur un portoir
- 1 ml de résine AG 1X4 en suspension dans de l'eau est ajoutée dans chaque colonne
- la résine est laissée à décanter quelques minutes
- chaque colonne est lavée par 1 ml d'eau

La figure 28 schématise le mode opératoire d'extraction.

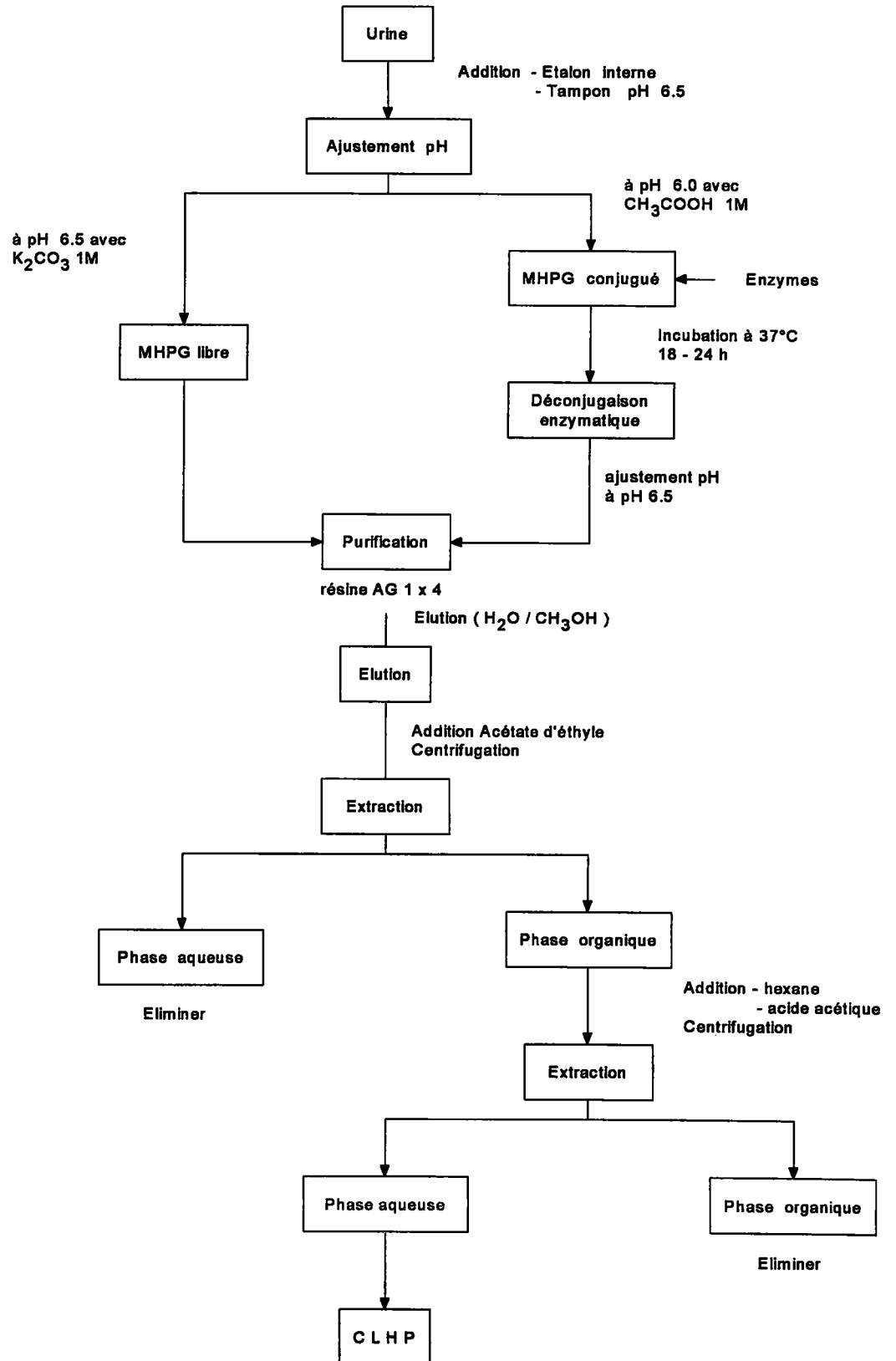


Figure 28 : Schéma simplifié du mode d'extraction du MHPG plasmatique et urinaire

4.5.5.1 Extraction urinaire

Après passage des échantillons sur les colonnes, chaque colonne est lavée par 2 fois 1 ml d'eau. L'élution se fait dans des tubes de 15 ml par 2 fois 1 ml de solution d'élution. A chaque tube est ajouté 1 g de NaCl puis 8 ml d'acétate d'éthyle.

Les tubes sont agités 15 min de façon automatique puis centrifugés 5 min à 3000 g. 5 ml de phase organique sont repris dans des tubes de 15 ml auxquels sont ajoutés 5 ml d'hexane et 2 ml de solution de réextraction. Après agitation de façon automatique durant 15 min puis centrifugation 5 min à 3000 g, la phase organique supérieure est éliminée. 1 ml de phase aqueuse est reprise dans des tubes à hémolyse et toute trace de solvant organique est éliminée sous azote à 40°C pendant 5 min. 50 µl de chaque extrait sont injectés

4.5.5.2 Extraction plasmatique

L'extraction est identique à celle du MHPG urinaire à une seule exception. Après passage sur colonne et extraction par acétate d'éthyle, la phase organique est passée sur sulfate de sodium anhydre, puis évaporée à sec. Le résidu est repris par 150 µl de phase mobile.

4.6 CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES

- **Colonne chromatographique:** Superspher RP 18 (250 x 4 mm I.D., 4 µm)
- **Phase mobile (v/v)**
 - Tampon phosphate KH_2PO_4 0,05 M: 98 %
 - Acétonitrile : 2 %
- **Débit :** 1 ml/min
- **Température :** ambiante
- **Pression (colonne) :** 170 bars
- **Détection**
 - potentiel: 0,85 V / Ag/AgCl
 - sensibilité
 - MHPG-L: 10 nA
 - MHPG CONJUGUE: 20 nA

• **Intégrateur :** atténuation 4

• **Injection**

- MHPG-L: 50 µl
- MHPG-S: 50 µl
- MHPG-T: 25 µl

Solution test

A 1 ml de phase mobile sont ajoutés 100 µl de solution étalon à 5 mg/l et 50 µl de solution étalon interne diluée au 1/400. 20 µl sont injectés dans les conditions d'analyse afin de vérifier les temps de rétention des composés.

Les chromatogrammes représentant le MHPG urinaire et plasmatique (libre et conjugué) sont visualisés sur les figures 29 et 30 respectivement.

Le chromatogramme de la figure 29b montre la présence de deux composés A et B pouvant interférer avec le MHPG et l'étalon interne. Seule une étude de température a permis de réaliser une séparation correcte (voir paragraphe 4.7.3.2).

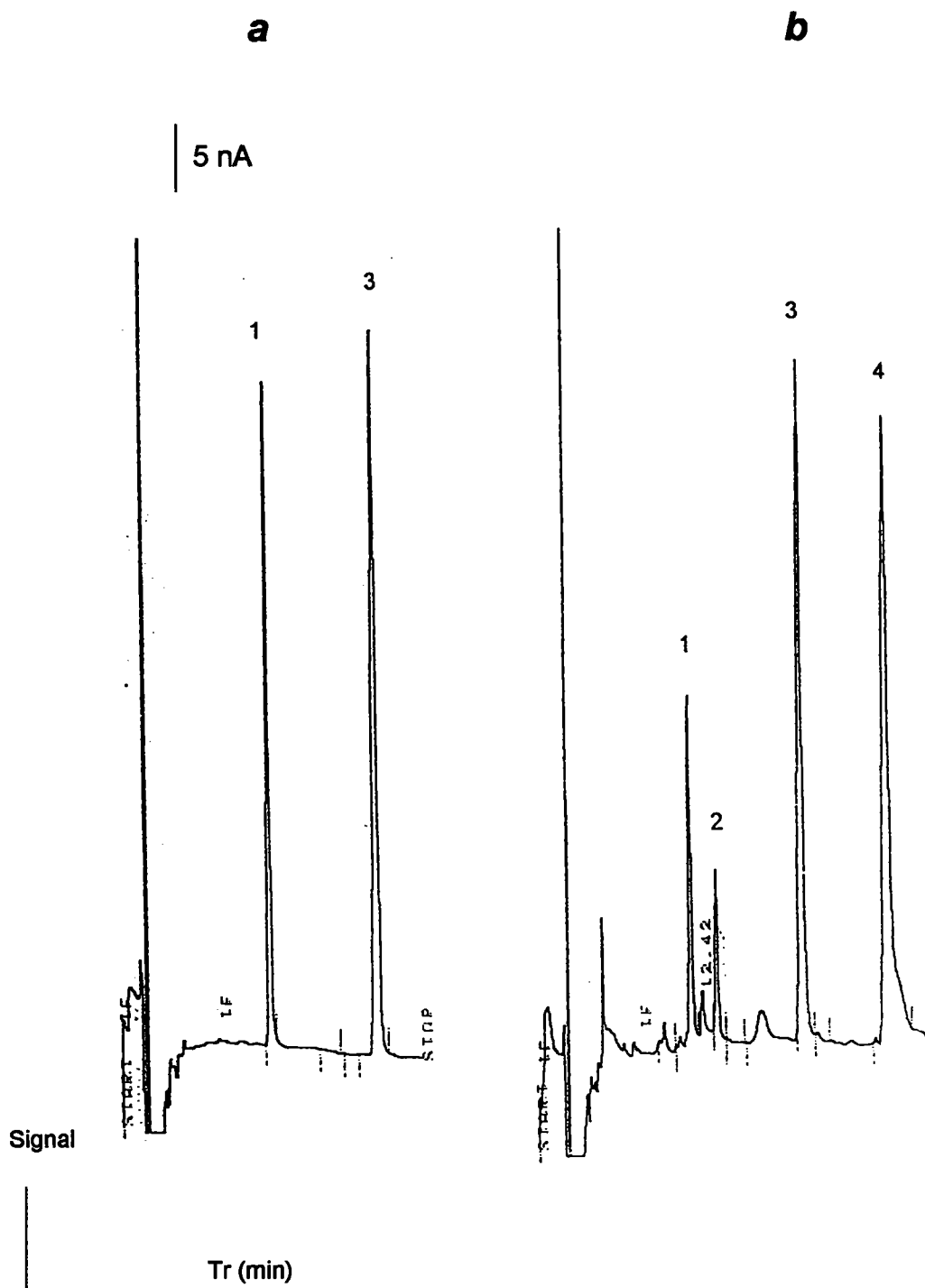


Figure 29. Chromatogrammes types après extraction de **a**: solution étalon de MHPG-S à 1 mg/l; **b**: urine contenant 1,2 mg/l de MHPG-S après hydrolyse.

Pics 1 = MHPG (11,6 min), 2 = composé A (13,6 min), 3 = iso-MHPG (20,9 min),
4 = composé B (27,6 min).

4.7 VALIDATION DE LA METHODE

4.7.1 MHPG urinaire

4.7.1.1 Linéarité

La linéarité du MHPG-L et MHPG-S a été établie à partir de solutions aqueuses sur six points pour MHPG-L et dix points pour le MHPG-S (figures 31a et 31b). L'étalonnage est linéaire entre 0,075 et 1 mg/l pour MHPG-L et entre 0,25 et 7 mg/l pour MHPG-S. 5 mesures ont été réalisées pour chaque niveau. Les coefficients de détermination (r^2) entre rapport de hauteur MHPG/E.I et concentration en MHPG des étalons sont les suivants: MHPG-L: $r^2 = 0,998$; MHPG-S: $r^2 = 0,999$.

	MHPG libre (mg/l)	MHPG sulfaté (mg/l)
Linéarité	0,075 - 1	0,25 - 7
Equation de la droite	$y = 2,189 x - 0,002$	$y = 0,582 x - 0,022$
Coefficient de détermination	0,998	0,999

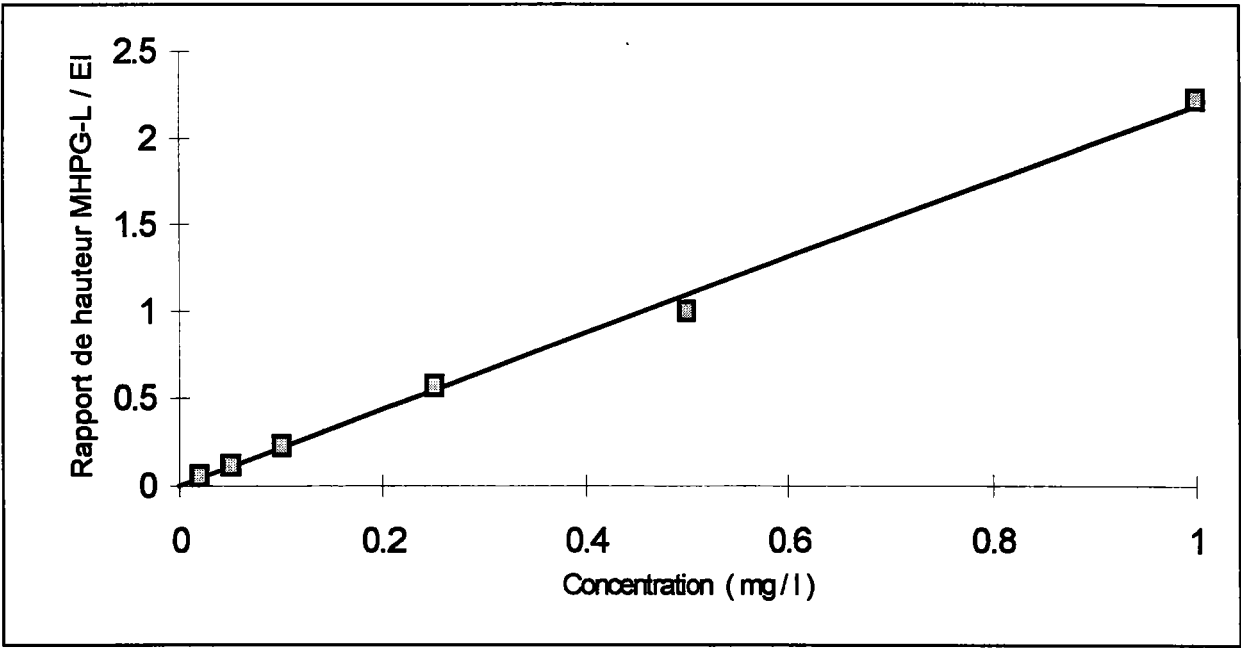


Figure 31a : Gamme étalon du dosage du MHPG-L urinaire (n = 5)

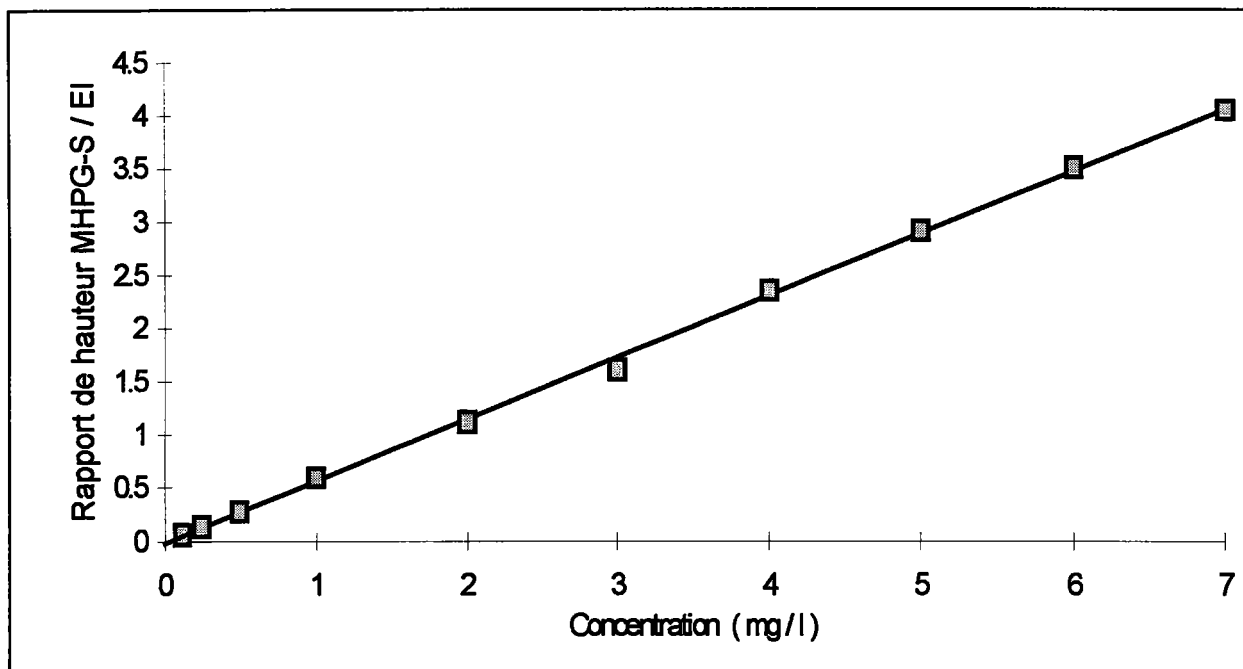


Figure 31b : Gamme étalon du dosage du MHPG-S urinaire ($n = 5$)

4.7.1.2 Exactitude

L'inexactitude relative $\Delta C/C$ a été appréciée sur deux niveaux de mesure pour le MHPG libre (surcharge de 0,2 $\mu\text{g/ml}$ et 1 $\mu\text{g/ml}$ à une solution aqueuse; $n = 10$) et pour le MHPG-S (surcharge de 1 $\mu\text{g/ml}$ et 6 $\mu\text{g/ml}$ à une solution aqueuse; $n = 10$).

Nous avons obtenu les résultats suivants:

MHPG libre:	$\Delta C_{0,2}/C$:	3%
	$\Delta C_1/C$:	1,1%
MHPG sulfaté:	$\Delta C_1/C$:	0,9%
	$\Delta C_6/C$:	0,4%

4.7.1.3 Précision de la technique

a) Répétabilité

La répétabilité réalisée sur deux contrôles (pool 1-2), montre des C.V respectivement plus élevés (3,4 % et 5,5 %) pour MHPG-L que pour MHPG-S (1,9 % et 3,2 %). Ceci est probablement dû aux concentrations plus faibles de MHPG-L. Les résultats concernant la répétabilité sont résumés dans le tableau II.

Tableau II: Répétabilité du MHPG-L et du MHPG-S urinaire

	Concentration (mg/l)	E.T.	C.V. (%)
MHPG-L (n = 10)			
Pool 1	0,115	0,004	3,4
Pool 2	0,090	0,005	5,5
MHPG-S (n = 10)			
Pool 1	2,10	0,04	1,9
Pool 2	0,93	0,03	3,2

b) Reproductibilité

La reproductibilité intersérielle a été réalisée à la fois sur les gammes de calibration et sur deux pools urinaires servant comme contrôle (n°1-2) pour chaque série. Les résultats pour douze séries différentes à des jours différents donnent des C.V corrects. Les résultats concernant la reproductibilité sont résumés dans le tableau III.

Tableau III: Reproductibilité du MHPG-L et du MHPG-S urinaire

	Concentration (mg/l)	E.T.	C.V. (%)
MHPG-L (n = 10)			
0,100	0,101	0,006	6,4
0,250	0,249	0,008	3,4
0,500	0,508	0,015	2,4
Pool 1	0,116	0,008	6,8
Pool 2	0,092	0,007	7,6
MHPG-S (n = 10)			
0,50	0,52	0,03	5,8
1,00	1,03	0,03	2,9
2,00	2,02	0,05	2,5
3,00	3,01	0,05	1,7
Pool 1	2,11	0,04	3,8
Pool 2	0,94	0,03	4,2

4.7.1.4 Sensibilité et limite de détection

La sensibilité de la méthode est la suivante: $S (\text{MHPG} - \text{L}) = 2,189$

$$S (\text{MHPG} - \text{S}) = 0,582$$

L'évaluation de la quantité minimale fournissant un signal mesurable a été obtenue après ajout de 30 ng à 1 ml d'une solution aqueuse pour le MHPG-L et 100 ng à 1 ml d'une solution aqueuse pour le MHPG-S. Pour $n = 10$, les moyennes des mesures effectuées sont les suivantes:

	Moyennes $\pm$ E.T.	Limite de détection (mg/l)
MHPG - L	$0,032 \pm 0,006$	0,050
MHPG - S	$0,101 \pm 0,008$	0,125

Les limites de détection pour le MHPG - L et MHPG - S sont de 0,05 et 0,125 mg/l respectivement.

4.7.2 MHPG plasmatique

4.7.2.1 Linéarité

La linéarité du MHPG-L et du MHPG-S a été établie à partir de solutions aqueuses sur six points pour le MHPG-L et sept points pour le MHPG-S (figures 32a et 32b). L'étalonnage est linéaire entre 1 et 40 $\mu\text{g/l}$ pour MHPG-L et entre 2,5 et 200 $\mu\text{g/l}$ pour MHPG-S. Les coefficients de détermination (r^2) entre rapport de hauteur de pic et concentration en MHPG et les équations des droites sont résumées ci-dessous:

	MHPG - L	MHPG - S
Linéarité ($\mu\text{g} / \text{l}$)	1 - 40	2,5 - 200
Equation de la droite	$y = 0,0991 x + 0,0021$	$y = 0,0277 x + 0,0668$
Coefficient de détermination	0,998	0,999

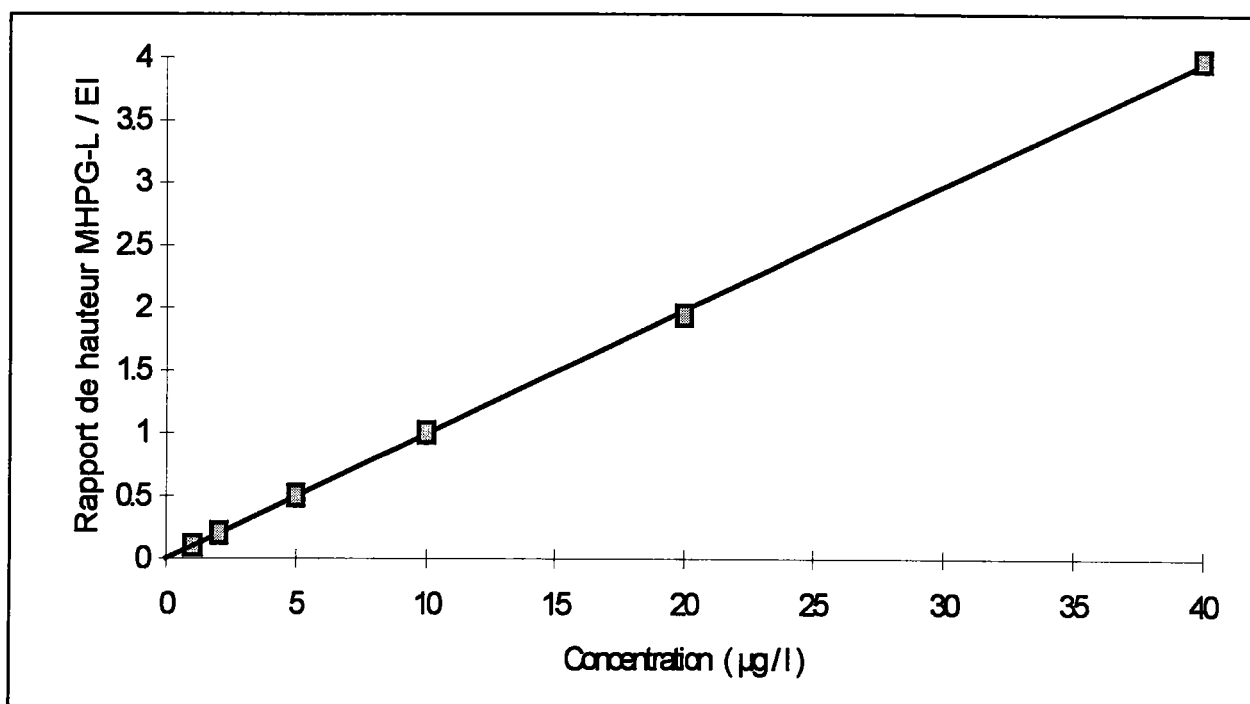


Figure 32a: Gamme étalon du dosage du MHPG-L plasmatique ($n = 5$)

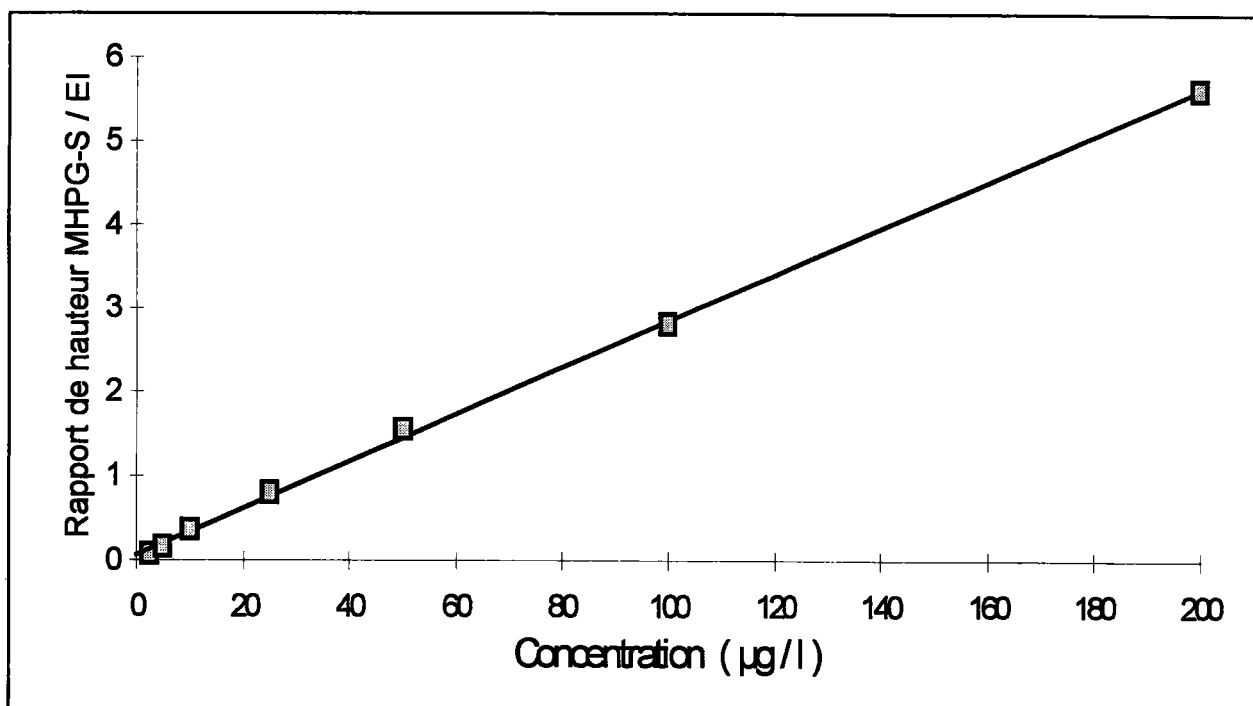


Figure 32b : Gamme étalon du dosage du MHPG-S plasmatique ($n = 5$)

4.7.2.2 Exactitude

L'inexactitude relative $\Delta C/C$ a été appréciée sur deux niveaux de mesure pour le MHPG libre (surcharge de 2 ng/ml et 20 ng/ml à une solution aqueuse; $n = 10$) et pour le MHPG-S (surcharge de 10 ng/ml et 100 ng/ml à une solution aqueuse; $n = 10$).

Nous avons obtenu les résultats suivants:

<i>MHPG libre:</i>	$\Delta C_2/C:$	2,1%
	$\Delta C_{20}/C:$	1%
<i>MHPG sulfaté:</i>	$\Delta C_{10}/C:$	1,5%
	$\Delta C_{100}/C:$	0,5%

4.7.2.3 Précision de la technique

a) Répétabilité

La répétabilité réalisée sur un contrôle (pool 1), montre des C.V plus élevés (4,7 %) pour MHPG-S que pour MHPG-L (2,5 %). Les C.V plus élevés pour MHPG-S montrent la difficulté de ce dosage (hydrolyse à bien maîtriser).

Les résultats concernant la répétabilité sont résumés dans le tableau IV.

Tableau IV: Répétabilité du MHPG-L et du MHPG-S plasmatiques

	Concentration ($\mu\text{g/l}$)	E.T.	C.V (%)
MHPG - L ($n = 10$)			
Pool 1	3,98	0,10	2,5
MHPG - S ($n = 10$)			
Pool 1	7,06	0,33	4,7

b) Reproductibilité

La reproductibilité intersérielle a été réalisée sur les gammes d'étalonnage et sur un pool plasmatique servant comme contrôle pour chaque série. Les résultats pour douze séries différentes à des jours différents donnent des C.V. satisfaisants. Les résultats concernant la reproductibilité sont résumés dans le tableau V.

Tableau V: Reproductibilité du MHPG-L et du MHPG-S plasmatiques

	Concentration ($\mu\text{g/l}$)	E.T.	C.V (%)
MHPG - L (n = 12)			
2	2,06	0,20	9,8
5	5,07	0,17	3,3
10	10,04	0,32	3,2
20	20,18	0,49	2,4
Pool 1	4,13	0,37	9,0
MHPG - S (n = 12)			
5	5,32	0,52	9,8
10	10,52	0,44	4,2
25	25,30	0,78	3,1
50	50,10	1,39	2,8
Pool 1	10,35	0,82	8,0

4.7.2.4 Sensibilité et limite de détection

La sensibilité de la méthode est la suivante: S (MHPG - L) = 0,0277

S (MHPG - S) = 0,0991

L'évaluation de la quantité minimale fournissant un signal mesurable a été obtenue après ajout de 0,5 ng à 1 ml d'une solution aqueuse pour le MHPG-L et 1 ng à 1 ml d'une solution aqueuse pour le MHPG-S. Pour n = 10, les moyennes des mesures effectuées sont les suivantes:

	Moyennes $\pm$ E.T.	Limite de détection ($\mu\text{g/l}$)
MHPG - L	0,57 $\pm$ 0,03	0,66
MHPG - S	1,06 $\pm$ 0,07	1,27

Les limites de détection pour le MHPG - L et le MHPG - S sont de 0,67 et 1,27 $\mu\text{g/l}$ respectivement.

4.8 DISCUSSION SUR LA METHODE ANALYTIQUE

4.8.1 Etalon interne

Une des difficultés du dosage du MHPG a été le choix d'un étalon interne. La plupart des auteurs portent leur choix sur l'ISO-MHPG, soit en le faisant fabriquer par un autre laboratoire soit en le préparant eux mêmes. (Moleman et Borstrok, 1982; Santagostino et coll., 1982; Shipe et coll., 1984).

Certains auteurs ont utilisé le MHPLA (acide 3-methoxy-4-hydroxyphényl lactique) (Javors et coll., 1984), le MOPET (4-hydroxy-3-méthoxyphényléthanol) (Moleman et Borstrok, 1982), IVOH (alcool isovanillique) (Julien et coll., 1988), HOQ (hydroquinone) (Ong et coll., 1982).

La présence chez l'Homme de l'ISO-MHPG en tant que métabolite par 4-O-méthylation de la noradrénaline, a été étudié par Muskiet et coll. (1979) en couplant la chromatographie en phase gazeuse avec un capteur d'électrons (CG-ECD) et la spectrométrie de masse (fragmentation). Pour un sujet normal, l'ISO-MHPG n'est présent qu'à des concentrations extrêmement faibles et peut être considéré comme quantité négligeable d'où son utilisation comme étalon interne.

4.8.2 Choix de l'extraction

Les matrices utilisées dans ce travail (urine et plasma) sont relativement complexes et contiennent de nombreux composés endogènes pouvant interférer avec notre étude. L'extraction doit permettre tout d'abord de différencier trois classes de neuromédiateurs:

- des composés basiques tels que adrénaline, noradrénaline, dopamine, métanéphrine, normétanéphrine, 3-méthoxytyramine.
- des composés neutres, principalement le MHPG.
- des composés acides tels que les acides vanillylmandélique, homovanillique, 3-4 dihydroxyphénylacétique.

Un simple ajustement de pH puis une extraction par un solvant organique ou une adsorption liquide solide peut permettre la séparation de ces classes, mais il reste souvent des pics interférents. Notre principale préoccupation a été de permettre une extraction simple, en utilisant une faible prise d'échantillon (1 ml) et des volumes de solvants faibles, tout en ayant une bonne limite de détection. La détection

ampérométrie couplée à la CLHP facilite ces analyses en routine.

Les méthodes procédant à une extraction uniquement par l'acétate d'éthyle sont très longues car elles nécessitent plusieurs étapes et lavages; de plus elles sont très peu sélectives. Les méthodes d'extraction liquide-solide sont plus faciles à mettre en oeuvre, nécessitent des prises d'échantillons faibles, donnent des résultats sans interférences, d'où des conditions chromatographiques relativement courantes.

Certains auteurs utilisent comme agent solide:

- une résine DEAE Sephadex A-25 (Pharmacia), puis une résine Extrelut (Merck) (Eicholtz et coll., 1984)
- une colonne Bond Elut C₁₈ (Analytichem) (Minegishi et coll., 1984)
- une phase greffée phényle (Karege, 1984)
- une résine Dowex (1X4 Sigma) (Julien et coll., 1988)
- une résine AG 50WX4 et AG 1X4 (Biorad) (Shea et Howell, 1984).

L'utilisation de petites colonnes commercialisées de type Bond Elut ou autre nécessite un appareillage adapté et coûteux. Nous avons donc mis au point une technique de dosage du MHPG libre et conjugué par extraction en phase solide, avec l'emploi d'une seule résine AG 1X4 (Biorad).

4.8.2.1 MHPG urinaire

Nous avons d'abord testé et adapté les techniques d'extraction liquide-liquide décrites (Dekirmenjian et Maas, 1974; Muskiet et coll., 1977; Joseph et coll., 1981; Moleman et Borstrok, 1982; Santagostino et coll., 1982; Eicholtz et coll., 1984; Filser et coll., 1989). Malheureusement celles-ci sont très longues et donnant des rendements d'extraction insuffisants.

De plus certaines étapes ne nous ont pas parues fondamentales; à savoir:

- ajout de florisil (Dekirmenjian et Maas, 1970; Moleman et Borstrok, 1982) permettant l'élimination de certains composés, et créant une interface stable entre les deux phases d'extraction et évitant ainsi de gros problèmes d'extraction (floculation)
- ajout d'une solution saturée de BaCl₂ (Moleman et Borstrok, 1982) permettant une meilleure précipitation des composés anioniques (phosphate, sulfate)
- lavage de l'hydrolysate par le chloroforme (Shea et Howell, 1984; Filser et coll., 1989)

- lavage de la phase organique par KHCO_3 (Dekirmenjian et Maas, 1974)
- réextraction du MHPG de la phase organique par un tampon borate à pH 8,7 (Santagostino et coll., 1982) procédant ainsi à une chélation et élimination de certains pics gênants pour obtenir une meilleure ligne de base.

Une des difficultés majeures de la détermination du MHPG dans les urines est sa séparation de nombreuses substances usuellement extraites par solvant organique à pH neutre. Malgré le grand pouvoir de résolution de la CLHP et la grande sélectivité de la détection électrochimique, la détermination du MHPG nécessite une bonne purification avant analyse. Un simple lavage avec grande sélectivité pour le MHPG est difficile à réaliser car celui-ci ne possède pas de groupement fonctionnel spécifique pour une telle réalisation. La seule propriété utilisable est sa polarité. Le MHPG possède trois fonctions neutres (deux fonctions alcool et une fonction méthoxylée) et un groupement acide faible (pK_a proche de 10) (Hariharan et coll., 1989).

L'acétate d'éthyle apparaît comme le meilleur solvant pour une extraction organique par la grande majorité des auteurs.

Malheureusement de nombreuses extractions sont nécessaires pour obtenir un rendement correct. De plus il est nécessaire ensuite de concentrer ces grands volumes pour une manipulation ultérieure. Pour augmenter la sélectivité de la procédure d'extraction, la phase organique peut être réextraite par une solution acétique, éliminant certaines interférences, probablement des composés acides (Moleman et Borstrok, 1982; Abe et Konaka, 1988), au lieu de l'évaporer à sec comme dans la plupart des techniques.

Dans d'autres études, après extraction par l'acétate d'éthyle, le MHPG est oxydé en vanilline à l'aide de periodate, puis réduit en alcool vanillique (Buchanan et coll., 1979) ou isolé par CCM (Alonso et coll., 1981; Abe et Konaka, 1988). Dans une étude (Abe et Konaka, 1988), il a été procédé à la comparaison de quatre modes de détection à savoir UV, électrochimie, fluorimétrie, réaction post-colonne après extraction liquide. Cette dernière technique, consistant en une séparation en phase inverse avec élution isocratique, puis oxydation par le métaperiodate de sodium et détection à 365 nm, a donné de loin la meilleure spécificité. Malheureusement l'emploi de réacteur post-colonne nécessite l'utilisation d'un appareillage que nous ne possédions pas (pompe, thermorégulateur).

