

2M11.2707.10

Université de Montréal

Effet des antidépresseurs sur le captage de calcium ATP-dépendant
par le réticulum endoplasmique neuronal.

par

Lucie Couture

Département de pharmacologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du
grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en pharmacologie

Mars 1999

© Lucie Couture, 1999



01.2019.11.16

W

4

U58

1999

v.013

Université de Montréal

Il s'agit des activités prévues pour le stage de colonie A TI-dépendant

par le titulaire en endocrinologie normale

Dr

Dr

Dr. Colette

Département de pharmacologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du

grade de maître en sciences (M.Sc.)

en pharmacologie

Mars 1999

Dr. Colette



Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Effet des antidépresseurs sur le captage ATP-dépendant de calcium
par le réticulum endoplasmique neuronal

présenté par:

Lucie Couture

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Mahmoud Sharkawi, Ph.D

Pierre-André Lavoie, Ph.D

Robert Élie, M.D, Ph.D

Louis-Éric Trudeau, Ph.D

Mémoire accepté le: 28 juin 1999

SOMMAIRE

Des recherches antérieures soutiennent qu'une trop grande concentration de calcium libre intracellulaire pourrait être une cause de l'apparition de maladies affectives telle la dépression. Nous savons l'existence d'une pompe calcique dépendante de l'ATP au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique. Cette Ca^{2+} -ATPase a la fonction de tamponner la forte concentration de calcium intracellulaire, présente lors de la dépolarisation neuronale, en faisant pénétrer deux ions calcium à l'intérieur du réticulum endoplasmique sous l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. Le but de la recherche est donc d'examiner l'effet des antidépresseurs tricycliques et atypiques sur le captage ATP-dépendant de calcium par le réticulum endoplasmique neuronal, puisqu'une stimulation de cette pompe calcique par les antidépresseurs serait compatible avec une normalisation du signal calcique trop élevé présent lors de la maladie affective.

Pour ce faire, des synaptosomes (terminaisons présynaptiques de neurones) provenant du cortex de cerveaux de rats sont recueillis par centrifugation différentielle. Chaque expérience a été effectuée avec des doses croissantes de 0 à 200 μM d'un antidépresseur donné. Pour chacune des expériences, un milieu de captage à l'état basal (sans ATP) et à l'état stimulé (avec ATP) fut

produit, et les résultats du captage ATP-dépendant de calcium furent obtenus par la différence de captage entre les deux états.

Les résultats, pour les antidépresseurs tricycliques (imipramine, désipramine, amitriptyline, clomipramine), suggèrent une légère inhibition du captage ATP-dépendant de calcium en fonction de la dose (0,06 à 200 μM). Pour ce qui est des antidépresseurs atypiques (miansérine et son métabolite desméthylmiansérine, venlafaxine et son métabolite O-desméthylvenlafaxine, fluoxétine) on remarque également un effet inhibiteur dose-dépendant (0,06 à 200 μM), plus marqué pour les concentrations les plus élevées.

Étant donné ces inhibitions, ces résultats signifient donc que les antidépresseurs tricycliques et atypiques étudiés ne sont pas associés à une stimulation du captage ATP-dépendant de calcium par le réticulum endoplasmique neuronal. Ainsi l'éventuelle normalisation, par les antidépresseurs, d'un signal calcique trop élevé qui serait impliqué dans l'étiologie des maladies affectives ne peut être due à un effet des antidépresseurs sur le réticulum endoplasmique.

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire	iii
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des sigles et abréviations.....	xi
Remerciements.....	xiv
INTRODUCTION.....	1
I. GÉNÉRALITÉS.....	2
II. PHARMACOLOGIE DU CAPTAGE ATP-DÉPENDANT.....	14
III. CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES DES ANTIDÉPRESSEURS.....	20
A. Les antidépresseurs tricycliques.....	25
1. Imipramine.....	26
2. Désipramine.....	27
3. Amitriptyline.....	27
4. Clomipramine.....	27
B. Les inhibiteurs de la monoamine oxydase (IMAO).....	28
C. Les antidépresseurs atypiques.....	28
1. Miansérine.....	28
2. Fluoxétine.....	29

3. Venlafaxine.....	30
IV. PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIF DE RECHERCHE.....	39
MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	41
I. MATÉRIEL.....	42
A. Animaux.....	42
B. Produits chimiques et solutions.....	42
1. Produits chimiques.....	42
2. Solutions.....	44
a. Solutions utilisées.....	44
b. Solutions "stock" préparées.....	47
C. Appareils et autre matériel.....	47
1. Appareils.....	48
2. Autre matériel.....	48
II. MÉTHODE EXPÉRIMENTALE.....	49
A. Préparation de terminaisons nerveuses présynaptiques (synaptosomes) lysées à partir du cortex.....	49
B. Captage ATP-dépendant de calcium dans les synaptosomes lysés.....	51
III. MÉTHODE STATISTIQUE.....	56
RÉSULTATS.....	57

I. EFFETS DES ANTIDÉPRESSEURS TRICYCLIQUES.....	58
II. EFFETS DES ANTIDÉPRESSEURS ATYPIQUES.....	62
DISCUSSION.....	70
BIBLIOGRAPHIE.....	77

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Blocage du recaptage des neurotransmetteurs noradrénaline (NA), sérotonine (5-HT) et dopamine (DA) par les différents antidépresseurs utilisés dans notre étude.....	31
--	----

LISTE DES FIGURES

- Figure 1:** Principaux mécanismes de tamponnage de calcium grâce auxquels les cellules nerveuses maintiennent une faible concentration intracellulaire de cet ion (10^{-7} M)..... 8
- Figure 2:** Cycle de pompage de la Ca^{2+} -ATPase du réticulum endoplasmique et sarcoplasmique..... 13
- Figure 3:** Diagramme résumant la méthode expérimentale utilisée..... 54
- Figure 4a:** Effet des antidépresseurs tricycliques sur le captage de calcium en présence d'ATP (état stimulé) et en absence d'ATP (état basal)..... 66
- Figure 4b:** Effet des antidépresseurs tricycliques sur le captage net ATP-dépendant de calcium..... 67
- Figure 5a:** Effet des antidépresseurs atypiques sur le captage de calcium en présence d'ATP (état stimulé) et en absence d'ATP (état basal)..... 68

Figure 5b: Effet des antidépresseurs atypiques sur le captage net ATP-
dépendant de calcium..... 69

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

5-HT: sérotonine

ADP: adénosine 5'-diphosphate

ARN_m: acide ribonucléique messenger

ATP: adénosine 5'-triphosphate

ATPase: adénosine triphosphatase

b_c: pente commune

BHQ: 2,5,-di(*tert*-butyl)-1,4-benzohydroquinone

⁴⁵Ca²⁺: calcium radioactif

Ca²⁺: ion calcium

[Ca²⁺]: concentration calcique

Ca²⁺-ATPase: calcium adénosine triphosphatase

CPA: acide cyclopiazonique

DA: dopamine

DAG: diacylglycérol

DHVSr: récepteur dihydropyridine sensible au voltage

dpm: désintégration par minute

F: coefficient de Fisher

F': coefficient de Fisher ajusté

g: force gravitationnelle au niveau de la mer

IMAO: inhibiteur de la monoamine oxydase

IP₃: inositol 1,4,5-triphosphate

K⁺: ion potassium

M: molaire

MAO: monoamine oxydase

mg: milligramme

Mg²⁺: ion magnésium

ml: millilitre

mm: millimètre

mM: millimolaire

ms: milliseconde

NA: noradrénaline

Na⁺: ion sodium

nM: nanomolaire

NS: non significatif

p: probabilité statistique

P: phosphate

P_i: phosphate inorganique

pH: $-\log [H^+]$

PIP₂: phosphatidylinositol 4,5-biphosphate

PLC: phospholipase C

SEM: erreur type

SERCA: Ca^{2+} -ATPases des réticulum sarco(endo)plasmiques

SSRI: inhibiteur sélectif de la recapture neuronale de la sérotonine

Tg: thapsigargin

μCi : microcurie

μg : microgramme

μm : micromètre

μM : micromolaire

μmol : micromole

$^{\circ}\text{C}$: degré Celsius

REMERCIEMENTS

Docteur Pierre-André Lavoie, Ph.D.

Professeur titulaire

Département de pharmacologie

Je tiens à remercier sincèrement Dr. Lavoie qui m'a permis d'accomplir cette recherche par son support et sa rigueur scientifique. J'ai grandement apprécié votre disponibilité et votre dévouement.

Docteur Robert Élie, M.D., Ph.D.

Professeur titulaire

Centre de Recherche Fernand Séguin

Je voudrais exprimer ma profonde gratitude envers le Dr. Élie pour ses nombreux encouragements et pour son immense générosité à partager ses connaissances. Merci pour vos bons conseils.

Docteur Guy Beauchamp, Ph.D.

Je tiens à remercier Dr. Beauchamp pour sa collaboration au niveau méthodologique.

Mme Elizabeth Pérès

Je remercie Mme Pérès pour sa précieuse aide technique au niveau de l'infographie.

INTRODUCTION

I. GÉNÉRALITÉS

La jonction neuromusculaire a été la première synapse à être caractérisée. En effet, au début des années 1920, il y a eu la première preuve de l'existence de la neurotransmission chimique où l'acétylcholine a agi sur le muscle cardiaque pour ralentir son battement (Loewi, 1921). Quelques années plus tard, on découvrait que la libération de l'acétylcholine, suite à une stimulation du nerf moteur innervant un muscle squelettique, provoquait la contraction de celui-ci (Dale et Gaddum, 1930). Un schéma de la transmission synaptique a été établi en 1948: dépolarisation du nerf moteur → potentiel dans la terminaison → libération d'acétylcholine → contraction (Eccles, 1948; Hunt et Kuffler, 1950; Rosenblueth, 1950). Ces découvertes ont donc engendré une longue et importante série d'expériences qui débuta dans les années 1950 dans le but d'établir le fonctionnement de la jonction neuromusculaire.

L'élément de base de la transmission chimique est le potentiel d'action qui est propagé le long de l'axone par l'ouverture et la fermeture de canaux ioniques. Rendu à la terminaison axonale, ce potentiel d'action ouvre des canaux calciques, particulièrement concentrés au niveau des terminaisons présynaptiques, faisant par conséquent pénétrer des ions calcium à l'intérieur de la terminaison axonale du neurone moteur (Katz et Miledi, 1968). Ce courant calcique entrant est possible

grâce au fort gradient existant entre le taux de Ca^{2+} libre dans le liquide extracellulaire qui se situe autour de 10^{-3} M et la concentration cytosolique de ce même ion qui est de 10^{-7} M (DiPolo et coll., 1976; Connor et coll., 1986). L'élévation de la concentration de Ca^{2+} dans la terminaison axonale engendre la fusion des vésicules synaptiques, contenant le neurotransmetteur acétylcholine, avec la membrane présynaptique. Cette exocytose libère ainsi le contenu vésiculaire en acétylcholine dans la fente synaptique. Les canaux calciques dépendants du voltage ont donc un rôle extrêmement important dans le processus de transmission synaptique car ils sont responsables de la conversion des signaux électriques (dépolariation de la membrane) en modification chimique (libération d'acétylcholine) dans les cellules nerveuses (Katz, 1969; Rubin, 1970; Miledi, 1973; Llinas et Nicholson, 1975). Par la suite, les molécules d'acétylcholine agissent sur la cellule postsynaptique musculaire en se liant à leurs récepteurs-canaux. Lorsqu'occupés par l'acétylcholine, les récepteurs de la membrane plasmique de la cellule musculaire changent de conformation et leurs canaux ioniques s'ouvrent devenant ainsi perméables aux cations. Le changement de potentiel de membrane engendré à la plaque motrice provoque l'ouverture de canaux ioniques voltage-dépendants déclenchant ainsi un potentiel d'action dans la cellule postsynaptique musculaire.

La membrane plasmique de la cellule musculaire, une fois dépolarisée, propage son potentiel d'action jusqu'aux tubules transverses, extension de la membrane plasmique (Peachey et Franzini-Armstrong, 1983), d'où il affectera le réticulum sarcoplasmique, site important de stockage des ions calcium. Le processus par lequel ceci se produit implique le récepteur dihydropyridine sensible au voltage (DHVSR) dans la membrane du tubule transverse. Lorsque cette membrane est dépolarisée, le changement de voltage est communiqué par le DHVSR au récepteur à la ryanodine (Gill, 1989), situé dans la membrane du réticulum sarcoplasmique, ce qui provoque sans délai l'ouverture du canal calcique. Le Ca^{2+} s'échappe ainsi du récepteur-canal vers le cytoplasme, où il déclenche la contraction musculaire en levant l'inhibition de l'interaction entre les filaments d'actine et de myosine (Weber, 1966; Weber et Murray, 1973). La libération de calcium peut également être provoquée par l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3). En effet, l'interaction spécifique d'un agoniste avec son récepteur de la membrane plasmique peut induire, par activation de la phospholipase C (PLC) et l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP_2), la génération d' IP_3 et de diacylglycérol (DAG). Les récepteurs à l' IP_3 dans la membrane du réticulum sarcoplasmique, lorsque activés, induisent la libération de calcium (Abdel-Latif, 1986).

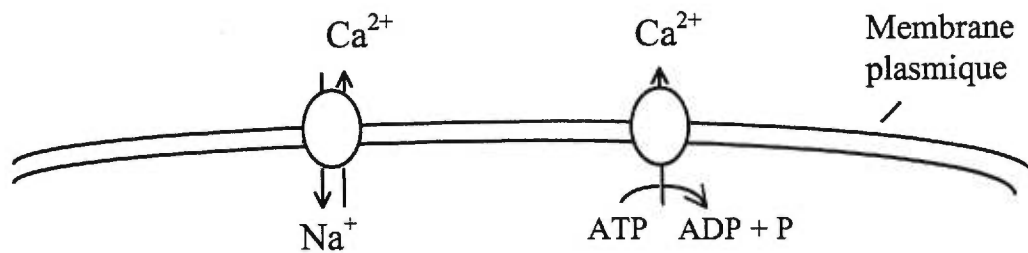
L'augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique est transitoire car les ions calcium sont rapidement pompés à l'intérieur du réticulum sarcoplasmique par une Ca^{2+} adénosinetriphosphatase (ATPase) localisée dans sa membrane, pour permettre la relaxation de la cellule musculaire, c'est-à-dire le détachement des filaments d'actine et de myosine (Tada et coll., 1978; Inesi, 1979). L'implication de la pompe calcique du réticulum sarcoplasmique dans le mécanisme de contraction-relaxation a été constatée en 1958 où une expérience a consisté à dénaturer l'ATPase des "granules" ce qui a aboli le mécanisme de relaxation du muscle squelettique (Ebashi, 1958). Le rôle du réticulum sarcoplasmique a de nouveau été mis en évidence au début des années 1960 où une préparation de microsomes de muscle a fait disparaître du milieu un taux de Ca^{2+} significatif, dans un processus dépendant de l'ATP (Gergely et Parker, 1960; Hasselbach et Makinose, 1961). Cette Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarcoplasmique est probablement la pompe calcique la mieux caractérisée. En fait, elle a été purifiée en 1970 où elle s'est révélée détenir un poids moléculaire de 100 000 daltons (MacLennan, 1970). On sait également qu'elle possède trois domaines cytoplasmiques et dix hélices transmembranaires (MacLennan et coll., 1985). Cette pompe transporte deux ions calcium vers l'intérieur du réticulum sarcoplasmique lorsqu'une molécule d'ATP est hydrolysée (Hasselbach, 1964). Cette pompe Ca^{2+} -ATPase représente 90% des protéines membranaires totales du réticulum sarcoplasmique des cellules musculaires (Carafoli, 1987), ce qui en a

facilité l'étude. La concentration cytosolique de Ca^{2+} revient au niveau basal en 30 ms, provoquant ainsi le relâchement de la contraction musculaire. Le réticulum sarcoplasmique dans les cellules musculaires s'est donc révélé, au cours des nombreuses recherches effectuées sur le sujet, un réservoir d'ions calcium indispensable dans le mécanisme de contraction musculaire car en plus de libérer le Ca^{2+} requis pour la contraction, le réticulum sarcoplasmique joue le rôle de site d'entreposage pour ce même ion.

Il a été mentionné plus tôt qu'une entrée importante d'ions calcium du liquide extracellulaire vers le cytosol des terminaisons présynaptiques était requise pour la libération du neurotransmetteur. Afin qu'un tel mécanisme ait lieu, il est nécessaire que la concentration cytosolique en ions calcium dans la terminaison axonale demeure faible; ce qui est réalisé de plusieurs façons dans les cellules nerveuses. En premier lieu, il y a présence d'une ATPase de haute affinité pour le Ca^{2+} dans la membrane plasmique neuronale qui utilise l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour pomper les ions Ca^{2+} hors de la cellule. Il existe également un transport actif secondaire dans la membrane plasmique qui couple un flux sortant de Ca^{2+} au flux entrant de Na^+ . Trois ions sodium se déplacent vers l'intérieur de la cellule pour chaque ion calcium qui en est excrété. Cet échange $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ a par contre une faible affinité et n'entre en fonction que lorsque la concentration de Ca^{2+} cytosolique est dix fois supérieure à la normale. Un troisième moyen peut

aussi être impliqué pour maintenir la concentration basale de Ca^{2+} cytosolique; c'est une pompe de faible affinité située dans la membrane interne de la mitochondrie. Bien que son implication demeure plus obscure, on sait qu'elle utilise le gradient électrochimique qui se forme au travers de cette membrane au cours de la phosphorylation oxydative. Une dernière pompe calcique est la Ca^{2+} -ATPase de la membrane du réticulum endoplasmique neuronal qui joue un rôle primordial dans le maintien d'un faible taux d'ions calcium dans le cytoplasme. Ce transport actif primaire de haute affinité fait entrer deux ions calcium pour chaque molécule d'ATP hydrolysée. Cette pompe permet l'entrée de Ca^{2+} du cytosol contre un fort gradient de concentration, même lorsque le taux de Ca^{2+} cytoplasmique est faible. C'est cette importante pompe de la membrane du réticulum endoplasmique neuronal qui est au premier plan de l'étude rapportée dans ce mémoire. Pour ce qui est de la mitochondrie, une étude a confirmé que ce sont les transports non-mitochondriaux dépendants de l'ATP qui sont principalement à l'origine du tamponnage de l'excès de calcium cytosolique (Budd et Nicholls, 1996). Ainsi, les mécanismes décrits ci-dessus contribuent au fait que la terminaison axonale soit prête à transmettre un autre signal aussi rapidement que l'axone est prêt à en délivrer un.

MILIEU
EXTRACELLULAIRE
[Ca²⁺] ≈ 10⁻³ M



CYTOPLASME
[Ca²⁺] ≈ 10⁻⁷ M

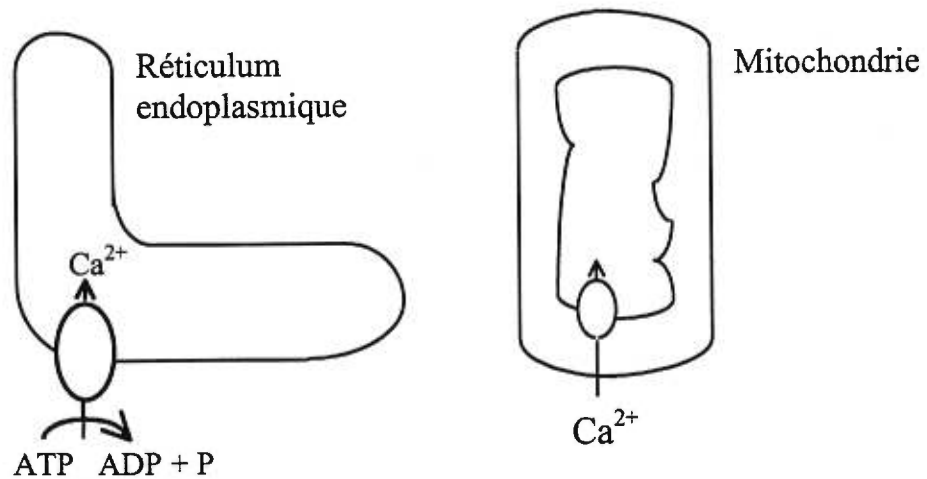


Figure 1 : Principaux mécanismes de tamponnage de calcium grâce auxquels les cellules nerveuses maintiennent une faible concentration intracellulaire de cet ion (10⁻⁷ M).

Les premiers travaux concernant la Ca^{2+} -ATPase intracellulaire ont été effectués sur la pompe calcique du réticulum sarcoplasmique des cellules musculaires, mais l'intérêt pour la Ca^{2+} -ATPase du réticulum endoplasmique s'est par la suite rapidement manifesté pour deux raisons. Tout d'abord, on s'est aperçu que la mitochondrie ne jouait pas de rôle majeur dans l'équilibre cytosolique du Ca^{2+} (Vercesi et coll., 1978; Somlyo et coll., 1979), laissant le réticulum endoplasmique comme étant la structure intracellulaire alternative pouvant être impliquée dans le processus. De plus, la découverte que le second messenger inositol triphosphate libérait du Ca^{2+} d'un compartiment intracellulaire qui apparaissait être comme le réticulum endoplasmique (Prentki et coll., 1984; Streb et coll., 1984; Ueda et coll., 1986) a également attiré l'attention vers cet organe pour la régulation de la concentration cytosolique d'ions calcium.