Nous avons donc poussé plus loin notre étude et cherché une extraction plus spécifique c'est à dire liquide-solide. L'extraction utilisant une phase solide permet d'éliminer toute une série d'étapes longues et pénibles, nécessaires en phase liquide-liquide.

Ici la méthode d'extraction utilisant un agent solide, met en jeu un adsorbant spécifique de modification de surface. La méthode nécessite une simple étape de purification sur une phase solide puis extraction par l'acétate d'éthyle.. De plus ce système est peu onéreux contrairement aux colonnes Bond Elut.

Les extraits (étalons, contrôles, urines et étalon interne) sont déposés en haut de chaque colonne puis lavés par deux fois 1 ml d'eau pure puis enfin élués par un mélange eau - méthanol (50-50, v/v), contenant 0,5 g/l d'EDTA et 0,5 g/l de métabisulfite de sodium (Julien et coll., 1988). Etant donné que le MHPG est un composé moyennement hydrophile, le lavage par l'eau permet d'éliminer des composés plus polaires que lui; une quantité inférieure à 2 ml permet de ne pas éliminer le MHPG. L'utilisation de méthanol en lieu et place du mélange eau-méthanol augmente les pics interférents.

Avec notre méthode, la majorité des métabolites acides et relevant des aminoacides sont éliminés en même temps que de nombreux composés interférents et inconnus (Minegishi et Ishizaki, 1984). L'éluat recueilli est saturé en chlorure de sodium (1g) puis le MHPG recueilli est extrait par l'acétate d'éthyle. La saturation par le sel facilite l'extraction par l'acétate d'éthyle (Moleman et Borstrok, 1982; Filser et coll., 1989; Hariharan et coll., 1989). Pour augmenter la sélectivité de la procédure, la phase organique est extraite en retour par de l'acide acétique 0,1 M, permettant d'éliminer certains composés.

Pour obtenir un rendement satisfaisant, les conditions d'extraction sont optimisées. L'extraction du MHPG peut être facilitée en faisant varier la polarité des solvants (ajout d'hexane) (Moleman et Borstrok, 1982; Julien et coll., 1988; Abe et Konaka, 1988). L'addition d'hexane facilite l'extraction de la phase organique en diminuant la polarité de celle-ci. Nous avons procédé à une étude de rapport de solvant hexane/acétate d'éthyle; et un rapport égal 1/1 donne les meilleurs résultats (figure 33). Les références (Moleman et Borstrok, 1982; Julien et coll., 1988) donnent le même rapport.

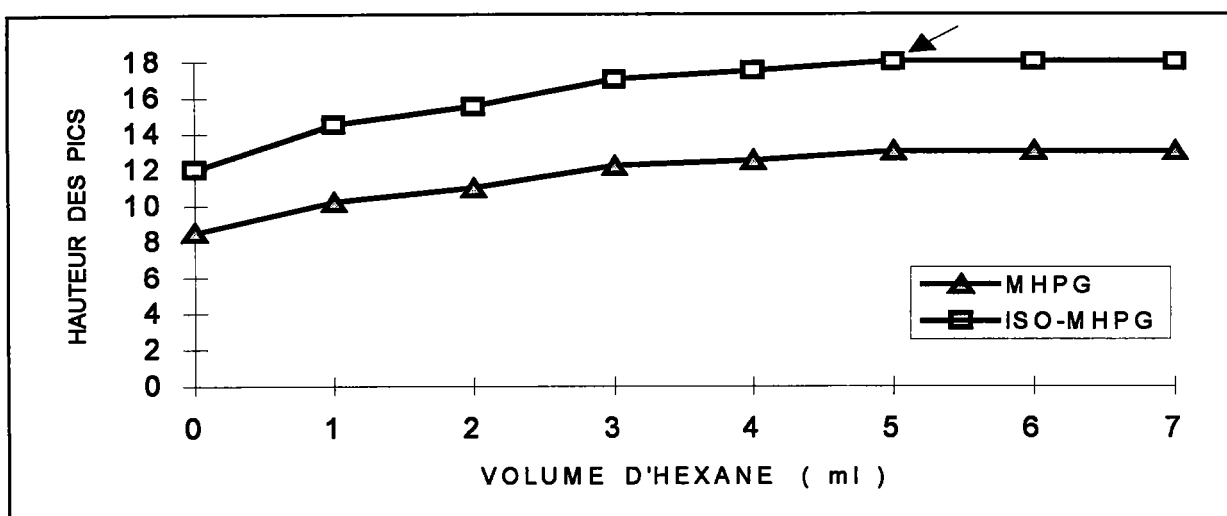


Figure 33: Influence du pourcentage d'hexane sur le rendement d'extraction du MHPG

L'étude du MHPG conjugué nécessite l'utilisation d'agent d'hydrolyse. Une étude exhaustive des enzymes d'hydrolyse des fabricants, nous a amené au choix suivant: pour la déconjugaison du MHPG-S: ARYLSULFATASE type VI de *Aerobacter aerogenes* (Sigma) 50 unités partiellement purifiée, et dont l'activité de la β -glucuronidase n'est pas détectée. Pour la déconjugaison du MHPG-T, nous avons utilisé une solution de β -GLUCURONIDASE type H-2S (glusulase) solution grossière de *Helix pomatia* filtrée; l'activité de la β glucuronidase est approximativement de 100 000 U/ml à pH 5,0, celle de la sulfatase de 1000-5000 U/ml; le calcul du MHPG-G se fait par soustraction de MHPG-L et MHPG-S au MHPG-T. Toutefois lors de la mise au point de cette technique, nous avons également procédé à l'ajout de β -glucuronidase pure type VIII-A (Sigma) afin de vérifier la véracité des différents ajouts d'enzymes. Ces résultats sont résumés dans le tableau VI.

Dans la majorité des cas, l'enzyme commercialisée est utilisée telle quelle sans poser de problèmes d'interférence sauf chez Alonso et coll. (1981), Hornsperger et coll. (1984) où il a été nécessaire de purifier l'*hélix pomatia* glusulase et sulfatase.

Karege (1984) a comparé l'activité de la sulfatase pure et grossière (brute), et a constaté que l'activité de la sulfatase brute était deux fois plus importante que la pure au bout de 16 heures d'incubation (49,1 ng au lieu de 22,7 ng pour 50 ng au départ).

Dans notre étude, l'enzyme commercialisée a été utilisée sans poser de

problème d'interférence. Nous pensons d'ailleurs que les agents interférents proviennent plus de la formation d'agents de déconjugaison créés par l'enzyme que par l'enzyme elle-même.

Tableau VI: Corrélation entre MHPG mesuré et calculé dans les urines (mg/l)

Urine	MHPG - L	MHPG - S	MHPG - G	MHPG - T mesuré *	MHPG - T calculé **
1	0,09	1,00	1,57	2,65	2,66
2	0,04	0,47	0,57	1,12	1,08
3	0,11	1,76	2,12	4,05	3,99
4	0,08	0,80	1,20	2,15	2,08

* Les résultats ont été obtenus après hydrolyse par:
100 µl de sulfatase pour MHPG-S, 40 µl glucuronidase pour MHPG-G et 200 µl glucosylase pour MHPG-T

** $MHPG-T = MHPG-L + MHPG-S + MHPG-G$

Une fois l'extraction terminée, la phase aqueuse est passée 5 min sous courant d'azote à 40°C afin d'éliminer toute trace de solvant organique perturbant fortement la détection électrochimique, ainsi que la forme des pics chromatographiques (Julien et coll., 1988).

Le mode de prélèvement des urines adopté pour les analyses est le suivant: aux urines de 24 heures recueillies, nous ajoutons 1 g/l de métabisulfite de sodium. Si le dosage n'est pas fait dans la semaine, nous congelons les urines en aliquotes à -20°C. Les prélèvements se conservent 6 mois dans ces conditions comme le confirme l'étude que nous avons faite sur un contrôle urinaire (figure 34). La majorité des études citées conservent également leurs urines avec du métabisulfite à 0,5 g/l ou 1 g/l et la durée de conservation va de trois mois à six mois suivant les études. Le métabisulfite de sodium prévient l'oxydation de tous les composés de type catéchol. Cependant dans l'étude de Julien et coll. (1988), il a été suggéré qu'une trop forte concentration en bisulfite pouvait inhiber la déconjugaison.

mettons jamais plus de 1 g/l dans chaque recueil. Les solutions standards conservées en milieu acide et avec 0,5 g/l de conservateur se gardent plus de six mois à + 4 °C sans aucun problème comme le confirme la majorité des études citées.

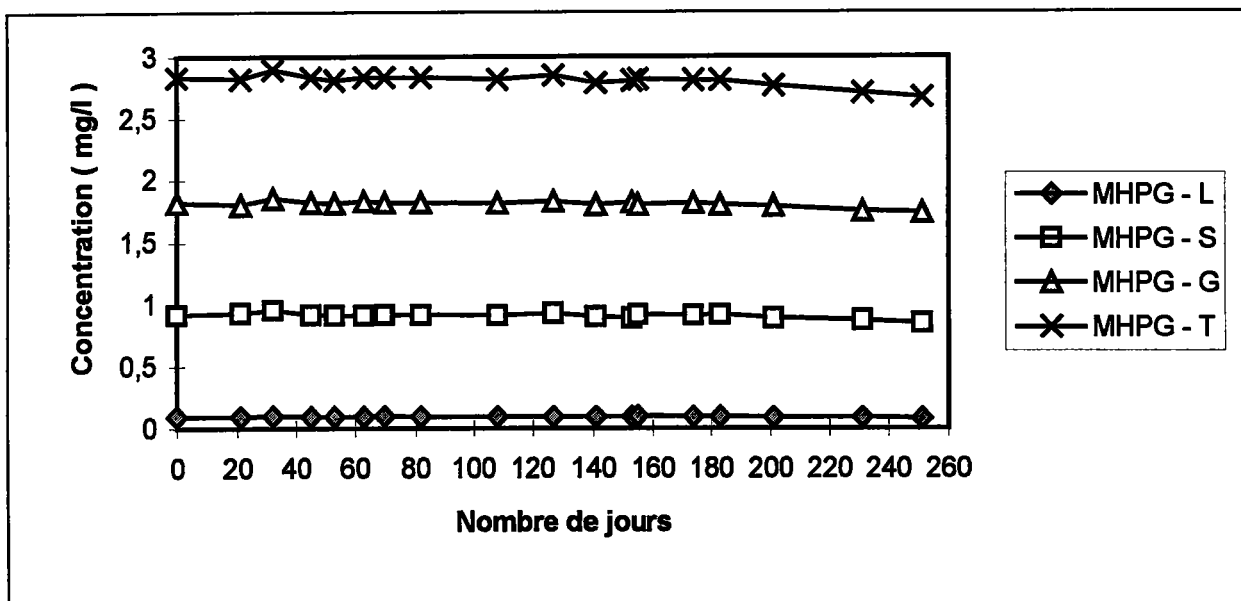


Figure 34 : Variation du contrôle urinaire dans le temps concernant le MHPG libre et conjugué

4.8.2.2 MHPG plasmatique

La technique d'extraction est identique sous de nombreux points à celle du MHPG urinaire. Seul l'extract organique final est passé sur sulfate de sodium anhydre puis évaporé à sec. Diverses procédures sont employées, mais chacun procédant de façon identique pour le plasma et les urines. Seule l'étude de Shea et Howell (1984) procède à la déproteinisation du plasma avant extraction.

Les concentrations de MHPG plasmatique (libre et conjugué) étant beaucoup plus faibles que celles du MHPG urinaire, nous avons évaporé à sec la phase organique afin de concentrer le composé à doser, au lieu de le réextraire par l'acide acétique.

4.8.3 Conditions chromatographiques

Les conditions chromatographiques pour le dosage urinaire et plasmatique sont identiques. Seule la sensibilité varie dans les deux cas.

4.8.3.1 Choix du potentiel

Dans de nombreuses études la détection est ampérométrique (Sweeney et coll., 1980; Ong et coll., 1982; Shea et Howell, 1984; Karege, 1984; Minegishi et Ishizaki, 1984; Semba et coll., 1985; Schinelli et coll., 1985; Huber-Smith et coll., 1986; Sharpless et coll., 1986) ou coulométrique (Karege et coll., 1987; Hariharan et coll., 1989), GC-ECD (Dekirmenjian et Maas, 1974), CG-SM (Jimerson et coll., 1981), CLHP-FL (Ortiz et coll., 1989). Le détecteur ampérométrique a un handicap lorsqu'il s'agit de détecter quelques ng/ml parce que seulement 5-10% des composés sont oxydés aux électrodes du système. Avec un détecteur coulométrique, 100% des analytes sont oxydés ou réduits.

Concernant le choix du potentiel, notre propre évaluation (figure 35) recoupe la plupart des études et nous nous sommes placés à 0,85 V / Ag/AgCl.

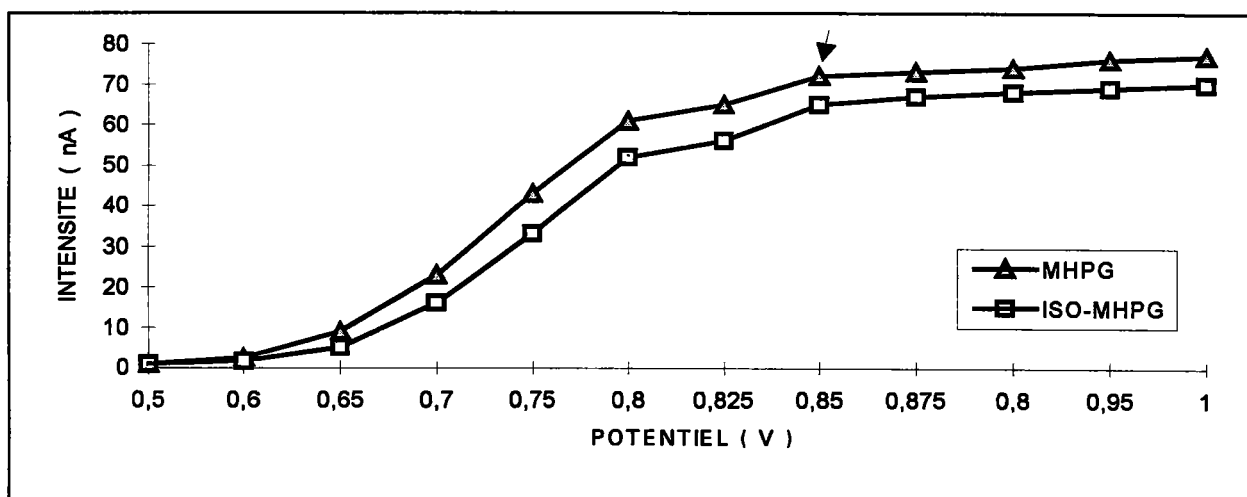


Figure 35: Etude par ampérométrie du choix du potentiel d'oxydation de l' ISO-MHPG et du MHPG

Le processus d'oxydation électrochimique convertit les composés phénoliques en quinones. Les composés méthoxylés sont plus difficiles à oxyder, étant donné que

le groupement méthoxylé rend le phénomène de conjugaison plus difficile. Pour que l'oxydation ait lieu, le groupement méthoxylé doit être rompu; ceci nécessite une forte énergie d'activation et par conséquent un fort potentiel d'oxydation. L'oxydation du MHPG a été réalisée selon l'équation suivante (Mefford, 1981) (figure 36):

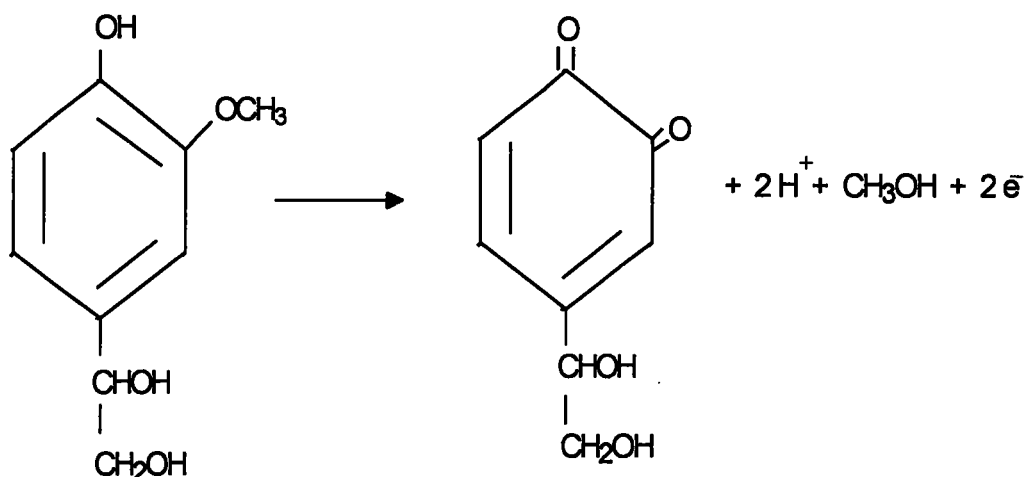


Figure 36: Schéma d'oxydation électrochimique du MHPG

Remarque

Il n'a pas été observé de modification des signaux en injectant successivement dix fois un extrait plasmatique ou urinaire de patient, indiquant par là la constance de la surface de l'électrode de travail et la non pollution de l'électrode par des molécules de la matrice.

4.8.3.2 Influence de la température

Le chromatogramme de la figure 29b montre la présence de deux composés (A et B), extraits en même temps que le MHPG et l'étalon interne. La séparation chromatographique a pu être réalisée après une étude exhaustive de la température sur les différents composés (figure 37). Seule une température de 25 °C permet une séparation correcte. Dans ces conditions le MHPG et l'étalon interne sont séparés (11,8 min pour le MHPG et 20,9 min pour l'étalon interne), les pics pouvant interférer se situant à 13,6 min pour le composé A et 27,6 min pour le composé B.

Nous pouvions également travailler à 50°C ou 55°C. Notre choix s'est porté sur 25°C, car si les k' sont plus importants, les résolutions le sont également. A 50°C et 55°C les pics sont plus fins et les k' plus faibles, mais les risques de dégradation de la colonne sont plus grands, surtout à 55°C. Avec une phase greffée comme la nôtre, il est préférable de ne jamais dépasser 60°C sous peine de dégradation très rapide et irréversible.

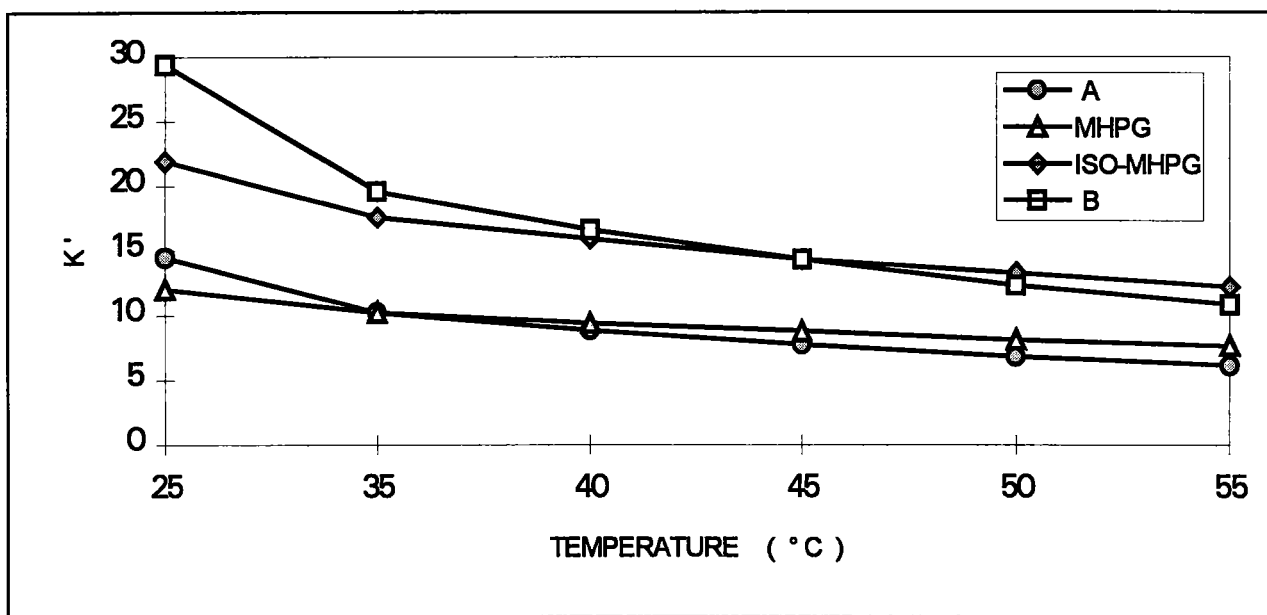


Figure 37: Influence de la température sur la séparation chromatographique du MHPG

4.8.3.3 Choix de la phase mobile

La plupart des études utilisent soit un tampon phosphate, citrate ou acétate. Nous avons adopté un tampon phosphate en raison de la zone de pH dans laquelle nous allons travailler. L'influence du pH sur la séparation (figure 38) n'a pas une grande importance tout comme la molarité (figure 39), aussi avons nous adopté un pH 3,0 et un tampon de molarité de 0,05 M en raison de la force ionique du milieu nécessaire pour une bonne électrolyse. Quant au solvant utilisé pour la séparation, la plupart des études utilisent du méthanol, mais nous avons opté pour l'acétonitrile, car les propriétés de notre colonne ne sont pas très compatibles avec l'utilisation de méthanol (mauvaise miscibilité, trajectoire préférentielle, ce qui à la longue peut provoquer la dégradation de la colonne).

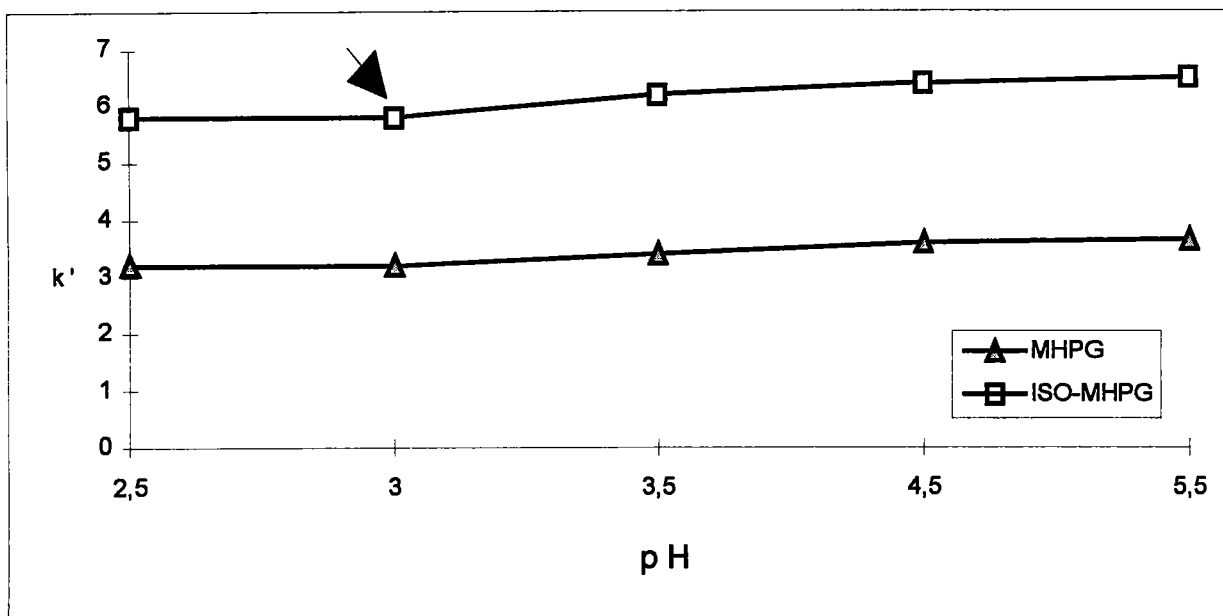


Figure 38 : Influence du pH du tampon sur la séparation chromatographique du MHPG et ISO-MHPG

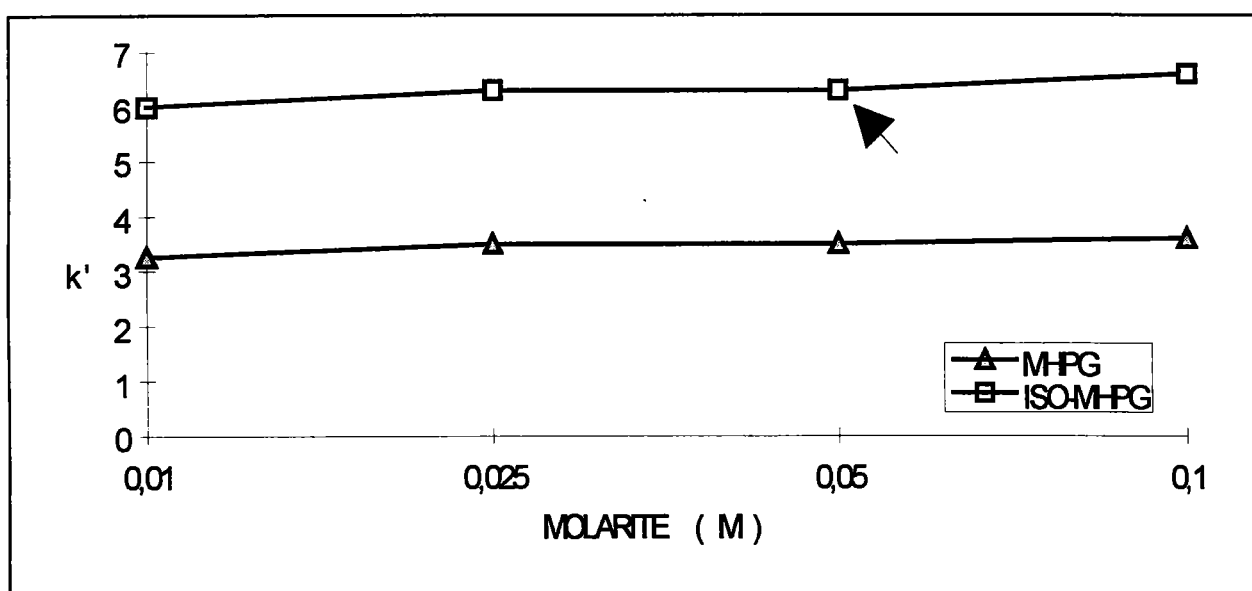


Figure 39: Influence de la molarité du tampon sur la séparation chromatographique du MHPG et ISO-MHPG

5. METHODES DE DOSAGE DANS LE CERVEAU DE RAT

5.1 SOLUTIONS ETALONS

5.1.1 Sérotonine et fluoxétine

La solution étalon de sérotonine est à 5 mg/l (identique au plasma humain).

Les solutions étalons de norfluoxétine et fluoxétine sont à 100 mg/l et correspondent aux solutions mères utilisées lors de l'étude clinique.

5.1.2 5-HIAA

La solution mère de 5-HIAA à 100 mg/l et la solution de travail à 5 mg/l sont préparées dans de l'éthanol absolu et conservées à + 4 °C.

5.1.3 Etalons internes

La N-méthyl sérotonine à 5 mg/l correspond à l'étalon interne utilisé pour le dosage de la sérotonine.

La fluphénazine (utilisée pour le dosage de la fluoxétine) est préparée à 100 mg/l dans HCl 0,1 M puis congelée en aliquotes de 5 ml à -20 °C.

Le 5-HICA (acide 5-hydroxy-2-indolcarboxylique) utilisé comme étalon interne pour le dosage du 5-HIAA est préparé à 100 mg/l et la solution de travail à 5 mg/l dans HClO_4 0,1 M.

5.2 SOLUTIONS D'EXTRACTION ET LAVAGE

5.2.1 Solution d'extraction du cerveau

Elle consiste en un mélange acétone / solution d'HCl 0,2 M (85 / 15, v / v).

5.2.2 Solvant d'extraction du 5-HIAA

Il consiste en un mélange dichlorométhane / isopropanol (90 / 10, v / v).

5.2.3 Solution de lavage des extraits de cerveau

Elle consiste en un mélange heptane / chloroforme (90 / 10, v / v).

5.3 AUTRES SOLUTIONS

Toutes les autres solutions sont identiques à celles utilisées pour les dosages chez l'Homme.

5.4 EXTRACTION DES DIFFERENTS COMPOSES

5.4.1 Dans le cerveau

Les extractions de la sérotonine, du 5-HIAA, de la fluoxétine et de la norfluoxétine se font sur le cerveau entier (figure 40). Le pool cerveau (ou matrice) est constitué de cerveau de mouton acheté dans le commerce. Il est réalisé en broyant celui-ci, jusqu'à l'obtention d'une bouillie. Ces cerveaux sont plus ou moins exempts de neuromédiateurs. Mais par mesure de précaution, nous avons ajouté systématiquement de l'étalon interne pour le dosage de la sérotonine et 5-HIAA afin de parer à toute présence de ces composés.

	Gamme étalon ($\mu\text{g} / \text{g}$)					Cerveau	
Gamme sérotonine	0,1	0,25	0,5	1,0	1,5	Blanc	Rat
Gamme 5 - HIAA	0,1	0,25	0,5	1,0	1,5		
Gamme fluoxétine	1	4	8	16	24		
Pool cerveau	# 1,7 g						
Cerveau rat							x g
Sol. 5HT: 5 mg/l	20 μl	50 μl	100 μl	200 μl	300 μl		
Sol. 5-HIAA: 5 mg/l	20 μl	50 μl	100 μl	200 μl	300 μl		
Sol. FL + NFL: 100 mg/l	10 μl	40 μl	80 μl	160 μl	240 μl		
Sol. EI 5-HT: 5 mg/l	200 μl						
Sol. EI 5-HIAA: 5 mg/l	200 μl						
Sol. EI FL + NFL: 100 mg/l	250 μl						250 μl
Solvant d'extraction	10 ml						

En présence de neuromédiateurs dans ce pool, il suffit de procéder au dosage selon la méthode des ajouts. Chaque extrait pesé (x g) est broyé 2 min avec un homogénéiseur (appareil Virtis, OSI, France).

Les lames de l'homogénéiseur et le flacon sont rincés par deux fois 3 ml d'acétone. Le broyat et les deux extraits de rinçage sont recueillis dans un tube borosilicaté de 20 ml. A chaque tube est ajouté 200 µl HCl 1M. Tous les tubes sont agités 15 min de façon automatique, puis centrifugés 10 min à 3000 g. Les surnageants sont lavés par un même volume de solution de lavage. Les phases organiques sont éliminées. Les phases aqueuses inférieures sont divisées en trois fractions égales de 1 ml (figure 39).

5.4.2 Extraction de la fluoxétine et de son métabolite

Le premier tiers est utilisé pour le dosage de la fluoxétine. Pour cela, nous ajoutons 200 µl de NaOH 1M afin de passer en milieu basique. Les étapes suivantes sont identiques à celles du dosage chez l'Homme.

5.4.3 Extraction de la sérotonine

Le deuxième tiers est utilisé pour le dosage de la sérotonine; pour cela nous ajoutons 1,5 ml de tampon borate pH = 10 et 10 ml de solvant d'extraction (dichlorométhane / n-butanol; 75 / 25, v / v). Les étapes suivantes sont identiques à celles du dosage en milieu sérique.

5.4.4 Extraction du 5-HIAA

Le troisième tiers est utilisé pour le dosage du 5-HIAA. Nous avons ajouté 8 ml de solvant d'extraction (dichlorométhane/isopropanol; 90/10, v/v) à la phase aqueuse. Après agitation automatique durant 15 min, les tubes sont centrifugés 5 min à 3000 g. La phase aqueuse supérieure est éliminée et la phase organique est passée sur Na₂SO₄ anhydre afin d'éliminer toute trace aqueuse. La phase organique est évaporée à sec à 45 °C. Le résidu sec est repris par 200 µl de phase mobile .

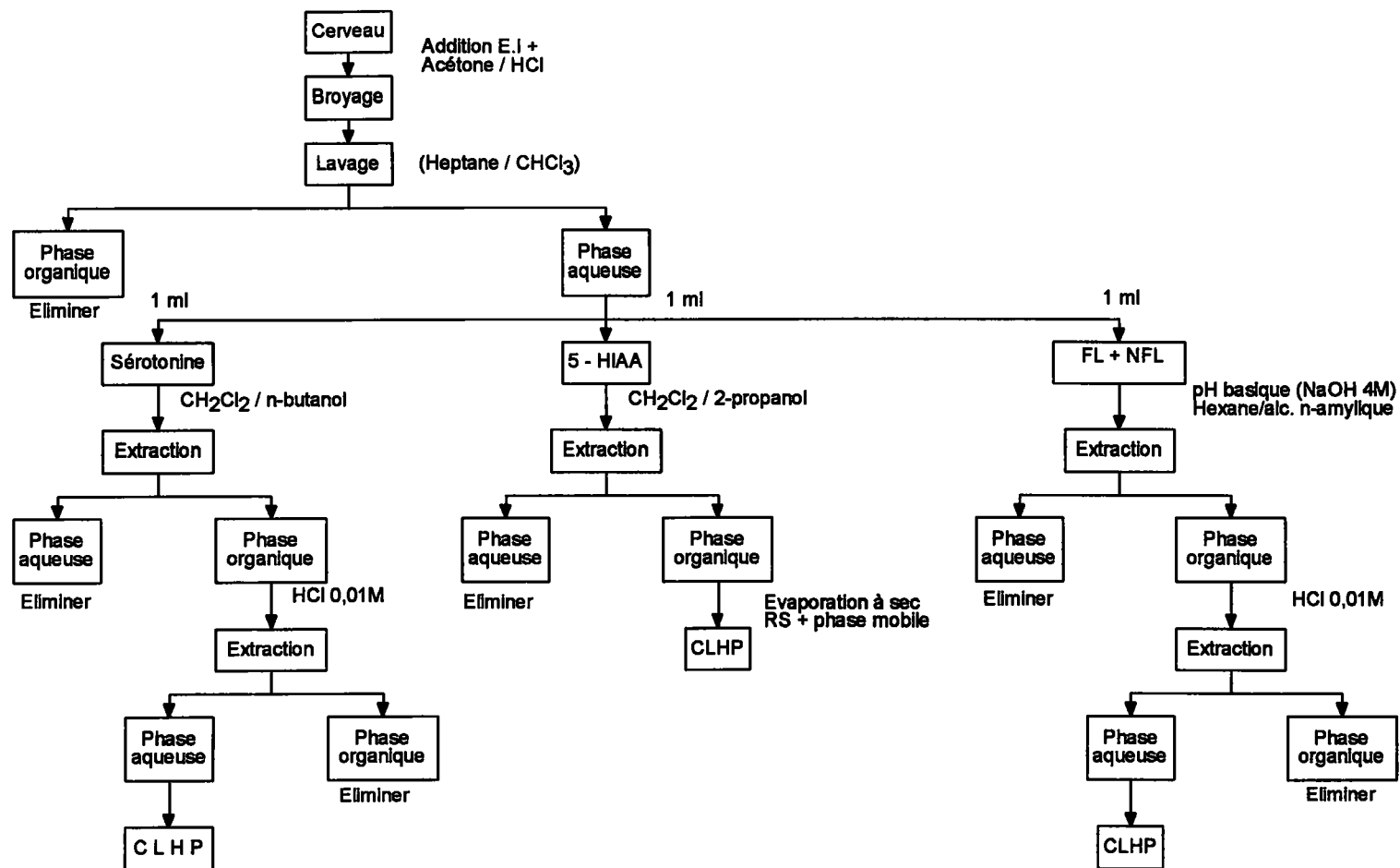


Figure 40: Schéma d'extraction de la sérotonine, du 5 - HIAA, de la fluoxétine et de la norfluoxétine dans le cerveau de rat.

5.5 CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES

5.5.1 Sérotonine et fluoxétine

Les conditions chromatographiques de la sérotonine sont identiques à celles des dosages sériques chez l'Homme. Concernant la fluoxétine, seules diffèrent la quantité injectée (20 µl) et la sensibilité de la détection (0,03 A).

5.5.2 Conditions chromatographiques du 5-HIAA

- **Colonne chromatographique:** Biorad C₁₈
- **Phase mobile (v/v):**
 - tampon KH₂PO₄ 0,05 M, pH 3,0 : 96 %
 - éthanol pour analyse : 4 %
- **Débit:** 1,5 ml /min
- **Température de la colonne:** 40 °C
- **Pression de la colonne:** 110 bars à 40 °C
- **Potentiel d'oxydation:** 0,7 V / Ag/AgCl
- **Sensibilité du détecteur:** 50 nA
- **Intégrateur:** atténuation 8
- **Défilement du papier:** 0,5 cm/min
- **Injection:** 30 µl

5.5.3 Profils chromatographiques

Les figures 41 et 42 montrent les profils chromatographiques des différentes molécules après extraction.

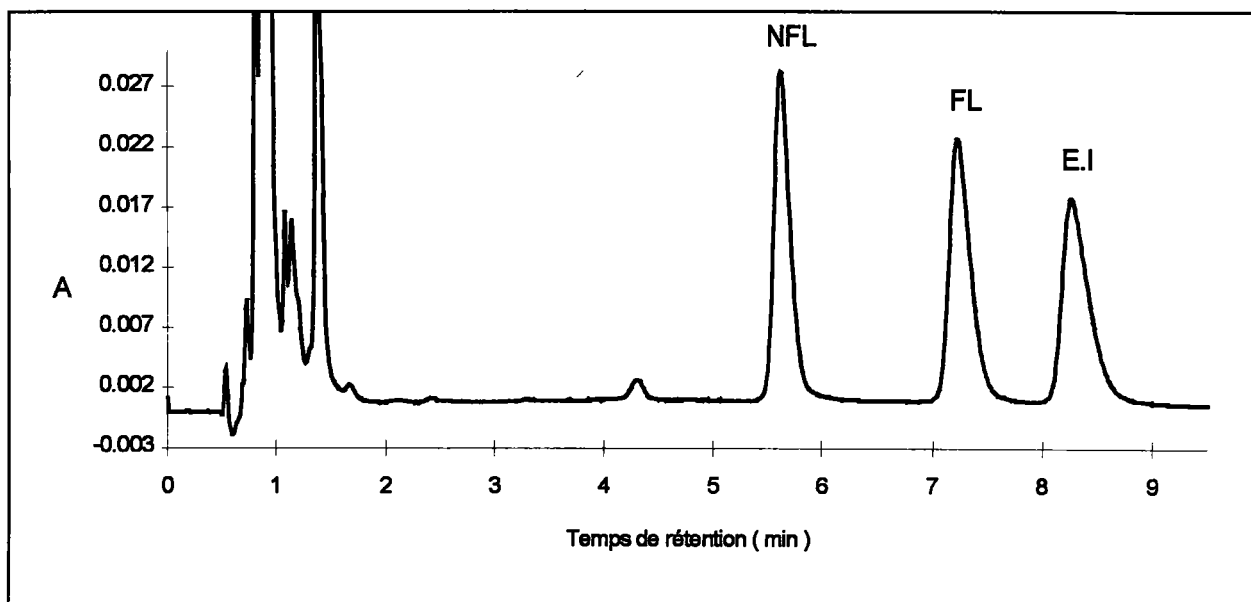


Figure 41: Chromatogramme type après extraction de NFL et de FL dans le cerveau de rat (NFL: 22,1 $\mu\text{g/g}$ de cerveau; FL: 19,2 $\mu\text{g/g}$ de cerveau)

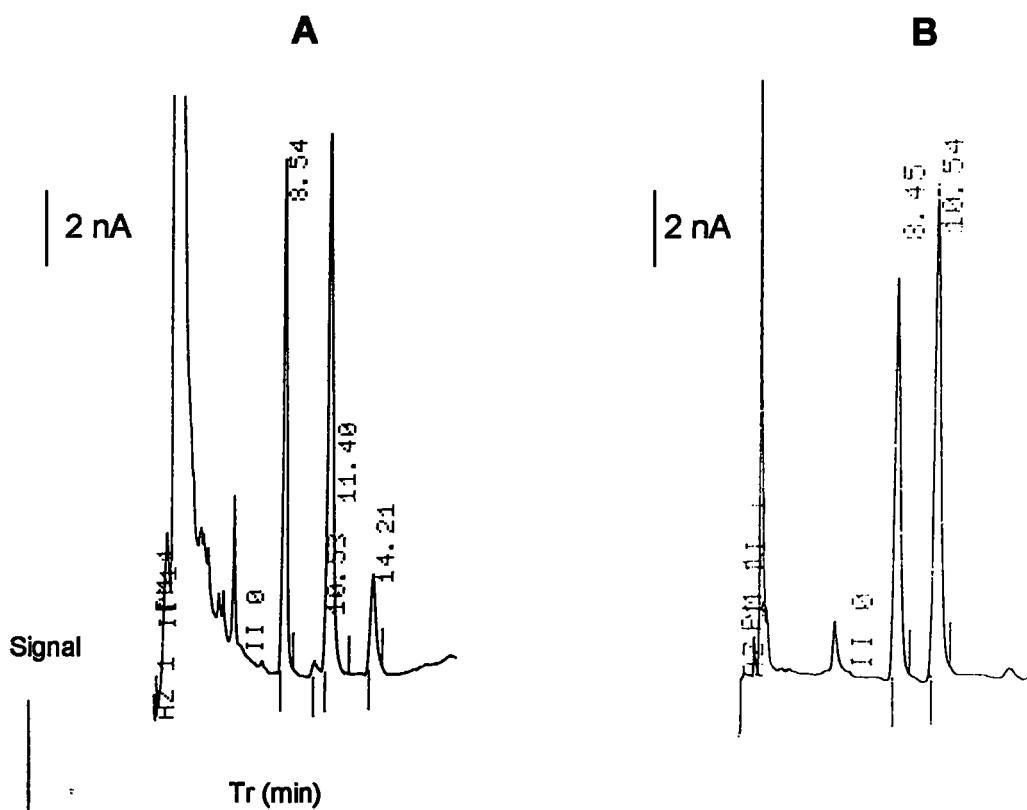


Figure 42: Chromatogrammes types après extraction de 5-HIAA (A) et de 5-HT (B) dans un cerveau de rat.

A: 5-HIAA (8,54 min), EI (11,40 min); (5-HIAA: 0,54 $\mu\text{g/g}$ de cerveau)

B: 5-HT (8,45 min), EI (10,54 min); (5-HT: 0,44 $\mu\text{g/g}$ de cerveau)

5.6 VALIDATION DE LA METHODE

5.6.1 Linéarité

5.6.1.1 Fluoxétine et norfluoxétine

La linéarité de la fluoxétine et de son métabolite a été établie à partir d'ajouts sur la matrice (sept points); l'étalonnage est linéaire entre 0,25 et 40 µg/g (figure 43). Pour chaque niveau 5 mesures ont été réalisées. Le coefficient de détermination et les équations de droite sont les suivants:

	Norfluoxétine	Fluoxétine
Coefficient de détermination (r ²)	0,999	0,999
Equation de la droite	y = 0,173x - 0,090	y = 0,156x - 0,081

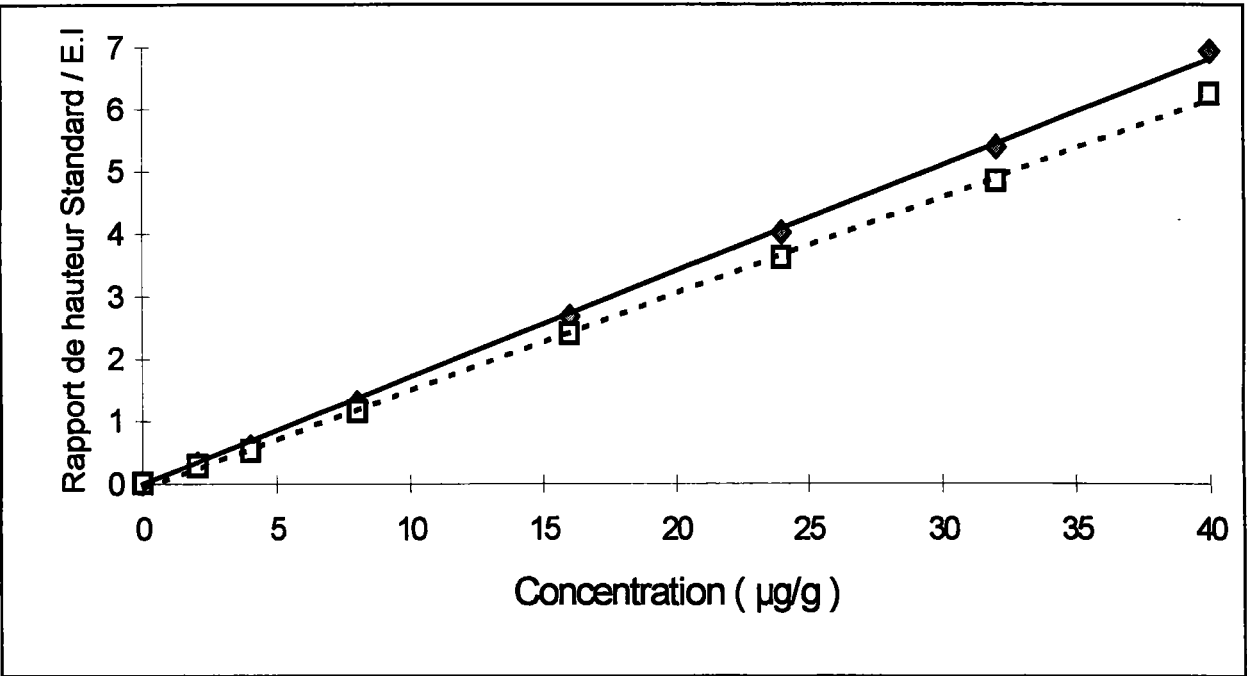


Figure 43: Gamme étalon du dosage de NFL et de FL dans le cerveau de rat (n = 5) (NFL: — ; FL: - - -)

5.6.1.2 Sérotonine et 5 - HIAA

La linéarité de la sérotonine et de son métabolite a été établie à partir d'ajouts sur la matrice (neuf points); l'étalonnage est linéaire entre 0,1 et 6 µg/g (figure 44). Pour chaque niveau 5 mesures ont été réalisées. Le coefficient de détermination et les équations de droite sont les suivants:

	Sérotonine	5 - HIAA
Coefficient de détermination (r ²)	0,999	0,999
Equation de la droite	y = 1,920x - 0,074	y = 1,608x + 0,018

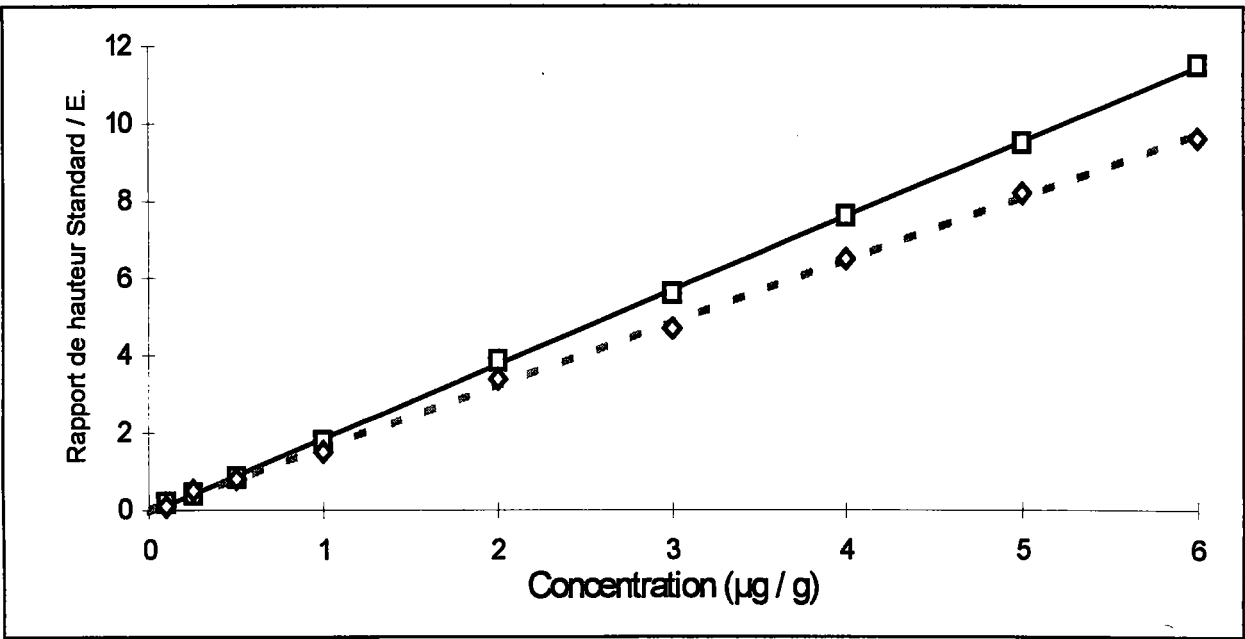


Figure 44: Gamme étalon du dosage de 5-HT et 5-HIAA dans le cerveau de rat (n = 5)
(5 - HT: — ; 5 - HIAA: - - -)

5.6.2 Exactitude

Nous avons apprécié l'inexactitude relative ΔC/C sur deux niveaux de mesure pour les différents composés en surchargeant la prise d'essai de:

- 8 µg et 32 µg pour la fluoxétine et norfluoxétine
- 1 µg et 5 µg pour la sérotonine et le 5- HIAA

Les résultats sont les suivants:

	Norfluoxétine	Fluoxétine	Sérotonine	5 - HIAA
$\Delta C_{8/C}$	3,1 %	3,0 %		
$\Delta C_{32/C}$	2,9 %	3,0 %		
$\Delta C_1/C$			2,8 %	3,3 %
$\Delta C_5/C$			2,5 %	3,2 %

5.6.3 Précision

5.6.3.1 Répétabilité

La répétabilité a été réalisée sur un point de gamme à 10 µg/g pour la fluoxétine et son métabolite et sur un pool de contrôle (0,5 µg/g) élaboré à partir de la matrice pour les deux neuromédiateurs (tableau VII).

Tableau VII: Répétabilité et reproductibilité des différents composés dans le cerveau

	Norfluoxétine	Fluoxétine	Sérotonine	5 - HIAA
Répétabilité (n = 12)				
Moyenne (µg/g)	10,36	9,67	0,493	0,504
Ecart type	0,57	0,6	0,024	0,034
C.V (%)	5,5	6,2	4,9	6,7
Reproductibilité (n = 10)				
Moyenne (µg/g)	5,21	4,98	0,525	0,51
Ecart type	0,37	0,34	0,04	0,04
C.V (%)	7,1	6,8	7,6	7,8

5.6.3.2 Reproductibilité

La reproductibilité intersérielle a été effectuée sur un pool de contrôle à concentration différente et passé lors de chaque nouvelle série (tableau VII):

- Norfluoxétine et fluoxétine: 5 µg/g
- Sérotonine et 5-HIAA: 0,5 µg/g

5.6.4 Sensibilité et limite de détection

La sensibilité (S) de la méthode est la suivante:

	S
Norfluoxétine	0,173
Fluoxétine	0,156
Sérotonine	1,920
5-HIAA	1,608

L'évaluation de la quantité minimale fournissant un signal mesurable a été obtenue après ajout à une prise d'essai de:

- 0,1 µg pour la norfluoxétine et fluoxétine
- 0,02 µg pour la sérotonine et 5 - HIAA

Pour n = 8, les moyennes des mesures effectuées sont les suivantes:

	Moyennes ± E.T.	Limite de détection (µg/g)
Norfluoxétine	0,108 ± 0,004	0,120
Fluoxétine	0,106 ± 0,005	0,121
Sérotonine	0,023 ± 0,002	0,029
5 - HIAA	0,024 ± 0,002	0,030

5.7 DISCUSSIONS SUR LA METHODE ANALYTIQUE

5.7.1 Extraction de la fluoxétine

Une revue de la bibliographie sur l'étude des amines dans le cerveau de rat permet de constater qu'un consensus existe sur les modalités d'extraction. La plupart des auteurs font un homogénéisat dans de l'acétone, puis passent en milieu acide [acide formique pour Frits-Axel (1976) ou acide perchlorique pour Dolezalova et Stepika-Klauco (1976)], ou évaporent tout simplement l'acétone sous azote après centrifugation (Pantarotto et coll.; 1976). Des travaux plus récents (Dailey et coll.; 1991) ont étudié l'effet de la fluoxétine sur des rats rendus épileptiques. Les cerveaux sont homogénéisés dans 20 volumes de tampon carbonaté, et une aliquote est extraite par du chlorobutane. Cette technique a l'avantage d'être simple car elle ne comporte qu'une seule étape en milieu basique. Malheureusement le front de solvant était trop important dans nos conditions de séparation pour nous permettre une bonne quantification de la fluoxétine. Pour la sérotonine et le 5-HIAA, l'extraction se limite souvent à une simple déproteinisation par de l'acide perchlorique ou un autre agent défécant utilisé de façon classique (ex: acide trichloracétique). Dans notre étude, la méthode d'analyse a été plus longue car la fluoxétine et les deux neuromédiateurs ont été dosés ensemble dans chaque prélèvement.

La technique d'extraction pour le cerveau de rat de laquelle nous nous sommes inspirés est celle de Caccia et coll. (1990). Dans cette technique, le cerveau est homogénéisé (10 ml/g) dans un mélange acétone - acide formique 1 M (85/15, v/v) puis centrifugé. Le surnageant est mélangé par un même volume de solvant de lavage (heptane-chloroforme; 90/10, v/v). La phase organique est éliminée et la phase aqueuse est divisée en trois fractions pour l'extraction finale de la fluoxétine et de son métabolite, de la sérotonine et du 5-HIAA. Cette technique ne nous a pas donné satisfaction. En effet, les rendements n'ont pas été très reproductibles; de plus un pic important est parfois détecté juste avant la norfluoxétine, ce qui nous a obligé à modifier les conditions chromatographiques.

A partir de ce constat, nous avons repris étape après étape toutes les phases de l'extraction. L'acide formique a une bonne affinité avec les amines, ce qui justifie peut-être le choix de ce composé pour former le sel correspondant et faciliter le passage en milieu acide. Etant un acide faible, une variation de sa concentration (1 M,

2 M ou 3 M) n'a cependant pas donné une bonne reproductibilité. Nous avons de ce fait formé un autre sel (acide chlorhydrique), le même que celui réalisé lors de l'extraction finale dans le sérum. L'acide chlorhydrique étant un acide fort, il a fallu trouver la concentration adéquate permettant le passage en milieu organique. Des essais à 0,05 M, 0,1 M, 0,2 M, 0,3 M ont donné satisfaction quant à la zone de pH (1,3 - 3,0) et nous avons choisi une solution HCl 0,2 M.

L'extrait obtenu est ensuite lavé par un mélange de deux solvants (heptane-chloroforme). L'acétone par miscibilité se mélange avec la phase organique et la phase aqueuse reste au fond du tube. Si le pH n'est pas suffisamment acide (en utilisant l'acide formique par exemple), une partie de la fluoxétine et de son métabolite passe en milieu organique. La présence de la fluoxétine et de son métabolite a été vérifiée en évaporant le mélange organique à sec, en reprenant le résidu sec par 200 µl HCl 0,01 M et en injectant une fraction de cette solution. Afin que le pH soit suffisamment acide (compris entre 1,7 et 2,1), 200 µl d'une solution HCl 1 M sont encore ajoutés à l'homogénéisat (en plus des 200 µl HCl 0,2 M) et ainsi la solution de lavage (heptane/chloroforme) ne contient plus aucune trace de produit. Nous avons conservé les mêmes proportions (9/1) que Caccia et coll. (1990) pour la solution de lavage. Une augmentation de la proportion de chloroforme ne donne aucun changement si ce n'est une inversion des phases (la phase organique passant sous la phase aqueuse). Ce mélange en dehors du fait d'éliminer l'acétone de la phase aqueuse, permet d'éliminer certaines impuretés de la matrice pouvant perturber la séparation chromatographique. Cette phase aqueuse acide après ajout de 250 µl d'hydroxyde de sodium 1 M devient basique et est traitée ensuite comme un sérum humain.

5.7.2 Extraction des neuromédiateurs

La sérotonine formant facilement un sel avec HCl, il a été facile d'adapter cette technique à un dosage quantitatif. La plus grande difficulté a été d'éliminer l'acétone, car la sérotonine y est insoluble. Après lavage de la matrice, la phase aqueuse restante n'a pas pu être injectée directement (concentration insuffisante pour une détection correcte). Les résidus d'acétone déforment fortement les profils chromatographiques. Des essais d'élimination du solvant sous azote n'ont pas permis une bonne reproductibilité. Nous sommes donc repassés en milieu basique et avons

procédé à une extraction comme pour le sérum humain.

Concernant le 5-HIAA, nous avons adapté une technique utilisée au sein du laboratoire de biochimie pour le dosage du 5-HIAA urinaire. La figure 45 schématise l'étude du potentiel d'oxydation du 5-HIAA. Une des difficultés à résoudre pour le dosage de la sérotonine et du 5-HIAA dans le cerveau est le caractère endogène de ces composés. La matrice utilisée (cerveau de mouton), contenait de la sérotonine et du 5-HIAA parfois en faible quantité (mais non négligeable). Deux possibilités s'offraient à nous: en tenir compte dans les calculs ou l'éliminer avant utilisation.

Pour une question de commodité, nous avons choisi d'en tenir compte dans les calculs et traiter les extraits suivant la méthode des ajouts; d'où la présence d'étalon interne dans le blanc pour le dosage de la sérotonine et du 5-HIAA.

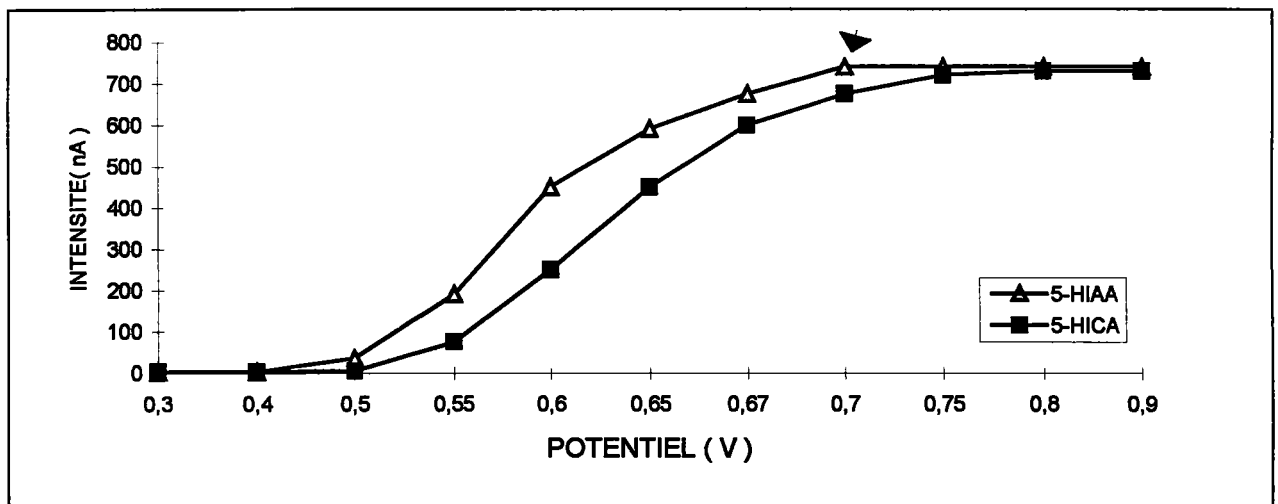


Figure 45: Etude du potentiel d'oxydation du 5-HIAA et du 5-HICA.

Les techniques analytiques ont été validées en terme d'exactitude, précision et limite de détection pour le dosage de la sérotonine, du 5-HIAA, du MHPG, de la fluoxétine et norfluoxétine dans des milieux biologiques.

Ces dosages biologiques sont utilisés dans l'étude clinique afin d'étudier les corrélations entre les concentrations de MHPG et les inhibiteurs de recapture de la sérotonine chez 32 patients mélancoliques traités durant un minimum de 3 semaines par le chlorhydrate de fluoxétine (20 mg/jour). Les résultats cliniques et analytiques ont été interprétés.

Suite aux observations cliniques, nous avons exploré les conséquences d'une injection i.p. de chlorhydrate de fluoxétine (doses variables) à des rats adultes sur les concentrations de:

- sérotonine, 5-HIAA, fluoxétine et norfluoxétine dans le cerveau
- sérotonine, fluoxétine et norfluoxétine dans le sang.

Les mêmes expériences ont été réalisées avec une injection de norfluoxétine (10 mg/kg) ou en bloquant le métabolisme par du SKF-525A (Proadifen).

L'étude comportementale a consisté à provoquer un syndrome dépressif chez des rats males Wistar en les plaçant dans un environnement de lumière forcée. Puis l'effet curatif de la fluoxétine sur la dépression a été étudié dans le test du stimulus aversif inévitable. Nous avons réalisé les mêmes dosages que précédemment dans le sang et le cerveau des rats avant et après traitement afin d'étudier les corrélations éventuelles entre l'effet curatif de la fluoxétine sur le phénomène de résignation comportementale chez le rat et la voie sérotoninergique.

PARTIE III

ETUDE CLINIQUE

CHAPITRE I : RESULTATS BIOCLINIQUES

1. RAPPELS SUR LA DEPRESSION ENDOGENE

1.1 LA MELANCOLIE

1.1.1 Définition

Quel que soit le registre où se situe la dépression, le TREPIED demeure primordial et fonde le diagnostic: TRISTESSE, RALENTISSEMENT PSYCHOMOTEUR, TROUBLES ORGANIQUES. Les autres symptômes définissent la gravité et la nature de la dépression (Pichot, 1978; Lèo, 1981; Koupernick et coll, 1982).

1.1.2 Variétés cliniques de la mélancolie

Il existe des variantes à ce tableau mélancolique (Koupernick et coll., 1982; Lèo H. et Lèo P., 1991):

- **la mélancolie simple:** inhibition, asthénie, impuissance, douleur morale
- **la mélancolie stuporeuse:** ralentissement psychomoteur extrême avec immobilité et mutisme.
- **la mélancolie délirante:** où les thèmes du délire tournent autour de la culpabilité, la damnation, l'hypochondrie, l'influence, la négation (du monde, du corps: syndrome de COTARD)
- **la mélancolie anxieuse:** où l'agitation du patient domine le tableau. Le risque suicidaire est ici maximal
- **la mélancolie d'involution:** touchant les sujets de plus de 45 ans, plus souvent les femmes, sans antécédents psychiatriques personnels, souvent accompagnés d'intenses manifestations anxieuses
- **l'état mixte:** où coexistent dans des proportions diverses des symptômes caractéristiques de l'état hypomaniaque et dépressif.

1.2 LA MANIE

1.2.1 Signes cliniques

Il faut la voir comme l'inverse de la mélancolie ou peut être comme une fuite de l'univers mélancolique (Koupernick et coll., 1982; Lèo H. et Lèo P. 1991)

- il y a excitation psychomotrice avec agitation motrice et logorrhée.
- les processus mentaux sont stimulés et accélérés, que ce soit les associations d'idées, la mémoire et l'imagination.
- il y a fuite des idées, qui sautent du coq à l'âne; si bien que rien de cohérent n'est construit; une idée ou un projet étant abandonné pour un autre.

1.2.2 Principales variantes cliniques

On distingue:

- ***l'hypomanie*** (forme mineure), où tout se limite à l'hyperactivité intellectuelle et physique dans une ambiance ludique et mégalomaniacale.
- ***la manie délirante*** avec des thèmes de grandeur et toute puissance.
- ***la fureur maniaque*** avec un déchaînement agressif; la confusion est extrême.
- ***l'état mixte*** où la manie peut à tout moment basculer dans la mélancolie avec un risque suicidaire. L'hospitalisation est également nécessaire.

1.3 LES DEPRESSIONS DANS LE CADRE DE LA PMD

La dépression endogène est surtout l'expression de la Psychose Maniaco Dépressive (PMD) (Koupernick et coll., 1982). Les PMD représentent 10% de l'ensemble des états dépressifs.

1.3.1 La PMD unipolaire

C'est une maladie cyclique où se succèdent de façon périodique les accès dépressifs séparés par des intervalles libres plus ou moins longs.

1.3.2 La PMD bipolaire

L'accès de dépression et d'excitation alternent. Dans 50% des cas, le premier épisode pathologique survient entre 30-50 ans. La fréquence des accès mélancoliques (par rapport à la manie) augmente avec l'âge. La première crise de la maladie est dépressive dans 60 % des cas. l'évolution est toujours curable.

La sensibilité des troubles au traitement antidépresseur (mélancolie) ou neuroleptique (manie) est grande. Le traitement préventif est efficace, surtout les sels de lithium quand il y a excitation dans la forme bipolaire de la PMD.

2. PROTOCOLE

2.1 EXPERIMENTATION

L'étude clinique porte sur un groupe de 32 patients: 12 hommes (âge moyen: $55,1 \pm 14,8$ ans) et 20 femmes (âge moyen: $54,6 \pm 15,7$ ans). Ces patients ont été diagnostiqués comme présentant selon le DSM III-R un état dépressif majeur avec caractéristiques psychotiques congruentes à l'humeur ou un état dépressif majeur du type mélancolique. Le choix des malades a toujours été effectué par le même psychiatre, qui est en même temps l'expérimentateur pour les fiches d'évaluation..

2.2 POSOLOGIE

Ces malades ont reçu de la fluoxétine sous forme chlorhydrate (Prozac^R des Laboratoires Dista). Ce sont des gélules dosées à 20 mg en fluoxétine (exprimé en base). Tous les malades ont reçu une posologie unique: une gélule de 20 mg le matin. Un seul patient est passé à deux gélules par jour lors d'une rechute et pour cause d'inefficacité de résultat avec une gélule.

REMARQUE: lors de toute étude, il est indispensable de procéder à une période de wash-out, afin d'éliminer toute interférence médicamenteuse. Pour notre étude, il n'a pas été possible de respecter cette période, car il était urgent de débiter immédiatement le traitement vu la gravité des admissions. Cependant aucun malade n'était traité par un autre antidépresseur dans la quinzaine qui a précédé l'admission au service.

2.3 SURVEILLANCE ET ECHELLE D'EVALUATION

2.3.1 Protocole

2.3.1.1 Avant traitement par la fluoxétine (J0)

Nous avons procédé au dosage du MHPG urinaire et plasmatique, ainsi que de la sérotonine plaquettaire.

2.3.1.2 Traitement en cours (J₂₁)

Le MHPG urinaire et plasmatique, la sérotonine plaquettaire, la fluoxétine sanguine ainsi que son métabolite sont dosés 21 jours après le début du traitement.

Parfois, le dosage de la sérotonine plaquettaire est remplacé par celui du 5HIAA dans le LCR. Une ponction lombaire est toujours traumatisante pour le malade et il est nécessaire avant chaque ponction de pratiquer une injection de Probénécide. Cette substance bloque le passage du neuromédiateur du LCR dans le sang et permet donc de mesurer le turn over de la sérotonine et des monoamines cérébrales. Par contre la sérotonine est plus facile à doser dans les plaquettes.

2.3.1.3 Remarques

Un délai de 21 jours a été choisi pour différentes raisons:

- la fluoxétine n'agit de manière positive qu'au bout de 2 à 3 jours, de ce fait, l'état d'équilibre est atteint au bout de 21 jours
- une hospitalisation dure au minimum 21 jours
- possibilité en cas d'échec du traitement, d'engager une autre thérapie (sismothérapie ou un autre antidépresseur).

Une des grandes difficultés est le recueil des urines de 24h en psychiatrie, notamment chez certains déprimés désintéressés de leur état et des mesures médicales. L'étude de Garvey et coll. (1990) suggère que le recueil des urines est complet si la créatinine urinaire est supérieure ou égale à 1000 mg chez l'homme et 750 mg chez la femme.

Une autre grande interrogation est la variation au cours des rythmes circadiens et saisonniers. Dans notre étude, ce phénomène est atténué car l'étude compare deux résultats rapprochés (J0 et J₂₁). Une autre remarque importante concerne le diagnostic psychiatrique.

Les scores des échelles d'évaluation sont donnés pour J₀ et J₂₁, c'est à dire en fonction du protocole que nous nous sommes imposés pour l'étude analytique; par contre l'évolution clinique est le reflet du résultat final (fin du traitement).

2.3.2 Echelle d'évaluation HDS/MES

L'examen clinique avec évaluation de l'effet antidépresseur est effectué sur l'échelle HDS/MES (Bech et coll., 1989). Il s'agit de l'échelle de dépression d'HAMILTON (HDS) et de l'échelle de mélancolie (MES).

Cette évaluation est toujours faite par le même observateur pour l'ensemble des patients, ce qui assure une plus grande cohérence aux scores obtenus.

Cette fiche (tableau VIII) couvre le champ de la dépression. L'épisode dépressif majeur (DSM III) défini par l'échelle de dépression d'Hamilton et l'échelle de mélancolie, est défini par une note d'au moins 1 pour A et la présence d'au moins 4 items de B.

Les critères du DSM III pour l'épisode dépressif majeur sont:

-
- A : humeur dysphorique
 - B (1) : anorexie ou perte significative de poids
 - B (2) : insomnie
 - B (3) : agitation ou ralentissement psychomoteur
 - B (4) : perte d'intérêt ou de plaisir
 - B (5) : perte d'énergie, fatigue
 - B (6) : autoaccusation ou culpabilité
 - B (7) : diminution de l'aptitude à penser ou à se concentrer
 - B (8) : impulsions suicidaires
-

Concernant l'échelle HDS/MES, les 17 premiers items constituent la version originale de l'échelle de dépression d'Hamilton (HDS). Les 6 items supplémentaires (18 à 23), forment avec certains des items de l'HDS, l'échelle de mélancolie et la dépression majeure selon le DSM III.

Les critères de l'HDS pour la dépression sont:

-
- un score global de 0 à 7 = absence de dépression
 - un score global de 8 à 15 = dépression mineure
 - un score global de 16 ou plus = dépression majeure
-

La sous échelle à 6 items de l'HDS regroupant les items (a) à (f) de l'HDS comme l'indique le tableau 8 présente les critères suivants:

-
- un score global de 0 à 3 = absence de dépression
 - un score global de 4 à 8 = dépression mineure
 - un score global de 9 ou plus = dépression majeure
-

Les critères de la MES pour la dépression sont :

-
- un score global de 0 à 5 = absence de dépression
 - un score global de 6 à 14 = dépression légère
 - un score global de 15 ou plus = dépression majeure
-

Ces scores ne sont pas définitifs, car donnés au bout de 21 jours de traitement, alors que quelquefois la maladie évolue beaucoup plus lentement, ce qui nécessiterait un suivi biologique beaucoup plus long et donc plus aléatoire si le patient était suivi en ambulatoire par exemple.

Tableau VIII : Fiche d'évaluation HDS / MES

DSM III	N° ITEM	HDS	MES
A	1 Humeur dépressive (0 - 4)	a _____	_____
B (6)	2 Autodépréciation et sentiments de culpabilité (0 - 4)	b _____	_____
B (8)	3 Suicide (0 - 4)	_____	_____
B (2) *	4 Insomnie du début de la nuit (0 - 2)	_____	
B (2) *	5 Insomnie du milieu de la nuit (0 - 2)	_____	
B (2) *	6 Insomnie du matin (0 - 2)	_____	
B (4)	7 Travail et intérêts (0 - 4)	c _____	_____
B (3) **	8 Ralentissement général (0 - 4)	d _____	
B (3)	9 Agitation (0 - 4)	_____	
	10 Anxiété psychique (0 - 4)	e _____	_____
	11 Anxiété somatique (0 - 4)	_____	
B (1)	12 Symptômes somatiques gastro-intestinaux (0 - 2)	_____	
B (5) ***	13 Symptômes somatiques généraux (0 - 2)	f _____	
	14 Intérêt sexuel (0 - 2)	_____	
	15 Hypochondrie (0 - 4)	_____	
B (1)	16 Perte de poids (0 - 2)	_____	
	17 Prise de conscience (0 - 2)	_____	
B (2) *	18 Troubles du sommeil (0 - 4)		_____
**	19 Ralentissement moteur (0 - 4)		_____
**	20 Ralentissement verbal (0 - 4)		_____
B (7) **	21 Ralentissement intellectuel (0 - 4)		_____
**	22 Emoussement affectif (0 - 4)		_____
B (5) ***	23 Fatigue et douleur (0 - 4)		_____
Les critères d'épisode dépressif majeur du DSM III sont-ils satisfaits ? oui = 1 non = 0 s/s HDS (a - f) HDS (1 - 17) Echelle visuelle analogique (dépression) Absence _____ Extrême			

* Items concernant l'insomnie ** Items concernant le ralentissement

*** Items concernant la fatigue et la douleur

2.4 ETUDE STATISTIQUE

La comparaison entre les différents groupes (contrôle et trois groupes traités) a été testée à l'aide d'une analyse de type ANOVA. De multiples comparaisons ont été étudiées en utilisant le test PLSD de Fisher (Winer, 1971). Les effets du traitement (évolution des valeurs entre J_0 et J_{21}) ont été évalués en utilisant le test bilatéral t de Student.

Une analyse discriminante a étudié les différences entre deux ou plusieurs groupes en utilisant plusieurs variables simultanément (Klecka, 1989). Celle-ci est obtenue en calculant des fonctions discriminantes (des combinaisons linéaires de variables donnent des variables discriminantes). Les coefficients de ces variables sont évalués pour optimiser les différences entre les moyennes de chaque groupe et la fonction discriminante. La valeur discriminante est généralement évaluée par le coefficient Lambda de Wilks. Un lambda de 1 est obtenu quand les moyennes de chaque groupe sont égales. Des valeurs proches de 0 sont obtenues quand la variabilité intergroupe est faible comparée à la variabilité totale. Ceci se produit quand la variabilité totale est principalement attribuée à des différences entre les moyennes des groupes. Le degré de significativité de l'indicateur lambda de Wilks est évalué par l'intermédiaire d'un X^2 à $(p-k)$ et $(g-k-1)$ degrés de liberté (avec p = nombre de variables discriminantes significatives, k = numéro d'ordre de la fonction discriminante et g = nombre de groupes). A la fin de l'analyse, les fonctions discriminantes et les variables discriminatoires sont utilisées pour prédire le groupe dans lequel chaque cas devrait appartenir. La comparaison entre prévision et réalité donnent une indication sur l'exactitude de la procédure et confirme indirectement le degré de séparation de chaque groupe.