Au fil des expériences sur la pompe calcique du réticulum endoplasmique, des analogies importantes ont été soulevées avec celle du réticulum sarcoplasmique. Entre autres, dans des microsomes de foie, des études ont démontré l'existence d'un transport d'ions calcium requérant de l'ATP (Famulski et Carafoli, 1982) qui utilise une Ca^{2+} -ATPase très similaire à celle du réticulum sarcoplasmique des muscles, car des études biochimiques comparatives ont suggéré de fortes ressemblances au point de vue fonctionnel, moléculaire et cinétique entre les pompes calciques des deux organites (Heilmann et coll., 1983). De plus, ces

similitudes ont également été présentées dans un autre type cellulaire, la cellule du muscle lisse, dans laquelle le réticulum endoplasmique renferme une Ca^{2+} -ATPase également apparentée à celle du réticulum sarcoplasmique (Wuytack et coll., 1989).

La biologie moléculaire a par la suite convaincu les chercheurs de la parenté entre les pompes calciques du réticulum sarcoplasmique des muscles striés et les pompes calciques du réticulum endoplasmique de divers types cellulaires. En effet, suite à l'étude plus poussée des séquences en acides aminés de ces protéines, l'ensemble de ces pompes calciques a été regroupé en une seule famille appelée Ca^{2+} -ATPases des réticulum sarco(endoplasmiques) (SERCA). Trois gènes SERCA ont été identifiés: SERCA 1, 2 et 3. Les isoformes provenant de ces gènes ont approximativement le même nombre d'acides aminés mais des séquences variables à l'extrémité carboxy-terminale. Ils ont 75-85 % d'homologie de séquence. De ces isoformes, SERCA 1 est uniquement exprimé dans les muscles squelettiques à contraction rapide. Un épissage alternatif de ce transcrit primaire résulte en l'isoforme SERCA 1b, un isoforme néonatal (Brandl et coll., 1986, 1987; Korczak et coll., 1988). Pour SERCA 2, le transcrit primaire du gène est également soumis à un processus de différenciation selon les tissus, qui est responsable de la génération de SERCA 2a, une forme spécifique aux muscles, exprimée dans le muscle squelettique (MacLennan et coll., 1985), cardiaque

(Lytton et coll., 1988) et également dans le muscle lisse (Eggermont et coll., 1989, 1990; Lytton et coll., 1989). L'isoforme SERCA 2b semble être ubiquitaire et donc exprimé dans tout type cellulaire. De façon plus détaillée, le clonage et le séquençage des ADN complémentaires dérivés de SERCA 2 ont révélé quatre classes distinctes, chacune dérivant du même transcrit de gène. L'ARN_m de classe 1 est traduit en protéine SERCA 2a, tandis que la deuxième, troisième et quatrième classe correspondent à la protéine SERCA 2b. La distribution des ARN_m de SERCA 2 de la quatrième classe en fait le type d'ARN_m majoritaire à l'intérieur du cerveau et du cervelet et de plus, cette classe d'ARN_m n'a pas été retrouvée dans d'autres tissus donc elle est spécifique aux cellules neuronales (Wuytack et coll., 1992). Le gène SERCA 3 est pour sa part moins bien documenté mais semble être exprimé dans plusieurs tissus tels la rate, le pancréas, les poumons, l'estomac, les intestins, l'utérus et le cervelet (Burk et coll., 1989; Wu et coll., 1995). SERCA 3 s'est révélé avoir une affinité réduite pour le Ca²⁺ en comparaison à SERCA 1 et SERCA 2 (MacLennan et coll., 1992). Par conséquent, le haut degré d'homologie entre les isoformes de SERCA suggère que ces isozymes partagent des mécanismes fondamentaux communs pour lier le Ca²⁺ et coupler l'hydrolyse subséquente de l'ATP au transport d'ions calcium.

Un autre fait convainquant de la similitude des Ca²⁺-ATPases des réticulum sarco(endo)plasmiques est l'étude qui a démontré que la thapsigargin, un

promoteur de tumeur, pouvait inhiber sans exception toutes les pompes calciques de la famille SERCA à une puissance égale . De plus, cette même substance même à doses plus fortes n'a pas la possibilité d'affecter l'activité de la Ca^{2+} -ATPase et de la Na^+/K^+ -ATPase de la membrane plasmique. Ceci suggère donc que la thapsigargin interagit avec un site de reconnaissance spécifique commun retrouvé seulement dans les Ca^{2+} -ATPases des réticulum sarco(endo)plasmiques (Thastrup et coll., 1990; Lytton et coll., 1991).

Plusieurs étapes régissent le transport de Ca^{2+} par l'ATPase de la membrane du réticulum endoplasmique (figure 2). Le mécanisme a été étudié dans les microsomes de foie par Heilmann et coll. (1989). Tout d'abord, il y a le substrat physiologique MgATP, des ions calcium et l'enzyme ATPase (E) à la surface externe (cytoplasmique) de la membrane. Dans un processus catalysé par le Ca^{2+} et le Mg^{2+} , le résidu phosphate terminal de l'ATP est transféré à l'enzyme résultant en la formation d'une acyl-phosphoprotéine intermédiaire liée au Ca^{2+} et au Mg^{2+} . Cette étape mène également à la libération de l'ADP dans le cytosol. Dû à un changement de conformation de la phosphoenzyme (EP), il y a translocation d'ions calcium à la surface interne de la membrane du réticulum endoplasmique où ces derniers se dissocient finalement suivant la baisse de l'affinité de liaison du Ca^{2+} . Dans la dernière étape, probablement catalysée par le Mg^{2+} qui est toujours lié à la phosphoenzyme, celle-ci est clivée par hydrolyse

libérant le phosphate et le Mg^{2+} . Ce processus enzymatique de la Ca^{2+} -ATPase du réticulum endoplasmique s'est révélé posséder des caractéristiques fonctionnelles, structurales et immunologiques communes au processus régissant la pompe calcique du réticulum sarcoplasmique (Heilmann et coll., 1989).

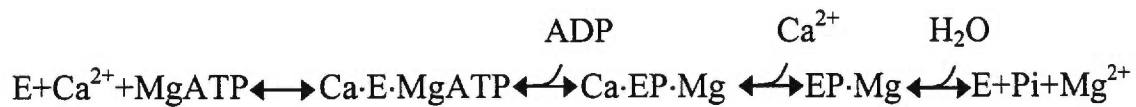


Figure 2: Cycle de pompage de la Ca^{2+} -ATPase du réticulum endoplasmique et sarcoplasmique.

Comme on l'a vu, dû à la grande importance des ions calcium dans la régulation de l'excitabilité des cellules neuronales (Llinas et Sugimori, 1980; Carafoli, 1987), le cerveau est enrichi en mécanismes intracellulaires de captage et de relâche de Ca^{2+} . Une étude a révélé que la distribution dans différentes coupes de cerveau des ARN_m de SERCA 2 est très similaire à la répartition du captage de Ca^{2+} ATP-dépendant par le réticulum endoplasmique des cellules neuronales de

ces mêmes coupes (Miller et coll., 1991). Ces résultats sont compatibles avec l'hypothèse proposant que la pompe calcique encodée par SERCA 2 est physiologiquement primordiale dans le cerveau pour la régulation du Ca^{2+} intracellulaire.

Une autre étude de biologie moléculaire a témoigné d'une conservation entre espèces du gène SERCA. En effet, il y a eu comparaison entre les séquences en acides aminés contenues dans la protéine SERCA de la drosophile et de mammifère. L'étude a démontré une homologie de séquence de 67-71 % entre la Ca^{2+} -ATPase des réticulum sarco(endo)plasmiques (SERCA) des deux espèces (Magyar et Varadi, 1990). De plus, on sait que le gène de la Ca^{2+} -ATPase des réticulum sarco(endo)plasmiques est localisé sur le bras droit du chromosome 2 dans la section 60A (Magyar et Varadi, 1990).

II. PHARMACOLOGIE DU CAPTAGE ATP-DÉPENDANT DE CALCIUM

Bien qu'on ait jusqu'à maintenant une connaissance considérable de la Ca^{2+} -ATPase des réticulum sarcoplasmique et endoplasmique (famille SERCA), il en reste néanmoins beaucoup à découvrir sur la physiologie des différents isoformes de celle-ci. Pour en savoir davantage, plusieurs études ont été effectuées sur des

substances pouvant affecter l'activité de la Ca^{2+} -ATPase des réticulum sarco(endo)plasmiques. Certaines de ces substances agissant sur la famille SERCA se sont avérées devenir des outils utiles pour la caractérisation plus approfondie du fonctionnement des différents isoformes de l'enzyme, et par conséquent contribuer à améliorer les connaissances sur les événements cellulaires reliés à la mobilisation de Ca^{2+} . Parmi celles-ci, il y a la thapsigargin (Tg), un promoteur de tumeur qui induit une augmentation de la concentration cytosolique de Ca^{2+} libre (Thastrup et coll., 1987a, b) en inhibant la pompe calcique du réticulum endoplasmique de cellules non-musculaires (Thastrup et coll., 1990). Ce composé s'est révélé par la suite posséder la capacité d'agir sur toutes les Ca^{2+} -ATPases de la famille SERCA, sans par contre affecter la Ca^{2+} -ATPase et la Na^+/K^+ -ATPase de la membrane plasmique (Lytton et coll., 1991). Un autre inhibiteur de la Ca^{2+} -ATPase est le vanadate qui a par contre un manque de spécificité pour les pompes calciques de la famille SERCA (Michaelis et coll., 1983; Salvador et Mata, 1998), c'est-à-dire qu'en plus des Ca^{2+} -ATPases des réticulum sarco(endo)plasmiques, il inhibe également entre autres la pompe calcique de la membrane plasmique. Le 2,5,-di(*tert*-butyl)-1,4-benzohydroquinone (BHQ) est également un puissant inhibiteur de la Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarcoplasmique et endoplasmique (Kass et coll., 1989; Llopsi et coll., 1991). Un autre produit couramment utilisé est la toxine fongique appelée acide cyclopiazonique (CPA) qui inhibe la pompe calcique du réticulum

sarcoplasmique et endoplasmique en interférant avec le changement conformationnel de l'enzyme, induit par l'ATP, relié au transport de l'ion calcium (Goeger et coll., 1988; Seidler et coll., 1989). La Ca^{2+} -ATPase des microsomes s'avère plus sensible à cet inhibiteur que son homonyme de la membrane plasmique (Salvador et Mata, 1998).

L'activité de captage ATP-dépendant de Ca^{2+} des réticulum sarco(endo)plasmiques a également été étudiée sous l'administration de d'autres composés, c'est-à-dire des substances médicamenteuses connues. Entre autres, des anesthésiques locaux tels que dibucaïne, tétracaïne et lidocaïne se sont vus posséder un effet biphasique, c'est-à-dire qu'aux faibles concentrations une stimulation du captage ATP-dépendant de Ca^{2+} est notée, tandis qu'aux fortes doses cette classe de médicament inhibe l'activité. Cet effet est remarqué aussi bien dans les microsomes de cerveau (Trotta et coll., 1980a) que dans les préparations de réticulum endoplasmique de synaptosomes lysés de cortex cérébral de rat (Lavoie et coll., 1986). Cette réponse biphasique n'est pas présente dans le réticulum sarcoplasmique puisque les anesthésiques locaux, peu importe la dose, inhibent le captage ATP-dépendant de Ca^{2+} (Johnson et Inesi, 1969). Un résultat similaire est également remarqué lors de l'administration de caféine, un stimulant largement consommé. En effet, un effet biphasique sur cette activité de captage de Ca^{2+} dans le réticulum endoplasmique de synaptosomes lysés de cortex

est engendré par la caféine: à des concentrations de 1 à 30 mM, la drogue stimule le captage ATP-dépendant de Ca^{2+} , alors qu'elle l'inhibe à une dose de 60 mM (Mekhail-Ishak et coll., 1987). Cet effet biphasique n'est, par contre, pas démontré dans les vésicules microsomales de cerveau où les faibles doses de 5 à 15 mM, en plus des fortes concentrations, inhibent l'activité (Trotta et coll., 1980b), ni dans les préparations de réticulum sarcoplasmique dérivées de muscles squelettiques où des concentrations de caféine de 5 à 20 mM empêchent également le captage de Ca^{2+} dépendant de l'ATP (Weber et Herz, 1968; Weber, 1968; Batra, 1974). Le mécanisme responsable de cet effet inhibiteur sur le captage calcique du réticulum sarcoplasmique, provient de l'incapacité pour les vésicules de retenir le Ca^{2+} capté, c'est-à-dire que la caféine stimule la sortie de l'ion Ca^{2+} séquestré à l'intérieur du réticulum sarcoplasmique (Weber et Herz, 1968; Fairhurst et Hasselbach, 1970; Su et Hasselbach, 1984). Une telle stimulation de la libération de Ca^{2+} par la caféine est également retrouvée dans les microsomes de cellules neuronales (Neering et McBurney, 1984; Gill et Chueh, 1985) et même dans la préparation de réticulum endoplasmique de synaptosomes rupturés de cerveau de rat, où par conséquent la libération de Ca^{2+} provoquée par la caféine peut cependant à certaines concentrations se retrouver masquée par la forte stimulation de l'afflux ATP-dépendant de Ca^{2+} à l'intérieur de l'organite (Mekhail-Ishak et coll., 1987). Une étude plus récente, sur des microsomes de cerveau de rat, résulte également en l'obtention d'un effet biphasique sur le captage ATP-dépendant de

Ca^{2+} lors de l'administration d'une substance antipsychotique, de la classe des phénothiazines, nommée trifluopérazine. Les petites doses, de 20 à 80 μM , de la substance médicamenteuse stimulent l'afflux de Ca^{2+} dans les microsomes de cerveau, tandis que les concentrations supérieures à 100 μM inhibent cet afflux et l'activité Ca^{2+} -ATPase (Rocha et coll., 1996). La stimulation induite aux faibles doses de trifluopérazine s'est révélée spécifique pour la Ca^{2+} -ATPase du cerveau puisque pour la pompe calcique des plaquettes sanguines ainsi que pour celle du réticulum sarcoplasmique de muscle squelettique, seule une inhibition dose-dépendante du captage est remarquée (Volpe et coll., 1984; de Meis et coll., 1988; Wolosker et coll., 1990; Rocha et coll., 1996). De plus, la trifluopérazine stimule la libération passive de l'ion calcium des microsomes de cerveau de manière dose-dépendante (Rocha et coll., 1996), ce qui n'a par contre pas été observé dans le réticulum sarcoplasmique (Volpe et coll., 1984). Ces découvertes menant à des résultats différents pour une même substance selon la localisation et donc le type de Ca^{2+} -ATPase, reflètent le fait que les isoformes de la famille SERCA, bien qu'ils possèdent des similarités importantes, ont des différences intrinsèques qui mènent à cette diversité de réponses pharmacologiques selon le tissu étudié. De plus, les recherches ont montré que l'antidépresseur tricyclique imipramine avait un effet inhibiteur sur le captage calcique du réticulum sarcoplasmique (Balzer et coll., 1968; Volpe et coll., 1984).

L'effet de d'autres substances médicamenteuses sur la Ca^{2+} -ATPase de la famille SERCA a été étudié. Parmi celles-ci, le sédatif pentobarbital s'est révélé être un inhibiteur du captage ATP-dépendant de Ca^{2+} dans les terminaisons présynaptiques rupturées de cerveau (Harris, 1981). L'éthanol est responsable de l'altération du mécanisme responsable de la diminution cytosolique de l'ion calcium, c'est-à-dire qu'il inhibe l'hydrolyse de l'ATP et par conséquent le captage de Ca^{2+} dans le réticulum endoplasmique de synaptosomes de cerveau de souris (Harris, 1981; Garrett et Ross, 1983). Une autre étude montre que le tamoxifen, un antiestrogène utilisé comme traitement contre le cancer du sein, inhibe également la pompe calcique du réticulum endoplasmique des membranes microsomales de cortex de mouton (Malva et coll., 1990). De plus, les polysaccharides sulfatés comme l'héparine ont aussi la capacité d'inhiber la Ca^{2+} -ATPase située dans les microsomes de cerveau de rat (Rocha et coll., 1996). Une particularité de ces découvertes est le fait que ces études ont toutes été effectuées sur un même type cellulaire; les neurones du cerveau. Par conséquent, le même isoforme de la famille des Ca^{2+} -ATPases des réticulum sarco(endo)plasmiques (SERCA) a donc été échantillonné, soit la protéine SERCA 2b, qui est la pompe calcique majoritaire dans cette région (Wuytack et coll., 1992).

Un autre mécanisme a également été soulevé lorsqu'il a été démontré que l'imipramine, l'amitriptyline, la désipramine et la miansérine augmentaient la

concentration intracellulaire de Ca^{2+} et ce, principalement dû à la mobilisation intracellulaire de l'ion calcium plutôt que par l'afflux de Ca^{2+} provenant du milieu extracellulaire. Cette augmentation observée dans les cellules corticales, s'est révélée être due à une production du second messenger inositol triphosphate (IP_3), qui va par la suite agir sur les réserves intracellulaires de Ca^{2+} sensibles à l' IP_3 (Shimizu et coll., 1993). Les doses nécessaires pour produire l'effet (300 μM à 1 mM) sont nettement supérieures aux doses requises au niveau clinique pour l'effet thérapeutique (Shimizu et coll., 1993), ce qui en fait un mécanisme d'action thérapeutique non plausible. Des études impliquant des neurones corticaux, ont montré que cette production de IP_3 était due à l'activation de la phospholipase C (Osborne, 1988; Dyck et Boulton, 1989), et plus précisément à la $\text{PLC-}\beta_1$ (Fukuda et coll., 1994). Ces mêmes résultats ont été obtenus par l'administration d'autres antidépresseurs (sertraline, paroxétine et fluoxétine) dans les plaquettes sanguines (Helmeste et coll., 1995) à des concentrations également supérieures à celles responsables de l'effet thérapeutique.

III. CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES DES ANTIDÉPRESSEURS

Peu importe le moment, on estime que 5 à 15% de la population montre des symptômes de dépression (Angst, 1992). Heureusement, la quarantaine d'années

de recherche dans ce domaine a permis de mettre à la disposition des patients un large éventail de substances antidépressives. Les recherches sur les antidépresseurs ont débuté dans les années '50 où l'on découvrit, par un heureux hasard, les propriétés antidépressives de deux substances. En effet, des chercheurs ont observé une amélioration de l'humeur chez des patients tuberculeux traités avec l'iproniazide, un inhibiteur de la monoamine oxydase (IMAO), considéré à ce moment comme un antituberculeux. Cette substance s'est révélée inefficace contre la tuberculose, mais des recherches subséquentes ont clairement prouvé l'efficacité de ce composé comme agent antidépressif (Kline et coll., 1958; Loomer et coll., 1958). Presqu'au même moment, en 1957, Roland Kuhn, un psychiatre suisse, remarque l'activité favorable sur l'humeur de la substance tricyclique imipramine, alors qu'on lui cherchait une activité contre la schizophrénie (Kuhn, 1958).

Une autre découverte importante pour l'avancement de la recherche dans ce domaine, fut l'apparition de la dépression suite à l'utilisation de la réserpine chez des patients traités pour l'hypertension et la schizophrénie. La réserpine s'est révélée induire une dépression cliniquement indifférenciée de la dépression endogène (Frize, 1954). Les études pharmacologiques ont révélé que le principal mécanisme d'action de la réserpine était d'inhiber le stockage des amines biogènes dans les vésicules des terminaisons synaptiques. Par la suite, il a été observé que

l'imipramine pouvait prévenir les effets comportementaux de la réserpine chez l'animal (Costa et coll., 1960; Sulser et coll., 1962). Cette découverte a donc mené à l'utilisation de la réserpine comme test pour identifier de nouveaux antidépresseurs (Askew, 1963) et aussi à l'investigation du processus par lequel l'imipramine pouvait réguler la biodisponibilité des neurotransmetteurs; ce qui a eu comme résultat l'identification du processus de recapture des amines transmetteurs (Axelrod et coll., 1961).

Les théories biochimiques de la dépression qui ont guidé les recherches depuis quarante ans ont tourné autour de quelques thèmes: la déficience en amines biogènes telles la noradrénaline et la sérotonine (Schildkraut, 1965), la régulation anormale des récepteurs des neurotransmetteurs (Vetulani et Sulser, 1975) et une altération de l'état neuroendocrinien (Kalin et Dawson, 1986). En relation avec les deux premières théories, des recherches plus approfondies ont été effectuées pour tenter de découvrir les bases biologiques de la dépression. En ce qui concerne le système sérotoninergique, un hypofonctionnement de ce système a été à l'origine proposé. En effet, des données suggérant une diminution dans le système nerveux central de la synthèse et du métabolisme de la sérotonine chez les dépressifs (Lloyd et coll., 1974; Beskow et coll., 1976) et une apparition de symptômes de la dépression suite à l'administration d'agent de déplétion de sérotonine (Shopsin et coll., 1976) ont été obtenues. Subséquemment, des

recherches ont proposé que d'autres changements dans le fonctionnement de ce même système pouvaient être impliqués, puisqu'une diminution de la capture de sérotonine a été démontrée dans les plaquettes de patients dépressifs. En effet, les plaquettes sanguines, dérivant du neuroectoderme, sont devenues un modèle périphérique très utilisé pour l'étude du transport, du stockage, du métabolisme et de la libération de sérotonine par les terminaisons sérotoninergiques (Sneddon, 1973; Stahl, 1977). Plus récemment, une diminution des sites de capture de sérotonine a également été remarqué au niveau du neurone chez des patients dépressifs vivants (Malison et coll., 1998). Ainsi cette diminution de la capture de sérotonine augmenterait la disponibilité de ce neurotransmetteur dans les synapses pour faciliter la neurotransmission (Meltzer et coll., 1981; Faludi et coll., 1988). Une augmentation de la densité des récepteurs à la sérotonine 5-HT₂ dans le cortex de suicidés (Stanley et Mann, 1983; Mann et coll., 1986; Arora et Meltzer, 1989) et de patients dépressifs décédés (McKeith et coll., 1987; Yates et coll., 1990) a également été remarquée. La présence de ces deux derniers changements dans le fonctionnement du système sérotoninergique pourrait possiblement être un résultat compensatoire de la fonction sérotoninergique présynaptique altérée. En égard au fonctionnement du système noradrénergique en relation avec la dépression, les données obtenues étudiant le métabolite de la noradrénaline dans le plasma, l'urine et le liquide céphalo-rachidien sont trop variables pour conclure (Lingjaerde, 1983; Siever et coll., 1986). Pour les récepteurs adrénergiques, une

diminution de la densité des récepteurs α_2 -adrénergiques (Roy et Kafka, 1989) et β -adrénergiques (Extein et coll., 1979; Halper et coll., 1988) a été démontrée chez les patients dépressifs. Quelques recherches ont également proposé l'implication du système dopaminergique dans l'étiologie de la dépression, mais sans toutefois pouvoir en ressortir des conclusions précises (Gjerris et coll., 1987; van Praag et coll., 1991). Ainsi, s'il est difficile d'élaborer une théorie précise pour expliquer la pathophysiologie de la dépression par le dysfonctionnement de chacun de ces différents systèmes, c'est probablement qu'une interaction des altérations de ceux-ci est impliquée.