3. RESULTATS CLINIQUES

3.1 PATIENTS

Les patients sont répartis en trois groupes selon l'évolution clinique des malades en cours de protocole.

Groupe 1 : Répondeurs (évolution favorable)

Groupe 2 : Répondeurs partiels (évolution partielle avec ou sans rechute)

Groupe 3 : Non répondeurs (évolution défavorable)

L'étude de la population est résumée dans le tableau IX; 17 patients sont unipolaires et 12 bipolaires; 3 patients ont été regroupés dans les états dépressifs majeurs (EDM). Ces patients sont des malades ayant leur premier accès dépressif mais n'étant pas atteint de PMD.

Tableau IX : Etude démographique des patients

	n	Répondeur	Répondeur partiel	Non répondeur
Homme (12) + Femme (20)	32	17 (53 %)	9 (28 %)	6 (19 %)
• Homme	12	8	3	1
• Femme	20	9	6	5
Dépression unipolaire	17	25 %	44 %	31 %
Dépression bipolaire	12	84 %	8 %	8 %
Etat dépressif majeur	3	80 %	20 %	

Les groupes 1, 2 et 3 comptent 17, 9 et 6 patients respectivement, soit 53 %, 28 % et 19 % de la population étudiée.

L'évolution des différents scores est visualisée dans le tableau X.

Tableau X : Evaluation des scores psychiatriques

GROUPES	DATE	SCORES		
		HDS	MES	s/s HDS
1. Répondeur (n = 17)	J 0	40,0 ± 6,8	35,0 ± 5,0	18,0 ± 2,8
	J 21	11,6 ± 4,5	7,9 ± 4,1	5,2 ± 2,8
2. Répondeur partiel (n = 9)	J 0	39,4 ± 7,3	34,9 ± 5,5	18,0 ± 2,8
	J 21	26,3 ± 7,8	21,1 ± 5,7	12,0 ± 2,3
3. Non répondeur (n = 6)	J 0	34,7 ± 6,7	32,2 ± 4,3	16,2 ± 1,2
	J 21	38,2 ± 8,9	36,2 ± 6,3	18,0 ± 3,3

(Valeurs exprimées en moyenne ± E.T. Les nombres entre parenthèses indiquent le nombre de patients)

Nous n'avons pas constaté de différence dans les 3 groupes à J₀ pour chaque échelle d'évaluation (HDS, MES, s/s HDS).

Dans le groupe 1, après trois semaines de traitement (J₂₁), les scores ont diminué d'une façon significative ($p < 0,0001$) pour chaque échelle d'évaluation soit respectivement de 71,0, 77,4, 71,1 % pour HDS, MES, s/s HDS. Tous les patients ont réagi positivement au traitement dans ce groupe. Tous les scores ont en effet diminué au bout de 21 jours atteignant des chiffres inférieurs aux échelles HDS/MES (respectivement 16, 15 et 9 pour HDS, MES et s/s HDS). Il est à noter dans ce groupe, le virage maniaque de 5 patients.

Le groupe 2 représente le groupe de patients à évolution partielle avec ou sans rechute. Les scores des patients ont baissé significativement ($p < 0,0001$) mais leur rémission est incomplète (< 50 %). Certains patients ont subi des électrochocs ou changé de traitement au bout d'un certain temps par manque d'efficacité de ce traitement.

Dans le groupe 3, l'évolution des patients n'a pas été favorable; dans tous les cas, les scores restent tels quels ou augmentent. Chez certains patients, les électrochocs ont permis d'améliorer leur état de santé.

Remarque

En tenant compte des 3 groupes, 11 patients subirent des électrochocs, 2 passèrent à l'acte suicidaire après leur séjour en milieu hospitalier, et 5 eurent un virage maniaque en cours de protocole.

Les pourcentages dans les groupes recoupent ceux de la littérature. Il est reconnu que les traitements par antidépresseur donnent 50-60 % de réussite, et que les électrochocs améliorent ce score de 20-25 % environ. Nos scores rentrent tout à fait dans ces fourchettes.

3.2 SEROTONINE

La sérotonine a été dosée dans le PRP de patients mélancoliques à J₀ et J₂₁ et les résultats comparés à ceux d'un groupe de contrôle.

3.2.1 Groupe de contrôle

Il a été réalisé à partir de 42 personnes exempts de signe psychiatrique et sans traitement médicamenteux (personnel du laboratoire et patients ambulatoires). La moyenne d'âge était de $47,3 \pm 9,9$ ans pour les femmes et $44,1 \pm 10,0$ ans pour les hommes. Nous obtenons le résultat suivant: $259,5 \pm 69,2$ µg/l; celui-ci tient compte du sexe des patients (hommes, n=21: 275 ± 72 µg/l; femmes, n=21: 244 ± 61 µg/l).

Ces valeurs sont plus restrictives que celles proposées par le laboratoire Cerba (Cergy Pontoise, France), qui indique une fourchette de valeurs usuelles allant de 100 à 300 µg/l et auxquelles certains laboratoires se réfèrent.

Certaines publications expriment les résultats de sérotonine en tenant compte du nombre de plaquettes, ce qui donne certainement un meilleur reflet de la situation. Nous n'avons pas réalisé la numération des plaquettes.

3.2.2 Résultats plaquettaires (PRP)

Les concentrations de sérotonine dans les PRP sont regroupés dans le tableau XI.

Une analyse statistique de type ANOVA appliquée à J₀ montre une certaine hétérogénéité entre les 4 groupes - contrôle et les 3 groupes de patients - $F(3,69) = 3,67$, $p = 0,016$. Les comparaisons multiples réalisées grâce au test de PLSD Fisher indiquent des différences significatives: groupe contrôle *versus* groupe 2 ($p < 0,05$) et groupe contrôle *versus* groupe 3 ($p < 0,05$). La comparaison groupe contrôle *versus* groupe 1 n'a pas montré de différence.

Durant les trois semaines de traitement, le chlorhydrate de fluoxétine a induit une forte réduction des taux de sérotonine chez les patients mélancoliques: soit respectivement de 79,9 ($p < 0,0001$), 81,3 ($p < 0,0079$) et 84,6 % ($p < 0,0165$) dans les groupes 1, 2, 3, ceci comparativement aux valeurs à J₀ (test bilatéral de Student).

Tableau XI: Concentrations de sérotonine (PRP) dans le groupe contrôle et chez les patients mélancoliques (µg/l)

	J 0	J 21
Groupe contrôle (n = 42)	259,5 ± 69,2	
Groupe 1. Répondeur (n = 16)	211,5 ± 126,3	42,4 ± 22,2
Groupe 2. Répondeur partiel (n = 9)	168,1 ± 123,2	31,4 ± 14,5
Groupe 3. Non répondeur (n = 6)	170,3 ± 106,0	26,2 ± 10,4

(Valeurs exprimées en moyenne ± E.T. Les nombres entre parenthèses indiquent le nombre de patients)

3.3 MHPG URINAIRE

3.3.1 Groupe de contrôle

Les volontaires étaient des personnes du laboratoire ou non hospitalisées venues en ambulatoire et ne subissant pas de thérapie. La moyenne d'âge était de 40,2 ± 10,1 ans pour les femmes et 47,1 ± 14,0 ans pour les hommes.

Les taux de MHPG-T ($3,20 \pm 1,09$ mg/24h) se répartissent en 4 % de MHPG-L, 37 % de MHPG-S et 59 % de MHPG-G.

MHPG urinaire	libre:	$0,12 \pm 0,05$ mg / 24h
	sulfaté:	$1,20 \pm 0,34$ mg / 24h
	glucuronide:	$1,89 \pm 0,87$ mg / 24h
	total:	$3,20 \pm 1,09$ mg / 24h

Nous n'avons pas observé de différence en tenant compte du sexe. Nos résultats comparés à ceux d'autres études montrent une bonne similitude (Tableau XII).

Tableau XII: Valeurs de MHPG urinaire trouvées dans la littérature chez des sujets bien portants adultes (Moyenne $\pm$ E.T.: μ g/24h)

REF.	METHODE	n	SEXE	MHPG URINAIRE (μ g / 24 heures)						
				Libre	Sulfaté	Glucuronide	Total	% L	% S	% G
1	CLHP-EC	14	F	139 ± 21	622 ± 64	853 ± 84	1613 ± 145	6,6	40	53,4
		14	M	128 ± 11	776 ± 80	1031 ± 122	1935 ± 189	8,6	38,6	52,8
2	CLHP-EC	7	F	116 ± 63	654 ± 340	1055 ± 559	1855 ± 630	7	33	60
		10	M	158 ± 86	1033 ± 454	1746 ± 645	2937 ± 980	6	35	59
3	CG - SM	9	M/F	83 ± 11	1090 ± 130	1340 ± 190	2500 ± 300	3,4	46	50,6
4, 5	CG - SM	9	M	49 ± 7	979 ± 84	845 ± 74	1863 ± 113	2,6	53,1	45,3
6	CG - ECD	6	F	190 ± 4	1260 ± 188	1000 ± 144	2450 ± 335	7,8	51,4	40,8
		7	M	150 ± 23	1360 ± 166	910 ± 49	2410 ± 189	6,2	56	37,8
7	CG - ECD	13	M/F		1490 ± 94	1020 ± 110	2740 ± 152		54,4	37,2
8	CLHP - EC	7	F	140 ± 20	809 ± 310	751 ± 310	1702 ± 500	8,2	47,6	44,2
		8	M	112 ± 30	1340 ± 300	1470 ± 430	2930 ± 730	3,8	45,7	50,5
9	CLHP - EC	20	F	120 ± 50	1200 ± 320	1860 ± 730	3170 ± 940	4	37	59
		20	M	120 ± 40	1200 ± 350	1910 ± 970	3230 ± 1190	4	38	58

Références

1: Peyrin et Pequinot (1983); 2: Filser et coll. (1988); 3: Boobis et coll. (1979); 4: Karoum et coll. (1973); 5: Karoum et coll. (1977); 6: Bond et coll. (1979); 7: Joseph et coll. (1976); 8: Santogostino et coll. (1982); 9: Laboratoire de biochimie, Hôpital Bel Air, Thionville (1991).

Si les taux de MHPG-L et MHPG-S sont en accord avec les résultats obtenus par les études citées dans le tableau XII , par contre les taux de MHPG-G et MHPG-T sont plus élevés dans notre étude; certains facteurs non spécifiques tels que l'exercice musculaire, le sommeil peuvent sensiblement influencer ces dérivés périphériques. Exprimés en %, nos valeurs sont relativement proches des autres études. Deux auteurs, Santagostino et coll. (1982) et Filser et coll. (1988) ont trouvé des variations selon le sexe du patient mais pas en pourcentage.

3.3.2 MHPG urinaire chez les patients

Les résultats moyennés des 3 groupes de patients sont résumés dans le tableau XIII et comparés au groupe de contrôle.

Tableau XIII: Concentrations urinaires de MHPG-T et de ses 3 fractions chez les patients mélancoliques et bien portants

PATIENTS (groupes)	DATE	MHPG URINAIRE (mg / 24 h)						
		Libre	Sulfaté	Glucuronide	Total	% L	% S	% G
Contrôle (n = 40)		0,12 ± 0,05	1,20 ± 0,34	1,89 ± 0,87	3,20 ± 1,09	4	37	59
1. Répondeur (n = 12)	J 0	0,09 ± 0,02	1,00 ± 0,46	1,42 ± 0,59	2,50 ± 0,78	3	40	57
	J 21	0,12 ± 0,06	1,00 ± 0,27	1,28 ± 0,54	2,39 ± 0,70	5	42	53
2. Répondeur partiel (n = 8)	J 0	0,12 ± 0,07	1,32 ± 0,40	1,33 ± 0,37	2,78 ± 0,42	4	48	48
	J 21	0,09 ± 0,03	0,82 ± 0,50	1,32 ± 0,46	2,24 ± 0,59	4	37	59
3. Non répondeur (n = 6)	J 0	0,10 ± 0,02	1,08 ± 0,30	2,08 ± 1,23	3,26 ± 1,25	3	33	64
	J 21	0,14 ± 0,11	0,45 ± 0,09	0,95 ± 1,02	1,54 ± 1,03	9	29	62

(Valeurs exprimées en moyenne ± E.T. Les nombres entre parenthèses indiquent le nombre de patients)

Concernant le MHPG-L, nous n'avons pas observé de différence entre les 3 groupes traités et le groupe contrôle à J₀ et J₂₁. Avant traitement (J₀), les taux de

MHPG-G varient peu entre les 4 groupes. Dans les groupes 1 et 2 nous n'avons pas observé de différence entre les valeurs à J_0 et J_{21} . Au contraire, les taux de MHPG-G dans le groupe 3 (non répondeur) ont chuté significativement après traitement (54,3 %, $p < 0,02$) (test t bilatéral de Student).

Pour le MHPG-S, les taux observés dans les 3 groupes sont identiques à ceux du groupe contrôle à J_0 . Après trois semaines de traitement (J_{21}), les concentrations de MHPG-S ont baissé significativement dans les groupes 2 (37,9 %, $p < 0,002$) et 3 (58,3 %, $p < 0,002$). Nous n'avons pas observé de différence entre les taux de MHPG-S à J_0 et J_{21} dans le groupe 1 (test t bilatéral de Student).

A J_0 les taux de MHPG-T dans les 3 groupes sont identiques à ceux du groupe contrôle. Dans le groupe 1, nous n'avons pas observé de différence entre les taux de MHPG-T à J_0 et J_{21} . Par contre après traitement, les concentrations de MHPG-T ont chuté significativement dans les groupes 2 et 3: 19,4 ($p < 0,05$) et 52,7 % ($p < 0,006$) respectivement (test t bilatéral de Student).

3.4 CREATININE URINAIRE

Les valeurs de créatinine urinaire (mg/24h) obtenues sont les suivantes:

	HOMMES	FEMMES
J 0	1437 ± 387	1117 ± 297
J 21	1418 ± 484	989 ± 454

Elles sont en conformité avec les valeurs de Garvey et coll. (1990).

3.5 MHPG PLASMATIQUE

3.5.1 Groupe de contrôle

Il a été réalisé à partir de 36 volontaires (18 hommes et 18 femmes) de différents âges (hommes: $45,3 \pm 10,1$ ans; femmes: $40,2 \pm 10,7$ ans), sans antécédent psychiatrique et ne subissant pas de thérapie. Les taux de MHPG-T ($30,02 \pm 6,21$ µg/l) consistent en 12 % MHPG-L, 18 % MHPG-S et 70 % MHPG-G.

MHPG plasmatique	libre:	3,50 ± 1,16 µg / l
	sulfaté:	5,38 ± 1,24 µg / l
	glucuronide:	21,14 ± 5,70 µg / l
	total:	30,02 ± 6,21 µg / l

Le tableau XIV compare nos résultats avec ceux d'autres études. La plupart des auteurs n'étudient que le MHPG plasmatique libre et total. Karoum et coll. (1977) ainsi que Piletz et Halaris (1989), ont dosé le MHPG-S en hydrolysant celui-ci avec de la sulfatase contenant de la β -glucuronidase, alors que pour le dosage du MHPG-G, ils ont utilisé de la glucuronidase exempt de sulfatase. Ceci peut expliquer les taux différents obtenus par rapport à notre étude. Nous trouvons cependant étonnant l'utilisation d'un mélange de 2 enzymes pour hydrolyser le MHPG-S car même à faible concentration de β -glucuronidase dans le mélange, une partie du dérivé glucuronide est hydrolysé et augmente ainsi le pourcentage de dérivé sulfaté.

Concernant le MHPG-L, nos résultats corroborent un certain nombre d'études. Ce n'est pas le cas pour le MHPG-T où nous avons trouvé de façon générale des taux plus élevés.

Tableau XIV: Valeurs de MHPG plasmatique ($\mu\text{g/l}$) trouvées dans la littérature chez des sujets bien portants adultes (Moyenne $\pm$ E.T.)

REFERENCE	METHODE	NOMBRE	SEXE	MHPG PLASMATIQUE ($\mu\text{g/l}$)			
				Libre	Sulfaté	Glucuronide	Total
1	CLHP - EC		M				18,8 $\pm$ 4,5
			F				15,6 $\pm$ 3,1
2	CLHP - EC	8	M				16,3 $\pm$ 4,0
		8	F				12,6 $\pm$ 3,2
3	CG - ECD	5	M/F	5,4 $\pm$ 1,5			15,7 $\pm$ 4,4
4	CG - SM	10	M/F	5,8 $\pm$ 0,6	8,3 $\pm$ 0,6	7,9 $\pm$ 0,5	22,0 $\pm$ 5,5
5	CG - SM	13	M/F				18,0 $\pm$ 2,0
6	CLHP - EC	10	M				18,7 $\pm$ 7,2
		12	F				14,5 $\pm$ 2,2
7	CG - SM	24	M	3,8 $\pm$ 0,4			10,7 $\pm$ 0,5
8	CLHP - EC	23	M/F				15,1 $\pm$ 1,7
9	CLHP - EC	11	M				20,5 $\pm$ 1,7
		10	F				19,8 $\pm$ 2,0
10	CG - ECD	7	M/F	5,3 $\pm$ 4,3	16,0 $\pm$ 7,3	3,9 $\pm$ 3,9	24,6 $\pm$ 11,1
11	CLHP - EC	18	M	3,4 $\pm$ 1,2	5,6 $\pm$ 1,3	22,7 $\pm$ 5,7	31,7 $\pm$ 5,8
		18	F	3,6 $\pm$ 1,0	5,1 $\pm$ 1,1	20,0 $\pm$ 5,6	28,7 $\pm$ 6,2

Références:

1: Karege (1984); 2: Sharpless et coll. (1986); 3: Dekirmenjian et Maas (1974); 4: Karoum et coll. (1977); 5: Hjemdahl et coll. (1982); 6: Azorin et coll. (1990); 7: Jimerson et coll. (1981); 8: Lancon et coll. (1990); 9: Bottai et coll. (1991); 10: Piletz et Halaris (1989); 11: Laboratoire de Biochimie, Hôpital Bel Air, Thionville (1991).

3.5.2 MHPG plasmatique chez les patients

Les résultats pour chaque groupe sont regroupés dans le tableau xv.

Tableau XV: Concentrations plasmatiques de MHPG-T et de ses 3 fractions chez les patients mélancoliques et les sujets bien portants.

PATIENTS (groupes)	DATE	M H P G PLASMATIQUE (µg / l)						
		Libre	Sulfaté	Glucuronide	Total	% L	% S	% G
Contrôle (n = 36)		3,50 ± 1,16	5,38 ± 1,24	21,14 ± 5,70	30,02 ± 6,21	12	18	70
1. Répondeur (n = 15)	J 0	4,01 ± 1,42	5,61 ± 1,88	21,07 ± 8,47	30,07 ± 9,75	13	18	69
	J 21	4,09 ± 1,38	5,99 ± 2,33	20,33 ± 8,49	29,91 ± 9,82	14	20	66
2. Répondeur partiel (n = 9)	J 0	3,47 ± 0,93	7,50 ± 3,62	15,93 ± 6,56	26,90 ± 5,53	13	29	58
	J 21	3,53 ± 0,91	7,05 ± 3,99	22,95 ± 8,51	33,54 ± 10,49	11	21	68
3. Non répondeur (n = 5)	J 0	3,64 ± 1,76	6,54 ± 2,10	18,20 ± 2,61	28,05 ± 4,46	13	22	65
	J 21	4,30 ± 1,97	4,94 ± 1,08	22,07 ± 11,23	30,77 ± 13,84	14	16	70

(Valeurs exprimées en moyenne ± E.T. Les nombres entre parenthèses indiquent le nombre de patients)

Nous n'avons pas observé de différence entre les 3 groupes de patients et le groupe contrôle à J₀ pour MHPG-L. Dans les groupes 1 et 2, les taux de MHPG-L sont pratiquement identiques à J₀ et J₂₁. Dans le groupe 3 les taux de fraction libre ont augmenté significativement après traitement (18,1 %, p < 0,04) (test t bilatéral de Student).

Avant traitement les taux de MHPG-G ne sont pas significativement différents entre les 3 groupes traités et le groupe de contrôle. A J₂₁ les taux de MHPG-G ont significativement augmenté dans le groupe 2 (44,1 %, p < 0,01), ce qui n'est pas le cas entre J₀ et J₂₁ dans les groupes 1 et 3 (test t bilatéral de Student).

Une analyse statistique de type ANOVA appliquée aux données de MHPG-S à J₀, montre une hétérogénéité dans les 4 groupes - F (3,61) = 3,20, p = 0,029. De multiples comparaisons réalisées en utilisant le test PLSD de Fisher, indiquent des différences significatives entre: groupe contrôle *versus* groupe 2 (p < 0,05) et groupe 1 *versus* groupe 2 (p < 0,05). Nous n'avons pas observé de différence entre le groupe de

contrôle et groupes 1 et 3; de même entre les 3 groupes traités à J_0 et J_{21} (test t bilatéral de Student).

Concernant le MHPG-T, nous n'avons pas observé de différence entre les 4 groupes à J_0 . A J_{21} , les taux de MHPG-T ont augmenté significativement dans le groupe 2 (24,7 %, $p < 0,02$), mais pas dans les groupes 1 et 3 entre J_0 et J_{21} (test t bilatéral de Student).

3.6 FLUOXETINE ET NORFLUOXETINE

Les concentrations de fluoxétine et norfluoxétine ont été évaluées chez les patients traités à J_{21} (tableau XVI).

Une analyse statistique de type ANOVA appliquée aux données de fluoxétine, norfluoxétine et à la somme des deux composés, n'indique pas de différence entre les 3 groupes de patients traités. Une analyse statistique de type ANOVA appliquée aux pourcentages de norfluoxétine (tableau 16), montre une tendance à l'hétérogénéité dans les 3 groupes: $F(2,25) = 2,68$, $p = 0,088$. Des comparaisons multiples réalisées en utilisant le test PLSD de Fisher, indiquent une différence significative en comparant groupe 1 *versus* groupe 3 ($p < 0,05$). Nous n'avons pas observé de différence entre les groupes 1 et 2. Le pourcentage de norfluoxétine augmente graduellement du groupe 1 au groupe 3; le groupe non répondeur possédant le pourcentage le plus élevé.

Tableau XVI: Concentrations de FL et NFL dans le sérum à J_{21} ($\mu\text{g/l}$).

GROUPES	FLUOXETINE (FL)	NORFLUOXETINE (NFL)	NFL + FL	% NFL = $\frac{\text{NFL} \times 100}{\text{NFL} + \text{FL}}$
1. Répondeur (n = 13)	118 ± 51	125 ± 45	243 ± 89	52 ± 7
2. Répondeur partiel (n = 9)	100 ± 47	147 ± 42	247 ± 51	60 ± 15
3. Non répondeur (n = 6)	73 ± 42	121 ± 38	194 ± 64	65 ± 14

(Valeurs exprimées en moyenne ± E.T. Les nombres entre parenthèses indiquent le nombre de patients)

CHAPITRE II : DISCUSSION

Nos résultats montrent que sur 32 patients 53 % ont réagi positivement au traitement (tableau 9). Toutefois le pourcentage de patients répondeurs atteints de dépression bipolaire (84 %) est supérieur à celui de patients atteints de dépression unipolaire (25 %). La forme bipolaire de la PMD est généralement plus homogène que la forme unipolaire. Une forme unipolaire initialement considérée bien délimitée, peut se subdiviser en différentes catégories du fait de l'existence d'aspects évolutifs.

Le système neuronal sérotoninergique a été l'un des systèmes neurotransmetteurs les plus étudiés dans le cadre de la dépression. Le cerveau étant inaccessible à l'exploration biochimique directe *in vivo*, les investigations biologiques ont porté à la périphérie. Les plaquettes ont la même origine embryologique que le SNC et présentent plusieurs équipements métaboliques identiques à ceux des cellules nerveuses à sérotonine. Pour cette raison, la plaquette sanguine est considérée comme un bon modèle périphérique du neurone cérébral à sérotonine (Dreux, 1983). La présence des mêmes sites de liaison à l'imipramine dans le cerveau et sur les plaquettes semble authentifier le bien-fondé de cette assimilation. Ces sites de liaison sont couplés avec le système de recapture de la sérotonine; ils pourraient donc jouer un rôle dans la régulation de la sérotonine cérébrale. Cependant si les plaquettes constituent un modèle périphérique d'exploration du cerveau, dans quelle mesure sont-elles un reflet fiable du SNC?

Différents facteurs doivent être pris en compte lorsque l'on compare les données de patients dépressifs à celles de sujets sains. Ainsi chez des sujets bien portants, des différences de concentration en sérotonine plaquettaire ont été constatées en fonction de l'âge, mais aucune différence significative n'a été observée dans chaque groupe d'âge quant au sexe (Flachaire et coll., 1990;

Martin et coll., 1990). D'autres facteurs, comme le rythme circadien (Dennis et coll., 1986), la variation saisonnière de la capture de sérotonine (Egrise et coll., 1986), le facteur génétique (Zemishlany et coll., 1982) peuvent modifier les résultats. Eynard et coll. (1993) n'ont cependant observé aucune variation des taux plaquettaires de sérotonine avec les rythmes circadiens et en fonction des saisons chez des personnes volontaires et bien portantes. Les résultats diffèrent lorsque la sérotonine est dosée dans le sang total et non pas dans les plaquettes (Dennis et coll., 1986; Egrise et coll., 1986; Pietraszek et coll., 1992).

L'âge des patients et le rythme circadien n'ont pas influé sur nos résultats; tous les prélèvements ont été réalisés le matin sur des sujets adultes. Nos valeurs dans le groupe contrôle sont corrélées avec celles établies par Martin et coll. (1990). La recapture de sérotonine dans le plasma riche en plaquettes (PRP) des patients mélancoliques est de façon générale inférieure au groupe de contrôle dans notre étude et ceci principalement dans les groupes répondeurs partiels et non répondeurs (tableau XI). Sarrias et coll. (1987) ont également trouvé des résultats de sérotonine inférieurs chez des patients mélancoliques en comparaison avec des sujets sains. Certains auteurs ont observé chez des patients dépressifs une augmentation de la densité des sites de liaison des récepteurs 5-HT₂ dans les plaquettes (Egrise et coll., 1986; Pandey et coll., 1990). Cette densité décroît uniquement chez les patients en état d'amélioration aboutissant aux valeurs du groupe de contrôle. Des études biochimiques et pharmacologiques ont montré que le processus de recapture implique la liaison de la sérotonine à un site reconnu à l'intérieur du transporteur. La fluoxétine se fixe sur le même site dans le transporteur que la sérotonine dans le cerveau humain (Owens et Nemeroff, 1994). Les plaquettes et les neurones sérotoninergiques présentent des séquences identiques quant au transport de la sérotonine (Lesch et coll., 1993). Dans notre étude, la réduction de concentration plaquettaire en sérotonine dans le groupe répondeur est plus significative que dans les 2 autres groupes ($p < 0,0001$) après traitement par la fluoxétine (J₂₁). Ceci peut s'expliquer par une meilleure efficacité du traitement dans ce groupe, la fluoxétine inhibant mieux le transporteur de capture de sérotonine dans les plaquettes sanguines. Enfin, nos résultats ne tiennent pas compte du nombre de

plaquettes et celles-ci peuvent varier d'un sujet à l'autre.

L'exploration de la voie noradrénergique a été réalisée en dosant le MHPG plasmatique et urinaire. Les concentrations du MHPG libre et conjugué plasmatique chez des sujets adultes bien portants ont été rarement déterminées (tableau XIV). Karoum et coll. (1977) en dosant les composés par spectrométrie de masse (fragmentation), après extraction par l'acétate d'éthyle, ont obtenu des résultats différents des nôtres. Les résultats obtenus par Piletz et Halaris (1989) en utilisant la méthode CPG sont également différents de ceux de Karoum et coll. (1977) (tableau XIV). Ces auteurs ont utilisé une méthode d'hydrolyse différente de la nôtre. Ainsi Karoum et coll. (1977), Piletz et Halaris (1989) ont hydrolysé les prélèvements avec de la β -glucuronidase pure pour MHPG-G et de la sulfatase contenant de la β -glucuronidase pour l'hydrolyse totale (processus inverse du nôtre). Cependant les variations circadiennes chez les déprimés rendent aléatoires les comparaisons quantitatives à des moments déterminés. Ainsi le MHPG plasmatique peut varier de $\pm 12\%$ en une heure (Lêo et coll., 1986). Notre étude montre que les taux moyens plasmatiques de MHPG libre et conjugué sont identiques chez les 3 groupes traités tant à J_0 qu'à J_{21} et entre J_0 et J_{21} (tableau XV). Chez des patients sujets à des dépressions unipolaires non mélancoliques, traités par I.V. durant 4 semaines avec de la clomipramine (inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine), Mine et coll. (1993) n'ont pas observé de différence significative pour les taux de MHPG libre plasmatique entre le groupe répondeur et le groupe non répondeur. Dans cette étude le MHPG-L est généralement inférieur à $5\text{ }\mu\text{g/l}$. Sweeney et coll. (1980) ont trouvé des taux de MHPG-L allant de 2 à $6\text{ }\mu\text{g/l}$ chez 10 patients dépressifs. Ces résultats sont en accord avec ceux de notre étude. Des patients dépressifs dont l'état s'améliorait après traitement avec de la clomipramine présentaient des diminutions significatives des taux de MHPG-S mais pas de modification des concentrations chez les sujets non répondeurs (Mine et coll.; 1993). Dans les groupes répondeur partiel et non répondeur, les taux de MHPG-S à J_0 sont légèrement supérieurs à ceux du groupe répondeur, mais le traitement avec de la fluoxétine n'a pas permis de diminuer significativement ces valeurs. La fluoxétine n'a donc pas eu d'effet dans les groupes 2 et 3.

Ainsi que l'ont noté Karoum et coll. (1977), les concentrations des 3 formes de MHPG dans les urines sont plus de 20 fois supérieures à celles dans le plasma; 4 % pour le MHPG-L et respectivement 37 et 59 % pour les dérivé sulfaté et glucuronide (tableau XIII). Ces pourcentages sont en concordance avec ceux de Filser et coll. (1988). De plus, les valeurs en MHPG libre et conjugué sont en accord avec celles d'autres études (tableau XII). Ces gradients de concentration suggèrent l'existence d'un mécanisme de concentration de MHPG au niveau rénal qui implique un système de transport actif. Dans notre étude, les valeurs des différentes formes de MHPG dans les 3 groupes traités ne sont pas significativement différentes de celles du groupe de contrôle à J_0 . Nous n'avons pas observé de différence entre J_0 et J_{21} pour MHPG-L. Au contraire, les taux de MHPG-S et MHPG-G ont baissé significativement après traitement dans le groupe non répondeur en comparaison du groupe répondeur. Cette baisse est le reflet de l'implication du système noradrénergique; ces patients étant plutôt résistants à la fluoxétine. Filser et coll. (1988) ont démontré que chez l'Homme, des exercices physiques importants augmentaient fortement l'excrétion urinaire du MHPG-G suggérant ainsi le rôle périphérique du MHPG-G; dans ce cas les concentrations en MHPG-S et MHPG-L ne sont pas significativement modifiées. La baisse des taux de MHPG-G dans le groupe 3 de notre étude peut s'expliquer par l'inaction prolongée durant trois semaines et corroborer ainsi l'étude précitée. La comparaison des scores psychiatriques (tableau X) et des résultats analytiques de MHPG-S montre une bonne corrélation au bout des 21 jours de traitement, confirmant ainsi son origine majoritairement centrale. Notre étude suggère donc que le MHPG-S urinaire représente un meilleur marqueur du turn-over de la noradrénaline du SNC que le dérivé plasmatique. Dans les groupes répondeur partiel et non répondeur, l'activité noradrénergique cérébrale est impliquée, mais aucun effet de la fluoxétine n'a été noté.

Dans notre étude la fluoxétine a été administrée durant 3 semaines à 20 mg/24h et 53 % des patients ont réagi positivement au traitement. Une dose plus élevée (60 mg/jour) chez des patients ne répondant pas à 20 mg n'a pas permis d'obtenir de meilleurs résultats (Wernicke et coll., 1987; Montgomery et coll., 1990; Beasley et coll., 1990). Dornseif et coll. (1989) ont montré dans une étude

portant sur 5 semaines supplémentaires de traitement, que 40,5 % des patients répondaient à une dose de 20 mg/24h et 44,7 % à une dose de 60 mg/24h en fluoxétine. Par ailleurs d'autres auteurs ont observé une meilleure efficacité avec des doses plus élevées (60 - 80 mg/24h) lorsque le patient le supportait (Schweitzer et coll., 1990; Fava et coll., 1992). Notre travail n'a pas montré de corrélation entre les scores psychiatriques et les concentrations plasmatiques en fluoxétine et norfluoxétine. Cependant le tableau XVI montre que le pourcentage de la norfluoxétine augmente progressivement du groupe 1 au groupe 3. Ainsi, pour le groupe répondeur, le pourcentage est plus faible (52 ± 7 %) que pour le groupe non répondeur (65 ± 14 %). La fluoxétine est un puissant inhibiteur du cytochrome hépatique P450 (CYP2D6) qui est largement ou partiellement responsable de l'élimination des antidépresseurs tricycliques et de nombreux inhibiteurs sélectifs de recapture de la sérotonine (Brøsen et Skjelbo, 1991; Bergstrom et coll., 1992). La fluoxétine est constituée d'un mélange racémique de deux énantiomères *S* et *R*, tous deux actifs en tant qu'inhibiteur de recapture de la sérotonine, et métabolisés par N-desméthylation en norfluoxétine (Fuller et Snoddy, 1991). Apparemment, l'inhibition des enzymes hépatiques est plus faible pour la norfluoxétine que pour la fluoxétine et plus faible pour les composés énantiomères *S* que *R* (Torok-Both et coll., 1992; Gram, 1994). Après traitement à la fluoxétine durant 3 semaines, les concentrations plasmatiques des énantiomères *S* de la fluoxétine et de la norfluoxétine sont plus de deux fois supérieures à celles des énantiomères *R* (Torok-Both et coll., 1992). Chaque patient aura par conséquent ces 4 composés à différentes concentrations dans son organisme, induisant des conséquences sur les effets cliniques, la tolérance ainsi que sur les interactions avec d'autres drogues. La difficulté pour établir une relation entre la dose et la concentration plasmatique de fluoxétine et ses effets est peut être due à ces énantiomères, ce qui nécessiterait des séparations et des dosages plus fins. Les concentrations plasmatiques de NFL + FL sont respectivement de 243 ± 89 , 247 ± 51 et 194 ± 64 µg/l dans les trois groupes avec une grande variation individuelle. Ces valeurs ont également été obtenues par Beasley et coll. (1990) et Montgomery et coll. (1990).

Des études précliniques permettent d'émettre l'hypothèse que les actions inhibitrices à la fois sur la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline sont

synergiques (Brunello et coll., 1982; Baron et coll., 1988). La désipramine, un inhibiteur relativement sélectif de la recapture de la noradrénaline, et la fluoxétine utilisées en combinaison ont donné une réponse plus rapide et efficace qu'utilisées seules dans le traitement de patients hospitalisés atteints de dépression majeure et mélancolie (Nelson et coll., 1991). Clerc et coll. (1994) ont observé que la venlafaxine était plus efficace que la fluoxétine dans le traitement de patients hospitalisés atteints de dépression majeure et mélancolie. Cette supériorité était le fait de son action simultanée sur la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline.

Dans notre étude, à propos de 32 patients atteints de mélancolie, l'utilisation à J₀ de plusieurs variables biologiques [5] et psychiatriques [3] dans une analyse discriminante a permis de prévoir l'efficacité du traitement dans 75.8 % des cas (tableau XVII).

Tableau XVII: Résultats de l'analyse discriminante avec 8 variables

GROUPES REELS	GROUPES PREDICTIFS	
	1	2
1 Répondeurs	12	4
2 Répondeurs partiels + non répondeurs	4	9

D'autre part, lorsque l'analyse discriminante ne prend en compte que les variables biologiques (créatinine urinaire, MHPG libre et conjugué, sérotonine PRP), il est possible de prévoir l'évolution du traitement à la fluoxétine pour 72.4 % des patients (tableau XVIII).

Tableau XVIII: Résultats de l'analyse discriminante avec 5 variables

GROUPES REELS	GROUPES PREDICTIFS	
	1	2
1 Répondeurs	12	4
2 Répondeurs partiels + non répondeurs	3	10

En conclusion, le dosage de MHPG urinaire donne de meilleurs informations que le MHPG plasmatique sur les perturbations de la voie noradrénergique; de faibles concentrations en MHPG sulfaté urinaire permettraient de prévoir une faible réponse à un antidépresseur sérotoninergique.

Notre étude a permis de montrer qu'il n'existait pas de corrélation entre les scores psychiatriques et les concentrations plasmatiques de fluoxétine et norfluoxétine. Elle confirme le fait que le rapport optimum bénéfices - risques pour la plupart des patients se trouve dans une posologie quotidienne de 20 mg et que seulement un nombre restreint (non répondeurs) nécessite des posologies supérieures. Le choix d'une posologie optimale est tiré d'un équilibre délibérément choisi entre la réponse antidépressive désirée et le niveau des effets secondaires indésirables. Il semble que l'on tire peu d'avantages à abaisser les posologies en dessous de 20 mg/jour. L'étude de 32 patients mélancoliques a permis de montrer que pour un nombre appréciable de patients, il était possible de prévoir leur évolution en suivant des variables biologiques et psychiatriques avant traitement.

PARTIE I V

ETUDE EXPERIMENTALE SUR LE RAT

Les propriétés biochimiques et pharmacologiques de la fluoxétine ont beaucoup été étudiées chez les animaux (Fuller et coll., 1974; Horng et Wong, 1976; Bymaster et Wong, 1977; Fuller et Wong, 1977; Ross et Renyi, 1977; Lemberger et coll., 1978; Wong et coll., 1985; Benfield et coll., 1986; Caccia et coll., 1990; Fuller et Snoddy, 1991; Dailey et coll., 1992; Trouvin et coll., 1993).

Ces études de la fluoxétine sur animal aident à comprendre les mécanismes d'action et facilitent l'extrapolation des découvertes biochimiques et pharmacologiques sur l'Homme.

Suite aux résultats cliniques obtenus, nous avons procédé à deux expérimentations sur le Rat.

- Dans un premier temps, nous avons défini la dose de fluoxétine provoquant une baisse sensible de la sérotonine plaquettaire. Puis nous avons voulu essayer de comprendre le rôle joué par la norfluoxétine dans l'inhibition de recapture de la sérotonine. Dans ce but, nous avons choisi d'étudier différents effets sur le système sérotoninergique (plaquettes et cerveau de rat), après administration de fluoxétine à différentes doses, de norfluoxétine à 10 mg/kg, ou après blocage du métabolisme de la fluoxétine par du SKF-525A (Proadifen).

- La deuxième étude a été réalisée en collaboration avec le laboratoire ETAP - Ethologie appliquée (Nancy). Le laboratoire ETAP a développé un processus expérimental où le rat a la possibilité de contrôler la luminosité des cages grâce à des leviers. Dans un premier temps, le rat apprend à contrôler son environnement en appuyant sur un levier actif, lui donnant une période d'obscurité, ou sur un levier inactif. Dans un deuxième temps, les deux leviers sont inactifs, et le rat progressivement arrête d'appuyer sur les leviers, augmente sa période d'immobilité et finalement se résigne à subir la lumière intense. Des rats traités par des antidépresseurs se résignent moins et continuent à appuyer sur les leviers en dépit de leur inactivité (Messaoudi et coll., 1996). Nous avons étudié les effets de la fluoxétine, en traitement curatif, administrée par voie intrapéritonéale, dans le modèle de dépression du " Stimulus Lumineux Aversif Inévitable". Le but de cette étude est d'évaluer l'effet curatif de la fluoxétine à la dose de 10 mg/kg sur le phénomène de résignation comportementale chez le Rat et d'étudier la corrélation éventuelle de cet effet avec différents dosages avant et après traitement.

CHAPITRE I: ACTION DE LA FLUOXETINE (DOSES VARIABLES) ET DE LA NORFLUOXETINE (10 MG/KG) SUR LA SÉROTONINE ET LE 5-HIAA

1. PROTOCOLE

1.1 EXPERIMENTATION

Nous avons été amené à réaliser plusieurs expériences:

- établir des groupes contrôles pour l'étude de la sérotonine et du 5-HIAA
- administrer des doses croissantes en i.p. de fluoxétine (2.5, 5, 10, 20 mg/kg), afin de suivre l'évolution du rapport NFL/FL
- injecter de la norfluoxétine seule (10 mg/kg), afin d'étudier son rôle dans l'inhibition de la recapture de la sérotonine
- injecter de la fluoxétine après blocage du métabolisme hépatique de cette dernière par du SKF-525A (Proadifen) afin d'étudier l'action de la fluoxétine plus ou moins métabolisée.

1.2 ANIMAUX

Les expériences sont réalisées sur des rats mâles adultes de race Wistar (Iffa Credo, l'Arbresle, France) pesant 250 g à la commande. Dès leur réception, les rats sont répartis dans des cages grillagées, puis placés dans une animalerie soumise à un cycle jour / nuit de douze heures d'éclairement et de douze heures d'obscurité et maintenue à une température constante de 21 ± 1 °C. L'eau et la nourriture (croquettes complètes et vitaminées M25 Extra-Labo, Provins, France) sont fournies *ad libitum*. Les animaux ont été nourris et laissés en réadaptation au sein de l'animalerie durant une semaine, afin de reprendre un poids stable ($n = 45$: 295 ± 25 g).

Au bout de cette période, les rats sont pesés, et une dose unique calculée en mg / kg de poids corporel leur est injecté en i.p. à l'aide d'une seringue de 1 ml. Trois

heures après l'injection, les rats ont été sacrifiés sous légère anesthésie à l'éther pour faciliter le flux sanguin; le cerveau total avec cervelet a été immédiatement congelé à - 20°C; le sang quant à lui a été recueilli dans des tubes contenant 0,15 % d'EDTA, centrifugé une première fois 15 min à 150 g pour recueillir le PRP (dosage de la sérotonine plaquettaire), puis une seconde fois 5 min à 3000 g afin de recueillir le plasma pour le dosage de la fluoxétine et de la norfluoxétine. Les prélèvements sanguins sont congelés à - 20 °C.

1.3 ADMINISTRATION DE LA FLUOXETINE

La solution à injecter en i.p. est préparée en diluant 30 mg de fluoxétine dans 4 ml d'eau pour préparation injectable (Laboratoires Meram, France). Nous obtenons ainsi une solution à 7,5 mg/ml; en injectant 0,8 ml de cette solution à un rat pesant 300 g, nous obtenons une dose injectée de 20 mg/kg. Pour des injections à 10, 5, 2.5 mg/kg, la solution mère à 7,5 mg/kg est diluée au demi, puis cette dernière également de moitié et au quart, afin d'injecter toujours le même volume de produit à poids égal.

Nous avons procédé de la même manière pour la norfluoxétine à 10 mg/kg (15 mg de produit dans 4 ml d'eau) ou pour l'agent bloquant à 40 mg/kg (60 mg de proadifen dans 4 ml d'eau).

2. RESULTATS ANALYTIQUES

2.1 GROUPES DE CONTROLE

Nous avons réalisé un groupe de contrôle pour:

- la sérotonine dans le sang et le cerveau de rat
- le 5-HIAA dans le cerveau de rat

2.1.1 Sérotonine

Les résultats de notre étude comparés à ceux d'autres auteurs donnent des valeurs de même grandeur, dans le sang (tableau XIX) et le cerveau (tableau XX).

Sérotonine	Nombre de rats	Moyenne $\pm$ E.T.
P.R.P ($\mu\text{g/ml}$)	8	1,03 $\pm$ 0,17
Cerveau ($\mu\text{g/g}$)	8	0,39 $\pm$ 0,03

Tableau XIX: Valeurs de sérotonine plasmatique trouvées dans la littérature chez des rats non traités (moyenne $\pm$ E.T.: $\mu\text{g/ml}$)

Sérotonine	Nombre de rats	Référence bibliographique
0,91 $\pm$ 0,08	5	Ross et coll. (1981)
1,17 $\pm$ 0,16		Mais et coll. (1981)
0,774 $\pm$ 0,019	30	Martin et Aldegunde (1989)
1,06 $\pm$ 0,75	11	Celada et coll. (1992)

Tableau XX: Valeurs de sérotonine de cerveau de rat non traité, trouvées dans la littérature (moyenne $\pm$ E.T.: $\mu\text{g/g}$)

Sérotonine	Nombre de rats	Référence bibliographique
0,48 $\pm$ 0,04	5	Growdon (1977)
0,455 $\pm$ 0,012	20	Ross et coll. (1981)
0,393 $\pm$ 0,02	6	Keshavan et coll. (1981)
0,411 $\pm$ 0,019	6	Berezsenyi et coll. (1983)
0,44 $\pm$ 0,01	6	Oka et coll. (1984)

2.1.2 5-HIAA

Les valeurs obtenues à partir de 8 rats non traités donnent les résultats suivants: $0,47 \pm 0,04$ $\mu\text{g/g}$. Cette moyenne est corroborée par d'autres auteurs (tableau XXI). Deux auteurs ont cependant obtenus des moyennes différentes (Ross et coll., 1981; Keshavan et coll., 1981).

Tableau XXI: Valeurs de 5-HIAA dans le cerveau de rat non traité, trouvées dans la littérature (moyenne $\pm$ E.T.: $\mu\text{g/g}$).

5-HIAA	Nombre de rats	Référence bibliographique
$0,50 \pm 0,01$	5	Fuller et coll. (1974)
$0,43 \pm 0,02$	5	Fuller et coll. (1974)
$0,36 \pm 0,008$	5	Fuller et coll. (1974)
$0,50 \pm 0,01$	6	Messing et coll. (1976)
$0,44 \pm 0,02$	5	Growdon (1977)
$0,799 \pm 0,06$	2	Keshavan et coll. (1981)
$0,284 \pm 0,006$	20	Ross et coll. (1981)
$0,41 \pm 0,02$	6	Berezensyi et coll. (1983)

2.2 SEROTONINE ET 5-HIAA

Dans le tableau XXII figurent les valeurs de sérotonine dans le sang (PRP) de rat à dose croissante de fluoxétine. Les concentrations plasmatiques de sérotonine décroissent significativement par rapport au groupe de contrôle (48 %), 3 heures après administration d'une dose unique de fluoxétine (10 ou 20 mg/kg). Nous n'avons pas observé de variations avec des doses plus faibles (2,5 ou 5 mg/kg).

Dans le cerveau (tableau XXII), les valeurs de sérotonine ne diffèrent pas significativement entre les 4 groupes de rats traités par fluoxétine et le groupe de

contrôle. La dose la plus faible de fluoxétine produisant une baisse significative de 5-HIAA est de 5 mg/kg.

La chute des concentrations de sérotonine plasmatique et 5-HIAA dans le cerveau est similaire après administration de fluoxétine ou norfluoxétine à 10 mg/kg. Au contraire, la baisse des concentrations de sérotonine dans le cerveau est significativement supérieure ($p < 0,05$) après traitement par norfluoxétine (10 mg/kg) que par fluoxétine (10 mg/kg).

Un prétraitement des rats par le proadifen (40 mg/kg) afin de bloquer le métabolisme de la fluoxétine n'a pas modifié les concentrations de sérotonine dans le plasma et cerveau après administration d'une dose unique de fluoxétine à 20 mg/kg. Seules les concentrations de 5-HIAA diffèrent significativement ($p < 0,05$).

Tableau XXII: Concentrations en sérotonine et 5-HIAA dans le sang et le cerveau de rat

DOSE (mg/kg)	n	5-HT (PRP) (mg/l)	CERVEAU	
			5-HT (µg/g)	5-HIAA (µg/g)
Contrôle	8	1,03 ± 0,17	0,39 ± 0,03	0,47 ± 0,04
FL (2.5)	5	1,04 ± 0,08	0,36 ± 0,01	0,45 ± 0,03
FL (5)	5	0,93 ± 0,10	0,40 ± 0,03	0,41 ± 0,02 *
FL (10)	6	0,54 ± 0,04 *	0,38 ± 0,03	0,36 ± 0,03 *
FL (20)	5	0,51 ± 0,02 *	0,36 ± 0,04	0,28 ± 0,04 *
Proadifen (40) + FL (20)	5	0,46 ± 0,02 *	0,34 ± 0,01 *	0,33 ± 0,02 *
NFL (10)	6	0,56 ± 0,09 *	0,34 ± 0,02 *	0,34 ± 0,01 *

n = nombre de rats; * $p < 0.05$ versus groupe de contrôle
Analyse statistique réalisée avec le test PLSD de Fisher.

2.3 NORFLUOXETINE ET FLUOXETINE

2.3.1 Sang

Les résultats obtenus dans le sang après administration en i.p. de fluoxétine ou norfluoxétine sont répertoriés dans le tableau XXIII (n = nombre de rats).

Tableau XXIII : Concentrations en NFL et FL obtenus dans le sang de rat

DOSE (mg/kg)	n	PLASMA (µg / l)				
		NFL	FL	NFL + FL	NFL / FL	% NFL
FL (2.5)	5	31,0 ± 4,5	11 ± 1,2	44,0 ± 2,1	2,84 ± 0,47	0,70 ± 0,09
FL (5)	5	65,4 ± 3,05	38,8 ± 1,6	104,2 ± 4,4	1,69 ± 0,05	0,63 ± 0,01
FL (10)	6	170,8 ± 14,8	123,7 ± 19,0	294,5 ± 30,0	1,40 ± 0,18	0,58 ± 0,03
FL (20)	5	228,8 ± 13,3	384,2 ± 28,6	613,0 ± 37,3	0,60 ± 0,04	0,37 ± 0,01
Proadifen (40) + FL (20)	5	118,8 ± 12,6	549,4 ± 23,6	668,2 ± 25,8	0,21 ± 0,03	0,18 ± 0,02
NFL (10)	6	280,5 ± 12,1				

Nous observons que les concentrations de fluoxétine augmentent linéairement avec la dose ($y = 21,763x - 66,01$; $r^2 = 0,969$). La droite de régression obtenue est visualisée sur la figure 46. Les concentrations de norfluoxétine suivent une courbe exponentielle suivant la dose administrée ($y = 101,144\ln x - 73,270$; $r^2 = 0,952$) (figure 47).

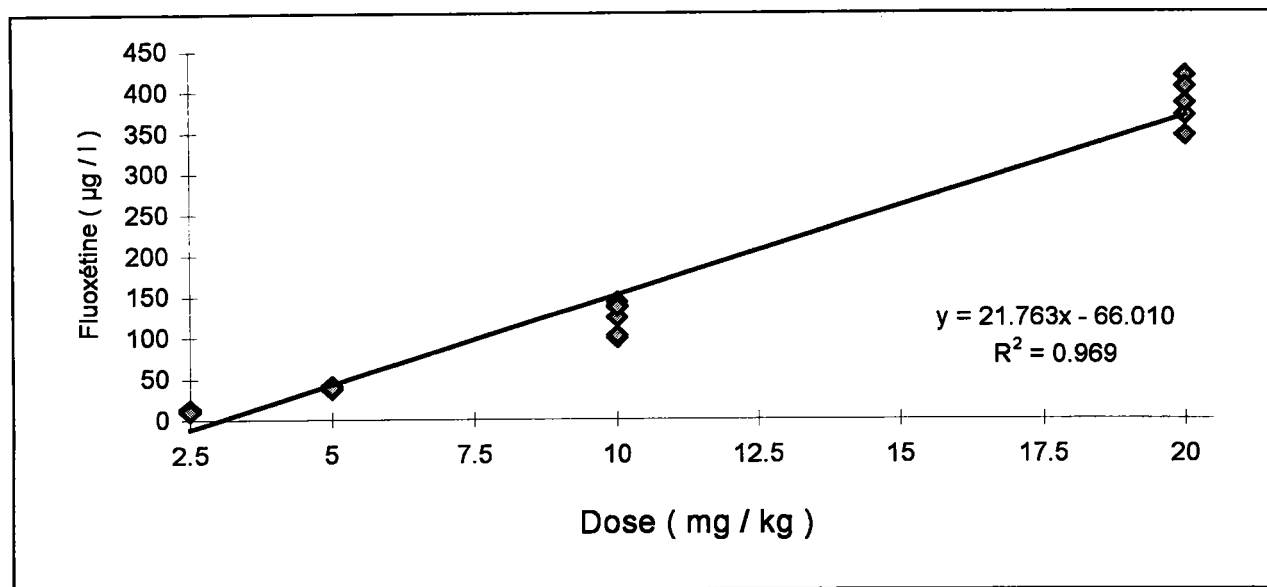


Figure 46: Corrélation de la fluoxétine dans le sang avec la dose administrée.

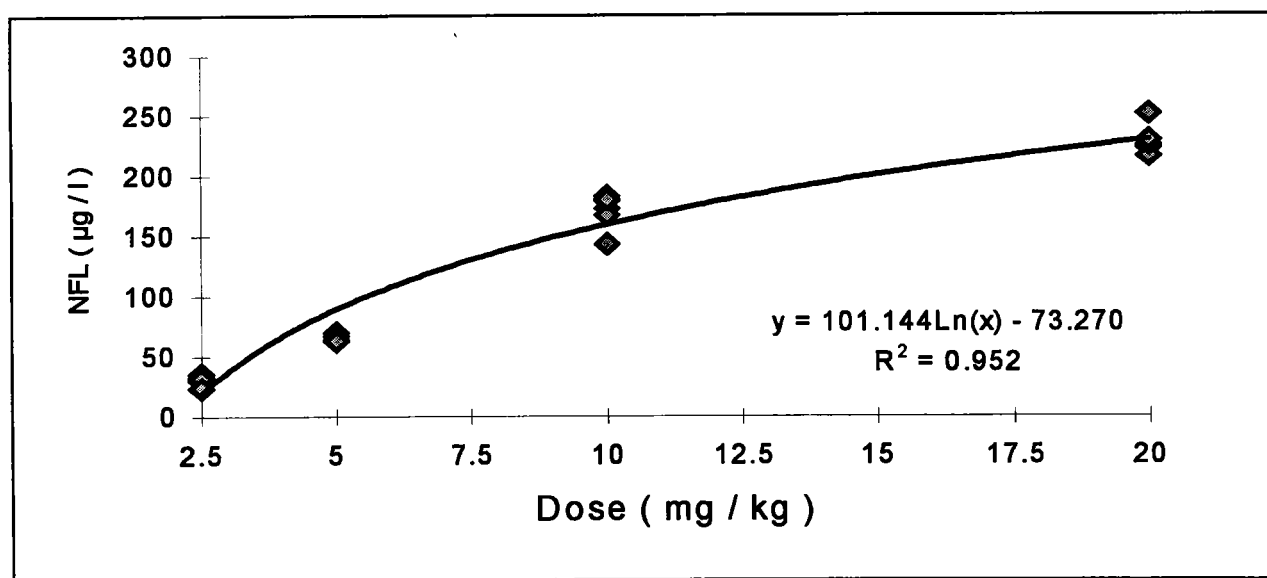


Figure 47: Corrélation de la norfluoxétine dans le sang avec la dose administrée.

Le rapport NFL / FL décroît avec l'augmentation de la dose en fluoxétine. Les concentrations de norfluoxétine après administration de norfluoxétine à 10 mg/kg ne diffèrent pas significativement de la somme NFL + FL obtenue après une dose unique de fluoxétine à 10 mg/kg.

2.3.2 Cerveau

Les résultats obtenus dans le cerveau après administration en i.p. de fluoxétine ou norfluoxétine sont répertoriés dans le tableau XXIV (n = nombre de rats).

Tableau XXIV : Concentrations en NFL et FL obtenus dans le cerveau de rat

DOSE (mg/kg)	n	CERVEAU (µg / g)				
		NFL	FL	NFL + FL	NFL / FL	% NFL
FL (2.5)	5	2,80 ± 0,16	1,18 ± 0,15	3,98 ± 0,30	2,32 ± 0,16	0,71 ± 0,03
FL (5)	5	5,38 ± 0,33	3,62 ± 0,47	9,00 ± 0,60	1,48 ± 0,16	0,60 ± 0,03
FL (10)	6	9,52 ± 0,52	10,77 ± 0,73	20,29 ± 0,86	0,88 ± 0,07	0,47 ± 0,02
FL (20)	5	11,24 ± 0,75	23,08 ± 0,93	34,32 ± 1,64	0,49 ± 0,02	0,33 ± 0,01
Proadifen (40) + FL (20)	5	4,30 ± 0,35	26,76 ± 1,65	31,06 ± 1,48	0,16 ± 0,02	0,14 ± 0,02
NFL (10)	6	24,63 ± 0,95				

Comme dans le plasma, les concentrations de fluoxétine augmentent linéairement avec la dose: ($y = 1,269x - 2,221$; $r^2 = 0,994$). La droite de régression obtenue est visualisée sur la figure 48.

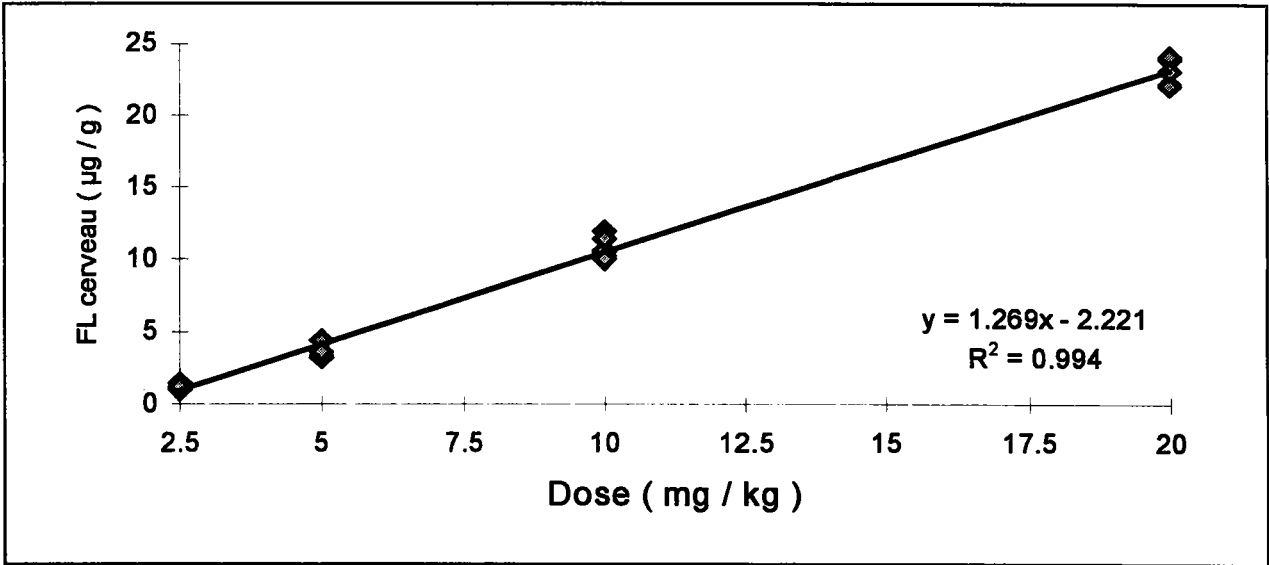


Figure 48: Corrélation de la fluoxétine dans le cerveau avec la dose administrée.

Comme dans le plasma, les concentrations de norfluoxétine suivent une courbe exponentielle avec la dose: ($y = 4,272\text{Ln } x - 1,083$; $r^2 = 0.958$). La courbe de croissance obtenue est visualisée sur la figure 49.

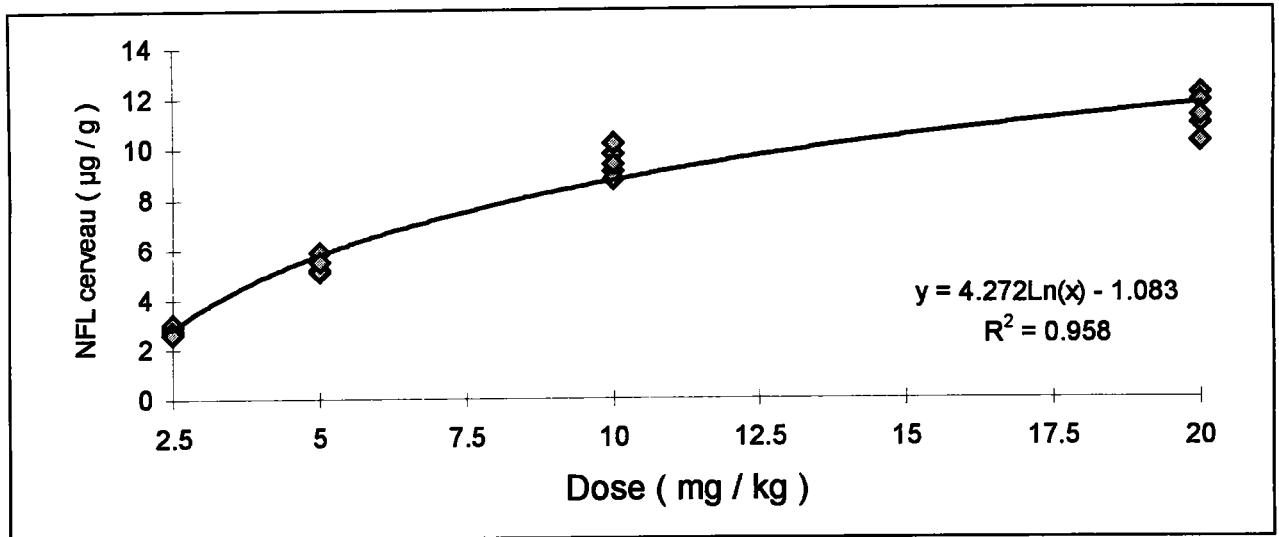


Figure 49: Corrélation de la norfluoxétine dans le cerveau avec la dose administrée.

Les concentrations de norfluoxétine après administration de norfluoxétine à 10 mg/kg diffèrent significativement de la somme NFL + FL obtenue après une dose unique de fluoxétine à 10 mg/kg (test de Student $p < 0,0001$).

2.3.3 Prétraitement par le proadifen

Après traitement des rats par le proadifen, la somme NFL + FL diffère significativement ($p < 0,05$) dans le plasma et le cerveau en comparaison des valeurs obtenues après administration unique de fluoxétine à 20 mg/kg. Cependant, les rapports NFL / FL et les pourcentages de norfluoxétine dans le plasma et le cerveau ne diffèrent pas significativement (tableaux XXIII et XXIV).

2.3.4 Corrélation sang - cerveau

Nous obtenons des droites de régression d'une part entre les concentrations de fluoxétine dans le sang et le cerveau (figure 50) ($y = 0,056x + 1,883$; $r^2 = 0,962$),

d'autre part entre les concentrations de norfluoxétine dans le sang et le cerveau (figure 51) ($y = 0,041x + 2,144$; $r^2 = 0,957$).

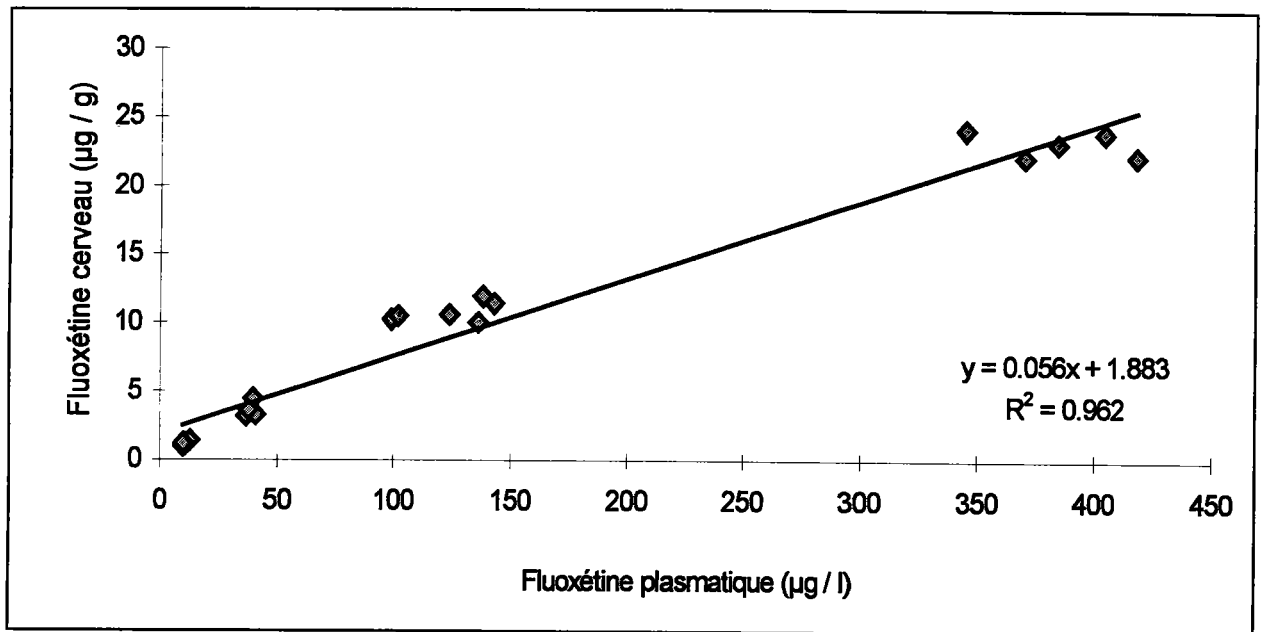


Figure 50: Corrélation entre les concentrations de fluoxétine dans le sang et le cerveau

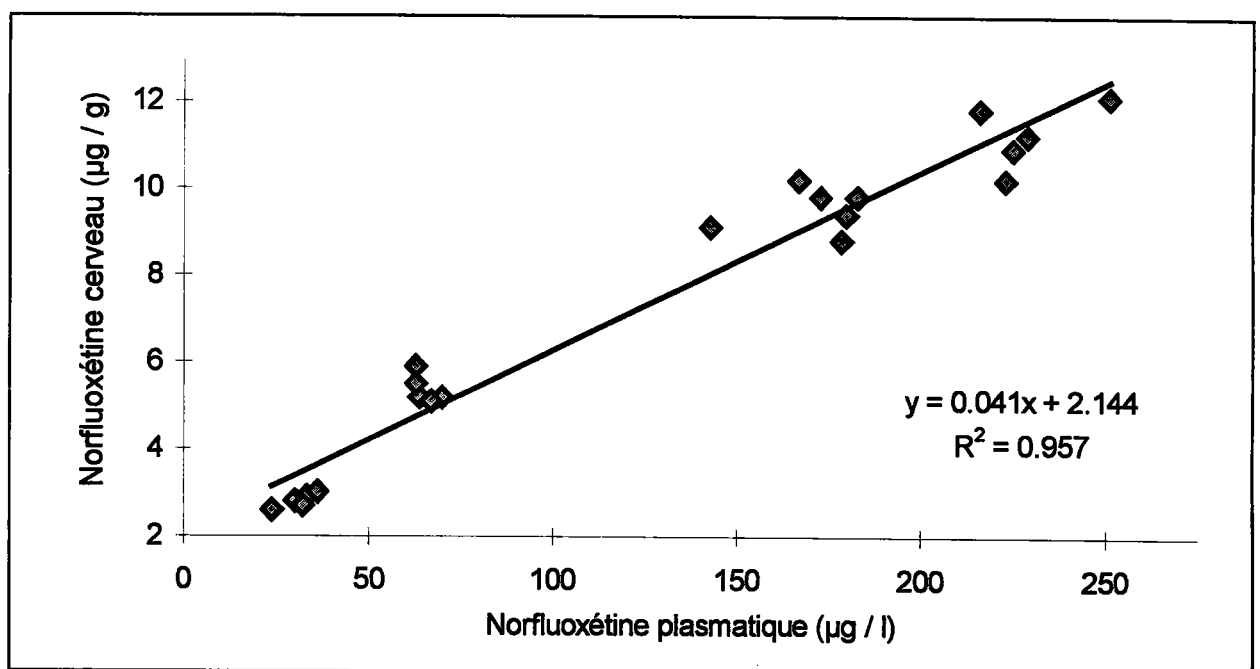


Figure 51: Corrélation entre les concentrations de norfluoxétine dans le sang et le cerveau

3. DISCUSSION

Des études antérieures (Caccia et coll., 1990; Trouvin et coll., 1993) ont montré qu'il était préférable pour le rat de ne pas injecter plus de 20 mg/kg de fluoxétine. Au delà de cette dose les animaux souffraient ou décédaient assez rapidement. Nous avons donc choisi de ne pas dépasser le seuil de 20 mg/kg. Par ailleurs, la grande majorité des auteurs administraient le médicament en i.p.; nous avons donc procédé de cette manière.

Concernant la durée entre l'injection et la décapitation, nous nous sommes basés sur d'autres études, où des cinétiques et des administrations réalisées en mode chronique et unique ont permis de montrer que le maximum d'effet était obtenu après 2-4 heures pour la fluoxétine à 10 mg/kg (Fuller et coll., 1974; Wong et coll., 1974; Ross et Renyi, 1977; Caccia et coll., 1990; Fuller et Snoddy, 1991). Nous avons donc décapités les rats 3 heures après l'injection.

La fluoxétine inhibe le transporteur de capture de la sérotonine dans les plaquettes sanguines. Etant donné que les plaquettes reçoivent la sérotonine par capture et non par synthèse, l'inhibition prolongée du transporteur de capture entraîne une déplétion de la sérotonine dans les plaquettes (Fuller et Wong, 1987).

Le tableau XXII montre les concentrations de sérotonine dans le sang et le cerveau de rat. Une diminution notable et dose - dépendante de sérotonine dans les plaquettes à partir de 10 mg/kg est le résultat de l'inhibition du transporteur de capture de la sérotonine dans les plaquettes. Cependant, si une seule injection de fluoxétine à différentes doses ne provoque aucun changement de concentration en sérotonine dans le cerveau total du rat, elle provoque une diminution de 5-HIAA (Fuller et coll., 1975; Ross et Renyi, 1977; Ross et coll., 1981). La baisse de 5-HIAA sans changement de sérotonine après traitement par la fluoxétine suggère que le turn-over de la sérotonine est diminué par la fluoxétine (Fuller et coll., 1974). De plus, le fait que les concentrations de sérotonine dans le cerveau n'aient pas été modifiées par des doses croissantes de fluoxétine, semble indiquer que la baisse de synthèse de sérotonine induite par la fluoxétine ou la norfluoxétine est équivalente à la baisse de relargage de sérotonine.

Ainsi la fluoxétine entraîne une diminution de cette vitesse de renouvellement dans le cerveau de rat telle qu'elle peut être mesurée par la diminution des

concentrations de 5-HIAA (Fuller et coll., 1974).

Les concentrations de sérotonine dans les plaquettes ont baissé de façon marquée aux mêmes doses que celles produisant une inhibition de recapture de sérotonine dans le cerveau (5-HIAA); ceci indique que l'inhibition de recapture de sérotonine dans les plaquettes et les neurones est affectée de façon similaire.

L'injection de norfluoxétine seule à 10 mg/kg ou le blocage hépatique par le proadifen avant l'injection de fluoxétine à 20 mg/kg modifient sensiblement de la même manière les valeurs de sérotonine dans les plaquettes ou le cerveau. Ainsi la norfluoxétine ou la formation de norfluoxétine ne modifie pas la puissance ou la spécificité mais prolonge la durée d'inhibition de sérotonine du fait de la demi-vie plus importante de la norfluoxétine (plus de 15 h pour la norfluoxétine contre plus de 5 h pour la fluoxétine) (Caccia et coll., 1990).

Les concentrations en fonction de la dose de fluoxétine donnent une droite de régression dans le sang et cerveau et une courbe de croissance en fonction de la dose pour la norfluoxétine. Ces corrélations indiquent que le médicament est rapidement transformé par le foie. Cependant les valeurs de norfluoxétine après injection de fluoxétine à 20 mg/kg montrent un léger phénomène de saturation du métabolisme ce qui explique la progression exponentielle de la concentration en fonction de la dose. C'est certainement dû à ce que l'on désigne par le terme d'effet de « premier passage hépatique ». Les baisses similaires des rapports (R) NFL / FL dans le sang et cerveau à des doses croissantes s'expliquent par une saturation concomitante de la clairance hépatique.

Les figures 50 et 51 montrent de bonnes corrélations entre les concentrations plasmatiques et dans le cerveau, tant pour la fluoxétine (0,962) que pour la norfluoxétine (0,957). La fluoxétine et norfluoxétine comme tous les médicaments du SNC passent très bien la barrière hémato-encéphalique en raison de leur lipophilie.

Pour des doses croissantes de fluoxétine, nous observons une diminution du rapport (R) dans le sang et cerveau. Une saturation transitoire du métabolisme lors de la première dose apparaît comme l'explication la plus probable; d'où des concentrations plus faibles en NFL à haute dose en FL (20 mg/kg). L'expérience avec le Proadifen montre bien le blocage métabolique induit par ce composé (R = 0,21 au lieu de R = 0,60 dans le sang et R = 0,16 au lieu de R = 0,49 dans le cerveau).

CHAPITRE II: EFFET "CURATIF" DE LA FLUOXETINE SUR LA DEPRESSION DANS LE TEST DU STIMULUS LUMINEUX AVERSIF INEVITABLE CHEZ LE RAT MALE WISTAR.

L'étude de l'effet curatif de la fluoxétine sur la dépression dans le test du stimulus aversif inévitable chez le rat a consisté en une succession de deux expériences.

Nous avons étudié

- dans un premier temps, le déficit comportemental et la déplétion sérotoninergique dans le test d'évitement d'un stimulus lumineux aversif en fonction de la contrôlabilité de l'agent stressant
- dans un deuxième temps, l'effet de la fluoxétine sur le comportement de résignation et les taux de sérotonine et 5-HIAA des rats soumis à un stimulus lumineux aversif inévitable.