Au fil des années, en relation avec les théories biochimiques de la dépression plusieurs composés ont été développés. Ces substances sont aujourd'hui classifiées sous diverses catégories telles les antidépresseurs tricycliques qui inhibent la recapture des neurotransmetteurs monoamines dans les terminaisons présynaptiques (Axelrod et coll., 1961; Glowinski et Axelrod, 1964), les inhibiteurs de la monoamine oxydase (IMAO) qui bloquent la dégradation des monoamines (Costa et Brodie, 1964) ainsi que les antidépresseurs atypiques ou de seconde génération qui interfèrent avec divers aspects du fonctionnement présynaptique ou postsynaptique des terminaisons et des récepteurs. Bien que ces antidépresseurs disponibles sur le marché soient indispensables pour le traitement des patients atteints de maladies dépressives, ils sont dotés d'inconvénients

considérables. Ces médicaments antidépresseurs ont un manque d'efficacité chez une proportion significative de patients, ils présentent plusieurs effets secondaires et font preuve d'un délai d'action clinique de quelques semaines après le début de leur utilisation. L'antidépresseur idéal remédierait à ces trois désavantages, mais la découverte d'une molécule qui résoudrait un seul de ces défauts serait un pas considérable autant du point de vue clinique pour le traitement de la maladie que sur le plan de la recherche fondamentale pour le développement subséquent d'autres molécules.

A. Les antidépresseurs tricycliques

Les antidépresseurs tricycliques furent parmi les premières molécules à démontrer des propriétés antidépressives (Kuhn, 1958). Leur mécanisme d'action postulé, bien qu'il ne soit pas parfaitement clair, repose sur l'inhibition de la recapture de noradrénaline et de sérotonine, prolongeant ainsi leur période d'activité sur leur récepteur respectif situé au niveau de la membrane postsynaptique (Axelrod et coll., 1961; Glowinski et Axelrod, 1964). Comme leur nom l'indique, leur structure chimique possède un noyau de trois anneaux, et in vivo ces amines tertiaires sont déméthylées. La prescription d'antidépresseurs tricycliques est la pharmacothérapie la plus utilisée contre la dépression (Olfson et Klerman, 1993), malgré leur profil d'effets secondaires. La concentration

plasmatique thérapeutique de ces substances se situe de 100 à 200 ng/ml (Baldessarini, 1985), ce qui correspond à 0,3 à 0,6 μM , avec un quotient entre la concentration cérébrale et plasmatique d'environ 20:1 (Morselli, 1977; Baumann et coll., 1984; Fujita et coll., 1991). Cette classe d'antidépresseurs a une capacité supérieure aux autres types d'antidépresseurs à bloquer les récepteurs cholinergiques muscariniques, ce qui leur confère des effets indésirables anticholinergiques. De plus, dû à leur grande affinité pour les récepteurs α_1 -adrénergiques, tous les antidépresseurs tricycliques peuvent causer de l'hypotension orthostatique. Les récepteurs histaminiques H_1 sont également bloqués par les tricycliques, d'où proviennent leurs effets de sédation et de somnolence (Richelson et Nelson, 1984; Tollefson, 1991).

1. Imipramine

L'imipramine est l'un des antidépresseurs tricycliques utilisés dans notre étude. Il est le prototype des antidépresseurs tricycliques car ayant démontré les premières propriétés antidépressives, c'est à partir de sa structure qu'ont été élaborées les autres substances tricycliques antidépressives. Il est reconnu pour être un inhibiteur de la recapture de sérotonine et à un moindre degré de noradrénaline (tableau I). Il semblerait que le blocage de la recapture de la noradrénaline observé à des taux plasmatiques thérapeutiques soit dû à l'activité de son principal métabolite, la désipramine (Gram et coll., 1987).

2. Désipramine

La désipramine est une amine secondaire provenant de la N-déméthylation de l'imipramine (Gillette et coll., 1961). Il s'est révélé posséder une demie-vie plus longue que sa substance mère. Cette substance antidépressive est un puissant bloqueur de la recapture de la noradrénaline (tableau I) et a été introduit au début des années 1970 (Byck, 1975).

3. Amitriptyline

Tout comme la désipramine, l'amitriptyline a fait ses débuts au début des années '70. Son métabolite déméthylé est l'amine secondaire nortriptyline. Cette substance tricyclique a la capacité de bloquer la recapture de la noradrénaline, mais surtout de la sérotonine (tableau I). L'amitriptyline est l'un des antidépresseurs ayant la plus grande affinité de liaison pour les récepteurs cholinergiques muscariniques, α_1 -adrénergiques et histaminiques (H_1) (Frazer, 1997).

4. Clomipramine

La clomipramine, également utilisée dans notre étude, a une habileté pour bloquer la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline, avec une légère préférence pour le premier neurotransmetteur (tableau I).

B. Les inhibiteurs de la monoamine oxydase (IMAO)

Découverts presque en même temps que les antidépresseurs tricycliques, les antidépresseurs de type IMAO (Kline et coll., 1958; Loomer et coll., 1958) comme leur nom l'indique, inhibent la monoamine oxydase (MAO) situé à la membrane externe des mitochondries, ce qui résulte en une augmentation de la disponibilité des monoamines cytosoliques dans les terminaisons neuronales (Zeller et Barsky, 1952). Le mécanisme par lequel l'inhibition de la MAO intracellulaire agit sur la concentration d'amine dans l'espace extracellulaire reste cependant obscur.

C. Les antidépresseurs atypiques

1. Miansérine

La miansérine est l'un des antidépresseurs atypiques utilisés dans notre étude. Les propriétés antidépressives de cet antagoniste histaminique ont été découvertes de façon fortuite grâce à une étude sur l'asthme où les chercheurs ont remarqué un effet bénéfique sur l'humeur des patients asthmatiques (Peet et Behagel, 1978). Quelques années plus tard, l'efficacité clinique de la miansérine a été établie par van Riezen et ses collègues (1981). Il a été démontré que la concentration plasmatique thérapeutique de la miansérine se situe de 0,06 à 0,33 μM (Perry et

coll., 1978; Montgomery et coll., 1983; Dawling et coll., 1987) et que le quotient entre sa concentration cérébrale et sa concentration plasmatique est approximativement de 12:1 (Altamura et coll., 1987; Kurata et Kurachi, 1989). Cette structure tétracyclique, contrairement à la plupart des autres antidépresseurs, n'a pas d'effet important sur le blocage de la recapture des neurotransmetteurs *in vivo* (Goodlett et coll., 1977) (tableau I). De plus, son mécanisme d'action semble impliquer l'inhibition des récepteurs α_2 -adrénergiques présynaptiques menant à une augmentation de la libération de noradrénaline (Baumann et Maître, 1977). La desméthylmiansérine est son métabolite actif également utilisé dans notre étude et présente une concentration plasmatique thérapeutique d'environ 40% de celle de sa substance mère (Dawling et coll., 1987).

2. Fluoxétine

La fluoxétine est un inhibiteur sélectif de la recapture neuronale de la sérotonine (SSRI). Son effet de blocage sur la recapture de sérotonine est approximativement 100 fois celui sur la recapture de la noradrénaline et de la dopamine (tableau I). Il est le premier de la classe des SSRI à atteindre l'utilisation clinique ce qui a eu lieu au début de l'année 1988. Contrairement aux antidépresseurs tricycliques, la fluoxétine exerce très peu d'effets antagonistes sur les récepteurs cholinergiques muscariniques, histaminiques (H_1) et alpha-adrénergiques. Cet énoncé contribue probablement au fait que le profil d'effets

secondaires de la fluoxétine soit plus favorable que celui des antidépresseurs tricycliques. Cette substance antidépressive a un métabolite cliniquement actif qui est la norfluoxétine. La concentration plasmatique de la fluoxétine lors d'un traitement chronique se situe entre 0,15 et 1,5 μM et la concentration plasmatique de son métabolite actif se retrouve également entre 0,15 et 1,5 μM (Orsulak et coll., 1988; Kelly et coll., 1989). De plus, le rapport des concentrations cérébrale et plasmatique de la combinaison fluoxétine-norfluoxétine chez l'homme lors d'un traitement chronique montre une estimation conservatrice de 20:1 (Karson et coll., 1993; Komoroski et coll., 1994).

3. Venlafaxine

On attribue les propriétés antidépressives de la venlafaxine à l'inhibition de la recapture neuronale de la sérotonine, de la noradrénaline et à une moins grande échelle de la dopamine (tableau I) (Montgomery, 1993; Scott et coll., 1996). Cet antidépresseur a peu ou pas d'activité antagoniste pour les récepteurs cholinergiques muscariniques, histaminiques ou α_1 -adrénergiques (Muth et coll., 1986; Cohen, 1997) ce qui peut expliquer un profil d'effets secondaires plus favorable que les antidépresseurs tricycliques (Thase, 1996). La venlafaxine, qui présente une concentration plasmatique thérapeutique de 105 ng/ml ou 0,33 μM (Troy et coll., 1998), est convertie en son métabolite déméthylé principal, le O-desméthylvenlafaxine. Ce dernier possède une activité pharmacologique similaire

à sa molécule mère (Muth et coll., 1991). Une concentration plasmatique à l'équilibre du O-desméthylvenlafaxine de 388 ng/ml a été rapportée (Troy et coll., 1998), ce qui équivaut à 1,47 μ M. De plus, comme sa molécule mère, le métabolite n'a pas d'affinité considérable pour les différents types de récepteurs.

Tableau I: Blocage du recaptage des neurotransmetteurs noradrénaline (NA), sérotonine (5-HT) et dopamine (DA) par les différents antidépresseurs utilisés dans notre étude.

Antidépresseurs	NA	5-HT	DA
Imipramine	++	+++	0
Désipramine	+++	±	0
Amitriptyline	+	+++	0
Clomipramine	++	+++	0
Miansérine	±	0	0
Fluoxétine	0	+++	0
Venlafaxine	++	+++	±

0 = aucun effet, ± = effet incertain, + = effet léger, ++ = effet modéré, +++ = effet marqué

Malgré les intenses recherches effectuées sur les antidépresseurs, les mécanismes d'action responsables des effets thérapeutiques demeurent encore nébuleux. Bien que les chercheurs aient pensé que leurs propriétés antidépressives étaient reliées à leur action sur la recapture de noradrénaline et de sérotonine, ou à l'inhibition de la MAO, cette hypothèse a été remise en question pour plusieurs raisons. Premièrement, les effets des antidépresseurs sur la recapture ou la dégradation d'amines sont observés rapidement après le traitement, alors que les effets thérapeutiques ne surviennent qu'après 2 à 4 semaines. Dans un deuxième temps, certains antidépresseurs de seconde génération (iprindole, alprazolam et bupropion) n'inhibent pas la recapture de noradrénaline et de sérotonine et ne bloquent pas la monoamine oxydase. Ceci a donné lieu à une investigation des effets adaptatifs et compensatoires produits par les antidépresseurs sur la régulation des amines dans le système nerveux central (Frazer et Conway, 1984) est également importante pour mieux comprendre les mécanismes d'action des antidépresseurs. Des études animales ont montré que l'administration chronique de plusieurs antidépresseurs réduisait la densité des récepteurs postsynaptiques de la noradrénaline, particulièrement le sous-type β (Banerjee et coll., 1977; Enna et coll., 1981; Mann et coll., 1985), et induisait une perte de sensibilité de l'adénylate cyclase à la stimulation d'agonistes adrénergiques (Moblely et Sulser, 1981). Cette régulation à la baisse de ce récepteur n'est pas seulement produite par l'administration chronique de différents types d'antidépresseurs, mais également

par la thérapie électroconvulsive qui est reconnue pour avoir des effets antidépresseurs chez plusieurs patients. De plus, une diminution de la densité des récepteurs postsynaptiques de la sérotonine, du type 5-HT₂, a également été observée suite à l'administration répétée d'antidépresseur (Sugrue, 1983). Un autre processus adaptatif concerne le taux de décharges des neurones sérotoninergiques dans les noyaux du raphé. Des chercheurs ont observé que très peu de temps après l'administration de substances antidépresseurs, le taux de décharges des cellules nerveuses était considérablement réduit (Aghajanian, 1978), pour revenir à son taux initial après 2 à 3 semaines de traitement (Blier et coll., 1987). Par conséquent, étant donné que ces mécanismes adaptatifs induits par les médicaments antidépresseurs se développent après quelques semaines de traitement, les chercheurs croient que ces changements ont probablement un rôle déterminant pour les effets thérapeutiques au niveau clinique (Blier et de Montigny, 1994).

Un autre concept, celui qui stipule qu'il existe une relation étroite entre un désordre de l'homéostasie calcique intracellulaire et l'apparition de maladies affectives (Dubovsky et coll., 1992a) est fortement à considérer; en fait un signal calcique trop élevé serait impliqué dans l'étiologie de ces pathologies. Au niveau métabolique des études ont démontré l'apparition de dépression chez des patients hypercalcémiques résultant d'une intoxication à la vitamine D (Anderson et coll.,

1968). D'autres recherches ont révélé que les patients présentant un niveau de calcium sérique élevé dû à un hyperparathyroïdisme montraient fréquemment des symptômes de la dépression (Gatewood et coll., 1975; Hayabara et coll., 1987; Coffernils et coll., 1989). De plus, des concentrations sériques élevées de cet ion ont également été retrouvées chez des patientes souffrant de dépression post-partum (Riley et Watt, 1985).

Également, une corrélation positive entre la concentration calcique dans le liquide céphalo-rachidien lombaire et la sévérité des symptômes a été démontrée chez des patients dépressifs (Jimerson et coll., 1979; Bowden et coll., 1988) et une diminution de la concentration de l'ion calcium dans ce même liquide serait en corrélation avec une rémission chez les personnes souffrant de dépression (Carman et coll., 1977; Jimerson et coll., 1979). La concentration calcique du liquide céphalo-rachidien lombaire étant voisine de celle du liquide provenant des ventricules cérébraux, elle reflète donc la concentration de cet ion dans l'environnement extracellulaire du cerveau (Jimerson et coll., 1979).

Chez les patients dépressifs, on a noté une élévation du signal calcique suite à une stimulation par une combinaison de thrombine et de facteur activateur de plaquette (Dubovsky et coll., 1989), par la thrombine seule (Kusumi et coll., 1992) ainsi que par la sérotonine (Kusumi et coll., 1991; Mikuni et coll., 1992), ce dernier effet étant médié par les récepteurs 5-HT₂ (Kagaya et coll., 1990). Ces augmentations calciques ont été obtenues dans les plaquettes sanguines, dont la

dynamique calcique intracellulaire s'apparente à celle des neurones (Detwiler et coll., 1978; Javors et coll., 1982; Hallam et coll., 1984; Doyle et Ruegg, 1985; O'Rourke et coll., 1985). Toujours dans les plaquettes et également dans les lymphocytes de patients dépressifs bipolaires et maniaques, une augmentation du niveau de calcium au repos a été également observée (Dubovsky, 1992b). De plus, l'activité de la Ca^{2+} -ATPase de la membrane du réticulum endoplasmique des plaquettes s'est avérée en corrélation inverse avec le degré de sévérité de la dépression (Bowden et coll., 1988).

Enfin, les résultats initiaux d'inhibition, par les antidépresseurs tricycliques, des canaux calciques voltage-dépendants semblaient également indiquer qu'un signal calcique trop élevé pouvait être impliqué dans l'étiologie de la dépression. Aux environs de 1990, il a en effet été démontré que les antidépresseurs comme l'imipramine, inhibent l'augmentation de la concentration intracellulaire de l'ion calcium induite par la dépolarisation dans les cellules neuronales corticales de rat (Shimizu et coll., 1991, 1992). Cet effet des antidépresseurs tricycliques sur les canaux calciques a également été observé dans les préparations de synaptosomes de cerveau, au moyen du captage de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ induit par la dépolarisation (Aronstam et Hoss, 1985; Wei et Lin, 1989; Lavoie et coll., 1990; Beauchamp et coll., 1992), et dans les cellules neuroblastes en culture et les neurones de ganglions spinaux de souris par des études électrophysiologiques des courants calciques (Ogata et coll., 1989; Choi et coll., 1992). Ainsi, l'hypothèse d'un signal calcique trop élevé dans

la dépression et de la normalisation du signal calcique par les antidépresseurs a donc été émise (Dubovsky et coll. 1992a; Walden et coll., 1992).

Des recherches subséquentes ont confirmé l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium dans les plaquettes sanguines de patients dépressifs en réponse à la sérotonine (Eckert et coll., 1993; Berk et coll., 1995; Konopka et coll., 1996; Yamawaki et coll., 1996). Cet effet n'est par contre pas rencontré suite à une stimulation avec la noradrénaline (Mikuni et coll., 1992). Quelques mécanismes possibles responsables de cette élévation de la concentration intracellulaire de calcium dans les maladies affectives ont été suggérés. D'abord, il a été proposé que la concentration intracellulaire de calcium après stimulation par un agoniste soit essentiellement fonction de la concentration de cet ion au niveau basal, suggérant qu'une augmentation calcique basale, telle qu'il a été démontré dans les plaquettes et lymphocytes de patients dépressifs bipolaires et maniaques (Dubovsky et coll., 1992b), mènerait à une augmentation de la réponse calcique lorsqu'il y a stimulation par un agoniste chez ces sujets (Dubovsky et coll., 1992a). D'autres recherches avancent que cet excès de calcium cellulaire serait causé par l'entremise d'une augmentation intracellulaire de sodium dans les plaquettes et les érythrocytes due à une diminution de l'activité $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ membranaire (Naylor et coll., 1973; Banks et coll., 1989). Ainsi, l'apparition d'un gradient de sodium de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule serait envisagée pour

inverser l'activité de l'échangeur $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$, élevant ainsi la concentration intracellulaire de calcium (Schaeffer et Blaustein, 1989; Torok, 1989).

Dans le contexte de la relation entre homéostasie calcique et dépression, l'inhibition des canaux calciques voltage-dépendants par les antidépresseurs tricycliques a été perçue comme un mécanisme possible pouvant contribuer à l'effet thérapeutique de ces médicaments. Des études ultérieures sur les stéréoisomères d'antidépresseurs tricycliques déjà étudiés ont montré que les deux isomères d'un même tricyclique présentaient entre eux une puissance égale d'inhibition sur les canaux calciques voltage-dépendants, ce qui ne correspondait pas à leur activité relative au niveau clinique (Beauchamp et coll., 1993; Lavoie et coll., 1994). De plus, une recherche subséquente a démontré que le métabolite principal de la désipramine, la 2-hydroxydésipramine, contrairement à sa substance mère était incapable d'inhiber la fonction des canaux calciques voltage-dépendants aux concentrations actives cliniquement (Beauchamp et coll., 1995). Des recherches sur les antidépresseurs atypiques ont également révélé des dissemblances entre les effets d'inhibition obtenus sur les canaux calciques voltage-dépendants et l'efficacité clinique de ces substances (Lavoie et coll., 1997; 1999). Un autre fait intéressant est la disparité des effets occasionnés par un traitement aigu versus un traitement à long terme. Bien que plusieurs études aient démontré qu'un traitement aigu d'antidépresseur pouvait supprimer

l'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} (Shimizu et coll., 1991; 1992; 1994), il apparaît improbable selon les résultats de l'étude menée par Shimizu et coll. (1996) qu'un traitement chronique d'antidépresseur affecte l'afflux de Ca^{2+} par les canaux calciques voltage-dépendants suite à une dépolarisation dans les cellules corticales de rat. Par conséquent, l'ensemble de ces recherches effectuées entre autres dans notre laboratoire, a conclu que l'inhibition du captage de Ca^{2+} au niveau de la membrane plasmique des synaptosomes, par les canaux calciques voltage-dépendants, n'est pas un mécanisme plausible de l'effet thérapeutique des antidépresseurs.

Dans le même ordre d'idées, on s'est demandé si les bloqueurs des canaux calciques pouvaient contribuer à atténuer les symptômes de la maladie affective en empêchant l'entrée de calcium à l'intérieur de la cellule. Des études ont révélé que le vérapamil, un antagoniste calcique, possédait des propriétés antidépressives (Dubovsky, 1993). Cependant, des recherches antérieures avaient montré que ce composé avait la capacité d'inhiber la recapture de sérotonine (Brown et coll., 1986; Rehavi et coll., 1988), ce qui est une caractéristique des antidépresseurs. De plus, chez les patients résistants aux antidépresseurs tricycliques, le vérapamil s'avérait inefficace (Adlersberg et coll., 1994). Ainsi, le potentiel thérapeutique antidépresseur du vérapamil résiderait au niveau de l'inhibition de la recapture de

sérotonine plutôt qu'au niveau du blocage des canaux calciques voltage-dépendants (Helmeste et Tang, 1998).

IV. PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIF DE RECHERCHE

Par conséquent, pour le projet ci-contre, nous nous sommes tournés vers un autre site de régulation des ions calcium soit le captage ATP-dépendant de ce cation par le réticulum endoplasmique des cellules neuronales, comme cible possible des antidépresseurs. Bien que des études aient démontré que l'imipramine inhibe la fonction du réticulum sarcoplasmique musculaire (Balzer et coll., 1968; Volpe et coll., 1984), l'objectif principal du projet est d'examiner l'effet de cette molécule, celui de d'autres antidépresseurs tricycliques (désipramine, clomipramine et amitriptyline) ainsi que l'effet d'antidépresseurs atypiques (miansérine, desméthylmiansérine, venlafaxine, O-desméthylvenlafaxine et fluoxétine) sur le captage ATP-dépendant de Ca^{2+} par le réticulum endoplasmique neuronal. Des recherches antérieures examinant l'effet des anesthésiques locaux et de la caféine sur le captage de Ca^{2+} ATP-dépendant par le réticulum endoplasmique neuronal (Lavoie et coll., 1986; Mekhail-Ishak et coll., 1987) ont permis de comparer les résultats obtenus à ceux de ces mêmes agents pharmacologiques sur le réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique.

Ainsi, malgré l'analogie entre les Ca^{2+} -ATPases du réticulum sarcoplasmique et endoplasmique, seule une inhibition du captage est présente dans le réticulum sarcoplasmique (Johnson et Inesi, 1969; Fairhurst et Hasselbach, 1970), alors qu'un effet biphasique (stimulation aux faibles concentrations et inhibition aux fortes concentrations) a été mis en évidence dans le réticulum endoplasmique neuronal. Il est donc raisonnable de penser que certaines concentrations d'antidépresseurs pourraient stimuler le captage de Ca^{2+} dépendant de l'ATP dans le réticulum endoplasmique des cellules neuronales. Si nous démontrons que les antidépresseurs ont un effet stimulant sur le captage ATP-dépendant de Ca^{2+} par cet organite, un tel effet serait compatible avec une normalisation du signal calcique trop élevé dans les maladies affectives.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

I. MATÉRIEL

A. Animaux

Pour les fins de l'étude, des rats mâles Sprague-Dawley de 200-250 grammes ont été utilisés comme source de cortex cérébral. Ceux-ci provenant de l'élevage Charles River de St-Constant, Québec. Durant leur séjour à l'Université de Montréal, les rats ont été nourris avec la nourriture de laboratoire Purina chow et l'eau du robinet.

B. Produits chimiques et solutions

1. Produits chimiques

- HEPES (acide 4-[2-hydroxyéthyl]-1-pipérazineéthanesulfonique) de Boehringer Mannheim, Canada
- Liquide à scintillation BCS de Amersham Canada Ltd.
- $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (CaCl_2) à activité spécifique de 10,6 Ci/g de Ca^{2+} de ICN Biochemicals, Irvine, Californie

- Réactif de phénol, acide acétique glacial ($\text{CH}_3\cdot\text{COOH}$) de BDH Chemicals
- Chlorure de potassium (KCl), chlorure de magnésium 6-hydrate ($\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$), chlorure de calcium ($\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) de J.T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, NJ.
- Sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$), tartrate de potassium-sodium ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6\cdot 4\text{H}_2\text{O}$), carbonate de sodium (Na_2CO_3), sucrose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$), chlorure de sodium (NaCl), phosphate de potassium monobasique (KH_2PO_4), hydroxyde de sodium solution 5N ($\text{NaOH}[5\text{N}]$) de Fisher Scientific Co., Fair Lawn, NJ.
- Albumine de bovin, 2-4-dinitrophénol (DNP), azoture de sodium (NaN_3), acide éthylèneglycol-bis-(β -aminoéthyléther) N,N'-tétraacétique (EGTA), oligomycine, sel de magnésium d'adénosine 5'-triphosphate ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3$), trizma base (tris[hydroxyméthyl]aminométhane) de Sigma Chemical Co., St-Louis, USA

Pour la première partie de l'étude, les antidépresseurs tricycliques utilisés sont: clomipramine hydrochlorure ($C_{19}H_{23}ClN_2 \cdot HCl$), imipramine hydrochlorure ($C_{19}H_{24}N_2 \cdot HCl$), désipramine hydrochlorure ($C_{18}H_{22}N_2 \cdot HCl$), amitriptyline hydrochlorure ($C_{20}H_{23}N \cdot HCl$) qui proviennent de Sigma Chemical Co. (St-Louis, MO). Pour ce qui est de la deuxième partie, les antidépresseurs atypiques employés sont: miansérine hydrochlorure ($C_{18}H_{20}N_2 \cdot HCl$) et desméthylmiansérine hydrochlorure ($C_{17}H_{18}N_2 \cdot HCl$) qui proviennent de Organon Canada Limited (Scarborough, Ont.), venlafaxine hydrochlorure ($C_{17}H_{27}NO_2 \cdot HCl$) et O-desméthylvenlafaxine ($C_{16}H_{25}NO_2C_4H_4O_4H_{20}$) qui proviennent de Wyeth-Ayerst Canada Inc. (Ville St-Laurent, Qué.), et fluoxétine hydrochlure ($C_{17}H_{18}NOF_3 \cdot HCl$) commandée de Research Biochemicals International (Philadelphia, PA).

2. Solutions

a. Solutions utilisées

- ◆ Solution NaCl sans calcium: 145,0 mM de NaCl, 5,0 mM de KCl, 1,4 mM de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 2,0 mM de KH_2PO_4 et 20,0 mM d'HEPES

- ◆ Solution de lyse: 1,4 mM de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2,0 mM de KH_2PO_4 , 20,0 mM d'HEPES, 0,1 mM de NaN_3 , 0,1 mM de DNP et 0,7 $\mu\text{g/ml}$ d'oligomycine

- ◆ Solution de proincubation: 322,20 mM de KCl, 11,10 mM de NaCl, 2,45 mM de KH_2PO_4 , 1,72 mM de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 24,50 mM d'HEPES, 0,11 mM de NaN_3 , 0,11 mM de DNP, 0,86 $\mu\text{g/ml}$ d'oligomycine, et 2,22 mM de sel de magnésium d'ATP ainsi qu'une concentration précise d'un antidépresseur donné au besoin.

- ◆ Solution de lavage: 5,0 mM de NaCl, 145,0 mM de KCl, 1,2 mM de CaCl_2 , 1,4 mM de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2,0 mM de KH_2PO_4 , 20,0 mM d'HEPES

Toutes les solutions ci-dessus ont été ajustées à un pH de 7,5 à température de la pièce avec trizma base.

- ◆ Solution de calcium-EGTA: 700 μM d'EGTA, 500 μM de CaCl_2 contenant 50 μCi de $^{45}\text{Ca}^{2+}/\mu\text{mol}$ de calcium

- ◆ Solution de sucrose 0,32 M

- ◆ Solution de sucrose 0,8 M

Le milieu d'incubation consiste en 0,9 ml de solution de proincubation (contenant ou pas du sel de magnésium d'ATP et/ou un antidépresseur donné) auquel s'ajoute 0,9 ml de solution de lyse, contenant en suspension les synaptosomes lysés, et 0,2 ml de solution de calcium-EGTA pour un total de 2 ml. Chaque milieu d'incubation contient donc une concentration finale de 1,4 mM de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2,0 mM de KH_2PO_4 , 20,0 mM d'HEPES, 145,0 mM de KCl, 5,0 mM de NaCl, 0,1 mM de NaN_3 , 0,1 mM de DNP, 0,7 $\mu\text{g/ml}$ d'oligomycine, 70,0 μM d'EGTA, 50,0 μM de CaCl_2 et 1,0 mM de sel de magnésium d'ATP (lorsque présent). La combinaison de 70,0 μM de EGTA et de 50,0 μM de CaCl_2 résulte en une concentration libre de calcium ionisé de 0,55 μM (Blaustein et coll., 1978a).

Pour le dosage des protéines:

- ◆ Solution de travail: 18,21 nM de CuSO_4 , 32,21 nM de tartrate K-Na, 8,58 μM de Na_2CO_3

- ◆ Solution folin phénol: 0,1 ml de réactif de phénol/ml d'H₂O

b. Solutions stock préparées

- Pour la solution de calcium-EGTA
 - 0,280 mg/ml d'EGTA + 0,077 mg/ml de CaCl₂
- Pour la solution de lyse et la solution de proincubation
 - 1,95 mg/ml du poison mitochondrial NaN₃
 - 4,60 mg/ml du poison mitochondrial DNP, l'addition de quelques gouttes de NaOH 2N a été nécessaire pour la dissolution
 - 0,35 mg/ml d'oligomycine, l'addition d'acide acétique glacial a été nécessaire pour la dissolution
- Pour le dosage des protéines (la méthode de Lowry)
 - CuSO₄·5H₂O 1%
 - tartrate K-Na 2%
 - Na₂CO₃ 10%/NaOH 0,5N

C. Appareils et autre matériel

1. Appareils

- Homogénéisateur: Cole-Parmer Standard, Servodyne System
- Centrifugeuse réfrigérée: Du Pont Instruments, Sorvall RC-5B
- Balance analytique: Fisher Scientific, Mettler H10
- Vortex: Fisher Scientific
- Plaque agitatrice-chauffante: Fisher, Thermix 210T
- pH mètre: Fisher, Accumet 230 pH/ion meter
- Incubateur-agitateur: Precision Scientific Co., Dubnoff
- Pompe à vide: Fisher, General Electric 91L/minute
- Compteur de radioactivité β à scintillation liquide: LKB, 1219 Rackbeta
- Spectromètre: Bausch & Lomb, Spectronic 20

2. Autre matériel

- Bouts de pipette en polypropylène: Selectapette, Clay Adams
- Tube à centrifuger en polyallomère: Nalgène
- Filtres d'esters de cellulose avec pores de 0,3 μm et 25 mm de diamètre,
Millipore

II. MÉTHODE EXPÉRIMENTALE

A. Préparation de terminaisons nerveuses présynaptiques (synaptosomes) lysées à partir du cortex.

Pour chaque expérience, trois rats sont guillotins dans le but de prélever leur cerveau. Dès leur extraction, les trois cerveaux sont immédiatement placés sur la glace, dans un petit b cher contenant du sucrose 0,32 M. Par la suite, sur une vitre apposée sur la glace, les cerveaux sont coupés transversalement en cinq parties afin d'y prélever le cortex, qui est gardé également dans un b cher de sucrose 0,32 M sur la glace. La quantité de cortex cérébral totale recueillie est sommairement asséchée sur papier filtre et pesée à l'aide d'une balance analytique.

Le cortex cérébral est homogénéisé (10% p/v) dans du sucrose 0,32 M. Cette première homogénéisation de type Potter-Elvehjem consiste en six aller-retours du piston de téflon dans l'homogénéisateur de verre à 850 révolutions/minute. Ensuite, l'homogénat obtenu est centrifugé pendant 10 minutes à 1000 g afin de faire précipiter les noyaux, les larges fragments de myéline et des débris de tissus. Le surnageant est par la suite recentrifugé à une force supérieure (10 000 g) et pour une plus longue durée, soit 25 minutes, dans le but d'obtenir un culot renfermant des mitochondries, des synaptosomes et des petits fragments de myéline. Ce

dernier est homogénéisé manuellement dans une solution de sucrose 0,32 M, d'égale quantité au volume décanté, et recentrifugé à 10 000 g pour 25 minutes également. Suite à cette centrifugation, il y a de nouveau homogénéisation du culot, mais cette fois-ci dans environ 5 ml de sucrose 0,32 M. Cet homogénat est versé minutieusement par-dessus 10 ml de sucrose 0,8 M, déjà contenu dans un tube à centrifuger de polyallomère, engendrant ainsi deux phases distinctes dans le but de créer un gradient de sucrose. Le tout est centrifugé à 10 000 g pour une durée de 25 minutes. Après cette période, le tube de polyallomère présente donc différentes phases. La phase supérieure, pratiquement translucide, contient du sucrose 0,32 M qui recouvre une couche blanchâtre très mince, à l'interface des deux phases du gradient, qui représente la myéline. Sous cette dernière, se retrouve une phase opaque de sucrose 0,8 M de sucrose contenant les synaptosomes recherchés. Le culot présent renferme des débris et des mitochondries. Les synaptosomes, contenus dans la phase 0,8 M de sucrose, sont recueillis en perçant le tube de polyallomère à la base.

La phase 0,8 M de sucrose recueillie, renfermant les synaptosomes, est conservée sur la glace pour être ensuite équilibrée grâce à la solution de NaCl sans calcium de façon à ce que les synaptosomes retrouvent un milieu normotonique physiologique. La solution est ajoutée à la suspension de synaptosomes graduellement à raison de 2 ml chaque 2 minutes. Le volume final obtenu est de

trois à quatre fois le volume initial recueilli. Suite à cette étape, on obtient donc des synaptosomes équilibrés.

L'étape suivante consiste en une centrifugation à 15 000 g du volume de synaptosomes équilibrés, d'une durée de six minutes. Un culot correspondant à 2 ml du volume total de synaptosomes équilibrés est remis en suspension dans de l'eau bidistillée et conservé pour le dosage des protéines (méthode de Lowry et coll., 1951), tandis que les autres culots obtenus sont destinés à l'étape subséquente de captage de calcium dans les synaptosomes lysés. En effet, ces culots sont resuspendus dans une solution hypotonique (solution de lyse) afin de rompre les terminaisons présynaptiques de façon à avoir accès à la pompe calcique ATPase de la membrane du réticulum endoplasmique. Pour chaque gramme de cerveau (pesé au début des manipulations) 10 ml de solution de lyse sont ajoutés. Le tout est incubé pendant trois minutes à 30°C et maintenu sur la glace par la suite.

B. Captage ATP-dépendant de calcium dans les synaptosomes lysés.

Le captage de calcium par la pompe ATPase du réticulum endoplasmique est mesuré dans quatre conditions différentes: en absence de médicament et d'ATP, en absence de médicament et en présence d'ATP, en présence de médicament et en

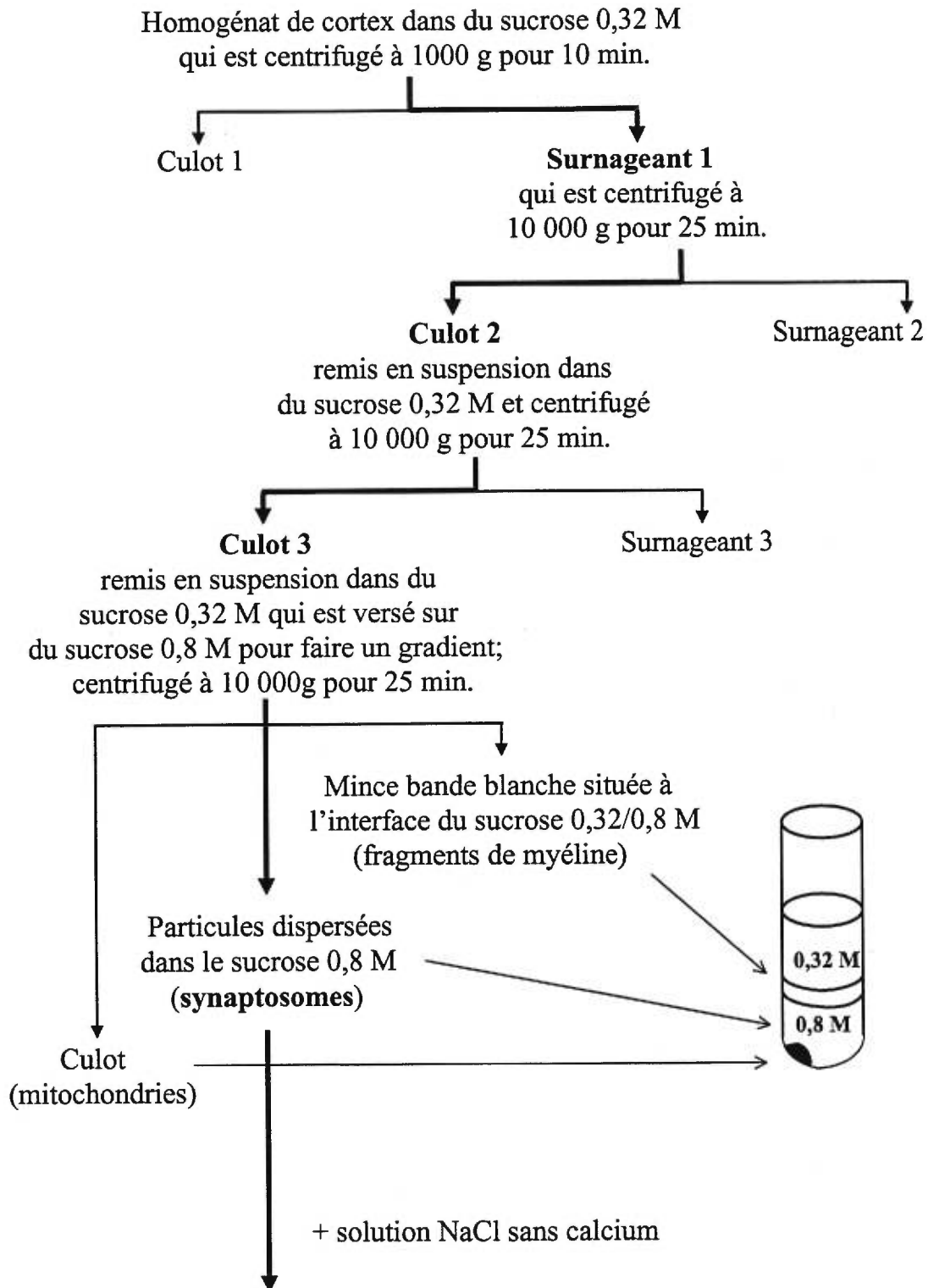
absence d'ATP et finalement en présence de médicament et d'ATP. En d'autres mots, une rangée de neuf éprouvettes renferme des concentrations croissantes d'un antidépresseur donné (0, 0,06, 0,2, 0,6, 2, 6, 20, 60, 200 μM) en absence d'ATP, tandis qu'une autre rangée de neuf éprouvettes contient les mêmes doses croissantes de la même substance, mais cette fois-ci en présence d'ATP. Par conséquent, le captage ATP-dépendant net peut ainsi être déduit en soustrayant le captage en absence d'ATP du captage en présence d'ATP.

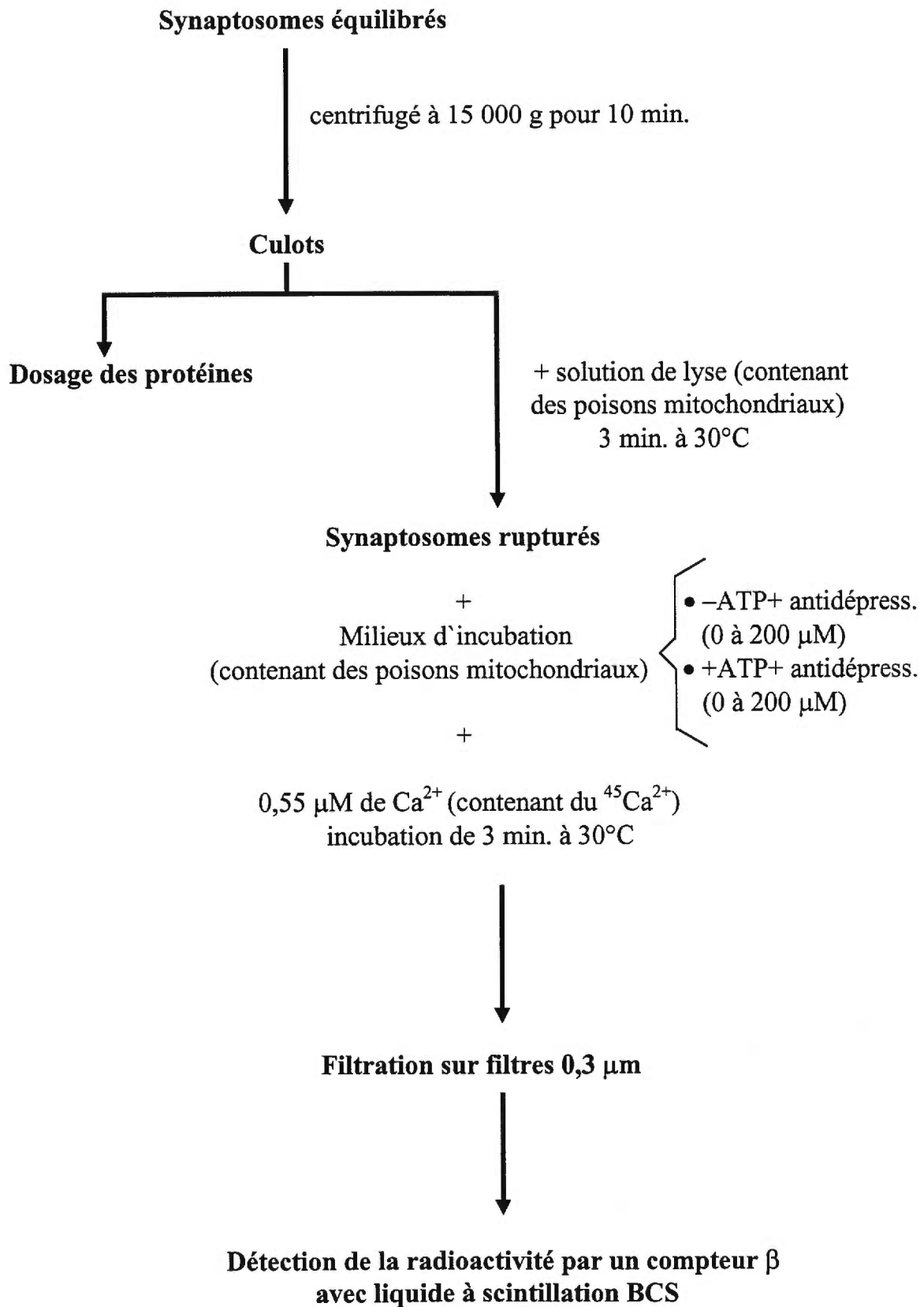
Cette méthode de mesure du captage de calcium dans les synaptosomes lysés, grâce à un marqueur radioactif ($^{45}\text{Ca}^{2+}$), a été décrite par Blaustein et coll. (1978a). En premier lieu, cette expérimentation consiste à ajouter 0,9 ml de la solution de synaptosomes lysés à chacun des 0,9 ml des 18 milieux de proincubation maintenus à 30°C. Après trois minutes, le captage de calcium débute lorsque 0,2 ml de la solution de calcium-EGTA est ajouté à chaque milieu d'incubation pour un volume total de 2 ml. Il est à noter que chaque milieu d'incubation contient des poisons mitochondriaux pour éliminer la possibilité de captage de calcium par les mitochondries. Le captage de calcium se poursuit pendant trois minutes à 30°C jusqu'à ce que la filtration ait lieu. En effet, 0,5 ml du 2 ml total de chaque milieu est prélevé pour être filtré sur des filtres Millipore d'esters de cellulose 0,3 μm . Un volume de 0,5 ml, provenant d'un milieu où le 0,9 ml de synaptosomes lysés

est substitué par 0,9 ml de solution de lyse, est également filtré pour quantifier la radioactivité retenue par le filtre en absence de terminaisons nerveuses présynaptiques lysées. Chaque filtre est par la suite rincé 3 fois par la solution de lavage, pour être ensuite déposé dans une fiole . Chaque vial, contenant un filtre, est rempli de 15 ml de liquide à scintillation BCS dans la but de déceler, grâce à un compteur β , la radioactivité retenue par les filtres.