1. PROTOCOLE

1.1 ANIMAUX

38 rats mâles albinos (22 rats pour la première expérience et 16 rats pour la deuxième expérience) de la souche Wistar (Iffa Credo, France), pesant 280 à 300 g sont maintenus par groupes de 4 par cage dans une animalerie climatisée, adjacente à la pièce de test, à une température de 22-24 °C, avec nourriture et boisson *ad libitum*. le cycle lumineux est de 12 heures (lumière de 02 h à 14 h).

1.2 MATERIEL

1.2.1 Dispositif TESLA

Le dispositif TESLA (Test d'Evitement de Stimulus Lumineux Aversif) a été mis au point par ETAP - Ethologie appliquée en collaboration avec le laboratoire de Biologie et de Physiologie du Comportement (U.R.A CNRS 1293, Nancy). Ce dispositif est composé d'un micro-ordinateur de contrôle capable de gérer simultanément six unités de conditionnement opérant. Il a été conçu pour des applications dans les domaines de la neuropharmacologie et de la psychopharmacologie: activité, dépression et mémoire - apprentissage.

Au court du test, l'animal apprend à obtenir des périodes d'obscurité en guise de renforcement, en appuyant sur l'un des leviers du dispositif. La mise en jeu de cette motivation ne nécessite aucune manipulation préalable de l'animal. L'utilisation de la lumière comme stimulus aversif et de périodes d'obscurité comme renforcement élimine les problèmes éthiques, et limite les perturbations physiologiques et comportementales rencontrées avec les systèmes utilisant des renforcements alimentaires ou traumatisants tels que les chocs électriques. Le choix des matériaux et l'absence de contraintes, entre le compartiment expérimental et le reste du dispositif, permettent une manipulation et un nettoyage rapides et très faciles.

1.2.2 Description technique de TESLA

1.2.2.1 Unités d'expérimentation

Chaque unité se compose d'un compartiment placé dans une enceinte individuelle. Ce choix présente de nombreux avantages:

- il garantit l'assurance d'un environnement expérimental individuel optimum
- la détection des appuis sur les leviers est assurée par un capteur magnétique (absence de connections électriques entre le compartiment d'expérimentation et l'enceinte extérieure)
- la mise en place de l'animal dans le dispositif est facilitée par une large ouverture frontale, transparente ou opaque en fonction du type d'observation réalisée
- le compartiment d'expérimentation se nettoie sans contrainte
- le tiroir amovible du compartiment d'expérimentation permet un changement rapide de la litière.

1.2.2.2 Système de contrôle

Une batterie de test comprend un micro-ordinateur de contrôle et d'enregistrement des résultats auquel peuvent être connectées de 2 à 6 unités d'expérimentation

Chaque unité expérimentale comporte un système électronique qui permet la détection des appuis et de contrôle de la puissance lumineuse utilisée (7 niveaux de stimulus lumineux aversifs peuvent être sélectionnés)

La liaison entre les différentes unités expérimentales se fait par un simple câble de liaison.

1.2.2.3 Logiciel de gestion des études

Le logiciel TESLA dispose d'une interface graphique et a été conçu de manière à assurer la gestion complète et autonome des expérimentations:

- définition des groupes (choix du nombre de groupes et répartition des animaux dans ces groupes)
- définition des paramètres de l'étude (nombre et durée des sessions, durée des périodes d'obscurité, échantillonnage des enregistrements des données, affectation des fonctions des leviers...)
- création de fichiers de résultats directement exploitables
- génération automatique d'un fichier journal de toutes les variables enregistrées.

1.2.3 Matériel

Le dispositif expérimental utilisé (TESLA) est constitué d'une cage isolée (50 x 40 x 37 cm), fortement éclairée (1200 lux) et comportant 2 leviers:

- l'un actif permettant d'obtenir 30 secondes d'obscurité lorsqu'il est actionné
- l'autre est inactif.

Les appuis sur le levier actif pendant la période d'obscurité, ne procurent pas de périodes d'obscurité supplémentaires.

Le dispositif analytique est identique à celui utilisé lors de l'expérimentation précédente.

2. ANALYSES STATISTIQUES

Le test de Wilcoxon a été utilisé dans le test d'évitement d'un stimulus lumineux aversif pour comparer les scores des rats entre les sessions des différents tests.

Le test de Mann-Whitney a été utilisé dans les analyses biochimiques pour comparer les concentrations de sérotonine dans les cerveaux et les plaquettes sanguines des rats des différents groupes.

Les résultats comportementaux et biochimiques ont été exprimés sous forme de médiane avec les valeurs des quartiles supérieur et inférieur.

3. DEFICIT COMPORTEMENTAL ET DEPLETION SÉROTONINERGIQUE

3.1 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Vingt deux rats mâles sont répartis au hasard dans trois groupes différents:

Groupe A (n = 6)

Groupe B (n = 8)

Groupe C (n = 8)

La familiarisation au dispositif expérimental se déroule sur deux jours successifs (tests 1 et 2) durant les premières heures de la phase d'obscurité (de 14 à 18 heures), période où les rats sont le plus actifs.

Lors de ces deux premières sessions de test (tests 1 et 2), le rat est placé dans le dispositif pendant une période de 20 minutes et dispose d'un levier actif (LA) et d'un levier inactif (LI) pour apprendre à contrôler son environnement lumineux. Les rats des trois groupes A, B et C subissent ces deux premières sessions de test.

Deux heures après la fin du test 2, les six rats du groupe A sont sacrifiés en vue des dosages biochimiques de la sérotonine et de son métabolite dans les cerveaux et de la sérotonine dans les plaquettes sanguines.

Lors des deux sessions suivantes (tests 3 et 4), chaque rat du groupe B est replacé dans le dispositif pendant une période de 20 minutes avec les deux leviers inactifs. Le stimulus lumineux aversif est rendu inévitable.

Deux heures après la fin du test 4, six rats du groupe B tirés au hasard sont sacrifiés en vue des dosages biochimiques de la sérotonine et de son métabolite dans les cerveaux et de la sérotonine dans les plaquettes sanguines.

Lors des tests 3 et 4, chaque rat du groupe C est remplacé dans le dispositif dans les mêmes conditions que lors des deux premiers tests, avec la possibilité d'éviter le stimulus lumineux aversif.

Deux heures après la fin du test 4, six rats du groupe C tirés au hasard sont sacrifiés en vue des dosages biochimiques de la sérotonine et de son métabolite dans les cerveaux et de la sérotonine dans les plaquettes sanguines. Ce dispositif expérimental est schématisé dans le tableau XXV.

Les variables enregistrées sont le nombre d'appuis sur le levier actif et le nombre d'appuis sur le levier inactif.

Tableau XXV: Schématisation du protocole expérimental utilisé lors du test de dépression

Groupe	n	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4
A	6	LA - LI	LA - LI		
B	8	LA - LI	LA - LI	LI - LI	LI - LI
C	8	LA - LI	LA - LI	LA - LI	LA - LI

3.2 RESULTATS

3.2.1 Test d'évitement du stimulus lumineux aversif

Groupe B.

L'évolution des nombres d'appuis sur les leviers actif et inactif des rats du groupe B, ayant subi des sessions d'apprentissage (tests 1 et 2: levier actif et levier inactif) suivies de deux sessions de résignation (tests 3 et 4: deux leviers inactifs) est étudiée entre les tests 2 et 4.

Les nombres d'appuis sur les leviers actif et inactif diminuent significativement pour les périodes 0 - 10, 0 - 15, et 0 - 20 minutes entre les tests 2 et 4 (tableau XXVI).

Lorsqu'on considère la somme des appuis sur les leviers actif et inactif, le test de Wilcoxon révèle une diminution significative des appuis totaux entre les tests 2 et 4 dès les 5 premières minutes de test (tableau XXVI).

Groupe C.

L'évolution des nombres d'appuis sur les leviers actif et inactif des rats du groupe C, ayant subi deux premières sessions d'apprentissage (tests 1 et 2: levier actif et levier inactif) suivies de deux sessions d'apprentissage supplémentaires (tests 3 et 4: levier actif et levier inactif) est étudiée entre les tests 2 et 4.

Alors que le nombre d'appuis sur le levier actif reste stable entre les tests 2 et 4, le nombre d'appuis sur le levier inactif diminue de manière significative dans les périodes 0 - 15 et 0 - 20 minutes de test (tableau XXVII). Le nombre total des appuis sur les leviers actif et inactif ne diminue significativement que dans la période 0 - 20 minutes de test (tableau XXVII).

Tableau XXVI: Nombre de leviers actif et inactif dans les tests 2 et 4
(Groupe B: $n = 8$)

		Appuis Levier Actif (LA)	Appuis Levier Inactif (LI)	Somme des appuis (LA + LI)
0 - 5 minutes	Test 2	8 (8 - 9,5)	7 (5 - 8,5)	15 (13,5 - 18,5)
	Test 4	5,5 (3 - 9)	4,5 (3 - 7,5)	9,5 (6,5 - 17,5)
	Test de Wilcoxon	$z = 1,61$ N.S.	$z = 1,84$ N.S.	$z = 1,96$ $p < 0,05$
0 - 10 minutes	Test 2	15 (13 - 17,5)	11 (8 - 16)	28,5 (21,5 - 30,5)
	Test 4	9,0 (5,5 - 14,5)	5,5 (7 - 10)	13,5 (10,5 - 24,5)
	Test de Wilcoxon	$z = 1,97$ $p < 0,05$	$z = 2,25$ $p < 0,03$	$z = 2,20$ $p < 0,03$
0 - 15 minutes	Test 2	19 (17 - 27)	13,5 (11,5 - 19,5)	35 (26,5 - 44,5)
	Test 4	11,5 (8,5 - 19,5)	8 (6,5 - 12,5)	18 (15 - 32)
	Test de Wilcoxon	$z = 2,39$ $p < 0,02$	$z = 2,11$ $p < 0,04$	$z = 2,38$ $p < 0,02$
0 - 20 minutes	Test 2	24,5 (22 - 30,5)	16 (13,5 - 20,5)	40 (34 - 52)
	Test 4	14,5 (11,5 - 21)	9,5 (8 - 14,5)	22,5 (19,5 - 34)
	Test de Wilcoxon	$z = 2,53$ $p < 0,02$	$z = 2,32$ $p < 0,03$	$z = 2,52$ $p < 0,02$

Médianes (écarts interquartiles)

Tableau XXVII: Nombre de leviers actif et inactif dans les tests 2 et 4
(Groupe C: $n = 8$)

		Appuis Levier Actif (LA)	Appuis Levier Inactif (LI)	Somme des appuis (LA + LI)
0 - 5 minutes	Test 2	8 (8 - 9)	8 (4 - 11)	14,5 (11 - 19,5)
	Test 4	6,5 (3 - 8)	4,5 (3 - 6,5)	9,5 (8 - 13,5)
	Test de Wilcoxon	$z = 0,14$ N.S.	$z = 1,61$ N.S.	$z = 1,75$ N.S.
0 - 10 minutes	Test 2	12,5 (9,5 - 16,5)	12 (7 - 15,5)	24 (18 - 33,5)
	Test 4	12,5 (6 - 14,5)	7,5 (6 - 9)	19,5 (13,5 - 22,5)
	Test de Wilcoxon	$z = 0,59$ N.S.	$z = 1,69$ N.S.	$z = 1,68$ N.S.
0 - 15 minutes	Test 2	17 (12,5 - 22,5)	16 (8 - 23)	31,5 (24,5 - 43)
	Test 4	16,5 (8,5 - 18)	10 (7,5 - 13)	25,5 (17 - 31,5)
	Test de Wilcoxon	$z = 0,85$ N.S.	$z = 2,37$ $p < 0,02$	$z = 1,54$ N.S.
0 - 20 minutes	Test 2	23 (14,5 - 30)	19,5 (13 - 25,5)	39,5 (32,5 - 53,5)
	Test 4	20 (11 - 22,5)	13 (10,5 - 15,5)	32,5 (122 - 39)
	Test de Wilcoxon	$z = 1,33$ N.S.	$z = 2,54$ $p < 0,02$	$z = 2,03$ $p < 0,05$

Médianes (écarts interquartiles)

3.2.2 Dosages biochimiques de la sérotonine

Les concentrations de sérotonine dans les cerveaux des rats du groupe B, ayant subi deux sessions d'apprentissage, où le stimulus lumineux est évitable, suivies de deux sessions de résignation, où le stimulus est rendu inévitable, sont significativement inférieures à celles des rats du groupe A qui ont subi deux sessions d'apprentissage, où le stimulus lumineux est évitable et à ceux du groupe C qui ont subi quatre sessions d'apprentissage successives, où le stimulus lumineux est évitable (tableau XXVIII).

Les concentrations de sérotonine plaquettaire ne diffèrent pas de manière significative entre les trois groupes de rats (tableau XXVIII).

Tableau XXVIII: Concentrations de sérotonine dans les cerveaux et plaquettes des rats

	Cerveau ($\mu\text{g} / \text{g}$)	P.R.P. (mg / l)
Groupe A	0,45 (0,40 - 0,48)	1,03 (0,92 - 1,12)
Groupe B	0,34 (0,28 - 0,41)	0,85 (0,82 - 1,37)
Groupe C	0,47 (0,45 - 0,54)	1,18 (1,09 - 1,40)
Groupe A <i>versus</i> Groupe B <i>Test de Mann-Whitney</i>	$z = 2,08$ $p = 0.03$	$z = 0,80$ N.S.
Groupe A <i>versus</i> Groupe C <i>Test de Mann-Whitney</i>	$z = 1,16$ N.S.	$z = 1,80$ N.S.
Groupe B <i>versus</i> Groupe C <i>Test de Mann-Whitney</i>	$z = 2,97$ $p = 0.003$	$z = 1,42$ N.S.

Médianes (écarts interquartiles)

3.2.3 Discussion

L'évolution des nombres d'appuis sur les leviers actif et inactif des rats du groupe B, ayant subi deux sessions d'apprentissage (stimulus évitable) suivies de deux sessions de résignation (stimulus inévitable) est étudiée entre les tests 2 et 4.

Les nombres d'appuis sur les leviers actif et inactif de ces rats diminuent significativement pour les périodes 0-10, 0-15 et 0-20 minutes de test. Devant l'absence de renforcement positif, sous forme de périodes d'obscurité, les rats du groupe B appuient de moins en moins sur les leviers et se résignent progressivement à subir passivement le stimulus lumineux aversif en s'immobilisant dans un coin de la cage. Les rats possèdent des cycles irréguliers d'activité, et afin d'obtenir une cinétique de comportement, nous avons adopté une méthode de temps cumulé (0-5, 0-10, 0-15 et 0-20 minutes) pour mesurer le nombre de leviers actif et inactif entre deux tests. En effet les rats peuvent avoir une forte activité durant 5 minutes puis se résigner durant 10 minutes et reprendre une activité durant les 5 dernières minutes.

A l'opposé les nombres d'appuis sur les leviers actif et inactif des rats du groupe C, ayant subi quatre sessions d'apprentissage évoluent différemment entre les tests 2 et 4. Alors que le nombre d'appuis sur le levier actif reste stable entre les tests 2 et 4, le nombre d'appuis sur le levier inactif diminue de manière significative dans les périodes 0-15 et 0-20 minutes de test. Les rats du groupe C renforcent leur apprentissage en appuyant préférentiellement de manière constante sur le levier actif et en diminuant progressivement les appuis inutiles sur le levier inactif. Ces rats ne montrent pas de résignation et continuent à exprimer une activité d'appuis efficace tout au long des sessions de test 2 et 4.

L'expérience correspondant aux rats du groupe C a été réalisée afin de démontrer que la répétabilité de la situation expérimentale n'influe pas sur le comportement des rats et sur les taux de sérotonine.

Dans le test d'évitement du stimulus lumineux aversif, les concentrations de sérotonine cérébrale varient de manière significative en fonction de la contrôlabilité ou de la non-contrôlabilité de la situation expérimentale. En effet, les valeurs de sérotonine dans les cerveaux des rats du groupe B, ayant subi deux sessions de test où il leur est impossible d'éviter le stimulus lumineux aversif, sont significativement

inférieures à celles des rats du groupe A qui ont subi deux sessions d'apprentissage et à ceux du groupe C qui ont subi quatre sessions d'apprentissage successives.

Les concentrations de sérotonine plaquettaire ne semblent pas sensibles à la situation expérimentale; en effet, on n'observe pas de différence significative entre les taux des trois groupes de rats.

Il serait intéressant d'utiliser cette situation expérimentale pour déprimer des rats afin de les traiter avec des produits à visée sérotoninergique (5-HT agonistes, inhibiteur de recapture de la 5-HT...) afin d'étudier une éventuelle récupération comportementale suite à la résignation exprimée par les rats.

4. EFFET DE LA FLUOXETINE SUR LE COMPORTEMENT DE RESIGNATION

4.1 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Seize rats mâles albinos sont répartis au hasard en deux groupes:

- Témoin (n = 8)
- Fluoxétine (n = 8).

La familiarisation au dispositif expérimental se déroule sur deux jours successifs (tests 1 et 2) durant les premières heures de la phase d'obscurité (de 14 à 18 heures), période où les rats sont le plus actifs.

Lors de ces deux premières sessions de test (tests 1 et 2), le rat est placé dans le dispositif pendant une période de 20 minutes et dispose d'un levier actif (LA) et d'un levier inactif (LI) pour apprendre à contrôler son environnement lumineux.

Lors des deux sessions suivantes (tests 3 et 4), chaque rat des deux groupes est replacé dans le dispositif pendant une période de 20 minutes avec les deux leviers inactifs afin de les déprimer.

Les rats sont ensuite quotidiennement traités pendant sept jours. Les rats témoins reçoivent une injection i.p. de solution saline (NaCl à 0,9 %) et les rats de

l'autre groupe une injection i.p. de fluoxétine dissous dans une solution NaCl (0,9 %) à la dose de 10 mg/kg .

Le lendemain de la fin du traitement, les rats sont de nouveau testés dans le test d'évitement du stimulus lumineux aversif avec les deux leviers inactifs (test 5).

Deux heures après la fin du test 5, les seize rats sont sacrifiés en vue des dosages biochimiques de:

- la sérotonine et de son métabolite, de la fluoxétine et norfluoxétine dans les cerveaux
- de la sérotonine plaquettaire et de la fluoxétine et norfluoxétine dans le plasma.

Ce dispositif expérimental est schématisé dans le tableau XXIX.

Les variables enregistrées sont le nombre d'appuis sur les deux leviers au cours des sessions 2 et 5.

Tableau XXIX: Schématisation du protocole expérimental utilisé lors du test de résignation

Groupe	n	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5
NaCl (0,9%)	6	LA - LI	LA - LI	LI - LI	LI - LI *	LI - LI
Fluoxétine (10 mg/kg)	8	LA - LI	LA - LI	LI - LI	LI - LI **	LI - LI

* Injection en i.p. d'une solution NaCl (0,9 %) durant 7 jours

** Injection en i.p. d'une solution de fluoxétine (10 mg/kg) durant 7 jours

4.2 RESULTATS

4.2.1 Test d'évitement du stimulus lumineux aversif

L'évolution des nombres d'appuis sur les leviers actif et inactif des rats des deux groupes est étudiée entre les tests 2 (stimulus évitable) et 5 (stimulus inévitable).

Les nombres d'appuis sur le levier actif des rats témoins diminuent significativement pour les périodes 0-10, 0-15 et 0-20 minutes entre les tests 2 et 5 (tableau XXX). Il en est de même du nombre d'appuis sur le levier inactif, mais la différence est significative dès les cinq premières du test (tableau XXXI).

Les nombres d'appuis sur les leviers actif et inactif des rats traités ne diminuent significativement qu'à partir de la période 0-15 minutes entre les tests 2 et 5 (tableaux XXX et XXXI).

L'évolution de la somme des appuis sur les leviers actif (LA) et inactif (LI) entre les tests 2 et 5 est visualisée par le tableau XXXII.

Tableau XXX: Evolution des appuis sur le levier actif (LA) entre les tests 2 et 5.

		Groupe témoin (n = 8)	Groupe fluoxétine (n = 8)
0 - 5 minutes	Test 2	9,5 (6,5 - 11,5)	8,5 (7,5 - 12)
	Test 5	7,5 (6,5 - 8,5)	7,5 (6 - 9)
	Test de Wilcoxon	z = 1,28 N.S.	z = 0,96 N.S.
0 - 10 minutes	Test 2	15,5 (12 - 17,5)	18 (14,5 - 20,5)
	Test 5	10,5 (8 - 12,5)	11,5 (9,5 - 18,5)
	Test de Wilcoxon	z = 2,40 $p < 0,02$	z = 1,78 N.S.
0 - 15 minutes	Test 2	21 (16,5 - 25)	27,5 (25 - 29,5)
	Test 5	13,5 (9 - 16,5)	15 (11 - 23,5)
	Test de Wilcoxon	z = 2,21 $p < 0,03$	z = 2,10 $p < 0,04$
0 - 20 minutes	Test 2	27 (22,5 - 39)	34 (30,5 - 40,5)
	Test 5	15 (9 - 20)	21,5 (11,5 - 28,5)
	Test de Wilcoxon	z = 2,52 $p < 0,02$	z = 2,38 $p < 0,02$

Médianes (écarts interquartiles)

Tableau XXXI: Evolution des appuis sur le levier inactif (LI) entre les tests 2 et 5.

		Groupe témoin (n = 8)	Groupe fluoxétine (n = 8)
0 - 5 minutes	Test 2	9 (6 - 12,5)	7 (6 - 8,5)
	Test 5	2,5 (1,5 - 6,5)	5 (2,5 - 7,5)
	Test de Wilcoxon	z = 2,31 p < 0,03	z = 1,68 N.S.
0 - 10 minutes	Test 2	13,5 (9,5 - 18,5)	11,5 (9,5 - 14)
	Test 5	4,5 (2,5 - 11)	8,5 (3 - 13,5)
	Test de Wilcoxon	z = 2,37 p < 0,02	z = 0,99 N.S.
0 - 15 minutes	Test 2	19 (11,5 - 22,5)	18,5 (14,5 - 22)
	Test 5	8 (3,5 - 14)	9,5 (3 - 15)
	Test de Wilcoxon	z = 2,52 p < 0,02	z = 2,11 p < 0,04
0 - 20 minutes	Test 2	21 (13,5 - 26,5)	23,5 (18,5 - 26,5)
	Test 5	12,5 (5,5 - 16)	9,5 (4 - 19)
	Test de Wilcoxon	z = 2,52 p < 0,02	z = 2,20 p < 0,03

Médianes (écarts interquartiles)

Tableau XXXII: Evolution de la somme des appuis sur le levier actif (LA) et levier inactif (LI) entre les tests 2 et 5.

		Groupe témoin (n = 8)	Groupe fluoxétine (n = 8)
0 - 5 minutes	Test 2	16,5 (14 - 24)	17 (14 - 19,5)
	Test 5	9,5 (8 - 15,5)	11,5 (10,5 - 16,5)
	Test de Wilcoxon	z = 2,38 p < 0,02	z = 1,90 N.S.
0 - 10 minutes	Test 2	27,5 (22,5 - 35)	30,5 (25 - 33,5)
	Test 5	16,5 (10,5 - 22,5)	22 (13 - 31)
	Test de Wilcoxon	z = 2,53 p < 0,02	z = 1,44 N.S.
0 - 15 minutes	Test 2	40,5 (30,5 - 49)	47 (39,5 - 52)
	Test 5	22,5 (12,5 - 30)	26 (14,5 - 37)
	Test de Wilcoxon	z = 2,52 p < 0,02	z = 2,24 p < 0,03
0 - 20 minutes	Test 2	49 (39 - 66,5)	54,5 (52 - 67)
	Test 5	28,5 (16 - 36)	32 (16 - 47)
	Test de Wilcoxon	z = 2,52 p < 0,02	z = 2,38 p < 0,02

Médianes (écarts interquartiles)

4.2.2 Dosages biochimiques

4.2.2.1 Conséquences du traitement fluoxétine pendant 7 jours

La comparaison des concentrations de sérotonine dans les cerveaux des rats témoins et traités ne montre pas de différence significative entre les deux groupes (tableau XXXIII).

La comparaison des concentrations de 5-HIAA dans les cerveaux des rats témoins et des rats traités montre une valeur significativement plus élevée chez les premiers (tableau XXXIII).

Il en est de même de la concentration de la sérotonine plaquettaire des rats témoins qui est significativement plus élevée que chez les rats traités (tableau XXXIII).

Tableau XXXIII: Concentrations cérébrales de sérotonine et 5-HIAA et sérotonine plaquettaire lors du test de comportement de résignation

	Témoin (n = 8)	Fluoxétine (n = 8)	Test de Mann- Whitney
Concentration de sérotonine dans le cerveau ($\mu\text{g} / \text{g}$)	0,34 (0,31 - 0,39)	0,34 (0,28 - 0,35)	$z = 0,96$ $N.S.$
Concentration de 5-HIAA dans le cerveau ($\mu\text{g} / \text{g}$)	0,41 (0,37 - 0,41)	0,30 (0,29 - 0,31)	$z = 3,34$ $p < 0,001$
Concentration de sérotonine dans les plaquettes (mg / l)	0,93 (0,74 - 1,15)	0,18 (0,14 - 0,24)	$z = 3,36$ $p < 0,001$

Médianes (écarts interquartile)

4.2.2.2 Résultats de fluoxétine et norfluoxétine

Les concentrations de fluoxétine et norfluoxétine des rats traités quotidiennement pendant sept jours par une injection i.p. de fluoxétine à la dose de 10 mg/kg sont visualisées dans le tableau XXXIV.

Tableau XXXIV: Concentrations de norfluoxétine et de fluoxétine lors du test de comportement de résignation

	Norfluoxétine	Fluoxétine
Concentrations plasmatiques ($\mu\text{g} / \text{l}$)	253 ± 24	154 ± 17
Concentrations dans le cerveau ($\mu\text{g} / \text{g}$)	$17,8 \pm 4,3$	$8,2 \pm 1,1$

4.2.3 Discussion

L'évolution des nombres d'appuis sur les leviers actif et inactif des rats des deux groupes est étudiée entre les tests 2 (stimulus évitable) et 5 (stimulus inévitable).

Les nombres d'appuis sur le levier actif des rats témoins diminuent significativement pour les périodes 0-10, 0-15 et 0-20 minutes entre les tests 2 et 5. Il en est de même du nombre d'appuis sur le levier inactif, mais la différence est significative dès les cinq premières minutes du test (période 0-5 minutes).

Les nombres d'appuis sur les leviers actif et inactif des rats traités ne diminuent significativement qu'à partir de la période 0-15 minutes entre les tests 2 et 5.

Les rats témoins se résignent donc significativement bien plus précocement que les rats traités à subir le stimulus lumineux aversif. Cependant cette résignation précoce des rats témoins ne peut être imputée à une différence en concentration de sérotonine cérébrale. En effet, la comparaison des concentrations de sérotonine dans les cerveaux des rats témoins et traités ne montre pas de différence significative entre les deux groupes. En revanche, la comparaison des concentrations de 5-HIAA dans les cerveaux des rats témoins et des rats traités montre une valeur significativement plus

élevée chez les premiers. Il en est de même de la concentration de sérotonine plaquettaire des rats témoins qui est significativement plus élevée que chez les rats traités.

Cette différence du métabolisme de la sérotonine pourrait s'expliquer par une réactivité plus forte des rats témoins quand la situation d'évitement devient incontrôlable. La fluoxétine permettrait aux rats de mieux s'adapter à une situation de stress incontrôlable, malgré l'absence de différence dans les taux de sérotonine cérébrale des rats témoins et traités. L'effet de la fluoxétine s'exprime par une résignation tardive des rats traités par rapport aux témoins.

Quelques études ont examiné l'effet d'une dose répétée de fluoxétine sur les concentrations de sérotonine et 5-HIAA dans le cerveau de rat. Hrdina (1984) a observé une baisse des concentrations de sérotonine et 5-HIAA dans le cerveau des rats après 21 jours de traitement par fluoxétine en i.p. à 10 mg/kg, alors que Hwang et coll. (1980) n'ont observé aucun changement dans les concentrations de sérotonine dans le cerveau de souris après 14 jours de traitement par fluoxétine. De même Caccia et coll. (1992) ont observé une baisse de sérotonine et 5-HIAA dans le cortex et hippocampe de rat après 7 et 21 jours de traitement par fluoxétine (15 mg/kg, i.p.), cette baisse persistant plus d'une semaine après la dernière dose. Trouvin et coll. (1993) ont étudié l'effet d'une dose répétée de fluoxétine (5, 10, 15 mg/kg, i.p.) deux fois par jour durant 21 jours sur la sérotonine et 5-HIAA dans différentes régions du cerveau (hypothalamus, hippocampe, pons medulla et cortex cérébral) sur des rats décapités 1 à 28 jours après la dernière dose. Le traitement chronique par fluoxétine a causé une chute de sérotonine dans le cerveau entre 10 et 50 % selon la région examinée, ceci 3 à 7 jours après la dernière dose à 5 ou 10 mg/kg et 7 à 14 jours pour une dose de 15 mg/kg ; les taux de 5-HIAA chutant de façon plus marquée encore (- 20 à - 60 %) selon la région étudiée. Les résultats de sérotonine et 5-HIAA dans le cerveau que nous avons obtenu sont similaires à ceux de l'étude avec une dose unique de fluoxétine (10 mg/kg). La diminution des concentrations de 5-HIAA sans modification des taux de sérotonine après administration de fluoxétine peut être ainsi attribuée à une diminution du turnover de la sérotonine après 7 jours de traitement. La diminution de la concentration plaquettaire en sérotonine est quant à elle bien supérieure lors du traitement répétitif (81 %) que lors d'une prise unique (48 %) par

rapport au groupe de contrôle. En effet, l'inhibition est prolongée d'un jour à l'autre du fait de la longue demi-vie de la norfluoxétine, renforçant ainsi l'action de la fluoxétine.

Lors d'un traitement chronique, Blier et coll. (1988) ont observé une hyperstimulation du récepteur présynaptique, c'est à dire l'autorécepteur 5-HT_{1B} ou 1D provoquant, avec le temps, une sous-sensibilité de cet autorécepteur ce qui rend le rétrocontrôle moins performant. L'agoniste endogène, la sérotonine, exerce moins son action de freinage et la libération de sérotonine augmente. Ils ont observé un recouvrement progressif de la décharge des neurones sérotoninergiques en dépit du maintien de l'inhibition de la recapture, ce recouvrement est complet après 14 jours de traitement et l'effet d'une stimulation électrique est même augmenté après ce délai: la transmission synaptique est donc augmentée.

Il semblerait que pour notre étude, un traitement d'une durée de 7 jours ne soit pas suffisant pour empêcher les rats de se résigner. Il est possible que les rats soient à un stade où leurs autorécepteurs 5-HT_{1A} finissent de se désensibiliser. En effet quand on bloque la recapture de la sérotonine, la fluoxétine agit sur tous ses récepteurs, notamment sur l'autorécepteur somato-dendritique 5-HT_{1A} porté par le corps cellulaire. Le seuil de concentration en sérotonine qui stimule ce récepteur est rapidement atteint; or, l'autorécepteur 5-HT_{1A} est inhibiteur de la transmission sérotoninergique. Sa stimulation bloque l'émission des potentiels d'action, de sorte que le neurone présynaptique ne libère plus de sérotonine dans la fente synaptique (Thiébot et Hamon, 1996). Ainsi, paradoxalement, au début de traitement, un inhibiteur de la recapture de la sérotonine bloque la libération de la sérotonine par le neurone présynaptique, et la concentration en sérotonine que l'on cherche à augmenter reste stable. L'état dépressif ne s'améliore pas. Heureusement, au bout de quelques jours, l'état s'améliore: Thiébot et Hamon (1996) ont montré que l'autorécepteur, trop stimulé, finit par être désensibilisé, c'est à dire qu'il faut des concentrations de plus en plus élevées en sérotonine pour l'activer. Son action s'estompe, les potentiels d'action recommencent à être réémis, la sérotonine est à nouveau libérée par le neurone présynaptique. Ce délai d'action semble compatible avec le laps de temps que met un tel antidépresseur à agir.

Un traitement supplémentaire d'une semaine augmenterait certainement le taux de sérotonine cérébrale et éviterait aux rats de se résigner même tardivement.

**CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES**

La fluoxétine, molécule originale issue de la recherche des Laboratoires Lilly offre aujourd'hui aux praticiens des possibilités nouvelles dans la thérapeutique antidépressive. Mise sur le marché en 1989 sous le nom de Prozac^R, la fluoxétine est aujourd'hui énormément prescrite tant par les psychiatres hospitaliers et de ville que par les médecins généralistes. La combinaison des profils d'efficacité, de tolérance et de sécurité d'emploi, autorise le positionnement de la fluoxétine comme une alternative de premier choix aux antidépresseurs tricycliques notamment dans le traitement ambulatoire des troubles de l'humeur.

Les résultats de ce travail peuvent être regroupés en trois points:

- développement analytique
- aspects cliniques
- expérimentation chez le Rat

Développement analytique

Nous avons réalisé des méthodologies complètes permettant des quantifications précises et fiables de certains neuromédiateurs et métabolites, ainsi que de la fluoxétine et de son métabolite dans différents milieux biologiques (sang et urine chez l'Homme, sang et cerveau chez le Rat). Si ces méthodes ont nécessité des investissements importants (pompes, détecteur UV et électrochimique, colonne différente pour chaque technique), les techniques une fois optimisées, sont quant à elles peu coûteuses.

• Sérotonine

La méthode, grâce à une double extraction liquide - liquide présente une excellente praticabilité depuis les six ans qu'elle est opérationnelle.

• Fluoxétine et norfluoxétine

Les qualités de la technique nous la font considérée comme une méthode

permettant de grandes séries de dosages. Le mode d'extraction utilisé permet également le dosage d'un grand nombre de psychotropes.

- **MHPG**

Le dosage du MHPG est plus délicat à réaliser de façon routinière car chaque dosage nécessite en réalité trois dosages différents (MHPG libre, sulfaté, total). La durée de son extraction, avec une longue hydrolyse pour les dérivés conjugués, ne permet pas de grandes séries d'analyses.

- **Cerveau de rat**

La caractéristique de ce dosage réside dans le dosage simultané de neuromédiateurs (sérotonine et 5-HIAA) et d'un médicament (fluoxétine et norfluoxétine).

Aspects cliniques

La caractéristique de l'étude clinique peut se résumer en plusieurs points:

- choix d'une population très ciblée et homogène (dépression la plus grave: patients atteints de mélancolie)
- examen des corrélations éventuelles entre un inhibiteur spécifique de la recapture de la sérotonine et la voie noradrénergique
- étude complète du MHPG libre et des différentes formes conjuguées dans le sang et dans les urines (la grande majorité des études dosent uniquement la forme libre ou la totalité du MHPG plasmatique)
- une analyse discriminante a étudié les différences entre deux ou plusieurs groupes en utilisant plusieurs variables simultanément, afin de prédire le groupe de chaque patient.

L'analyse des résultats de notre étude démontre une bonne efficacité de la fluoxétine (20 mg/jour) dans les dépressions endogènes.

Les dosages de MHPG libre et conjugué n'ont pas permis de détecter dans le sang et les urines un indice biologique permettant de poser un diagnostic avant traitement. Toutefois, le MHPG sulfaté urinaire, de part ses taux bas chez les patients non répondeurs, laisse à penser que cette diminution de l'excrétion urinaire proviendrait de la destruction de la noradrénaline au niveau cérébral et que la prescription d'un antidépresseur noradrénergique serait préférable pour ces patients.

Cependant, notre étude confirme qu'il est possible dans un nombre appréciable de cas, de prévoir l'évolution des patients atteints de mélancolie en utilisant différentes variables biologiques et psychiatriques avant traitement avec une dose quotidienne de 20 mg de chlorhydrate de fluoxétine. Cette prédiction, par l'intermédiaire d'une analyse discriminante n'est cependant pas facile à mettre en place de façon routinière.

Expérimentation sur le rat

Concernant les expériences sur le rat, la caractéristique de nos travaux peut se résumer en quatre points:

- rôle de la norfluoxétine dans l'inhibition de recapture de la sérotonine
- action de la fluoxétine non ou peu métabolisée après blocage de son métabolisme
- utilisation d'un test comportemental spécifique et peu stressant dans le domaine animal des modèles de dépression
- étude des corrélations éventuelles entre le phénomène de résignation comportementale avec différents dosages avant et après traitement par chlorhydrate de fluoxétine à 10 mg/kg

L'étude de doses croissantes de fluoxétine n'est pas très originale car de nombreux auteurs l'ont réalisé avant nous. Cependant elle était nécessaire à la détermination de la dose efficace provoquant une baisse de la sérotonine dans le sang et le cerveau.

Les résultats des expérimentations sur le rat tant à dose unique, que de façon chronique, montrent que la fluoxétine bloque la recapture neuronale de la sérotonine,

renforçant ainsi l'efficacité de la sérotonine libérée dans l'espace synaptique. La fluoxétine augmente ainsi la neurotransmission sérotoninergique.

Concernant l'étude comportementale, l'utilisation du dispositif TESLA et de la lumière comme stimulus aversif élimine les problèmes éthiques et limite les perturbations physiologiques et comportementales rencontrées avec les systèmes utilisant des renforcements alimentaires ou traumatisants tels que les chocs électriques. Ainsi, le test d'évitement d'un stimulus lumineux aversif semble prometteur vis à vis des tests comportementaux habituels.