Les résultats du captage de calcium par le réticulum endoplasmique dans chaque condition d'incubation sont exprimés en picomoles/milligramme de protéines pour trois minutes de captage. Par conséquent, une transformation en cette dernière unité de mesure à partir des résultats exprimés en dpm (mesure de la radioactivité) est possible par le dosage des protéines qui permet à l'aide de quatre standards d'albumine de bovin de déterminer la teneur en protéines d'un volume fixe de synaptosomes équilibrés prélevé à chaque expérience (Lowry et coll. 1951).

Figure 3: Diagramme résumant la méthode expérimentale utilisée.





III. MÉTHODE STATISTIQUE

Les résultats de la première étude, portant sur le captage ATP-dépendant de calcium sous l'influence d'antidépresseurs tricycliques, ont été évalués selon un plan factoriel 4 X 9 (quatre médicaments et neuf concentrations) par analyse de variance (Winer et coll., 1991), et ce pour l'état basal et stimulé. Le même principe fut appliqué pour la seconde étude impliquant les antidépresseurs atypiques mais un plan factoriel 5 X 9 (cinq médicaments et neuf concentrations) fut utilisé.

Les données représentant le captage net ATP-dépendant de calcium ont été obtenues par analyse de covariance (Winer et coll., 1991) en utilisant les données de l'état basal comme valeurs explicatives de la réponse à l'état stimulé. Un plan factoriel de 4 X 9 pour les tricycliques et de 5 X 9 pour les atypiques fut employé. Pour chacune des deux études effectuées, une pente de régression commune a été utilisée pour ajuster les moyennes et par le fait même les sommes de carrés.

Pour toutes les analyses effectuées, les différences observées furent acceptées à un seuil critique de signification de 5%.

RÉSULTATS

I. EFFET DES ANTIDÉPRESSEURS TRICYCLIQUES

Dans un premier temps, pour ce qui est de l'état basal (figure 4a), les analyses statistiques ne montrent aucune différence significative entre les quatre antidépresseurs tricycliques pour leurs effets sur le captage de Ca^{2+} par le réticulum endoplasmique neuronal ($F_{3,20}=0,36$, NS). En effet, la désipramine ne se différencie pas de l'imipramine ($F_{1,20}=0,93$, NS), ces deux tricycliques ne se différencient pas de la clomipramine ($F_{1,20}=0,05$, NS) et l'amitriptyline n'est pas différent significativement des trois autres antidépresseurs ($F_{1,20}=0,11$, NS). Globalement, cette absence de différence entre les traitements est démontrée peu importe le niveau de concentration considéré. Aucune interaction entre les facteurs traitements et concentrations n'est observée ($F_{24,180}=0,21$, NS). La comparaison globale des divers niveaux de concentrations montre une différence significative pour celles-ci ($F_{8,160}=7,76$, $p<10^{-5}$). La décomposition de ce facteur indique, de façon significative, une tendance linéaire ($F_{1,160}=20,42$, $p<10^{-5}$), quadratique ($F_{1,160}=10,85$, $p<0,01$) et cubique ($F_{1,160}=9,89$, $p<0,01$) pour les quatre concentrations les plus élevées, soit celles de 6 à 200 μM . De plus, une différence significative est observable entre les deux étendues de concentrations, 0,06 à 2 μM et 6 à 200 μM ($F_{1,160}=16,43$, $p<0,001$). Étant donné l'absence d'une interaction entre les deux facteurs traitements et concentrations, cette cinétique médicamenteuse est valable pour les quatre antidépresseurs tricycliques.

L'état stimulé du captage calcique (figure 4a), c'est-à-dire l'effet sous l'influence de l'adénosine triphosphate (ATP), montre à l'analyse de variance pratiquement les mêmes caractéristiques que l'état basal, mais évidemment à un niveau de captage calcique très différent. En effet, on remarque que l'ensemble des courbes doses-réponses de l'état stimulé représente approximativement le double du captage de calcium par rapport à l'état en l'absence d'ATP. Le facteur médicament ne démontre aucune différence significative entre les quatre antidépresseurs tricycliques pour cet état stimulé ($F_{3,20}=0,92$, NS). Cette absence de différence s'observe quelle que soit la concentration. Il est intéressant de remarquer que l'interaction entre les médicaments et les concentrations n'est pas significative ($F_{24,180}=0,11$, NS), ce qui permet d'évaluer les effets principaux des concentrations. La comparaison des différentes concentrations, indépendamment des substances médicamenteuses, dénote une différence significative ($F_{8,160}=30,41$, $p<10^{-5}$). L'analyse des concentrations fait ressortir clairement une différence pour la comparaison des effets des substances tricycliques par rapport au placebo ($F_{1,160}=24,24$, $p<10^{-5}$). Il en est de même pour la tendance linéaire ($F_{1,160}=115,05$, $p<10^{-5}$), quadratique ($F_{1,160}=11,10$, $p<0,01$) et cubique ($F_{1,160}=11,63$, $p<0,01$) pour les concentrations de 6 à 200 μM . De plus, la comparaison entre les deux plages de concentrations, soit entre 0,06 à 2 μM et 6 à 200 μM , reflète une différence hautement significative entre celles-ci ($F_{1,160}=79,86$, $p<10^{-5}$). L'absence d'une

interaction entre les deux facteurs traitements et concentrations indique que cette cinétique médicamenteuse reflète les quatre antidépresseurs tricycliques.

Pour obtenir le captage net ATP-dépendant, une analyse de covariance fut effectuée en utilisant les valeurs obtenues à l'état stimulé aux différentes concentrations, comme dépendantes de la réponse à l'état basal. L'analyse statistique n'a révélé aucune différence significative entre les pentes de régression correspondant aux quatre antidépresseurs tricycliques ($F_{3,16}=0,64$, NS) et aux neuf niveaux de concentrations étudiés ($F_{8,171}=0,60$, NS). De cette façon, l'absence d'hétérogénéité nous a conduit à l'utilisation d'une pente commune ($b_c=1,59723$), celle de la régression linéaire simple. L'équation mathématique de la droite des moindres carrés des écarts se traduit comme suit:

$$Y_{j\alpha} = Y_j - b_c (X_j - \bar{X})$$

Où $Y_{j\alpha}$: est la valeur stimulée-ajustée en fonction de
l'état basal

Y_j : est la valeur stimulée à un point "j" quelconque

b_c : est la pente commune pour la relation XY

X_j : est la valeur basale correspondant à Y_j

\bar{X} : est la moyenne globale de l'état de base

L'évaluation des effets des antidépresseurs tricycliques sur le captage net ATP-dépendant de calcium (figure 4b) n'a montré aucune différence significative au niveau du facteur médicament entre les quatre substances, pour l'ensemble des concentrations ($F'_{3,19}=1,19$, NS). Cette observation est valable pour chacune des neuf concentrations étudiées. L'interaction des traitements avec les concentrations n'étant pas significative ($F'_{24,179}=0,60$, NS), nous avons évalué l'effet des différentes concentrations. Une différence significative est observable entre celles-ci ($F'_{8,160}=3,63$, $p<0,001$). En effet, de façon plus précise on note un effet significatif des antidépresseurs par rapport au placebo ($F'_{1,160}=7,61$, $p<0,01$). De plus, dû à une réduction progressive du captage net ATP-dépendant de calcium pour les concentrations 0,06 à 2 μM , on observe un terme linéaire significatif ($F'_{1,160}=4,18$, $p<0,05$). De plus, pour l'étendue des concentrations 6 à 200 μM , on observe également une réduction progressive du captage calcique se traduisant par une tendance linéaire significative ($F'_{1,160}=10,43$, $p<0,01$). Une autre différence significative est retrouvée entre les faibles niveaux de concentrations d'antidépresseurs (0,06 à 2 μM) et les plus élevés (6 à 200 μM) ($F'_{1,160}=5,96$, $p<0,05$). Étant donné qu'aucune interaction n'est produite entre les deux facteurs étudiés, cette cinétique médicamenteuse, pour le captage net de calcium ATP-dépendant détectée par l'analyse de covariance, est valable pour les quatre substances tricycliques.

En conclusion, l'analyse de variance a montré qu'à l'état basal, bien que le placebo ne diffère pas des autres concentrations, l'inhibition du captage calcique par les antidépresseurs tricycliques se fait selon une cinétique linéaire, quadratique et cubique pour les quatre concentrations les plus élevées. La même cinétique médicamenteuse est observée pour l'état stimulé mais cette fois le placebo, ayant une valeur plus élevée, diffère du reste des concentrations. Concernant le captage net ATP-dépendant, on observe que le placebo diffère des autres concentrations et que l'inhibition des antidépresseurs tricycliques se fait selon une cinétique linéaire autant pour les quatre premières que pour les quatre concentrations les plus élevées.

II. EFFET DES ANTIDÉPRESSEURS ATYPIQUES

Dans un premier temps, l'analyse de variance, comparant les antidépresseurs atypiques à l'état basal (figure 5a), ne montre pas de différence significative entre les cinq médicaments ($F_{4,25}=0,72$, NS). En effet, la miansérine ne se différencie pas de la venlafaxine ($F_{1,25}=0,03$, NS) et les substances mères ne se différencient pas de leurs métabolites ($F_{1,25}=0,21$, NS). De plus, il n'existe point d'interaction significative entre ces deux premières comparaisons ($F_{1,25}=2,62$, NS). Enfin, la

fluoxétine ne se différencie pas des deux autres antidépresseurs atypiques ($F_{1,25}=0,01$, NS). Cette absence de différence, de façon globale, s'observe quelle que soit la concentration considérée. L'interaction des médicaments avec les concentrations n'étant pas significative ($F_{32,225}=0,37$, NS), nous avons évalué l'effet des différentes concentrations. La comparaison globale de ces dernières n'est pas significative ($F_{8,200}=1,61$, NS), ce qui reflète aucune différence entre les diverses concentrations et ce, pour les cinq antidépresseurs.

Dans un deuxième temps, une analyse de variance a été effectuée sur les valeurs de l'état stimulé (figure 5a). Aucune différence significative n'a été relevée entre les cinq traitements ($F_{4,25}=0,60$, NS). En effet, les quatre comparaisons mentionnées au paragraphe précédent n'ont point démontré de différence significative et cette absence de différence vaut pour chacune des neuf concentrations étudiées. Aucune interaction entre les traitements et les concentrations ($F_{32,225}=0,47$, NS) n'est observée. De façon globale, la comparaison des concentrations est significative ($F_{8,200}=17,28$, $p<10^{-5}$). En effet, les antidépresseurs atypiques induisent, par rapport à la concentration témoin (placebo), une inhibition du captage calcique par le réticulum endoplasmique à l'état stimulé ($F_{1,200}=48,16$, $p<10^{-5}$). Un terme linéaire significatif est observé pour les quatre concentrations les plus faibles ($F_{1,200}=4,74$, $p<0,05$), ainsi que pour les quatre concentrations les plus élevées ($F_{1,200}=21,26$, $p<10^{-5}$). Ces deux termes

linéaires traduisent une diminution de captage calcique. Enfin, une autre différence significative est retrouvée pour la comparaison entre les faibles et les fortes concentrations ($F_{1,200}=60,95$, $p<10^{-5}$). Cette cinétique est valable pour les cinq antidépresseurs atypiques, puisqu'il n'y a pas d'interaction entre les traitements et les concentrations.

L'analyse des valeurs de captage net ATP-dépendant de calcium pour les antidépresseurs atypiques (figure 5b) a été effectuée en tenant compte des valeurs de l'état de base comme régresseur. L'analyse des pentes de régression n'a pas montré d'hétérogénéité que ce soit pour les concentrations ou pour les médicaments. De ce fait, une seule pente de régression fut considérée pour l'ensemble des traitements et des concentrations ($b_c=1,23093$). Les variations obtenues sont donc corrigées en fonction des fluctuations de l'état basal. Nous n'observons aucune différence significative entre les différents groupes médicamenteux ($F'_{4,24}=0,55$, NS). En effet, la miansérine ne se différencie pas de la venlafaxine ($F'_{1,24}=1,35$, NS) et les substances mères ne se différencient pas des métabolites ($F'_{1,24}=0,39$, NS). L'interaction substances mères métabolites par rapport à ces deux médicaments n'est pas significative ($F'_{1,24}=0,14$, NS) et la fluoxétine ne se différencie pas de ces deux médicaments ($F'_{1,24}=0,31$, NS). Cette absence de différence entre les médicaments s'observe évidemment quelle que soit la concentration évaluée. Il est intéressant de souligner que l'interaction entre les

traitements et les concentrations n'est point significative ($F'_{32,224}=0,73$, NS). Les concentrations se différencient de façon significative ($F'_{8,200}=9,55$, $p<10^{-5}$). Plus précisément, la concentration 0 μM est significativement plus élevée que les suivantes ($F'_{1,200}=33,57$, $p<10^{-5}$), et une tendance linéaire significative s'observe déjà dès les quatre premières doses ($F'_{1,200}=9,04$, $p<0,01$), sans quadrature ou cubisme. Il en est de même des concentrations plus élevées, de 6 à 200 μM , où le terme linéaire est aussi significatif ($F'_{1,200}=5,90$, $p<0,05$). La comparaison des quatre premières concentrations aux quatre suivantes, montre que l'inhibition est encore plus importante dans les quatre dernières ($F'_{1,200}=26,72$, $p<10^{-5}$). Étant donné l'absence d'une interaction entre les facteurs traitements et concentrations, on n'observe pas de différence dans la cinétique médicamenteuse entre les cinq antidépresseurs atypiques.

En conclusion, pour le captage calcique en absence d'ATP, l'analyse de variance n'a démontré aucun effet concentration significatif. En présence d'ATP, l'inhibition du captage calcique se fait exclusivement selon une tendance linéaire, tout comme c'est le cas pour le captage net ATP-dépendant analysé par covariance.

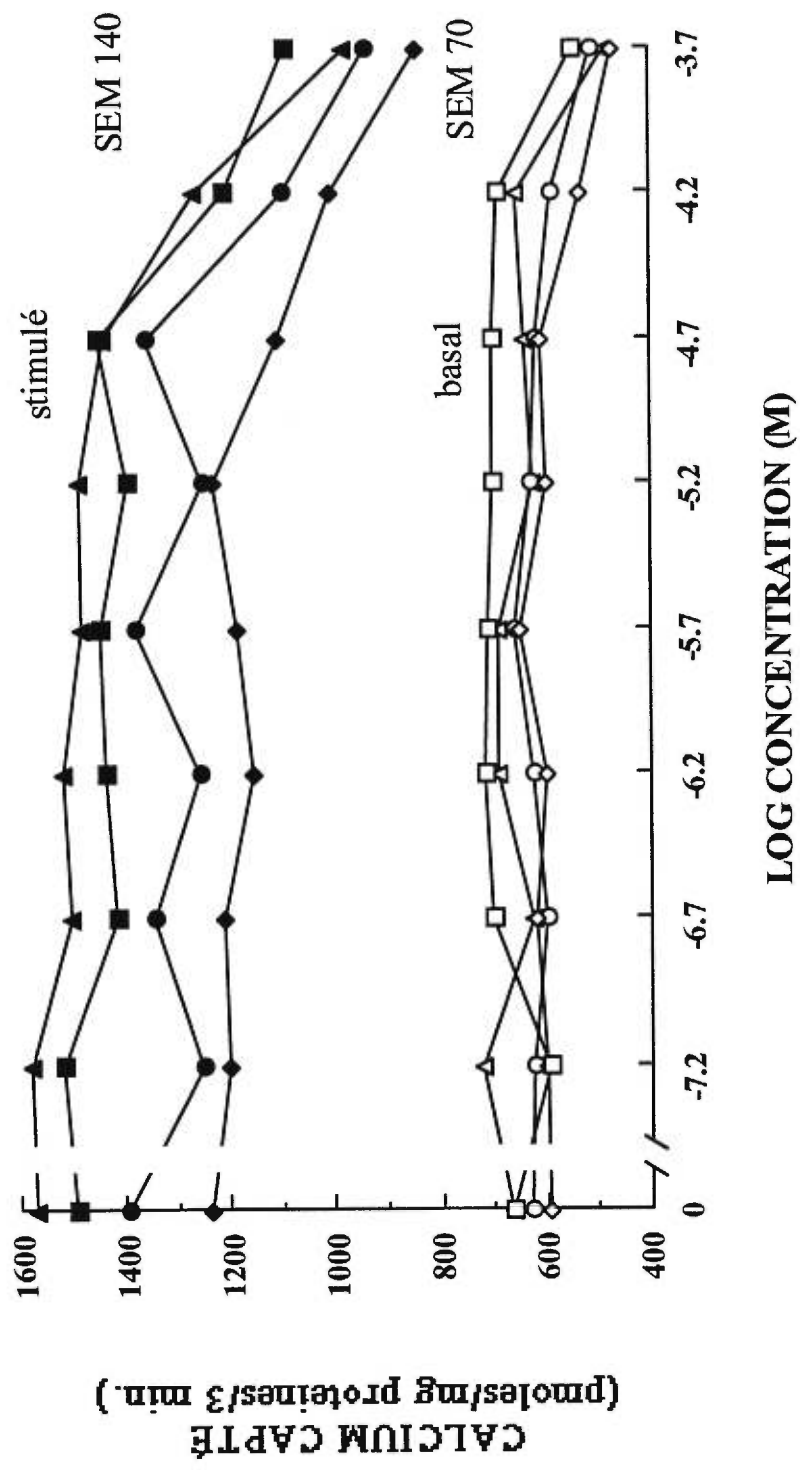


Figure 4a: Effet des antidépresseurs tricycliques sur le captage de calcium en présence d'ATP (état stimulé) et en absence d'ATP (état basal). Chaque point de chacune des courbes représente la moyenne des résultats de six préparations synaptosomales. Désipramine (□), imipramine (◇), amitriptyline (○) et clomipramine (△).

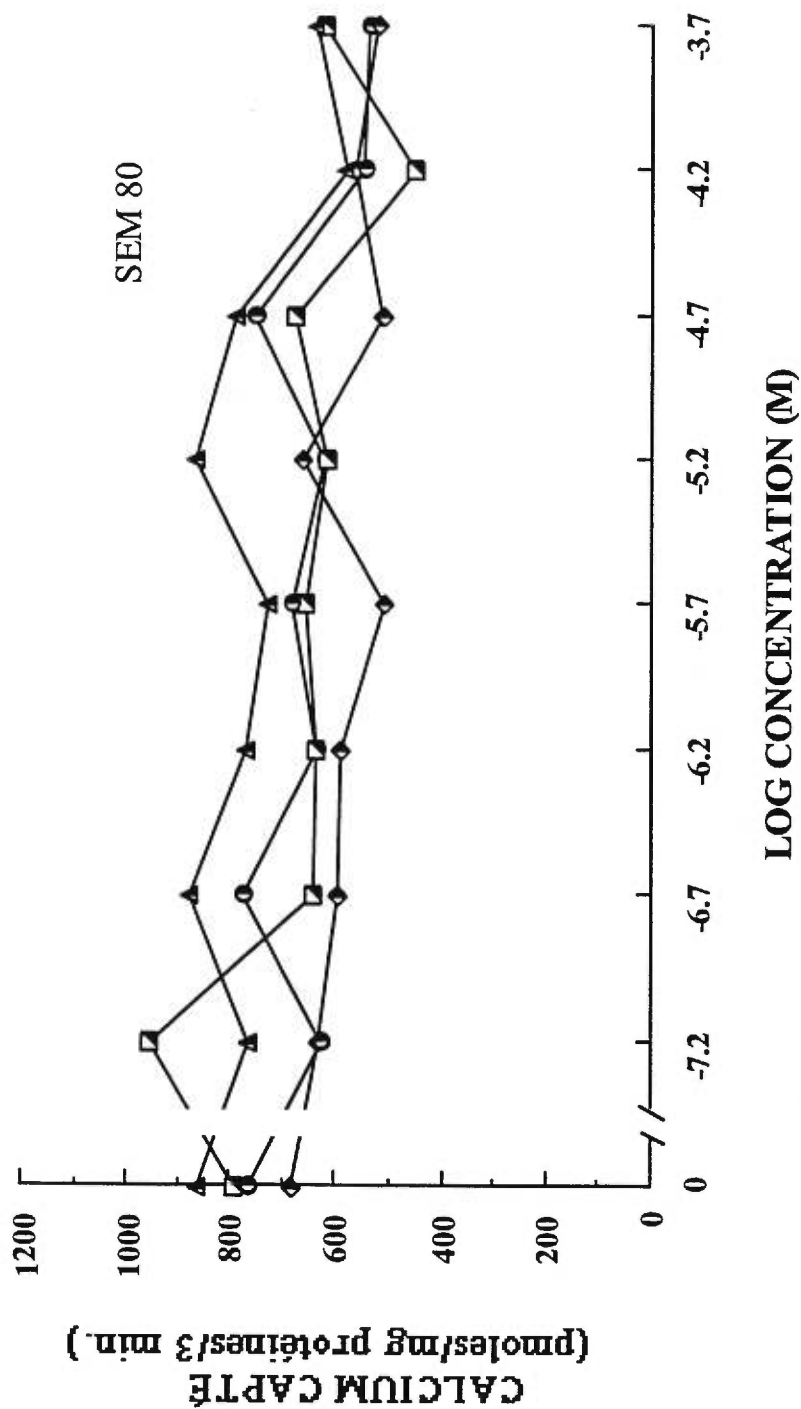


Figure 4b: Effet des antidépresseurs tricycliques sur le captage net ATP-dépendant de calcium. Chaque point de chacune des courbes représente la moyenne des résultats de six préparations synaptosomales. Désipramine (◻), imipramine (◊), amitriptyline (●) et clomipramine (△).

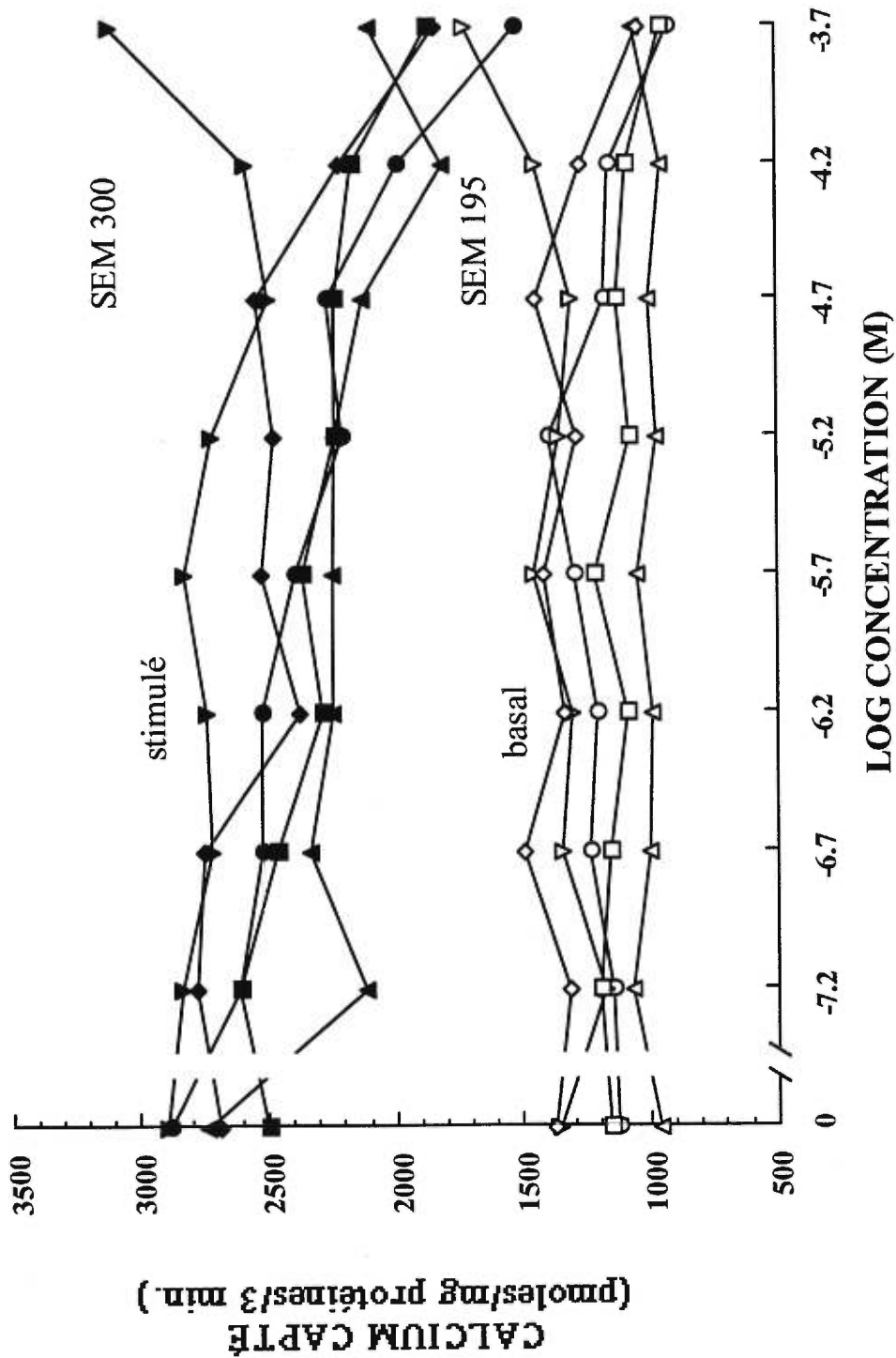


Figure 5a : Effet des antidépresseurs atypiques sur le captage de calcium en présence d'ATP (état stimulé) et en absence d'ATP (état basal). Chaque point de chacune des courbes représente la moyenne des résultats de six préparations synaptosomales. Miansérine (□), desméthylmiansérine (◇), venlafaxine (▽), O-desméthylvenlafaxine (Δ) et fluxétine (○).

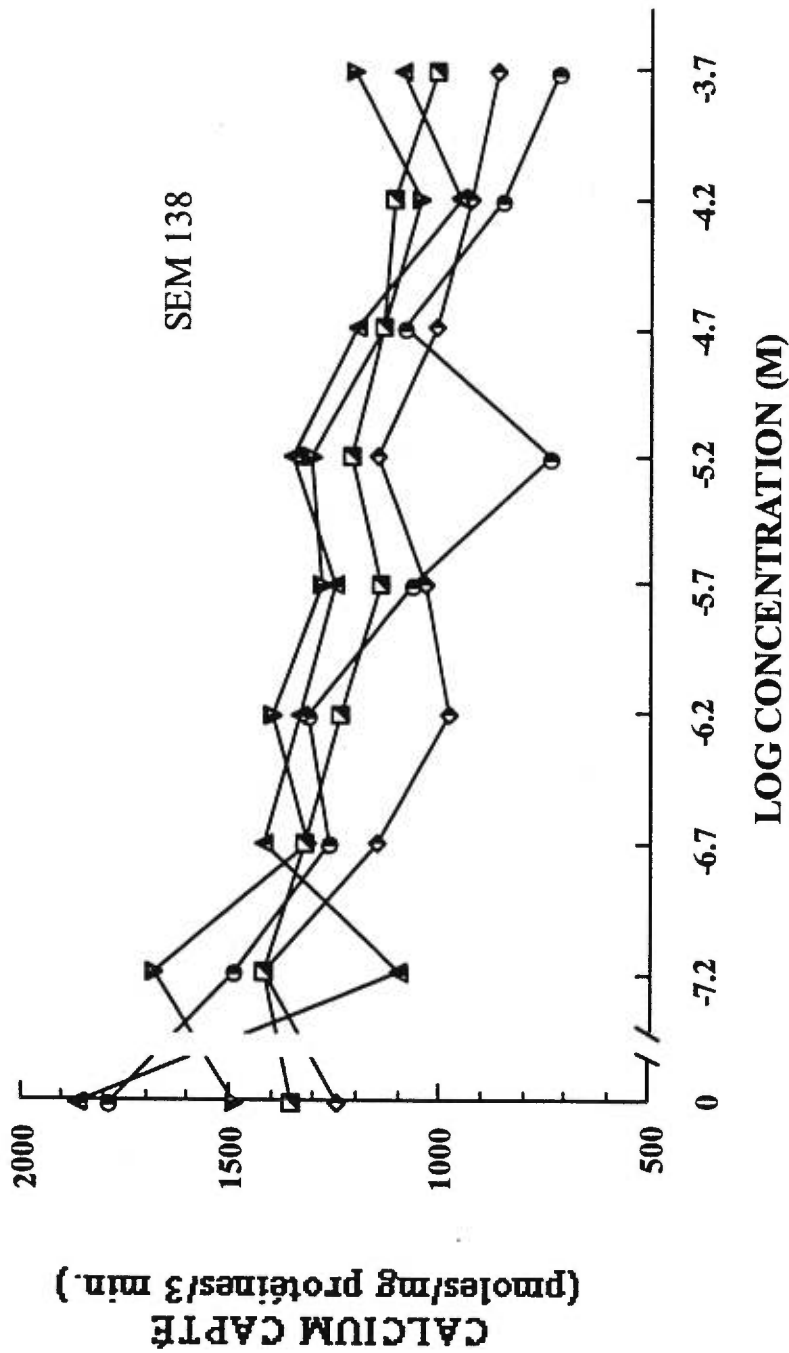


Figure 5b: Effet des antidépresseurs atypiques sur le captage net ATP-dépendant de calcium. Chaque point de chacune des courbes représente la moyenne des résultats de six préparations synaptosomales. Miansérine (◻), desméthylmiansérine (◊), venlafaxine (▼), O-desméthylvenlafaxine (▲) et fluoxétine (○).

DISCUSSION

L'effet des antidépresseurs tricycliques sur le captage ATP-dépendant de calcium par le réticulum endoplasmique neuronal démontre, pour la première étude une légère inhibition du captage de calcium en fonction de la dose, et ce pour l'ensemble des quatre antidépresseurs. Dans la seconde étude, nous avons pu constater que les antidépresseurs atypiques génèrent une inhibition apparemment plus évidente du captage net calcique ATP-dépendant, en relation avec l'augmentation de la dose. Ces résultats suggèrent donc que les antidépresseurs tricycliques et atypiques n'induisent pas une stimulation du captage ATP-dépendant de calcium par le réticulum endoplasmique neuronal. Une telle stimulation aurait été requise pour affirmer que les antidépresseurs, par leurs effets sur le réticulum endoplasmique, avaient une éventuelle capacité de normaliser un signal calcique trop élevé. Ainsi, des effets de ces antidépresseurs sur d'autres sites de régulation de calcium seraient nécessaires pour expliquer comment ces substances pourraient abaisser un niveau élevé de calcium intracellulaire qui serait impliqué dans l'apparition de maladies affectives (Dubovsky et coll., 1992a).

En effet, comme le tamponnage de calcium s'effectue aussi par d'autres mécanismes cellulaires, il nous paraît plausible que les antidépresseurs puissent avoir d'autres sites d'action que le réticulum endoplasmique pour normaliser un signal calcique trop élevé. Par exemple, la stimulation par les antidépresseurs de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrane plasmique serait en conformité avec la théorie de Dubovsky (1992a), puisqu'une diminution de la concentration

cytosolique de calcium en résulterait; il faut cependant mentionner que des recherches antérieures ont démontré un effet monophasique d'inhibition, à des doses supra-thérapeutiques, du fonctionnement de cet échangeur (Lavoie et coll., 1990; Beauchamp et coll., 1992). La Ca^{2+} -ATPase de la membrane plasmique pourrait également constituer une cible pour les substances antidépresseurs en normalisant la trop haute concentration calcique cytosolique par stimulation de son mécanisme. De plus, bien que son implication nous paraisse moins évidente, la mitochondrie pourrait représenter un site d'action pour les antidépresseurs. En effet, elle possède un mécanisme de tamponnage de calcium, et de plus elle produit de l'ATP qui est essentiel au bon fonctionnement de la Ca^{2+} -ATPase de la membrane plasmique et de la membrane du réticulum endoplasmique. Récemment, on a démontré que les vésicules synaptiques (Blondel et coll., 1995; Petersen, 1996), l'enveloppe nucléaire (Petersen et coll., 1998) et même l'appareil de Golgi (Pinto et coll., 1998) sont des sites de stockage calcique munis de pompes ATP-ases (SERCA) et/ou de récepteurs à la ryanodine et à l' IP_3 . Ainsi, suite à un signal calcique trop important comme c'est le cas dans les maladies affectives, une normalisation par les antidépresseurs pourrait se faire par des effets sur ces différents sites.

Une stimulation de libération passive de calcium a été rapportée pour la trifluopérazine, un antipsychotique de la classe des phénothiazines, dans des microsomes de cerveau (Rocha et coll., 1996). Volpe et coll. (1984) n'ont par

contre pas observé, avec l'imipramine et la trifluopérazine, une telle stimulation de la libération de calcium dans les vésicules de réticulum sarcoplasmique. Étant donné le comportement similaire de la trifluopérazine et de l'imipramine sur la libération de calcium dans les vésicules de réticulum sarcoplasmique, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'imipramine, tout comme la trifluopérazine, produirait une stimulation d'une libération passive de calcium du réticulum endoplasmique neuronal. Ainsi, l'inhibition du captage ATP-dépendant de calcium obtenue dans notre étude par les antidépresseurs pourrait être due, en plus de leur effet direct d'inhibition sur la Ca^{2+} -ATPase (Balzer et coll., 1968; Volpe et coll., 1984; Rocha et coll., 1996), à une stimulation de la libération de calcium à partir du réticulum endoplasmique de synaptosomes rupturés de cerveau.

Même si l'inhibition du captage de calcium ATP-dépendant ne représente pas un mécanisme vraisemblable de l'action thérapeutique des antidépresseurs, il s'avère quand même intéressant de considérer la connotation clinique de cet effet lors de l'administration chronique. Un traitement efficace avec un antidépresseur tricyclique correspond à une concentration plasmatique à l'état d'équilibre de 100 à 200 ng/ml (Baldessarini, 1985), ce qui équivaut à 0,3 à 0,6 μM . Par ailleurs, le quotient observé entre la concentration cérébrale et la concentration plasmatique des antidépresseurs tricycliques est approximativement de 20:1 lors d'un traitement chronique (Morselli, 1977; Baumann et coll., 1984; Fujita et coll.,

1991). En fonction de ces paramètres, la concentration cérébrale de tricycliques se situerait approximativement entre 6 et 12 μM lors d'un traitement chronique. La relation dose-réponse que nous avons observée indique, pour les quatre antidépresseurs tricycliques étudiés, une inhibition marginale d'environ 10% du captage ATP-dépendant de calcium au niveau du réticulum endoplasmique neuronal lors d'un traitement clinique chronique à ces substances.

Pour les antidépresseurs atypiques, la concentration plasmatique à l'équilibre de la miansérine lors d'un traitement chronique est de 0,06 à 0,33 μM (Perry et coll., 1978; Montgomery et coll., 1983; Dawling et coll., 1987). Sachant que le quotient entre la concentration cérébrale de miansérine et celle de sa concentration plasmatique est approximativement de 12:1 chez les rongeurs pour des concentrations plasmatiques à l'équilibre similaires à celles chez l'homme (Altamura et coll., 1987; Kurata et Kurachi, 1989), on devrait s'attendre à une concentration cérébrale d'environ 0,72 à 4 μM . La concentration moyenne de la desméthylmiansérine dans le plasma est environ 40% de celle de sa substance mère (Dawling et coll., 1987), ce qui correspond à une concentration cérébrale de 0,3 à 1,6 μM de cette molécule chez le patient. Pour la miansérine, incluant son métabolite, la relation concentration-effet décrite dans cette étude indiquerait également une inhibition approximative de 10% du captage ATP-dépendant de calcium aux concentrations atteintes durant l'administration chronique de miansérine.

Pour la venlafaxine, une concentration plasmatique à l'équilibre de 105 ng/ml a été rapportée (Troy et coll., 1998) ce qui correspond à 0,33 μM . Le rapport des concentrations cérébrale et plasmatique n'ayant jamais été déterminé, nous avons supposé que ce dernier se situe entre 12 :1 et 20 :1 ce qui résulterait en une concentration cérébrale d'environ 3,6 à 6 μM pour la venlafaxine. De plus, la concentration plasmatique moyenne à l'état d'équilibre de son métabolite principal, la O-desméthylvenlafaxine, est de 388 ng/ml (Troy et coll., 1998), ce qui représente 1,47 μM . Assumant encore un rapport des concentrations cérébrale et plasmatique entre 12:1 et 20:1, une concentration cérébrale du desméthylvenlafaxine d'environ 18 à 29 μM serait envisagée. Ainsi, prenant en considération son métabolite principal, la venlafaxine produirait une inhibition approximative de l'activité de captage de 30% chez les patients suivant un traitement chronique avec cet antidépresseur.

Enfin, la concentration plasmatique à l'état d'équilibre de la fluoxétine, ainsi que celle de la norfluoxétine, se situe entre 0,15 et 1,5 μM (Orsulak et coll., 1988; Kelly et coll., 1989). Le rapport des concentrations cérébrale et plasmatique de la combinaison fluoxétine-norfluoxétine chez l'homme lors d'un traitement chronique est chiffré à 20 :1, à la résonance magnétique nucléaire (Karson et coll., 1993; Komoroski et coll., 1994), qui démontre aussi un intervalle de concentration cérébrale de fluoxétine-norfluoxétine d'environ 3 à 30 μM ; de plus, comme dans le plasma, la fluoxétine et la norfluoxétine semblent être représentées à part égale

dans le cerveau (Komoroski et coll., 1994). Sur la base de nos résultats expérimentaux présentés dans cette étude et d'une concentration conservatrice de 1,5 à 15 μM de fluoxétine dans le cerveau, nous postulons qu'un traitement chronique à la fluoxétine induirait une inhibition du captage calcique ATP-dépendant de 35 à 46%. Si la norfluoxétine démontrait une relation concentration-effet similaire à sa substance mère, comme cela a été démontré pour les métabolites déméthylés de la miansérine et de la venlafaxine dans notre étude, l'inhibition du captage ATP-dépendant de calcium représenterait un minimum de 43% et un maximum de 45% au cours d'un traitement chronique à la fluoxétine. De façon globale, pour l'ensemble des antidépresseurs évalués, la fluoxétine semble posséder la plus grande capacité à inhiber le captage calcique ATP-dépendant dans le réticulum endoplasmique neuronal lors d'un traitement chronique.

BIBLIOGRAPHIE

Abdel-Latif, A. A. Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides, and the generation of second messengers. *Pharmacol. Rev.* **38**: 227-72. 1986.

Adlerberg, S., Toren, P., Mester, R., Rehavi, M., Skolnick, P. and Weizman, A. Verapamil is not an antidepressant in patients resistant to tricyclic antidepressants. *Clin. Neuropharmacol.* **17**: 294-7. 1994.

Aghajanian, G.K. Feedback regulation of central monoaminergic neurons: evidence from single cell recording studies. *Essays in Neurochem. and Neuropharmacol.* **3**:1-33

Altamura, A.C., De Novellis, F., Mauri, M.C. and Gomeni, R. Plasma and brain pharmacokinetics of mianserin after single and multiple dosing in mice. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **11**: 23-33. 1987.

Anderson, D.C., Cooper, A.F., and Naylor, G.J. Vitamin D intoxication, with hypernatraemia, potassium and water depletion, and mental depression. *Brit. Med. J.* **4**: 744-6. 1968.

Angst, J. Epidemiology of depression. *Psychopharmacology* **106**: 71-4. 1992.

Aronstam, R.S. and Hoss, W. Tricyclic antidepressant inhibition of depolarization-induced uptake of calcium by synaptosomes from rat brain. *Biochem. Pharmacol.* **34**: 902-4. 1985.

Arora, R.C. and Meltzer, H.Y. Serotonergic measures in the brains of suicide victims: 5-HT₂ binding sites in the frontal cortex of suicide victims and control subjects. *Am. J. Psychiat.* **146**: 730-6. 1989.

Askew, B.M. A simple screening method for imipramine-like antidepressant agents. *Life Science* **2**: 725-30. 1963.

Axelrod, J., Whitby, L.G. and Hertting, G. Effects of psychotropic drugs on the uptake of H³-norepinephrine by tissues. *Science* **133**: 383-384. 1961.

Baldessarini, R.J. Drugs and the treatment of psychiatric disorders. In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 7th ed. Edited by Gilman, A.G., Goodman, L.S., Rall, T.W. and Murad, F. Macmillan Publishing Company, New York pp. 387-445. 1985.

Balzer, H., Makinose, M. and Hasselbach, W. The inhibition of the sarcoplasmic calcium pump by prenylamine, reserpine, chlorpromazine and imipramine. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **260**: 444-55. 1968.

Banerjee, S.P., Kung, L.S. and Chanda, S.K. Development of β adrenergic receptor subsensitivity by antidepressants. *Nature* **268**: 455-6. 1977.

Banks, R.E., Aiton, J.F., Naylor, G.J., Cramb, G., Wright, A.F., Griffith, R.C. and Reich, T. Cation transport in lymphoblastoid cell lines established from bipolar manic-depressive patients. *J. Affective Disord.* **16**: 259-67. 1989.

Batra, S. The effect of drugs on calcium uptake and calcium release by mitochondria and sarcoplasmic reticulum of frog skeletal muscle. *Biochem. Pharmacol.* **23**: 89-104. 1974.

Baumann, P.A. and Maître, L. Blockade of presynaptic α -receptors and of amine uptake in the rat brain by the antidepressant mianserin. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **300**: 31-37. 1977.