Dans un avenir plus ou moins proche, d'autres molécules pourraient être commercialisées comme la paroxétine, la zimélidine ou la venlafaxine. Ces molécules ont un mécanisme d'action qui ressemble à celui de la fluoxétine et présenteraient elles aussi peu d'effets indésirables.

D'autre part, la mise au point de combinaisons de médicaments semble efficace et prometteuse. Ainsi l'association de la fluoxétine avec un inhibiteur de la recapture de la noradrénaline comme la désipramine a déjà donné une réponse plus rapide et efficace qu'en monothérapie.

De même l'association d'un inhibiteur de la recapture de la sérotonine et d'un antagoniste de l'autorécepteur 5-HT_{1A} a permis d'améliorer l'humeur des patients déprimés bien plus efficacement et plus rapidement que les traitements antidépresseurs inhibant uniquement la recapture de la sérotonine.

P U B L I C A T I O N



ELSEVIER

Journal of Chromatography B, 665 (1995) 45–51

JOURNAL OF
CHROMATOGRAPHY B:
BIOMEDICAL APPLICATIONS

Assay of urinary free and conjugated 3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol by high-performance liquid chromatography with amperometric detection

R. Bourdeaux^a, B. Capolaghi^{a,*}, C. Lacroix^b, C. Younos^c, P.R. Lehr^d

^a*Laboratoire de Biochimie, Centre Hospitalier Regional Thionville, 57100 Thionville France*

^b*Laboratoire de Pharmacocinétique, Centre Hospitalier, 76600 Le Havre, France*

^c*Centre des Sciences de l'Environnement, Université de Metz, 57000 Metz France*

^d*Laboratoire de Biologie et Physiologie du Comportement, URA CNRS 1293, Faculté des Sciences, Université de Nancy I, 54000 Nancy, France*

First received 14 July 1994; revised manuscript received 1 November 1994; accepted 1 November 1994

Abstract

The aim of this study was to develop an analytical method for free and conjugated 3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol (MHPG) in urine. After hydrolysis of the conjugated forms, the urinary MHPG was purified by solid-phase extraction on anion exchanger and eluted with a water-methanol (1:1, v/v) mixture. After addition of ethyl acetate to the eluate and back-extraction into acetic acid, the aqueous phase was separated on a C₁₈ column by HPLC and detected amperometrically. The results obtained from forty healthy human subjects were compared with the literature values. The precision and accuracy of the assay were studied using 4-methoxy-3-hydroxyphenylethyleneglycol (iso-MHPG) as internal standard.

1. Introduction

3 - Methoxy - 4 - hydroxyphenylethyleneglycol (MHPG), the main metabolite of brain norepinephrine is preferably measured in the urine [1]. It can also be evaluated in the cerebrospinal fluid and the plasma. In biological fluids, MHPG is present in the free and conjugated form. The sulfate conjugate is derived from the brain, whereas the glucuronide conjugate originates

from pools of norepinephrine outside the central nervous system [2–5].

Several reports concern mainly the urinary MHPG evaluation in patients with bipolar and unipolar affective disorders. Most of the data suggests that noradrenergic and serotonergic systems in the brain may be involved in the pathophysiology of depression. Reduction in neurotransmitter concentrations was postulated to be a determining factor in the etiology of depression. Furthermore these neurotransmitter systems have been implicated in the therapeutic actions of antidepressant drugs [6–8]. Many individual antidepressants block the reuptake of both norepinephrine and serotonin, thereby in-

* Corresponding author. Address for correspondence: Laboratoire de Biologie, Centre Hospitalier Regional Thionville, Hopital Bel-Air, B.P. 327, Thionville, France.

creasing the concentrations of these transmitters. The main objective of our study was to prove that from the quantities of urinary MHPG the response to antidepressant drugs could be predicted. In many reports, only the total MHPG (MHPG-T) was evaluated, whereas the sulfate MHPG (MHPG-S) seems to be a better indicator of the metabolism of brain norepinephrine. It was therefore essential to measure the free MHPG, the MHPG-S, the glucuronide MHPG (MHPG-G) and the MHPG-T. MHPG-G is obtained by subtraction of the free and MHPG-S from the MHPG-T.

Methods using only ethyl acetate for extraction are tedious because they require several washing steps [9–15]. Furthermore they are not very selective. Liquid–solid extraction methods are very easy to perform and require only small sample volumes. Therefore we developed a method for measuring the free and conjugated MHPG by HPLC and amperometric detection after solid-phase extraction on AG 1×4 (Biorad) resin and liquid–liquid extraction with ethyl acetate.

2. Experimental

2.1. Reagents

3-Methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol (MHPG), 4-methoxy-3-hydroxyphenylethyleneglycol (iso-MHPG), 3-hydroxy-4-methoxy-mandelic acid, lithium aluminum hydride, purified glucuronidase type VIII-A, β -glucuronidase type H-2S (glusulase) from *Helix pomatia*, arylsulfatase type VI from *Aerobacter aerogenes* were obtained from Sigma (St. Quentin Fallavier, France). All other reagents used were analytical grade. AG 1×4 resin (100–200 mesh) and the chromatography Econocolumn were purchased from BioRad (Ivry sur Seine, France).

2.2. Instrumentation

The liquid chromatographic-electrochemical detection system consisted of a Waters Model 510 pump (St. Quentin, France), a Superspher

100 RP18 reversed-phase column (4 μ m particle size, 250×4 mm I.D.) with a LiChrospher 100 RP18 (7 μ m particle size, 4×4 mm I.D.) precolumn (Merck, Nogent sur Marne, France), and an amperometric LC 4B detector with glassy carbon electrodes (Biochrom, Angoulême, France). The electrochemical detector was operated at +0.85 V versus a Ag/AgCl reference electrode.

A 0.05 M potassium dihydrogenophosphate buffer (pH 3.0) containing 2% acetonitrile was used as isocratic mobile phase. Elution of the compounds from the column was carried out at ambient temperature with a flow-rate of 1.0 ml/min. The resultant pressure was about 15.1 MPa.

2.3. Standard solutions

The internal standard 4-methoxy-3-hydroxyphenylethyleneglycol (iso-MHPG) was prepared from the 3-hydroxy-4-methoxy-mandelic acid by reduction of the acid function with lithium aluminum hydride according to the previously described method [12–16]. All standard solutions were prepared in a 0.05 M HCl solution containing sodium metabisulfite (0.5 g/l). From the stock solutions of MHPG (100 mg/l) and MHPG-S (100 mg/l), dilutions to 5 mg/l and 25 mg/l were prepared for the evaluation of free and conjugated MHPG respectively. The standard solutions were stable for more than six months at 4°C.

2.4. Urine samples

Before analysis, the 24-h urine samples, non acidified, were stored at –20°C after addition of a solution containing 1 g/l sodium metabisulfite in order to prevent oxidation of the catechol compounds. The creatinine concentration was evaluated in each urine sample by Jaffé's method without deproteinisation, using an Hitachi 704 analyser [17].

2.5. Extraction

The extraction procedures for the urine samples are shown in Fig. 1. For each extraction

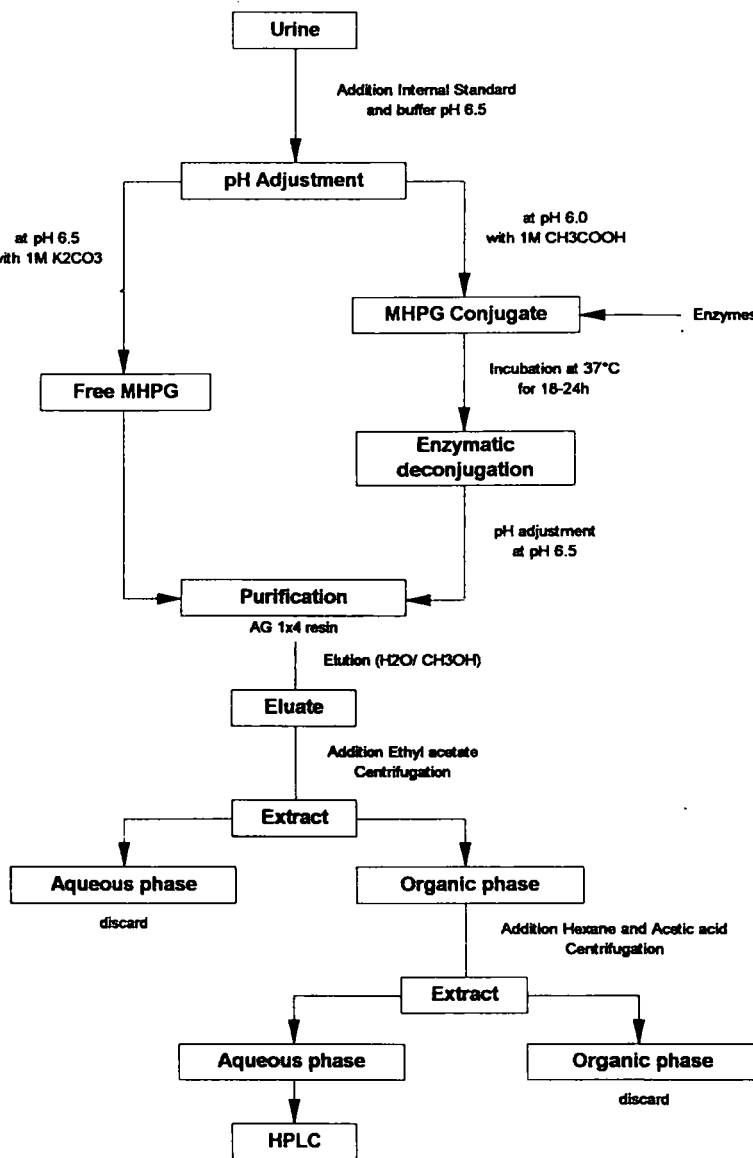


Fig. 1. Schematic outline of the extraction procedures.

assay, the following samples were prepared: a standard range (free MHPG: 0.1, 0.25 and 0.5 mg/l; MHPG-S: 0.5, 1, 2, and 3 mg/l), a urinary pool from several subjects as control and the urine samples of the patients. Aliquots of 25 μ l and 100 μ l of internal standard were added to each tube for the assay of free and conjugated MHPG (MHPG-S and MHPG-T) respectively. The extracts were buffered by addition of 500 μ l

of 1 M sodium acetate buffer (pH 6.5) and adjusted to $\text{pH } 6.0 \pm 0.05$ with 1 M CH_3COOH or 1 M KHCO_3 when necessary.

After addition to each extract of the corresponding enzyme (100 μ l of arylsulfatase for MHPG-S and 200 μ l of glucuronidase for MHPG-T), all the tubes were incubated between for a 18–24-h period at 37°C. After incubation, the pH was adjusted in all tubes to 6.5 ± 0.05 with 1 M

KHCO₃. In the arylsulfatase type VI (50 U) preparation, no β -glucuronidase activity could be detected. In the glucuronidase preparation, the activities of β -glucuronidase and arylsulfatase were about 100 000 U/ml (at pH 5.0) and 1000–5000 U/ml, respectively.

Each extract (standards, control and urine samples) was applied to a BioRad Econocolumn containing AG 1 $\times$ 4 resin (100–200 mesh) suspended in water, then washed twice with 1 ml of water and finally eluted with 2 ml of a water-methanol mixture (1:1, v/v) containing 0.5 g/l EDTA and 0.5 g/l sodium metabisulfite [18]. Then 1 g of dry NaCl and 8 ml of ethyl acetate were added to each eluate. The tubes were shaken for 15 min and centrifuged at 3000 g for 5 min. From the organic layer 5 ml were withdrawn and added to 5 ml of hexane and 2 ml of 0.1 M acetic acid (pH 3.0), containing 0.5 g/l EDTA and 0.5 g/l sodium metabisulfite. The extracts were then shaken for 15 min and centrifuged at 3000 g for 5 min. The organic layer was aspirated and 1 ml of the aqueous phase (pH 3.0) was transferred into an haemolysis tube. The traces of organic solvent were removed under nitrogen at 40°C for 5 min. A 50- μ l volume of each extract was injected.

3. Results and discussion

The assay of MHPG conjugate requires the use of a hydrolysing agent. After an exhaustive review of the commercially available hydrolytic

enzymes, the following were selected: arylsulfatase type VI and β -glucuronidase type H-2S (glucuronidase) for the deconjugation of MHPG-S and MHPG-T, respectively. After subtraction of the free MHPG and MHPG-S from MHPG-T, we obtained the MHPG-G value. However, several times during the adjustment of the extraction method, 40 μ l of glucuronidase type VIII-A were added in order to verify complete glycolysis and to evaluate the MHPG-G. The results obtained from four urine samples (Table 1) showed no significant difference between the measured and calculated values of the MHPG-T.

Unlike catecholamines, MHPG does not have a functional group that allows the specific extraction of MHPG from a complex matrix such as urine. In some previously reported procedures, MHPG was extracted with ethyl acetate [9–15]. In some cases, MHPG was purified or prepared by solid-phase extraction before treatment with ethyl acetate [9,19–22]. Our extraction procedure is essentially the same as that of Julien et al. [21] with some modifications to increase sensitivity and precision. We have purified the urine with the strong anion-exchange resin Dowex 1 $\times$ 4 before extraction with ethyl acetate. We have improved the specificity of the MHPG extraction by back-extracting the ethyl acetate extract into acetic acid. The addition of hexane makes the organic phase extraction easier by decreasing its polarity. With the liquid chromatographic technique of Julien et al. the eluate injected onto the chromatographic system

Table 1
Correlation between measured and calculated total MHPG values

Urine sample	Concentration (mg/l)				
	Free MHPG	MHPG-S	MHPG-G	MHPG-T measured ^a	MHPG-T calculated ^b
1	0.09	1.00	1.57	2.65	2.66
2	0.04	0.47	0.57	1.12	1.08
3	0.11	1.76	2.12	4.05	3.99
4	0.08	0.80	1.20	2.15	2.08

^a Results obtained after hydrolysis with 100 μ l of aryl-sulfatase for MHPG-S, 40 μ l of glucuronidase for MHPG-G and 200 μ l of glucuronidase for MHPG-T.

^b MHPG-T = free MHPG + MHPG-S + MHPG-G.

caused erratic recovery of the internal standard (vanillyl alcohol). Our attempts to use vanillyl alcohol in ethyl acetate extractions were unsuccessful. The chromatographic conditions used in Ref. [21] were insufficiently specific and the ODS column (10 μm particle size) showed neither satisfactory efficiency nor good resolution. In most hydrolyzed samples, the peak of the internal standard was partly obscured by an endogenous compound, and some late-eluting analytes were occasionally observed in the chromatogram. Consequently Julien et al. performed a rapid cleaning of the column between two consecutive analyses to only evaluate free

MHPG and MHPG-T. In our assay, the precision of the method was increased by using iso-MHPG as internal standard. The extraction, chromatographic and detection characteristics of iso-MHPG are similar to those of MHPG. This compound, which has not been commercialized yet, was prepared in situ using the method of Muskiet et al. [12].

Typical chromatograms obtained after extraction are shown in Fig. 2. Two unknown compounds (A and B) were extracted along with MHPG and the internal standard. These compounds did not originate from the enzyme preparation but most likely from deconjugation of

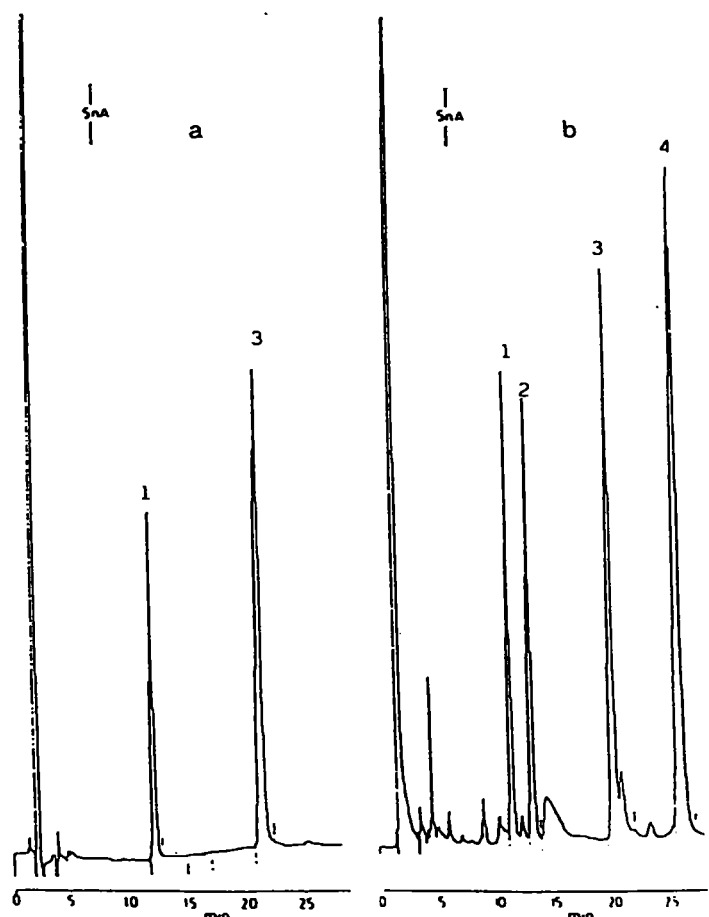


Fig. 2. Typical chromatograms obtained after extraction of (a) 1 mg/l MHPG-S standard solution, (b) urine containing 1.2 mg/l MHPG-S after hydrolysis. Peaks: 1 = MHPG, 2 = compound A, 3 = iso-MHPG, 4 = compound B. Volume injected: 20 μl ; detection: amperometric, +0.85 V; range: 20 nA; integrator attenuation: 4.

endogenous compounds. The chromatographic separation of the four compounds (MHPG, iso-MHPG, A and B) was studied as a function of temperature (Fig. 3). The best separation was obtained at ambient temperature with a Superspher 100 RP18 column (4 μ m particle size, 250 $\times$ 4 mm I.D.). The peaks of the unknown compounds A (13 min) and B (27.6 min) did not interfere with those of MHPG and iso-MHPG (11.8 min and 20.9 min), respectively.

In order to improve the assay, several columns were tested: Hypersil ODS (5 μ m particle size, 250 $\times$ 4 mm I.D.), Nucleosil CN (5 μ m particle size, 250 $\times$ 4.6 mm I.D.), Brownlee RP18 (5 μ m particle size, 220 $\times$ 4.6 mm I.D.). The resolution of these columns did not prove successful after optimization of the chromatographic conditions. The use of acetonitrile rather than methanol in the mobile phase and the Superspher C₁₈ column rather than other manufacturer's columns was crucial for the separation of the unidentified peaks. Special care was taken to prevent the

presence of ethyl acetate in the injected extracts, because peak shapes were dramatically affected in the presence of this solvent.

Standard curves were obtained with aqueous solutions of free MHPG and MHPG-S. When the free MHPG concentration was plotted versus the ratio free MHPG peak height/iso-MHPG peak height, the response was linear between 0.075 and 1 mg/l (regression equation: $y = 2.189x - 0.002$; $r = 0.998$). When the MHPG-S concentration was plotted versus the ratio MHPG-S peak height/iso-MHPG peak height, the response was linear between 0.25 and 7 mg/l (regression equation: $y = 0.582x - 0.022$; $r = 0.999$). The detection limit for both compounds, based on a signal-to-noise ratio of 2, was found to be 0.05 mg/l for free MHPG and 0.125 mg/l for MHPG-S. The precision of the assay was tested using two control urine pools containing 0.115 and 0.09 mg/l of free MHPG and 2.10 and 0.93 mg/l of MHPG-S. The within-run ($n = 10$) precision of quantitative results gave coefficients of variation (C.V.) of 3.4% and 5.5% for free MHPG, and 1.9% and 3.2% for MHPG-S. The higher C.V. for free MHPG compared to MHPG-S is probably due to the lower concentrations and hence quite understandable. For each assay, the standard range and two control urinary pools were used to determine the day-to-day variability with twelve different assays on different days; accurate C.V.s were observed.

The urine samples from forty healthy human subjects (twenty males and twenty females) were collected to determine the normal concentrations of the free and conjugated forms of MHPG. The free MHPG (0.12 ± 0.05 mg/l) and MHPG-S (1.20 ± 0.34 mg/l) values did not differ significantly between male and female subjects. The present results are consistent with the values obtained by other authors [2–5,10,23,24]. However, the MHPG-G (1.89 ± 0.86 mg/l) and MHPG-T (3.20 ± 1.07 mg/l) values are much higher in our study but no sex effect was detected. Some investigators reported that muscular exercise or sleep could influence the peripheral MHPG-G values. Only some authors [5,10] have observed that the MHPG values differ according to the sex.

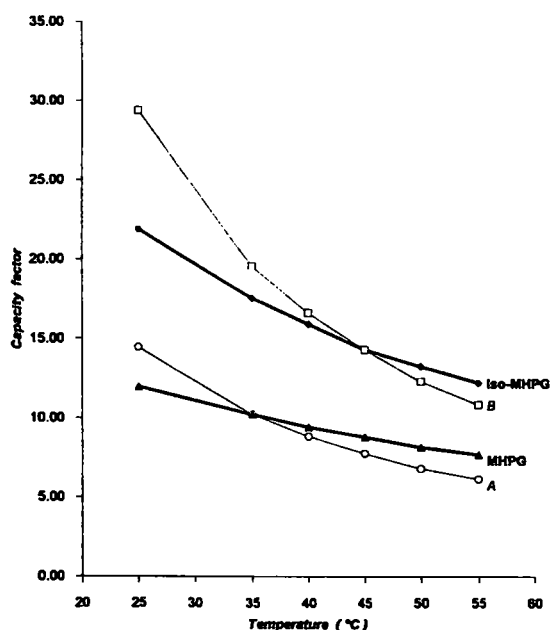


Fig. 3. Effect of temperature on the chromatographic separation of the four compounds: MHPG, iso-MHPG, A, and B.

References

- [1] J.W. Maas, J.A. Fawcett and H. Dekirmenjian, *Arch. Gen. Psychiatry*, 19 (1968) 129.
- [2] P.A. Bond and D.R. Howlett, *Biochem. Med.*, 10 (1974) 219.
- [3] M.H. Joseph, H.F. Baker, E.C. Johnstone and T.J. Crow, *Psychopharmacology*, 51 (1976) 47.
- [4] L. Peyrin and J.M. Pequinot, *Psychopharmacology*, 79 (1983) 16.
- [5] J.G. Filser, F.S. Spira, A. Gabel, H. Beckman and W.E. Muller, *J. Psychiatr. Res.*, 22 (1988) 171.
- [6] J.J. Schildkraut, *Am. J. Psychiatry*, 130 (1973) 695.
- [7] P.A. Ridges, *Br. J. Clin. Pract.*, suppl. 7 (1980) 12.
- [8] De Leon Jones, *Science*, 179 (1973) 300.
- [9] P.C. Eicholtz, D. Binkhuizen and R.E. Thieme, *J. Chromatogr.*, 305 (1984) 438.
- [10] G. Santagostino, P. Frattini, S. Schinelli, M.L. Cucchi and G.L. Corona, *J. Chromatogr.*, 233 (1982) 89.
- [11] P. Moleman and J.J.M. Borstrok, *J. Chromatogr.*, 227 (1982) 391.
- [12] F.A.J. Muskiet, H.J. Jeurig and G.G. Thomasson, *J. Label. Compounds*, 14 (1978) 497.
- [13] H. Dekirmenjian and J. Maas, *Clin. Chim. Acta*, 52 (1974) 203.
- [14] M.H. Joseph, B.V. Kadam and D. Risby, *J. Chromatogr.*, 226 (1981) 361.
- [15] J.G. Filser, S. Koch, M. Fischer and W.E. Muller, *J. Chromatogr.*, 493 (1989) 275.
- [16] J.R. Shipe, J. Savory and M.P.R. Wills, *Clin. Chem.*, 30 (1984) 140.
- [17] H. Bartels, M. Böhmer and C. Heierli, *Clin. Chim. Acta*, 37 (1972) 193.
- [18] L. Peyrin, J.M. Pequinot and G. Chauplannaz, *J. Neural Transmiss.*, 63 (1985) 255.
- [19] A. Minegishi and T. Ishizaki, *J. Chromatogr.*, 311 (1984) 51.
- [20] F. Karege, *J. Chromatogr.*, 311 (1984) 361.
- [21] C. Julien, C. Rodriguez, J. Sacquet, G. Cuisinaud and J. Sassard, *Clin. Chem.*, 34 (1988) 966.
- [22] P.A. Shea and J.B. Howell, *J. Chromatogr.*, 306 (1984) 358.
- [23] F. Karoum, H. Lefevre, L.B. Bigelow and E. Costa, *Clin. Chim. Acta*, 43 (1973) 127.
- [24] F. Karoum, J.M. Schwing, S.G. Potkin and R.J. Wyatt, *Brain Res.*, 125 (1977) 33.

BIBLIOGRAPHIE

ABE K, KONAKA R. (1988). Specific determination of 3-methoxy-4 hydroxy phenylethylene glycol in urine by liquid chromatography with post - column reaction. *Clin Chem.*; 34: 87-90.

AGREEN H (1982). Depressive symptom patterns and urinary MHPG excretion. *Psychiatry Res.*; 6: 185-196.

ALONSO R., GIBSON C.J., Mc GILL J. (1981). Determination of 3-methoxy-4 hydroxyphenylethylene glycol in urine by liquid chromatography with amperometric detection. *Life Sci.*; 29: 1689- 1696.

ALTAMURAA C., MONTGOMERY S.A, WERNICKE J.F. (1988). The evidence for 20 mg a day of fluoxetine as the optimal dose in the treatment of depression. *Bri. J. Psychiatry*; 153 suppl 3: 109-112.

ANDERSON G.M., YOUNG J.G., COHEN D.J., SCHLICHT K.R., PATEL N. (1981). Liquid chromatography determination of serotonin and tryptophan in whole blood and plasma. *Clin. Chem.*; 27/5: 775-776.

ASBERG M., BERTILSSON L., TUCK D. (1973). Indolamine metabolites in the cerebrospinal fluid of depressed patients before and during treatment with nortriptyline. *Clin. Pharmacol. Ther.*; 14: 277-286.

ASBERG M., TRASKMAN L., THOREN P. (1976). 5-HIAA in the cerebrospinal fluid. A biochemical suicide predictor? *Arch. Gen. Psychiatry*; 33: 1193-1197.

AZORIN J.M., PUPESCHI G., VALLI M., JOANNY P., RAUCOULES D., LANCON C., TISSOT R. (1990). Plasma 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol in manic patients: relationships with clinical variables. *Acta Psychiatr. Scand.*; 81: 14-18.

BARON B.M., OGDEN A.M., SIEGEL B.W., STEGEMAN J., URSILLO R.C., DUDLEY M.W. (1988). Rapid down regulation of β -adrenoreceptors by co-administration of desipramine and fluoxetine. *Eur. J. Pharmacol.*; 154: 125-134.

BARTELS H., BOHMER M., HEIERLI C. (1972). Serum Kreatininbestimmung ohne Enteiweissen. *Clin. Chim. Acta*, 37: 193-197.

BEASLEY C.M. Jr, JANET C., BOSOMWORTH B.S., WERNICKE J.F. (1990). Fluoxetine: relationships among dose, response, adverse events, and plasma concentrations in the treatment of depression. *Psychopharmacol. Bull.*; 26-1: 18-23.

BECH P., KASTRUP M., RAFAELSEN O.J. (1989). Echelles d'anxiété, de manie, de dépression, de schizophrénie. Correspondance avec les syndromes du DSM III (traduit de l'anglais par Chambon O, Poncet F, Kiss L). Collection Médecine et Psychothérapie. Editions Masson.

BECKMANN H., GOODWIN F.K. (1975). Antidepressant response to tricyclics and urinary MHPG in unipolar patients. Clinical response to imipramine or amitriptyline. *Arch. Gener. Psychiatry*; 32: 17-21.

BECKMANN H., GOODWIN F.K. (1980). Urinary MHPG in subgroups of depressed patients and normal controls. *Neuropsychology*; 91-100.

BENFELD P., HEEL R.C., LEWIS S.P. (1986). Fluoxetine, a review of its pharmacologic and pharmacokinetics properties and therapeutic efficacy in depressive illness. *Drugs*; 32: 481-508.

BERZSENYI P., GALATEO E., VALZELLI L. (1983). Fluoxetine activity on muricidal aggression induced in rats by p-chlorophenylalanine. *Aggressive Behav.*; 9: 333-338.

BERGSTROM R.F., LEMBERGER L., FARID N.A., WOLEN RL. (1988). Pharmacologie clinique et pharmacocinétique de la fluoxétine; revue de la littérature. *Br. J. Psychiatry*, 153: suppl 3: 51-55.

BERGSTROM R.F, PEYTON AL, LEMBERGER L. (1992). Quantification and mechanism of the fluoxetine and tricyclic antidepressant interaction. *Clin. Pharmacol. Ther.*; 51: 239-248.

BLIER P., DE MONTIGNY C., CHAPUT Y. (1988). Détermination électrophysiologique de l'effet des traitements antidépresseurs sur l'efficacité de la neurotransmission sérotoninergique. *Clin. Neuropharmacol.*; 11: 51-510.

BOND P.A., DIMITRAKOUDI M., HOWLETT D.R., JENNER F.A . (1975). Urinary excretion of the sulfate and glucuronide of 3-methoxy-4-hydroxyphényléthyléneglycol in a manic depressive patient. *Psychol. Méd.* ; 5: 279-285.

BOND P.A., HOWLETT D.R., JENNER F.A . (1979). Urinary excretion of the sulfate and glucuronide of 3-methoxy-4-hydroxyphényléthyléneglycol in urine. *Biochem. Med.* ; 10: 219-228.

BOOBIS A.R., MURRAY S., JONES H., REID J.L., DAVIES J.L. (1979). Conjugates of 3-methoxy-4-hydroxyphényléthyléneglycol in man. In: Usdin E., Kopin I.J., Barchas J; (eds) Catecholamines-basic and clinical frontiers, vol 1. Pergamon Press, 213-215.

BOTTAI T., LEVY C., LANCON C., AZORIN J.M., GRIGNON S., VALLI M., JADOT G., TISSOT R. (1991). Contribution à l'étude du MHPG plasmatique, marqueur noradrénergique périphérique et des taux plasmatiques hormonaux de cortisol, T3, T4, TSH, dans les syndromes dépressifs. *L'Encéphale* ; XVII: 203-211.

BOURDEAUX R., CAPOLAGHI B., LACROIX C., YOUNOS C., LEHR P.R. (1995). Assay of urinary free and conjugated 3-methoxy-4-hydroxyphényléthylène glycol by high-performance liquid chromatography with amperometric detection. *J. Chromatogr. B.* ; 665: 45-51.

BROSEN K., SKJELBO E. (1991). Fluoxetine and norfluoxetine are potent inhibitors of P450IID6 - the source of the sparteine/debrisoquine oxidation polymorphism. *Br. J. Clin. Pharmacol.* ; 32: 136-137.

BRUNELLO N., BARBACCIA M.L., CHUANG D.M., COSTA E. (1982). Down regulation of β -adrenergic receptors following repeated injections of desmethylinipramine: permissive role of serotonergic axons. *Neuropharmacology* ; 21: 1145-1149.

BUCHANAN D.N., FUCEK F.R., DOMINO E.P.(1979). Analysis of urinary 3-methoxy-4-hydroxyphényléthylène glycol by high-performance liquid chromatography with amperometric detection. *J. Chromatogr. B.* ; 162: 394-400.

BUTLER J., LEONARD B.E. (1988). The platelet serotonergic system in depression and following sertraline treatment. *Int. Clin. Psychopharmacol.*; 3-4: 343-347.

BYMASTER F.P., WONG D.T. (1977). Effect of Lilly 110140, 3-(p-trifluorométhylphenoxy)-N-méthyl-3-phénylpropanolamine, on synthesis of 3H-serotonin from 3H-tryptophan in rat brain. *The pharmacologist*, 16: 244.

CACCIA S., CAPPI M., FRACASSO C., GARATTINI S. (1990). Influence of dose and route of administration on the kinetics of fluoxetine and its metabolite norfluoxetine in the rat. *Psychopharmacology*, 100: 509-514.

CACCIA S., FRACASSO C., GARATTINI S., GUIZO G., SARABI S. (1990). Effects of short and long-term administration of fluoxetine on the monoamine content of rat brain. *Neuropharmacology*; 31: 343-347.

CAZALA P. (1980). Effect of Lilly 110140 (Fluoxetine) on self-stimulation behavior in the dorsal and ventral regions of the lateral hypothalamus in the mouse. *Psychopharmacology*; 71: 143-146.

CELADA P., DOLERA M., ALVAREZ E., ARTIGAS F. (1992). Effects of acute and chronic treatment with fluvoxamine on extracellular and platelet serotonin in the blood of major depressive patients. Relationship to clinical improvement. *J. Affect. Disord.*; 25: 243-250.

CHOUINARD G. (1985). A double blind controlled clinical trial of fluoxetine and amitriptyline in the treatment of out patients with major depressive disorder. *J. Clin. Psychiatry*; 46: 32-37.

CLERC G.E., RUIMY P., VERDEAU-PAILLES J. (1994). A double-blind comparison of venlafaxine and fluoxetine in patients hospitalized for major depression and melancholia. *Int. Clin. Psychopharmacol.*; 9: 139-143.

COHN J.B., WILCOX C. (1985). A comparison of fluoxetine, imipramine, and placebo in patients with major depressive disorder. *J. Clin. Psychiatry*; 46: 26-31.

DAILEY J.W., YAN Q.S., MISHRA P.K., BURGER R.L., JOBE P.C. (1991). Effects of fluoxetine on convulsions and on brain serotonin as detected by microdialysis in genetically epilepsy-prone rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* ; 260: 533-540.

DEKIRMENJIAN H., MAAS J.W. (1970). An improved procedure of 3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol determination by gas-liquid chromatography. *Ann. Chem.*; 35: 113 - 122.

DEKIRMENJIAN H., MAAS J. (1974). 3-methoxy-4-hydroxyphenylethylene glycol in plasma. *Clin. Chim. Acta*; 52: 203-210.

DE LEON JONES F., MAAS J.W., DEKIRMENJIAN H., SANCHEZ J. (1975). Diagnostics subgroups of affective disorders and their urinary excretion of catecholamine metabolites. *Am. J. Psychiatry*, 132: 1141-1148.

DENNIS T., BENKELFAT C., TOUITOU Y. (1986). Lack of circadian rhythm in healthy plasma levels of 3,4 dihydroxyphenylethyleneglycol in healthy human subjects. *Psychopharmacology* ; 90: 471-474.

DOLEZALOVA H., STEPITA-KLAUCO M. (1976). Elevated piperidine and cadaverine content in the brain and blood of dormant mice. *Advances in Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine*; Vol 1: 207-214.

DORNSEIF B.E, WERNICKE J.F, DUNLOP S.R, POTVIN J.H. (1989). Effect of dose escalation after low-dose therapy. *Psychopharmacol. Bull.*; 25: 71-79.

DREUX C., (1983). La plaquette sanguine: un modèle neuronal en psychiatrie. *Seminaire de Psychiatrie Biologique, Hôpital St Anne 3.* Paris: eds Pharmuka: 77-113.

DUGGAN P.F., HURLEY T., MARTIN N. (1985). Centrifugation speeds and the removal of platelets from heparinized plasma. *Clin. Chem.*; 31: 1082-1083.

DUMBRILLE-ROSS A., TANG S.W. (1983). Manipulations of synaptic serotonin: discrepancy of effects on serotonin S1 and S2 sites. *Life Sci.* ; 32: 2677-2684.

EGRISE D., RUBINSTEIN M., SCHOUTERS A., CANTRAINE F., MENDLEWICZ J. (1986). Seasonal variation of platelet serotonin uptake and ³H-imipramine binding in normal and depressed patients. *Biol. Psychiatry*; 21: 283-292.

EICHOLTZ P.C.N., BINKHUYZEN D., THIEME R.E. (1984). Direct determination of 3-methoxy-4-sulphonyl-oxyphenylglycol (MHPG sulphate) in urine using gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr.*; 305: 438-441.

EYNARD N., FLACHAIRE E., LESTRA C., BROYER C., ZAIDAN R., CLAUSTRAT B., QUINCY C. (1993). Platelet serotonin content and free and total plasma tryptophan in healthy volunteers during 24 hours. *Clin. Chem.* 39: 2337-2340.

FABRE L.F., CRISMON L. (1985). Efficacy of fluoxetine in out-patients with major depression. *Curr. Ther. Res. Clin. Exp.*; 37: 115-123.

FAVA M, ROSENBAUM J.F, COHEN L., REITER S, Mc CARTY M., STEINGARD R., CLANCY K. (1992). High-dose fluoxetine in the treatment of depressed patients not responsive to a standard dose of fluoxetine. *J. Affect. Disord.* ; 25: 229-234.

FAWCETT J., MAAS J.W., DEKIRMENJIAN H. (1972). Depression and MHPG excretion. *Arch. Gen. Psychiatry* ; 26: 246-251.

FEIGHNER J.P., COHN J.B. (1985). Double-blind comparative trials of fluoxetine and doxepin in geriatric patients with major depressive disorder. *J. Clin. Psychiatry*; 46: 20-25.

FEIGHNER J.P. (1985). A comparative trial of fluoxetine and amitriptyline in patients with major depressive disorder. *J. Clin. Chem.*; 46: 369-372.

FILSER J.G., SPIRA J., FISCHER M., GATTAZ W.F., MULLER W.E (1988). The evaluation of 4-hydroxy-3-methoxyphenylglycol sulfate as a possible marker of central norepinephrine turnover. Studies in healthy volunteers and depressed patients. *J. Psychiat. Res.* ; 22: 171-181.

FILSER J.G., KOCH S., FISCHER M., MULLER W.E. (1989). Determination of urinary 3-methoxy-4-hydroxyphenylethylene glycol and its conjugates by HPLC with electrochemical and ultraviolet absorbance detection. *J. Chromatogr. B.*; 493; 275-286.

FLACHAIRE E., BENEY C., BERTHIER A., SALANDRE J., QUINCY C., RENAUD B. (1990). Determination of reference values for serotonin concentration in platelets of healthy newborns, children, adults, and elderly subjects by HPLC with electrochemical detection. *Clin. Chem.* ; 36: 2117-2120.

FLOOD J.F., CHERKIN A. (1987). Fluoxetine enhances memory processing in mice. *Psychopharmacology* 93: 36-43.

FRITS-AXEL W. (1976). A Mass fragmentographic method for the determination of 4-hydroxy-3-methoxyphenylethylamine and dopamine in brain tissue. *Advances in Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine*; Vol 1: 171-179.

FULLER R.W., PERRY K.W., MOLLOY B.B. (1974). Effect on an uptake inhibitor on serotonin metabolism in rat brain: studies with (3p-trifluoromethyl phenoxy) N-methyl 3-phenyl-propylamine (LILLY 110140). *Life Sci.*; 15, 1161-1171.

FULLER R.W., SNOODY H.D. MOLLOY B.B. (1975). Potentiation of the L-5-hydroxytryptophan-induced elevation of plasma corticosterone levels in rats by a specific inhibitor of serotonin uptake. *Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol.* ; 10: 193-196.

FULLER R.W., WONG D.T. (1977). Inhibitor of serotonin re-uptake. *Féd. Proc.*; 36: 2154-2158.

FULLER R.W., HOLLAND D.R., YEN T.T., BEMIS K.G., STAMM N.B. (1979). Antihypertensive effects of fluoxetine and the L-5-hydroxytryptophan in rats. *Life Sci.* ; 25: 1237-1242.

FULLER R.W. (1980). Mechanism by which uptake inhibitors antagonise p-chloramphetamine-induced depletion of brain serotonin. *Neurochem. Res.* ; 5: 241-245.

FULLER R.W., SNOODY H.D. (1980). Effect of serotonin-releasing drugs on serum corticosterone concentration in rats. *Neuroendocrinology* ; 31: 96-100.

FULLER R.W., OWEN J.E (1981). Suppression of milk drinking by the combination of fluoxetine and L-5-hydroxytryptophan in rats. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* ; 34: 137-140.

FULLER R.W, WONG D.T. (1987). Serotonin re-uptake blockers in vitro and in vivo. *J. Clin. Psychopharmacol.*; 7: 365-435.

FULLER R.W., SNODDY H.D. (1991). Role of norfluoxetine in the inhibition of desipramine metabolism and in the inhibition of serotonin uptake after fluoxetine administration to rats. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*; vol 73: 31-40.

GARVEY M., NOYES R. Jr, COOK B. (1990). Comparaison of panic disordered patients with high versus low MHPG. *J. Affect. Disord.* ; 20: 7-12.

GEYER M.A, DAWSEY W.J., MANDELL A.J. (1978). Fading: a new cytofluorimetric measure quantifying serotonin in the presence of catecholamines at the cellular level in brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* ; 207: 650-667.

GIBBS D.M., VALE W. (1983). Effect of the serotonin reuptake inhibitor fluoxetine on corticotropin-releasing factor and vasopressin secretion into hypophyseal portal blood. *Brain Res.* ; 280: 176-179.

GINESTET D. (1989). Fluoxétine versus clomipramine dans les dépressions endogènes et les mélancolies. *Synapse* ; 56: 79-83.

GOODWIN F.K., POST R.M., DUNNER D.L., GORDON E.K. (1973). Cerebrospinal fluid amine metabolites in affective illness: the probenecid technique. *Am. J. Psychiatry*; 130: 73-79.

GOODWIN F.K., COWDRY R.W., WEBSTER M.H. (1978). Predictors of drug response in the affective disorders: toward an integrated approach. *Psychopharmacology*, 1277-1288.

GRAM L.F. (1994). Drug Therapy: Fluoxetine. *N. Engl. J. Med.*; 331: 1354-1361.

GROWDON J. H. (1977). Postural changes, tremor, and myoclonus in the rat immediately following injections of p-chloramphetamine. *Neurology*; 27: 1074-1077.

GUAN X.M., Mc BRIDE W.J. (1986). Selective action of fluoxetine on the extracellular pool of serotonin in the nucleus accumbens. *Society for Neuroscience Abstracts*; 12: 428.

HALL J. (1988). Efficacité de la fluoxétine contre placebo et à doses fixes: revue de la littérature. *Brit. J. Psychiatry*, 153 (suppl. 3): 65-69.

HAMON M. (1983). Les systèmes sérotoninergiques centraux. *Sem. Psychiatr. Biologique, Hôpital St Anne*, 107-125.

HARDEMAN M.R., DENVYL A., PRINS H.K. (1972). A semi mechanized method for the fluorometric determination of 5-hydroxytryptamine (serotonin) in blood plasma and platelets. *Clin. Chim. Acta* ; 37: 71-79.

HARIHARAN M., VANNOORD T., CAMERON O.G., CURTIS G.C., OSTROW D.G. (1989). Free 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol determined in plasma by liquid chromatography with coulometric detection. *Clin. Chem.* ; 35: 202-205.

HJEMDAHL P., SJOQUIST B., DALESKOG M., ELIASSON K. (1982). A comparison of noradrenaline, MHPG and VMA in plasma as indicators of sympathetic nerve activity in man. *Acta Physiol. Scand.* ; 115: 507-509.

HORNG J.S., WONG D.T. (1976). Effects of serotonin uptake inhibitor, Lilly 110140, on transport of serotonin in rat and human blood platelets. *Biochem. Pharmacol.* , vol 25: 865-867.

HORNSPERGER J.M., WAGNER J., HINKEL J.P., JUNG M.J. (1984). Measurement of 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol sulfate ester in brain using reversed phase liquid-chromatography and electrochemical detection. *J. Chromatogr. B*; 306: 364-370.

HRDINA P.D. (1984). Differentiation of two components of specific triated-imipramine binding in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.*; 102: 481-488.

HUBER-SMITH M.J., NESSE R., MAZHAR M., Mc CANN D.S. (1986). Evaluation of plasma 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol . *J. Chromatogr. B*; 377; 91-99.

HWANG E.C., MAGNUSSEN I., VAN WOERT M.H. (1980). Effects of chronic fluoxetine administration on serotonin metabolism. *Res. Commun. Chem. Pharmacol.*; 29: 79-98.

JAVORS M.A., BOWDEN C.L., MAAS J.W. (1984). 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol, 5 hydroxyindolacetic acid, and homovanillic acid in human cerebrospinal fluid. Storage and measurement by reversed phase HPLC and coulometric detection using 3-methoxy-4-hydroxyphenyllactic acid as an internal standard. *J. Chromatogr. B.*; 336: 259-269.

JIMERSON D.C., MARKEY S.P., OLIVER J.A., KOPIN I.J. (1981). Simultaneous measurement of plasma 4-hydroxy-3-methoxyphenylethylene glycol by gas chromatography mass spectrometry. *Biomedical Mass Spectrometry* ; vol8; N°6: 256-259.

JOSEPH M.H., BAKER H.F., JOHNSTONE E.C., CROW T.J. (1976). Determination of 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol conjugates in urine. Application to the study of central noradrenaline metabolism in unmedicated chronic schizophrenic patients. *Psychopharmacology*; 51: 47-51.

JOSEPH M.H., KADAM B.V., RISBY D. (1981). Simple HPLC method for the concurrent determination of the amine: metabolites vanillylmandelic acid, 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol, 5-hydroxyindolacetic acid, dihydroxyphenylacetic acid and homovanillic acid in urine using electrochemical detection. *J. Chromatogr. B.* ; 226: 361-368.

JOSEPH M.H., RISBY D., CROWT J. (1985). MHPG excretion in endogenous depression. Relationship to clinical state and the effects of ECT. *Psychopharmacology*, 87: 442-448.

JULIEN C., RODRIGUEZ C., SACQUET J., CUISINAUD G., SASSARD J. (1988). Liquid chromatographic determination of free and total 3,4-dihydroxy phenylglycol and 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol in urine. *Clin. Chem.* ; 34: 966-969.

KAREGE F. (1984). Method for total 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol extraction from urine, plasma and brain tissue using bonded phase materials: comparison with the ethylacetate extraction method. *J. Chromatogr. B.*; 311: 361-368.

KAREGE F., GAILLARD J.M., TISSOT R., AZORIN J.M., VALLI M. (1987). Determination of 3,4-Dihydroxyphenylglycol (DHPG) by HPLC with coulometric detection, and correlation with 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG) in human plasma. *Biomed. Chromatogr.*; Vol 2; N°1: 30-33.

KAREGE F., BOVIER P., GAILLARD J.M., TISSOT R. (1989). The heterogeneity of 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol levels among depressed patients. *Acta Psychiatr. Scand.*; 80: 499-504.

KAROUM F., LEFEVRE H., BIGELOW L.B., COSTA E. (1973). Urinary excretion of 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol and 3-methoxy-4-hydroxyphenylethanol in man and rat. *Clin. Chim. Acta*; 43: 127.

KAROUM F., MOYER-SCHWING J., POTKIN S.G., WYATT R.J. (1977). Presence of free, sulfate and glucuronide conjugated 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG) in human brain, cerebrospinal fluid and plasma. *Brain Res.* ; 125: 333-339.

KELLY M.W., PERRY P.J., HOLSTAD S.G., GARVEY M.H. (1989). Serum fluoxetine and norfluoxetine concentrations and antidepressant response. *Ther. Drug Monit.*; 11: 165-170.

KESHAVAN H.J.H., GURBANI N.K., DANDIYA P.C. (1981). Effects of fluoxetine on a specific serotonergic syndrome in rats. *Indian J Med. Res.* ; 73: 653-657.

KISSINGER P.T., BRUNTLETT C.S., SHOUP R.E. (1981). Neurochemical applications of liquid chromatography with electrochemical detection. *Life Sci.* ; 28: 455-465.

KLECKA W.R. (1989). Discriminant analysis: Sage university paper series on Quantitative applications in the social sciences. Beverly Hills: Sage Pubns.

KOUPERNICK C., LOO H., ZARIFIAN E. (1982). Précis de psychiatrie, Chevilly-Larue, Flammarion Médecine-Sciences éd..

LAAKSO J.T., KOSKINIEMI M.L., WAHLROOS O., HARKÖNEN M. (1983). Simultaneous determination of tryptophan and its 5-hydroxy metabolites in human cerebrospinal fluid by reversed phase liquid chromatography with electrochemical detection. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*; 43: 463-472.

LABORATOIRE LILLY FRANCE (1989). Prozac 20mg: Chlorhydrate de fluoxétine. Dossier réservé aux pharmaciens des établissements hospitaliers. Information préliminaire. St Cloud.

LANCON R., JEANNINGROS R., VALLI M., BOUGEROL T., SCOTTO J.C., TISSOT R. (1990). Transports membranaires érythrocytaires de la tyrosine et du tryptophane et taux plasmatique de MHPG dans les dépressions. *L'Encéphale* ; XVI: 269-74.

LCEC Application Note N°34. Determination of tryptophan metabolites by LCEC. *Bioanalytical Systems INC.*

LE FUR G. (1981). Mécanisme d'action des antidépresseurs. Entretiens du vendredi. Conférence à l'Hôpital Saint Anne; Paris; 9 janvier 1981

LEMBERGER L., ROWE H., CARMICHAEL R. CRABTREE R., HORNG J.S., BYMASTER F., WONG D. (1978). Fluoxetine; a selective serotonin uptake inhibitor.. *Clin. Pharmacol. Ther.* ; 23: 421-429.

LEMBERGER L., BERGSTROM R.F., WOLEN R.L., FARID N.A., ENAS G.G., ARONOFF G.R. (1985). Fluoxetine: Clinical pharmacology and physiologic disposition. *J. Clin. Psychiatry* ; 46: 14-19.

LESCH K.P., WOLOZIN B.L., MURPHY D.L., REIDERER P. (1993). Primary structure of the human platelet serotonin uptake site: identity with the brain serotonin transporter. *J Neurochem* ; 60: 2319-2322.

LIPTON M.A., DIMASCIO A., KILLAM K.F. (1978). Psychopharmacology: A generation of progress. Raven Press, New York.

LOO H. (1981). Implications thérapeutiques de la caractérisation biochimique des dépressions. *L'Encéphale*. 6-3: 241-246.

LOO H., GAY C., (1983). Neurotransmetteurs et antidépresseurs. *Confront. Psychiatr.*, 16 (22): 301-339.

LOO H., GRANGER B. (1986). Les catabolites des catécholamines: conférence. *Séminaire de Psychiatrie biologique*; Hôpital St Anne: 69-88.

LOO H., DENNIS T., VANELLE J.M. (1986). Lack of correlation between plasma DOPEG and urinary MOPEG levels in depressed patients. *Biol. Psychiatry* ; 21: 900-906.

LOO H. (1987). Bilan des recherches biologiques dans la dépression chez l'homme. *Psychophar. Medi.*; 19: 2031-2055.

LOO H., COLONNA L., (1988). Abord critique des recherches de perturbations monoaminergiques dans les dépressions. Autour de la dépression: Comptes rendus du Congrès de New-York, numéro spécial 1989, Spécia Ed. Paris: 351-364.

LOO H., LOO P., (1991). La dépression, N°2579, Que sais-je.

LOPEZ-IBOR J.J. JR, (1988). Implication de la sérotonine au cours de divers troubles psychiatriques et sur certains comportements. *Br. J. Psychiatr.*, 153 (suppl.3): 28-42.

LUO S., LI E.T.S. (1991). Effects of repeated administration of serotonergic agonists on diet selection and body weight in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* ; 38: 495-500.

MAAS J.W., DEKIRMENJIAN H., FAWCETT J. (1971). Catecholamine metabolism, depression and stress. *Nature*; 230: 330-331.

MAAS J.W. (1975). Biogenic amines and depression. *Arch. Gen. Psychiatry* ; 32; 1357-1361.

MAAS J.W. (1978). Clinical and biochemical heterogeneity of depressive disorders. *Ann. Intern. Med.*; 88; 4: 556-563.

MAAS J.W. (1983). MHPG: Basic mechanisms and psychopathology New york, London; Academic Press; 226.

MAIS D.E., LAHR P.D., BOSIN T.R. (1981). Determination of serotonin, its precursors, metabolites and [3H] serotonin in lung by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B.* ; 225: 27-35.

MAJ J., ROGOZ Z., SKUZA G., SOWINSKA H. (1983). The effect of selective inhibitors of noradrenaline and serotonin uptake on reserpine and apomorphine induced hypothermia in mice. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* ; 35: 49-57.

MARSDEN C.A., CONTI J., STROPE E., CURZON G., ADAMS R.N. (1979). Monitoring 5-hydroxytryptamine release in the brain of the freely moving un anaesthetized rat using voltammetry. *Brain Res.* ; 171: 85-99.

MARTIN F., ALDEGUNDE M. (1989). Simple HPLC with electrochemical detection for the determination of indolamines in tissue and plasma. *J. Chromatogr. B.*; 491: 221-225.

MARTIN P. (1990). Effets des antidépresseurs chez le Rat: résistance et délai d'action. *Psychiatr. Psychobiol.* ; 5: 147-149.

MARTIN F. ROZAS G., MIGUEZ J., ALDEGUNDE M. (1990). Plasma serotonin: factors affecting its levels. *Biogenic Amines* ; 7-1: 57-62.

McINTYRE L.M., NORMAN T.R. (1989). Platelet serotonin response to treatment in geriatric depression. *Biol. Psychiatry* ; 26 (4): 431-436.

MEFFORD I.N. (1981). Application of high performance liquid chromatography with electrochemical detection to neurochemical analysis: measurement of catecholamines, serotonin and metabolites in rat brain. *J. Neuroscience Methods*; 3: 207-224.

MESSAOUDI M., TRICOIRE A., JUNG P.H., DESOR D., MOCAER E., LESOURD M. (1996). Effects of alnespirone (S 20499) in the depression model of unavoidable aversive light stimulus in rats. *Xxth C.IN.P. Congress Melbourne, Australia.*

MESSING R.B., FISHER L.A., PHEBUS L., LYTLE L.D. (1976). Interaction of diet and drugs in the regulation of brain 5-hydroxyindoles and the response to painful electric shock. *Life Sci.* ; 18: 707-714.

MINE K., OKADA M., MISHIMA N., FUJIWARA M., NAKAGAWA T. (1993). Plasma-free and sulfoconjugated MHPG in major depressive disorders: differences between responders to treatment and nonresponders. *Biol. Psychiatry* ; 34: 654-660.

MINEGISHI A. and ISHIZAKI T. (1984). Determination of free 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol with several other monoamine metabolites in plasma by HPLC with amperometric detection. *J. Chromatogr. B.*; 311: 51-57.

MOLEMAN P., BORSTROK J.J.M. (1982). Analysis of urinary 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol by high performance liquid chromatography and electrochemical detection. *J.Chromatogr. B.* ;227: 391-405.

MOLINA V.A., GOBAILLE S., MANDEL P. (1986). Effects of serotonin-mimetic drugs on mouse-killing behavior. *Agressive Behavior* ; 12: 201-211.

MOLINA V., CIESIELSKI L., GOBAILLE S., ISEL F., MANDEL P. (1987). Inhibition of mouse killing behavior serotonin-mimetic drugs : effects of partial alterations of serotonin neurotransmission . *Pharmacol. Biochem. & Behavior* ; 27: 123-131.

MONTGOMERY S.A., BALDWIN D., SHAH A., GREEN M., FINEBERG N., MONTGOMERY D. (1990). Plasma level response relationships with fluoxetine and zimelidine. *Clin. Neuropharmacol.*; vol 13; Suppl 1: 71-75.

MOUSSAOUI D. (1978). Biochimie de la dépression. Analyse de la littérature. *L'Encéphale*; 4-3: 193-222.

MUSCETTOLA G., DI LAURO A., GIANNINI C.P. (1984). Urinary MHPG and major affective disorders. A replication and new findings. *Arch. Gener. Psychiatry* ; 41: 337-342.

MUSKIET F. A., FREMOUW - OTTEVANGERS D. G., WOLTHERS B. G., DEVRIES J.A. (1977). Gas chromatographic profiling of urinary acidic and alcoholic catecholamine metabolites. *Clin. Chem.* ;23: 863-867.

MUSKIET F.A.J., JEURING H.J., THOMASSON C.G. (1978). Deuteration of catecholamines, catecholamine metabolites and tryptophan metabolites. *J. Labelled Compd.*; 14: 497-505.

MUSKIET F.A.J., FREMOUW - OTTEVANGERS D.C., NAGEL G.T., WOLTHERS B.G. (1979). Determination of 4-O-methylated catecholamine metabolites in urine by mass fragmentography. *Clin. Chem.* ; 25: 1708-1713.

NASH J.F., BOPP R.J., CARMICHAEL R.H., FARID K.Z., LEMBERGER L. (1982). Determination of fluoxetine and norfluoxetine in plasma by gas chromatography with electron capture detection. *Clin. Chem.* ; 28: 2100-2102.

NELSON J.C., MAZURE C.M., BOWERS M.B. Jr, JATLOW P.I. (1991). A preliminary, open study of the combination of fluoxetine and desipramine for rapid treatment of major depression. *Arch. Gen. Psychiatry* ; 48: 303-307.

OKA K., KOJIMA K., TOGARI A., NAGATSU T. (1984). An integrated scheme for the simultaneous determination of biogenics amines, precursor amino acids, and related metabolites by liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. B.* ; 308: 43-53.

ONG H., CAPET-ANTONINI F., YAMAGUCHI N., LAMONTAGNE D. (1982). Simultaneous determination of free 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid and free 3-methoxy-4-hydroxyphenylethylene glycol in plasma by liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. B.*; 233: 97-105.

ORSULAK P.J., DEBUS J.R., HIMMEL C., WITTMAN P. (1988a). Determination of the new antidepressant fluoxetine and its metabolite by HPLC and preliminary clinical studies. *Clin. Chem.* ;34: 1267.

ORSULAK J., KENNEY J.T., DEBUS J.R., CROWLEY G., WITTMAN P.D. (1988b). Determination of the antidepressant fluoxetine and its metabolite norfluoxetine in serum by reversed phase HPLC with ultraviolet detection. *Clin. Chem.*; 34: 1875-1878.

ORTIZ J., MARTINEZ E., GELPI E., ARTIGAS F. (1989). Rapid non-enzymatic HPLC determination of total MHPG in human plasma. *Life Sci.* ; vol 46: 239-246.

OWENS M.J., NEMEROFF C.B. (1994). Role of serotonin in the pathophysiology of depression: focus on the serotonin transporter. *Clin Chem* ; 40: 288-295.

PANDEY G.N., PANDEY S.C., JANICAK P.G., MARKS R.C., DAVIS J.M. (1990). Platelet serotonin-2 receptor binding sites in depression and suicide. *Biol. Psychiatry* ; 28: 215-222.

PANTAROTTO C., BELVEDERE G., FRIGERIO A., MANARA L., MENNINI T. (1976). Gas chromatographic - Mass fragmentographic identification and quantitative determination of reserpine in rat brain. *Advances in Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine*; Vol 1: 351-364.

PASTEL R.H., FERNSTROM J.D. (1987). Short-term effects of fluoxetine and trifluoromethylphenylpiperazine on electroencephalographic sleep in the rat. *Brain Res.*; 436: 92-102.

PETIT M., COLONNA L. (1986). Etats dépressifs, marqueurs clinico-biochimiques et orientations thérapeutiques. *Sem. Hôp. Paris*, 62 (27), 2059-2064.

PETIT M., DOLLFUS S. (1986). Facteurs biochimiques de résistance aux antidépresseurs. *L'Encéphale*; XII: 207-215.

PEYRIN L., PEQUINOT J.M. (1983). Free and conjugated 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol in human urine: peripheral origin of glucuronide. *Psychopharmacology*, 79: 16-20.

PEYRIN L., PEQUINOT J.M., CHAUPLANNAZ G., LAURENT B., AIMARD G. (1985). Sulfate and glucuronide conjugates of MHPG in urine of depressed patients: central and peripheral influences. *J. Neural Transm.* ; 63: 255-269.

PEYRIN L., PEQUINOT J.M., LACOUR J.R., FOURCADE J. (1987). Relationships between catecholamine or 3-methoxy-4-hydroxyphenyl glycol changes and the mental performance under submaximal exercise in man. *Psychopharmacology*, 93: 188-192.

PEYRIN L. (1990). Urinary MHPG sulfate as a marker of central norepinephrine metabolism: a commentary. *J. Neural Transm.* ; 80: 51-65.

PICHOT P., HAKIM C., MEISCH J.J., BOISSIER J.R. (1976). Action antidépressive du L-5-hydroxy-tryptophane et test au Probenécide. *Neuropsychopharmacology* ; 655-663.

PICHOT P. (1978). Les voies nouvelles de la dépression. Eds. Masson: Paris.

PICKAR D., SWENNB Y D.R., MAAS J.W., HENINGER G.R. (1974). Primary affective disorder, clinical state change and MHPG excretion. *Arch. Gener. Psychiat.*; 30: 234-239.

PIETRASZEK M.H., URANO T., SUMIYOSHI K., TAKADA Y., TAKADA A., OHARA K., KONDO N., OHARA K. (1992). Diurnal variations of whole serotonin content in patients with depression and neurosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 55: 336.

PILETZ J.E., HALARIS A. (1989). Gas-liquid chromatographic method for routine detection of plasma sulfo-, gluco-, and free 3-methoxy-4-hydrophenylglycol. *Clin. Chim. Acta* ; 185: 165-176.

PORSOLT R.D., BERTIN A., BLAVET N., DENIEL M., JALFRE M. (1979). Immobility induced by forced swimming in rats: effects of agents which modify central catecholamine and serotonin activity. *Eur. J. Pharmacol.* ; 57: 201-210.

POST R.M. and GOODWIN F.K. (1974). Effects of amitriptyline and imipramine on amine metabolites in cerebrospinal fluid on depressed patients. *Arch. Gener. Psychiatry* ; 30: 234-239.

RAFAELSEN O.J. (1980). Biology of manic melancolic disorders. *Med. Journ. Austr.* ; June 28: 637-643.

RICKELS K., AMSTERDAM J.D., AVALONE M.F. (1986). Fluoxetine in major depression. A controlled study. *Current Therapeutic Research Clinical and Experimental* ; 39: 559-563.

RIDGES P.A. (1980). The amine hypothesis in relation to the present understanding of depressive illness. *Brit. J. Clin. Pract.* ; suppl 7: 12-21.

ROPERT R. (1989). Fluoxétine versus clomipramine dans les dépressions ambulatoires d'intensité modérée. Communication au Symposium " dépression ". Evolution des Concepts; Paris.

ROSENBAUM A.H., SCHATZBERG A.F., MARUTA T., (1980). MHPG as a predictor of antidepressant response to imipramine and maprotiline. *Am. J. Psychiatry* ; 137; 9: 1090-1092.

ROSS S.B., RENYI A.L. (1977). Inhibition of the neuronal uptake of 5-hydroxytryptamine and noradrenaline in rat brain by (Z)- and (E)-3-(4-bromophenyl)-N,N-dimethyl-3-(3-pyridyl) allylamines and their secondary analogues. *Neuropharmacology* ; 16: 57-63.

ROSS S.B., HALL H., RENYI A.L., WESTERLUND D. (1981). Effects of Zimelidine on serotonergic and noradrenergic neurons after repeated administration in the rat. *Psychopharmacology* ; 72: 219-225.

SANTAGOSTINO G., FRATTINI P., SCHINELLI S., CUCCHI M.L., CORONA G.L. (1982). Urinary 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol determination using reversed phase chromatography with amperometric detection. *J. Chromatogr. B.* ; 233: 89-95.

SARRIAS M.J., CABRE P., MARTINEZ E. (1987). Decreased plasma serotonin in melancholic patients: a study with clomipramine. *Biol Psychol* ; 22: 1429-1438.

SASA S., LEROY BIANK C., WENKE D.C., SCZUPAK C.A. (1978). Liquid chromatography determination of serotonin in serum and plasma. *Clin. Chem.* ; 2; 1509-1514.

SCHILDKRAUT J.J. (1965). The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am. J. Psychiatry* ; 122: 509-522.

SCHILDKRAUT J.J., KEEBER B.A., GRAB E.L., KANTROWICH J., HARTMANN E. (1973). MHPG excretion and clinical classification in depressive disorders. *Lancet* ; 1: 1251-1252.

SCHILDKRAUT J.J., ORSULAK P.J., LABRIE R.A., SCHATZBERG A.F., GUDEMAN J.E., COLE J.O., ROHDE W.A. (1978). Toward a biochemical classification of depressive disorders.

I/ Differences in urinary excretion of MHPG and other catecholamine metabolites in clinically defined subtypes of depressions. *Arch. Gen. Psychiatr.* ; 35: 1427-1433

II/ Application of multivariate function analysis to data on urinary catecholamine and metabolites. *Arch. Gen. Psychiatr.* ; 35: 1436-1439.

SCHILDKRAUT J.J. (1978). Current status of the catecholamine hypothesis of affective disorders. *Psychopharmacology* ; 1223-1234.

SCHILDKRAUT J.J., ORSULAK P.J., SCHATZBERG A.F., ROSENBAUM A.H. (1983). Relationship between psychiatric diagnostic groups of depressive disorders and MHPG. *In* MHPG: Basic mechanisms and psychopathology. Maas J.W; ed. New York Academic Press; 129-144.

SCHINELLI S., SANTAGOSTINO G., FRATTINI P., CUCCHI M.L., CORONA G.L. (1985). Assay of 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol in human plasma using HPLC with amperometric detection. *J. Chromatogr. B.*; 338: 396-400.

SCHMIDT M.J., FULLER R.W., WONG D.T. (1988). La fluoxétine, un inhibiteur hautement sélectif de la recapture de la sérotonine; revue des études pré-cliniques. *Brit. J. Psychiatry*; 153 (suppl. 3): 43-50.

SCHWEITZER E., RICKELS K., AMSTERDAM J.D., FOX I., PUZZUOLI G., WEISE C. (1990). What constitutes an adequate antidepressant trial for fluoxetine? *J. Clin. Psychiatry*; 51: 8-11.

SEMBA J., WATANABE A., TAKAHASHI R. (1985). Determination of free and total 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol in human plasma by HPLC with electrochemical detection. *Clin. Chim. Acta*; 152: 185-192.

SHARPLESS N.S., HALBREICH U., FELDFOGEL H. (1986). Determination of total 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol in human plasma using reversed HPLC with electrochemical detection. *J. Chromatogr. B.* ; 377: 101-109.

SHEA P.A., HOWELL J.B. (1984). HPLC method for determining plasma and urine 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol by amperometric detection. *J Chromatogr. B.*; 306; 358-363.

SHIPE J.R., SAVORY J., WILLS M.P.R. (1984). Improved liquid chromatographic determination of 3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol in urine with electrochemical detection. *Clin. Chem.* ; 30: 140-143.

SHUM A., SOLE M.J., VAN LOON G.R. (1982). Simultaneous measurement of 5-hydroxytryptophan and L-Dihydroxy phenylalanine by HPLC with electrochemical detection. Measurement of serotonin and catecholamine turnover in discrete brain regions. *J. Chromatogr. B.* ; 228: 123-130.

SLATER I.H., JONES G.T., MOORE R.A. (1978). Inhibition of REM sleep by fluoxetine, a specific inhibitor of serotonin uptake. *Neuropharmacology* ; 17: 383-389.

SLATER I.H., RATHBUN R.C., KATTAU R. (1979). Role of 5-hydroxy tryptaminergic and adrenergic mechanism in antagonism of reserpine-induced hypothermia in mice. *J. Pharm. Pharmacol.* ; 31: 108-110.

STARK P., HARDISON C.D. (1985). A review of multicentre controlled studies of fluoxetine versus imipramine and placebo in out patients with major depressive disorder. *J. Clin. Psychiatry* ; 46: 53-58.

SWEENEY D.R., LECKMAN J.F., MAAS J.W., HATTOX S., HENINGER G.R. (1980). Plasma free and conjugated MHPG in psychiatric patients. *Arch. Gen. Psychiatry* ; 37: 1100-1103.

TAGARI P., BOULLIN D.J., DAVIES C.L. (1984). Simplified determination of serotonin in plasma by liquid chromatography with electrochemical detection. *Clin. Chem.* ; 30: 131-135.

THIEBOT M.H., HAMON M. (1996). Un agent multiple: la sérotonine. *Pour la Science*; 221: 82-89.

TISSOT R. (1975). Un concept hypothétique: l'unité physiopathologique des psychoses monoaminergiques. *L'Encéphale* ; 1; 4: 289-339.

TOROK-BOTH G.A., BAKER G.B., COUTTS R.T., McKENNA K.F., ASPESLET L.J. (1992). Simultaneous determination of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in biological samples by gas-chromatography with electron-capture detection. *J. Chromatogr. B.* ; 579: 99-106.

TOURATIER S., PRADEAU D. (1992). Validation d'une méthode analytique appliquée aux dosages du médicament. L'analyse pratique du médicament. Eds Médicales Internationales.

TRASKMAN L., ASBERG M., BERTILSSON L. (1979). Plasma levels of chlorimipramine and its desmethylmetabolite during treatment of depression. *Clin. Pharmacol. Ther.* ; 26: 600-610.

TROUVIN J.H., DESALLES M.C., MAHUZIER G. (1983). Séparation des antidépresseurs polycycliques et de leurs principaux métabolites par chromatographie en phase liquide à polarité de phase inversée. *Analisis*; vol 11-6: 278-283.

TROUVIN J.H., GARDIER A.M., CHANUT E., PAGES N., JACQUOT C. (1993). Time course of brain serotonin metabolism after cessation of long-term fluoxetine treatment in the rat. *Life Sci.*; vol 52: 187-192.

TSUCHIYA H., HAYASHI T., TATSUMI M. (1989). HPLC analysis for serotonin and tryptamine excreted in urine after oral loading with L-tryptophan. *Clin. Chem.* ; 35: 43-47.

VALLI M., LANCON C., BOUGEROL T. (1987). Caractérisation préliminaire du MHPG plasmatique total dans la dépression. *J. Psychiat. Biol. Ther.*; 27: 5-11.

VAN PRAAG H.M., KORF J., PUITE J. (1970). 5 HIAA levels in the cerebrospinal fluid of depressive patients treated with probenecid. *Nature*; 225: 1259-1260.

VAN PRAAG H.M., KORF J., DOLS L.C.W., SCHUT T. (1972). A pilot study of the value of the probenecid test in application of the 5 HTP as antidepressant. *Psychopharmacologia* ; 25; 1: 14-21

VAN PRAAG H.M., KORF J., SCHUT D. (1973). Cerebral monoamines and depression. An investigation with the probenecid technique. *Arch. Gen. Psychiatry* ; 28; 827-831.

VAN PRAAG H.M., KORF J. (1974a). Serotonin metabolism in depression: Clinical application of the probenecid test. *Int. Pharmacopsychiatry*; 9: 35-41.

VAN PRAAG H.M., KORF J. (1974b). 5-hydroxytryptophan as an antidepressant: the predictive value of the probenecid test. *J. Nerv. Ment. Dis.*; 158; 5: 331-337.

VAN PRAAG H.M. (1977). New evidence of serotonin deficient depressions. *Neuropsychobiology* ; 3: 56-63.

VAN PRAAG H.M., DEHANN S. (1979). Central serotonin metabolism and frequency of depression. *Psychiat. Research* ; 1; 219-224.

VAN PRAAG H.M. (1981). Management of depression with serotonin precursors. *Biol. Psychiat.* ; 16: 291-310.

VAROQUAUX O., MORIN D., ADVENIER C., PAYS M. (1988). Dosage de la sérotonine libre et totale dans le plasma et le sérum par CLHP-EC. *Ann. Biol. Clin.* ; 46: 576-611.

WERNICKE J.F., DUNLOP S.R., DORNSEIF B.E., ZERBE R.L. (1987). Fixed dose fluoxetine therapy for depression. *Psychopharmacol. Bull.* ; 23: 164-168.

WINER B.J. (1971). Statistical principles. Dans « Experimental design »; *Mc Graw-Hill, Inc, New-York*; vol 1, 2nd ed.

WONG D.T., HORNG J.S., BYMASTER F.P., HAUSER K.L., MOLLOY B.B. (1974). A selective inhibitor of serotonin uptake: Lilly 110140, 3-(p-trifluorométhyl phénoxy)-N-méthyl-3-phényl propylamine. *Life Sci.* ; 15: 471-479.

WONG D.T., BYMASTER F.P., HORNG J.S., MOLLOY B.B. (1975). A new selective inhibitor for uptake of serotonin into synaptosomes of rat brain: 3-(p-trifluorométhyl phénoxy)-N-méthyl-3-phényl propylamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*; 193: 804-811.

WONG D.T., BYMASTER F.P. (1981). Subsensitivity of serotonin receptors after long-term treatment of rats with fluoxetine. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* ; 32: 41-51.

WONG D.T., BYMASTER F.P., REID L.R., THRELKELD P.G. (1983). Fluoxetine and two other serotonin uptake inhibitors without affinity for neuronal receptors. *Biochem. Pharmacol.* ; 32: 1287-1293.

WONG D.T., REID L.R., BYMASTER F.P., THRELKELD P.G. (1985). Chronic effects of fluoxetine, a selective inhibitor of serotonin uptake, on neurotransmitter receptors. *J. Neural Transm.* ; 64: 251-269.

YOUNG J.P.R., COLEMAN A., LADER M.H. (1987). A controlled comparison of fluoxetine and amitriptyline in depressed out-patients. *Brit. J. Psychiatry* ; 151: 337-340.

ZARIFIAN E. (1979). Hypothèses monoaminergiques dans la dépression. *Ann. Biol. Clin.* ; 37; 21-26.

ZARIFIAN E., CUCHE H. (1980). Caractéristiques biochimiques des dépressions et leurs traitements pharmacologiques. *Rev. Méd.*; 21: 673-677.

ZEMISHLANY Z., MUNITZ H., ROTMAN A., WIJSENBEEK H. (1982). Increased uptake of serotonin by blood platelets from patients with bipolar primary affective disorder-bipolar type. *Psychopharmacology* ; 77: 175-178.