Baumann, P., Gaillard, J.-M., Jonzier-Perey, M., Gerber, C. and Bouras, C. Evaluation of the levels of free and total amitriptyline and metabolites in the plasma and brain of the rat after long-term administration of doses used in receptor studies. *Psychopharmacology* **84**: 489-95. 1984.

Beauchamp, G., Lavoie, P.-A. and Élie, R. Effect of trimipramine on depolarization-induced and Na^+ - Ca^{2+} exchange-induced ^{45}Ca uptake in synaptosomes from the cortex of rat brain. *Neuropharmacology* **31**: 229-34. 1992.

Beauchamp, G., Lavoie, P.-A. and Élie, R. Effect of some stereoisomeric tricyclic antidepressants on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in synaptosomes. *Psychopharmacology* **110**: 133-9. 1993.

Beauchamp, G., Lavoie, P.-A. and Élie, R. Differential effect of desipramine and 2-hydroxydesipramine on depolarization-induced calcium uptake in synaptosomes from rat limbic sites. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **73**: 619-23. 1995.

Berk, M., Bodemer, W., Vanoudenhove, T. and Butkow, N. The platelet intracellular calcium response to serotonin is augmented in bipolar manic and depressed patients. *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.* **10**: 189-93. 1995.

Beskow, J., Gottfries, C.G., Roos, B.E. and Winblad, D.B. Determination of monoamine and monoamine metabolites in the human brain: Postmortem studies in a group of suicides and in a control group. *Acta Psychiat. Scand.* **53**: 7-20. 1976.

Blaustein, M.P., Ratzlaff, R.W., Kendrick, N.C. and Schweitzer, E.S. Calcium buffering in presynaptic nerve terminals. I. Evidence for involvement of a nonmitochondrial ATP-dependent sequestration mechanism. *J. Gen. Physiol.* **72**: 15-41. 1978a.

Blaustein, M.P., Ratzlaff, R.W. and Schweitzer, E.S. Calcium buffering in presynaptic nerve terminals. II. Kinetic properties of a nonmitochondrial Ca^{2+} sequestration mechanism. *J. Gen. Physiol.* **72**: 43-66. 1978b.

Blier, P., de Montigny, C. and Chaput, Y. Modifications of the serotonin system by antidepressant treatments: implications for the therapeutic response in major depression. *J. Clin. Psychopharmacol.* **7**: 24S-35S. 1987.

Blier, P. and de Montigny, C. Current advances and trends in the treatment of depression. *Trends Pharmacol. Sci.* **15**: 220-6. 1994.

Blondel, O., Bell, G.I. and Seino, S. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors, secretory granules and secretion in endocrine and neuroendocrine cells. *Trends Neurosci.* **18**: 157-61. 1995.

Bowden, C.L., Huang, L.G., Javors, M.A., Johnson, J.M., Seleshi, E., McIntyre, K., Contreras, S. and Maas, J.W. Calcium function in affective disorders and healthy controls. *Biol. Psychiat.* **23**: 367-76. 1988.

Brandl, C.J., Green, N.M., Korczak, B. and MacLennan, D.H. Two Ca^{2+} -ATPase genes: homologies and mechanistic implications of deduced amino acid sequences. *Cell* **44**: 597-607. 1986.

Brandl, C.J., de Leon, S., Martin, D.R. and MacLennan, D.H. Adult forms of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. Expression in developing skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **262**: 3768-74. 1987.

Brown, N.L., Sirugue, O. and Worcel, M. The effects of some slow channel blocking drugs on high affinity serotonin uptake by rat brain synaptosomes. *Eur. J. Pharmacol.* **123**: 161-5. 1986.

Budd, S.L. and Nicholls, D.G. A reevaluation of the role of mitochondria in neuronal Ca^{2+} homeostasis. *J. Neurochem.* **66**: 403-11. 1996.

Burk, S.E., Lytton, J., MacLennan, D.H. and Shull, G.E. cDNA cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of a third organellar Ca^{2+} pump. *J. Biol. Chem.* **264**: 18561-68. 1989.

Byck, R. Drugs and the treatment of psychiatric disorders. In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 5th ed. Edited by Goodman, L.S. and Gilman, A. Macmillan Publishing Company, New York pp. 152-200. 1975.

Carafoli, E. Intracellular calcium homeostasis. *Ann. Rev. Biochem.* **56**: 395-433. 1987.

Carman, J.S., Post, R.M., Goodwin, F.K. and Bunney, W.E.Jr Calcium and electroconvulsive therapy of severe depressive illness. *Biol. Psychiat.* **12**: 5-17. 1977.

Choi, J.J., Huang, G.-J., Shafik, E., Wu, W.-H. and McArdle, J.J. Imipramine's selective suppression of an L-type calcium channel in neurons of murine dorsal root ganglia involves G proteins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **263**: 49-53. 1992.

Coffernils, M., De Rijcke, A. and Herbaut, C. Hyperparathyroidism and depression: a clinical case and review of the literature. *Rev. Med. Bruxelles* **10**: 29-32. 1989.

Cohen, L.J. Rational drug use in the treatment of depression. *Pharmacotherapy* **17**: 45-61. 1997.

Connor, J.A., Kretz, R. and Shapiro, E. Calcium levels measured in a presynaptic neurone of *Aplysia* under conditions that modulate transmitter release. *J. Physiol.* **375**: 625-42. 1986.

Costa, E., Garattini, S. and Valzelli, L. Interactions between reserpine, chlorpromazine and imipramine. *Experientia* **16**: 461-3. 1960.

Costa, E. and Brodie, B.B. Concept of the neurochemical transducer as an organized molecular unit at sympathetic nerve endings. *Prog. Brain Res.* **8**: 168-85. 1964.

Cusack, B., Nelson, A. and Eichelson, E. Binding of antidepressants to human brain receptors: focus on newer generation compounds. *Psychopharmacol.* **114**: 559-65. 1994.

Dale, H.H. and Gaddum, J.H. Reactions of denervated voluntary muscle, and their bearing on the mode of action of parasympathetic and related nerves. *J. Physiol.* **70**: 109-44. 1930.

Dawling, S., Ford, S., Ariyanayagam, P., O'Neal, H. and Lewis, R.R. Plasma concentrations of mianserin after single dose and at steady-state in depressed elderly patients. *Clin. Pharmacokinet.* **12**: 73-8. 1987.

de Meis, L., Gomez-Puyou, M.T. and Gomez-Puyou, A. Inhibition of mitochondrial F_1 ATPase and sarcoplasmic reticulum ATPase by hydrophobic molecules. *Eur. J. Biochem.* **171**: 343-9. 1988.

Detwiler, T.C., Charo, I.F. and Feinman, R.D. Evidence that calcium regulates platelet function. *Thrombos. Haemostas.* **40**: 207-11. 1978.

Di Polo, R., Requena, J., Brinley, F.J. Jr., Mullins, L.J., Scarpa, A. and Tiffert, T. Ionized calcium concentrations in squid axons. *J. Gen. Physiol.* **67**: 433-67. 1976.

Doyle, V.M. and Ruegg, U.T. Lack of evidence for voltage dependent calcium channels on platelets. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **127**: 161-7. 1985.

Dubovsky, S.L., Christiano, J., Daniell, L.C., Franks, R.D., Murphy, J., Alder, L., Baker, N. and Harris, R.A. Increased platelet intracellular calcium concentrations in patients with bipolar affective disorders. *Arch. Gen. Psychiat.* **46**: 632-8. 1989.

Dubovsky, S.L., Murphy, J., Christiano, J. and Lee, C. The calcium second messenger system in bipolar disorders: data supporting new research directions. *J. Neuropsychiat. Clin. Neurosci.* **4**: 3-14. 1992a.

Dubovsky, S.L., Murphy, J., Thomas, M. and Rademacher, J. Abnormal intracellular calcium ion concentration in platelets and lymphocytes of bipolar patients. *Am. J. Psychiat.* **149**: 118-20. 1992b.

Dubovsky, S.L. Approaches to developing new anxiolytics and antidepressants. *J. Clin. Psychiat.* **54(suppl. 5)**: 75-83. 1993.

Dyck, L.E. and Boulton, A.A. Effects of antidepressant drugs on inositol phospholipid hydrolysis in rat cerebral slices. *Neurochem. Res.* **14**: 1047-52. 1989.

Ebashi, S. A granule-bound relaxation factor in skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* **76**: 410-23. 1958.

Eccles, J.C. Conduction and synaptic transmission in nervous system. *Ann. Rev. Physiol.* **10**: 93-116. 1948.

Eckert, A., Gann, H., Riemann, D., Aldenhoff, J. and Muller, W.E. Elevated intracellular calcium levels after 5-HT₂ receptor stimulation in platelets of depressed patients. *Biol. Psychiat.* **34**: 565-8. 1993.

Eggermont, J.A., Wuytack, F., De Jaegere, S., Nelles, L. and Casteels, R. Evidence for two isoforms of the endoplasmic reticulum Ca²⁺-pump in pig smooth muscle. *Biochem. J.* **260**: 757-61. 1989.

Eggermont, J.A., Wuytack, F. and Casteels, R. Characterization of the mRNAs encoding the gene 2 sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺ pump in pig smooth muscle. *Biochem. J.* **266**: 901-7. 1990.

Enna, S.J., Mann, E., Kendall, D. and Stancel, G.M. Effect of chronic antidepressant administration on brain neurotransmitter receptor binding. In: Antidepressants: Neurochemical, Behavioural and Clinical Perspectives. Edited by Enna, S.J, Malick, J.B. and Richelson E. Raven Press, New York pp. 91-105. 1981.

Extein, I., Tallman, J., Smith, C.C. and Goodwin, F.K. Changes in lymphocyte beta-adrenergic receptors in depression and mania. *Psychiat. Res.* **1**: 191-7. 1979.

Fairhurst, A.S. and Hasselbach, W. Calcium efflux from a heavy sarcotubular fraction. Effects of ryanodine, caffeine and magnesium. *Eur. J. Biochem.* **13**: 504-9. 1970.

Faludi, G., Magyar, I., Tekes, K., Tothfalusi, L. and Magyar, K. Measurement of ³H-serotonin uptake in blood platelets in major depressive episodes. *Biol. Psychiat.* **23**: 833-6. 1988.

Famulski, K. and Carafoli, E. Ca²⁺ transporting activity of membrane fractions isolated from the post-mitochondrial supernatant of rat liver. *Cell Calcium* **3**: 263-81. 1982.

Frazer, A. and Conway, P. Pharmacologic mechanisms of action of antidepressants. *Psychiat. Clin. North Am.* **7**: 575-86. 1984.

Frazer, A. Antidepressants. *J. Clin. Psychiat.* **58(suppl. 6)**: 9-25. 1997.

Frize, E.D. Mental depression in hypertensive patients treated for long periods with large doses of reserpine. *New England J. Med.* **251**: 1006-8.

Fujita, K., Kobayashi, A., Suzuki, S. and Nakazawa, K. Changes of serotonin and catecholamines are related to pharmacokinetic alterations of clomipramine in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* **204**: 227-33. 1991.

Fukuda, H., Nishida, A., Saito, H., Shimizu, M. and Yamawaki, S. Imipramine stimulates phospholipase C activity in rat brain. *Neurochem. Int.* **25**: 567-71. 1994.

Garrett, K.M. and Ross, D.H. Effects of in vivo ethanol administration on $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase and ATP-dependent Ca^{2+} uptake activity in synaptosomal membranes. *Neurochem. Res.* **8**: 1013-28. 1983.

Gatewood, J.W., Organ, C.H. Jr. and Mead, B.T. Mental changes associated with hyperparathyroidism. *Am. J. Psychiat.* **132**: 129-32. 1975.

Gill, D.L. and Chueh, S.-H. An intracellular (ATP + Mg²⁺)-dependent calcium pump within the N1E-115 neuronal cell line. *J. Biol. Chem.* **260**: 9289-97. 1985.

Gill, D.L. Calcium signalling: receptor kinships revealed. *Nature* **342**: 16-18. 1989.

Gillette, J.R., Dingell, I.V., Sulser, F., Kuntzman, R. and Brodie, B.B. Isolation from rat brain of metabolic product, desmethyylimipramine, that mediates the antidepressant activity of imipramine. *Experientia* **17**: 417-20. 1961.

Gjerris, A., Werdelin, L., Rafaelson, O.J., Alling, C. and Christensen, N.J. CSF dopamine increased in depression: CSF dopamine, noradrenaline and their metabolites in depressed patients and in controls. *J. Affective Disord.* **13**: 279-86. 1987.

Glowinsky, J. and Axelrod, J. Inhibition of uptake of tritiated noradrenaline in the intact rat brain by imipramine and structurally related compounds. *Nature* **204**: 1318-9. 1964.

Goeger, D.E, Riley, R.T, Dorner, J.W. and Cole, R.J. Cyclopiazonic acid inhibition of the Ca^{2+} -transport ATPase in rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochem. Pharmacol.* **37**: 978-81. 1988.

Goodlett, I.E., Mireylees, S.E. and Sugrue, M.F. Effects of mianserin, a new antidepressant on the in vivo and in vitro uptake of monoamines. *Brit. J. Pharmacol.* **61**: 307-313. 1977.

Gram, L.F, Brosen, K., Christensen, P. and Kragh-Sorenson, P. Pharmacokinetic considerations relevant to the pharmacodynamics of antidepressants. In: *Clinical Pharmacology in Psychiatry: Selectivity in Psychotropic Drug Action, Promises or Problems? Series 3*. Edited by Dahl, S.G., Gram, L.F., Paul, S.M. and Potter, W.Z. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York pp. 184-92. 1987.

Hallam, T.J., Sanchez, A. and Rink, T.J. Stimulus-response coupling in human platelets. Changes evoked by platelet-activating factor in cytoplasmic free calcium monitored with the fluorescent calcium indicator quin2. *Biochem. J.* **218**: 819-27. 1984.

Halper, J.P., Brown, R.P., Sweeney, J.A., Kocsis, J.H., Peters, A. and Mann, J.J. Blunted beta-adrenergic responsivity of peripheral blood mononuclear cells in endogenous depression. Isoproterenol dose-response studies. *Arch. Gen. Psychiat.* **45**: 241-4. 1988.

Harris, R.A. Ethanol and pentobarbital inhibition of intra-synaptosomal sequestration of calcium. *Biochem. Pharmacol.* **30**: 3209-15. 1981.

Hasselbach, W. and Makinose M. Die Calcium pumpe der Erschlaffungsgrana des Muskels und ihre Abhängigkeit von der ATP-Spaltung. *Biochem. Z.* **333**: 518-28. 1961.

Hasselbach, W. Relaxing factor and the relaxation of muscle. *Prog. Biophys. Chem.* **14**: 167-222. 1964.

Hayabara, T., Hashimoto, K., Izumi, H., Morioka, E. and Hosokawa, K. Neuropsychiatric disorders in primary hyperparathyroidism. *Jap. J. Psychiat. Neurol.* **41**: 33-40. 1987.

Heilmann, C., Spamer, C. and Gerok, U. The phosphoprotein intermediate of a Ca^{2+} transport ATPase in rat liver endoplasmic reticulum. *Biochem. Biophys. Commun.* **114**: 584-92. 1983.

Heilmann, C., Spamer, C. and Gerok W. The calcium pump in rat liver endoplasmic reticulum. Demonstration of the phosphorylated intermediate. *J. Biol. Chem.* **259**: 11139-44. 1984.

Heilmann, C., Spamer, C. and Gerok, W. Mechanism of the calcium pump in the endoplasmic reticulum of liver: phosphoproteins as reaction intermediates. *Cell Calcium* **10**: 275-87. 1989.

Helmeste, D.M., Tang, S.W., Reist, C. and Vu, R. Serotonin uptake inhibitors modulate intracellular Ca^{2+} mobilization in platelets. *Eur. J. Pharmacol.* **288**: 373-77. 1995.

Helmeste, D.M. and Tang, S.W. The role of calcium in the etiology of the affective disorders. *Jap. J. Pharmacol.* **77**: 107-16. 1998.

Hunt, C.C. and Kuffler, S.W. Pharmacology of the neuromuscular junction. *Pharmacol. Rev.* **2**: 96-120. 1950.

Inesi, G. Transport across sarcoplasmic reticulum in skeletal and cardiac muscle. In: Membrane Transport in Biology. Vol. II. Edited by Giebish, G., Tosteson, D.C and Ussing, H.H. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York pp. 357-93. 1979.

Javors, M.A., Bowden, C.L. and Ross, D.H. Kinetic characterization and substrate requirement of the Ca^{2+} uptake system in platelet membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **691**: 220-6. 1982.

Jimerson, D.C., Post, R.M., Carman, J.S, van Kammen, D.P., Wood, J.H., Goodwin, F.K. and Bunney, W.E.Jr CSF calcium: Clinical correlates in affective illness and schizophrenia. *Biol. Psychiat.* **14**: 37-51. 1979.

Johnson, P.N. and Inesi, G. The effect of methylxanthines and local anesthetics on fragmented sarcoplasmic reticulum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **169**: 308-14. 1969.

Kagaya, A., Mikuni, M., Kusumi, I., Yamamoto, H. and Takahashi, K. Serotonin-induced acute desensitization of serotonin₂ receptors in human platelets via a mechanism involving protein kinase C. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **255**: 305-11. 1990.

Kalin, N.H. and Dawson, G. Neuroendocrine dysfunction in depression: hypothalamic-anterior pituitary systems. *Trends Neurosci.* **9**: 261-6. 1986.

Karson, C.N., Newton, J.E.O., Livingston, R., Jolly, J.B., Cooper, T.B., Sprigg, J. and Komoroski, R.A. Human brain fluoxetine concentrations. *J. Neuropsychiat. Clin. Neurosci.* **5**: 322-9. 1993.

Kass, G.E.N., Duddy, S.K., Moore, G.A. and Orrenius, S. 2,5-di(tertbutyl)-1,4-benzohydroquinone rapidly elevates cytosolic Ca^{2+} concentration by mobilizing the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} pool. *J. Biol. Chem.* **264**: 15192-8. 1989.

Katz, B. and Miledi, R. The role of Ca^{2+} in neuromuscular facilitation. *J. Physiol.* **195**: 481-92. 1968.

Katz, B. The release of neural transmitter substances. Liverpool University Press. 1969.

Kelly, M.W., Perry, P.J., Holstad, S.G. and Garvey, M.J. Serum fluoxetine and norfluoxetine concentrations and antidepressant response. *Ther. Drug Monit.* **11**: 165-70. 1989.

Kline, N.S. Clinical experience with iproniazid (Marsilid). *J. Clin. Exp. Psychopathol.* **19**: 72-8. 1958.

Komoroski, R.A., Newton, J.E., Cardwell, D., Sprigg, J., Pearce, J. and Karson, C.N. In vivo ^{19}F spin relaxation and localized spectroscopy of fluoxetine in human brain. *Magn. Reson. Med.* **31**: 204-11. 1994.

Konopka, L.M., Cooper, R. and Crayton, J.W. Serotonin-induced increases in platelet cytosolic calcium concentration in depressed, schizophrenic, and substances abuse patients. *Biol. Psychiatry* **39**: 708-13. 1996.

Korczak, B., Zarain-Herzberg, A., Brandl, C.J., Ingles, C.J, Green, N.M. and MacLennan, D.H. Structure of the rabbit fast-twitch skeletal muscle Ca^{2+} -ATPase gene. *J. Biol. Chem.* **263**: 4813-19. 1988.

Kuhn, R. The treatment of depressive states with G22355 (imipramine hydrochloride). *Am. J. Psychiat.* **115**: 459-64. 1958

Kurata, K. and Kurachi, M. Heterogeneous distribution of mianserin in rat brain during chronic continuous infusion. *Pharmacology* **39**: 285-90. 1989.

Kusumi, I., Koyama, T. and Yamashita, I. Serotonin-stimulated Ca^{2+} response is increased in the blood platelets of depressed patients. *Biol. Psychiat.* **30**: 310-2. 1991.

Kusumi, I., Koyama, T. and Yamashita, I. Thrombin-induced platelet calcium mobilization is enhanced in bipolar disorders. *Biol. Psychiat.* **32**: 731-4. 1992.

Lavoie, P.-A., Mekhail-Ishak, K. and Sharkawi, M. Biphasic effect of local anesthetics on the adenosine triphosphate-dependent calcium uptake by lysed synaptosomes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **64**: 218-21. 1986.

Lavoie, P.-A., Beauchamp, G. and Élie, R. Tricyclic antidepressants inhibit voltage-dependent calcium channels and Na^{+} - Ca^{2+} exchange in rat brain cortex synaptosomes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **68**: 1414-8. 1990.

Lavoie, P.-A., Beauchamp, G. and Élie, R. Absence of stereoselectivity of some tricyclic antidepressants for the inhibition of depolarization-induced calcium uptake in rat cingulate cortex synaptosomes. *J. Psychiat. Neurosci.* **19**: 208-12. 1994.

Lavoie, P.-A., Beauchamp, G. and Élie, R. Atypical antidepressants inhibit depolarization-induced calcium uptake in rat hippocampus synaptosomes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **75**: 983-7. 1997.

Lavoie, P.-A., Cherradi, S. and Élie, R. Inhibition of K⁺-induced Ca²⁺ uptake in rat hippocampus synaptosomes by mianserin enantiomers. *Eur. J. Pharmacol.* **369**: 387-90. 1999.

Lingjaerde, O. The biochemistry of depression: A survey of monoaminergic, neuroendocrinological, and bio-rythmic disturbances in endogenous depression. *Acta Psychiat. Scand.* **302**: 36-51. 1983.

Llinas, R. and Nicholson C. Calcium role in depolarization-secretion coupling: an aequorin study in squid giant synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 187-90. 1975.

Llinas, R. and Sugimori, M. Electrophysiological properties of in vitro Purkinje cell dendrites in mammalian cerebellar slices. *J. Physiol.* **305**: 197-213. 1980.

Llopsi, J., Chow, S.B., Kass, G.E., Gahm, A. and Orrenius, S. Comparison between the effects of microsomal Ca^{2+} -translocase inhibitors thapsigargin and 2,5-di-(t-butyl)-1,4-benzohydroquinone on cellular calcium fluxes. *Biochem. J.* **277**: 553-6. 1991.

Lloyd, K.G., Farley, I.J., Deck, J.H.N. and Horneykiewicz, O. Serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid in discrete areas of the brainstem of suicide victims and control patients. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* **11**: 387-97. 1974.

Loewi, O. Ueber humorale Uebertragbarkeit der Herzmervenwirkung. *Pflüger's Arch.* **189**: 239-42. 1921.

Loomer, H.P., Saunders, J.C. and Kline, N.S. A clinical and pharmacodynamic evaluation of iproniazid as psychic energizer. In: *Psychiatric Research Reports*. Edited by Pasamanick, B. and Knapp, P.H. American Psychiatric Association pp. 129-31. 1958.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.L. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-75. 1951.

Lytton, J. and MacLennan, D.H. Molecular cloning of cDNA from human kidney coding for two alternatively spliced products of the cardiac Ca^{2+} -ATPase gene. *J. Biol. Chem.* **263**: 15024-31. 1988.

Lytton, J., Zarain-Herzberg, A., Periasamy, M. and MacLennan, D.H. Molecular cloning of the mammalian smooth muscle sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *J. Biol. Chem.* **264**: 7059-65. 1989.

Lytton, J., Westlin, M. and Hanley, M.R. Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase family of calcium pump. *J. Biol. Chem.* **266**: 17067-71. 1991.

Lytton, J., Westlin, M., Burk, S.E., Shull, G.E., MacLennan, D.H. Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J. Biol. Chem.* **267**: 14483-89. 1992.

MacLennan, D.H. Purification and properties of an adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **245**: 4508-18. 1970.

MacLennan, D.H., Brandl, C.J., Korczak, B. and Green, N.M. Amino-acid sequence of a $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ -dependent ATP-ase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature* **316**: 696-700. 1985.

MacLennan, D.H, Toyofuku, T. and Lytton, J. Structure-function relationships in sarcoplasmic or endoplasmic reticulum type Ca^{2+} pumps. *Ann. New York Acad. Sci.* **671**: 1-10. 1992.

Magyar, A. and Varadi, A. Molecular cloning and chromosomal localization of sarco(endoplasmic reticulum-type Ca^{2+} -ATPase of *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**: 872-77. 1990.

Malison, R.T., Price, L.H., Berman, R., van Dyck, C.H., Pelton, G.H., Carpenter, L., Sanacora, G., Owens, M.J., Nemeroff, C.B., Rajeeva, N., Baldwin, R.M., Seibyl, J.P., Innis, R.B. and Charney, D.S. Reduced brain serotonin transporter availability in major depression as measured by [^{123}I]-2 β -carbomethoxy-3 β -(4-iodophenyl)tropane and single photon emission computed tomography. *Biol. Psychiat.* **44**: 1090-8. 1998.

Malva, J.O., Lopes, M.C.F., Vale, M.G.P. and Carvalho, A.P. Action of antiestrogens on the $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ -ATPase and Na^+/Ca^{2+} exchange of brain cortex membranes. *Biochem. Pharmacol.* **40**: 1877-84. 1990.

Mann, J.J., Brown, R.P., Halper, J.P., Sweeney, J.A., Kocsis, J.H., Stokes, P.E. and Bilezikian, J.P. Reduced sensitivity of beta-adrenergic receptors in patients with endogenous depression and psycho-motor agitation. *N. England J. Med.* **313**: 715-20. 1985.

Mann, J.J., Stanley, M., McBride, P.A. and McEwen, B.S. Increased serotonin-2 and beta-adrenergic receptor binding in the frontal cortices of suicide victims. *Arch. Gen. Psychiat.* **43**: 954-9. 1986.

McKeith, I.G., Marshall, E.F., Ferrier, I.N., Armstrong, M.M., Kennedy, W.N., Perry, R.H., Perry, E.K. and Eccleston, D. 5-HT receptor binding in post-mortem brain from patients with affective disorder. *J. Affective Disord.* **13**: 67-74. 1987.

Mekhail-Ishak, K., Lavoie, P.-A. and Sharkawi, M. Effects of caffeine and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate on adenosine triphosphate-dependent calcium uptake by lysed brain synaptosomes. *Brain Res.* **426**: 62-8. 1987.

Meltzer, H.Y., Arora, R.C., Baber, R. and Tricou, B.J. Serotonin uptake in blood platelets of psychiatric patients. *Arch. Gen. Psychiat.* **38**: 1322-6. 1981.

Michaelis, E.K., Michaelis, M.L., Chang, H.H. and Kinos, T.E. High affinity Ca^{2+} -stimulated Mg^{2+} -dependent ATPase in rat brain synaptosomes, synaptic membranes, and microsomes. *J. Biol. Chem.* **258**: 6101-8. 1983.

Mikuni, M., Kagaya, A., Takahashi, K. and Meltzer, H.Y. Serotonin but not norepinephrine-induced calcium mobilization is enhanced in platelets of affective disorders. *Psychopharmacology* **106**: 311-4. 1992.

Miledi, R. Transmitter release induced by the injection of Ca^{2+} ions into nerve terminals. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B.* **183**: 421-5. 1973.

Miller, K.K., Verma, A., Snyder, S.H. and Ross, C.A. Localization of an endoplasmic reticulum calcium ATPase mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Neuroscience* **43**: 1-9. 1991.

Mobley, P.L. and Sulser, F. Down-regulation of the central noradrenergic receptor system by antidepressant therapies: biochemical and clinical aspects. In: *Antidepressants: Neurochemical, Behavioural and Clinical Perspectives*. Edited by Enna, S.J., Malick, J.B. and Richelson, E. Raven Press, New York pp. 31-51. 1981.

Montgomery, S.A., Roy, D., Wynne-Willson, S., Robinson, C. and Montgomery, D.B. Plasma levels and clinical response with imipramine in a study comparing efficacy with mianserin and nomifensine. *Brit. J. Clin. Pharmacol.* **15**: 205S-211S. 1983.

Montgomery, S.A. Venlafaxine: A new dimension in antidepressant pharmacotherapy. *J. Clin. Psychiat.* **54**: 119-26. 1993.

Morselli, P.L. Psychotropic drugs. In: *Drug Disposition During Development*. Edited by Morselli, P.L. Spectrum Publications, New York pp. 431-74. 1977.

Muth, E.A., Haskins, J.T. and Moyer, J.A. Antidepressant biochemical profile of the novel bicyclic compound Wy-45,030, an ethyl cyclohexanol derivative. *Biochem. Pharmacol.* **35**: 4493-7. 1986.

Muth, E.A., Moyer, J.A., Haskins, J.T., Andree, T.H. and Husbands, G.E.M. Biochemical, neurophysiological, and behavioral effects of Wy-45,233 and other identified metabolites of antidepressant venlafaxine. *Drug Dev. Res.* **23**: 191-9. 1991.

Naylor, G.J., Dick, D.A., Dick, E.G., Le Poidevin, D. and Whyte, S.F. Erythrocyte membrane cation carrier in depressive illness. *Psychol. Med.* **3**: 502-8. 1973.

Neering, I.R. and McBurney, R.N. Role for microsomal Ca^{2+} storage in mammalian neurons? *Nature* **309**: 158-60. 1984.

Ogata, N., Yoshii, M. and Narahashi, T. Psychotropic drugs block voltage-gated ion channels in neuroblastoma cells. *Brain Res.* **476**: 140-4. 1989.

Olfson, M. and Klerman, G.L. Trends in the prescription of antidepressants by office-based psychiatrists. *Am. J. Psychiat.* **150**: 571-7. 1993.

O'Rourke, F.A., Halenda, S.P., Zavoico, G.B. and Feinstein, M.B. Inositol 1,4,5-triphosphate releases Ca^{2+} from a Ca^{2+} -transporting membrane vesicle fraction derived from human platelets. *J. Biol. Chem.* **260**: 956-62. 1985.

Orsulak, P.J., Kenney, J.T., Debus, J.R., Crowley, G. and Wittman, P.D. Determination of the antidepressant fluoxetine and its metabolite norfluoxetine in serum by reversed-phase HPLC, with ultraviolet detection. *Clin. Chem.* **34**: 1875-8. 1988.

Osborne, N.N. Tricyclic antidepressants, mianserin, and ouabain stimulate inositol phosphate formation in vitro in rat cortical slices. *Neurochem. Res.* **13**: 105-11. 1988.

Peachey, L.D. and Franzini-Armstrong, C. Structure and function of membrane systems of skeletal muscle cells. In: *Handbook of Physiology. Section 10.* Edited by Peachey, L.D., Adrian, R.H. and Geiger, S.R. American Physiological Society pp. 23-71. 1983.

Peet, M. and Behagel, H. Mianserin: a decade of scientific development. *Brit. J. Clin. Pharmacol.* **5(Suppl. 1)**: 5S-9S. 1978.

Perry, G.F., Fitzsimmons, B., Shapiro, L. and Irwin, P. Clinical study of mianserin, imipramine and placebo in depression: blood level and MHPG correlations. *Brit. J. Clin. Pharmacol.* **5**: 35S-41S. 1978.

Petersen, O.H. Can Ca^{2+} be released from secretory granules or synaptic vesicles?

Trends Neurosci. **19**: 411-3. 1996.

Petersen, O.H., Gerasimenko, O.V., Gerasimenko, J.V., Mogami, H. and Tepikin, A.V. The calcium store in the nuclear envelope. Cell **23**: 87-90. 1998.

Pinto, P., Pozzan, T. and Rizutto, R. The Golgi apparatus is an inositol trisphosphate-sensitive Ca^{2+} store, with distinct functional properties from endoplasmic reticulum. EMBO J. **17**: 5298-308. 1998.

Plessers, L., Eggermont, A., Wuytack, F. and Casteels, R. A study of the organellar Ca^{2+} -transport ATPase isozymes in pig cerebellar Purkinje neurons. J. Neurosci. **11**: 650-6. 1991.

Prentki, M., Biden, T.J., Janjic, D., Irvine, R.F., Berridge, M.J. and Wollheim, C.B. Rapid mobilization of Ca^{2+} from rat insulinoma microsomes by inositol-1,4,5-trisphosphate. Nature **309**: 562-4. 1984.

Rehavi, M., Carmis, R. and Weizman, A. Tricyclic antidepressants and calcium channel blockers: interactions at the (-)-desmethoxyverapamil binding site and serotonin transporter.. *Eur. J. Pharmacol.* **155**: 1-9. 1988.

Richelson, E. and Nelson, A. Antagonism by antidepressants of neurotransmitter receptors of normal human brain in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **230**: 94-102. 1984.

Riley, D.M. and Watt, D.C. Hypercalcemia in the etiology of puerperal psychosis. *Biol. Psychiat.* **20**: 479-88. 1985.

Rocha, J.B.T., Wolosker, H., Souza, D.O. and de Meis, L. Alteration of Ca^{2+} fluxes in brain microsomes by K^+ and Na^+ : modulation by sulfated polysaccharides and trifluoperazine. *J. Neurochem.* **66**: 772-8. 1996.

Rosenblueth, A. The transmission of nerve impulses at neuro-effector junctions and peripheral synapses. New York Wiley. 1950.

Roy, A. and Kafka, M.S. Platelet adrenoceptors and prostaglandin responses in depressed patients. *Psychiat. Res.* **30**: 181-9. 1989.

Rubin, R.P. The role of Ca^{2+} in the release of neurotransmitter substances and hormones. *Pharmacol. Rev.* **22**: 389-428. 1970.

Salvador, J.M. and Mata, A.M. Characterization of the intracellular and the plasma membrane Ca^{2+} -ATPases in fractioned pig brain membranes using calcium pump inhibitors. *Arch. Bioch. Biophys.* **351**: 272-8. 1998.

Schaeffer, J. and Blaustein, M.P. Platelet free calcium concentrations measured with fura-2 are influenced by transmembrane sodium gradient. *Cell Calcium* **10**: 101-13. 1989.

Schildkraut, J.J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am. J. Psychiat.* **122**: 509-22.

Scott, M.A., Shelton, P.S. and Gattis, W. Therapeutic options for treating major depression and the role of venlafaxine. *Pharmacotherapy* **16**: 352-65. 1996.

Seidler, N.W., Jona, I., Vegh, M. and Martonosi, A. Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **264**: 17816-23. 1989

Shimizu, M., Nishida, A. and Yamawaki, S. Inhibitory effects of imipramine on intracellular Ca^{2+} mobilization in rat fronto-cortical cultured neurons. *Jap. J. Psychopharmacol.* **11**: 311-7. 1991.

Shimizu, M., Nishida, A. and Yamawaki, S. Antidepressants inhibit spontaneous oscillations of intracellular Ca^{2+} concentrations in rat cortical cultured neurons. *Neurosci. Lett.* **146**: 101-4. 1992.

Shimizu, M., Nishida, A., Hayakawa, H. and Yamawaki, S. Ca^{2+} release from inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} store by antidepressant drugs in cultured neurons of rat frontal cortex. *J. Neurochem.* **60**: 595-601. 1993.

Shimizu, M., Nishida, A., Fukuda, H., Saito, H. and Yamawaki, S. Inhibitory effect of imipramine on depolarization-induced increases in intracellular Ca^{2+} of rat cortical neurons. *Eur. J. Pharmacol.* **268**: 65-71. 1994.

Shimizu, M., Nishida, A., Fukuda, H., Saito, H. and Yamawaki, S. Effects of chronic exposure to desipramine and mianserin on Ca^{2+} mobilization induced by noradrenaline, acetylcholine, and high K^+ in rat frontocortical neurons. *Neuropsychobiology* **33**: 66-70. 1996.

Shopsin, B., Friedman, E. and Gershon, S. Parachlorophenylalanine reversal of tranylcypromine effects in depressed patients. *Arch. Gen. Psychiat.* **33**: 811-9. 1976.

Siever, L.J., Uhde, T.W., Jimerson, D.C., Lake, C.R., Kopin, I.J. and Murphy, D.L. Indices of noradrenergic output in depression. *Psychiat. Res.* **19**: 59-73. 1986.

Sneddon, J.M. Blood platelets as a model for monoamine-containing neurons. *Prog. Neurobiol.* **1**: 151-98. 1973.

Somlyo, A.P., Somlyo, A.V. and Shuman H. Electron probe analysis of vascular smooth muscle. Composition of mitochondria, nuclei, and cytoplasm. *J. Cell Biol.* **81**: 316-35. 1979.

Stahl, S.M. The human platelet: A diagnostic and research tool for the study of biogenic amines in psychiatric and neurologic disorders. *Arch. Gen. Psychiat.* **34**: 509-16. 1977.

Stanley, M. and Mann, J.J. Increased serotonin-2 binding sites in frontal cortex of suicide victims. *Lancet* **1**: 214-6. 1983.

Streb, H., Bayerdorffer, E., Haase, W., Irvine, R.F and Schulz, I. Effect of inositol-1,4,5-trisphosphate on isolated subcellar fractions of rat pancreas. *J. Membr. Biol.* **81**: 241-53. 1984.

Su, J.Y. and Hasselbach, W. Caffeine-induced calcium release from isolated sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. *Eur. J. Physiol.* **400**: 14-21. 1984.

Sugrue, M.F. Chronic antidepressant therapy and associated changes in central monoaminergic receptor functioning. *Pharmacol. Therap.* **21**: 1-33. 1983.

Sulser, F., Watts, J. and Brodie, B.B. On the mechanism of antidepressant action of imipramine like drugs. *Ann. New York Acad. Sci.* **96**: 279-86. 1962.

Tada, M., Yamamoto, T. and Tonomura, Y. Molecular mechanism of active calcium transport by sarcoplasmic reticulum. *Physiol. Rev.* **58**: 1-79. 1978.

Thase, M.E. Antidepressant options, venlafaxine in perspective. *J. Clin. Psychopharmacol.* **16(Suppl. 2)**: 10S-18S. 1996.

Thastrup, O., Foder, B. and Scharff, O. The calcium mobilizing tumor promoting agent, thapsigargin elevates the platelet cytoplasmic free calcium concentration to a higher steady state level. A possible mechanism of action for the tumor promotion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **142**: 654-60. 1987a.

Thastrup, O., Linnebjerg, H., Bjerrum, P.J., Knudsen, J.B. and Christensen, S.B. The inflammatory and tumor-promoting sesquiterpene lactone, thapsigargin, activates platelets by selective mobilization of calcium as shown by protein phosphorylations. *Biochim. Biophys. Acta* **927**: 65-73. 1987b.

Thastrup, O., Cullen, P.J., Drobak, B.K., Hanley, M.R. and Dawson, A.P. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 2466-70. 1990.

Tollefson, G.D. Antidepressant treatment and side effect considerations. *J. Clin. Psychiat.* **52(suppl. 5)**: 4-13. 1991.

Torok, T.L. Neurochemical transmission and the sodium pump. *Prog. Neurobiol.* **32**: 11-76. 1989.

Trotta, E.E., Freire, G.L. and Godinho, C.S. The mode of action of local anesthetics on the calcium pump of brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **214**: 670-4. 1980.

Trotta, E.E. and Freire, G.L. Inhibition by caffeine of calcium uptake by microsomal vesicles. *J. Pharmacol.* **32**: 791-3. 1980.

Troy, S.M., Rudolph, R., Mayersohn, M. and Chiang, S.T. The influence of cimetidine on the disposition kinetics of the antidepressant venlafaxine. *J. Clin. Pharmacol.* **38**: 467-74. 1998.

Ueda, T., Chueh, S.H., Noel, M.W. and Gill, D.L. Influence of inositol 1,4,5-trisphosphate and guanine nucleotides on intracellular calcium release within the N1E-115 neuronal cell line. *J. Biol. Chem.* **261**: 3184-92. 1986.

van Praag, H.M., Brown, S.L., Asnis, G.M., Kahn, R.S., Korn, M.L., Harkavy-Friedman, J.M. and Wetzler, S. Beyond serotonin: A multi-aminergic perspective on abnormal behavior. In: *The Role of Serotonin in Psychiatric Disorders*. Edited by Brown, S.L. and van Praag, H.M, Brunner/Mazel, New York pp. 302-32. 1991.

van Riezen, H., Pinder, R.M., Nickolson, V.J., Hobbelen, P., Zayed, I. and van der Veen, F. Mianserin. In: Pharmacological and Biochemical Properties of Drug Substances. Vol. 3. Edited by Goldberg, M.E. American Pharmaceutical Association pp. 56-93. 1981.

Vercesi, A., Reynafarje, B. and Lehninger, A.L. Stoichiometry of H^+ ejection and Ca^{2+} uptake coupled to electron transport in rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* **253**: 6379-85. 1978.

Vetulani, J. and Sulser, F. Action of various antidepressant treatments reduces reactivity of noradrenergic cyclic AMP-generating system in limbic forebrain. *Nature* **257**: 495-6. 1975.

Volpe, P., Costello, B., Chu, A. and Fleischer, S. The effect of local phenothiazines on Ca^{2+} fluxes in skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Arch. Bioch. Bioph.* **233**: 174-9. 1984.

Walden, J., Grunze, H., Olbrich, H. and Berger, M. Bedeutung von Kalziumionen und Kalziumantagonisten bei affektiven Psychosen. *Fortschr. Neurol. Psychiat.* **60**: 471-6. 1992.

Weber, A. Energized Ca^{2+} transport and relaxing factors. *Curr. Top. Bioenerg.* **1**: 203-54. 1966.

Weber, A. and Herz, R. The relationship between caffeine contracture of intact muscle and the effect of caffeine on reticulum. *J. Gen. Physiol.* **52**: 750-9. 1968.

Weber, A. The mechanism of action of caffeine on sarcoplasmic reticulum. *J. Gen. Physiol.* **52**: 760-72. 1968.

Weber, A. and Murray, J.M. Molecular control mechanisms in muscle contraction. *Physiol. Rev.* **53**: 612-73. 1973.

Wei, J.W. and Lin, S.S. Studies of blocking mechanisms of carbachol-induced polyphosphoinositide turnover in rat cortical synaptosomes by neuroactive drugs. *Int. J. Biochem.* **21**: 59-65. 1989.

Winer, B.J., Brown, D.R. and Michels, K.M. *Statistical principles in experimental design*. 3rd ed. McGraw-Hill, New York. 1991.

Wolosker, H., Petretski, J.H. and de Meis, L. Modification of ATP regulatory function in sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase by hydrophobic molecules. *Eur. J. Biochem.* **193**: 873-7. 1990.

Wu, K.-D., Lee, W.-S., Wey, J., Bungard, D. and Lytton, J. Localization and quantification of endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase isoform transcripts. *Am. J. Physiol.* **269**: C775-84. 1995.

Wuytack, F., Kanmura, Y., Eggermont, J.A., Raeymaekers, L., Verbist, J., Hartweg, D., Gietzen, K. and Casteels, R. Smooth muscle expresses a cardiac/slow muscle isoform of the Ca^{2+} -transport ATPase in its endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* **257**: 117-23. 1989.

Wuytack, F., Raeymaekers, L., De Smedt, H., Eggermont, J.A., Missiaen, L., Van Den Bosch, L., De Jaegere, S., Verboomen, H., Plessers, L. and Casteels, R. Ca^{2+} -transport ATPases and their regulation in muscle and brain. *Ann. New York Acad. Sci.* **671**: 82-91. 1992.

Yamawaki, S., Kagaya, A., Okamoto, Y., Shimizu, M., Nishida, A. and Uchitomi, Y. Enhanced calcium response to serotonin in platelets from patients with affective disorders. *J. Psychiat. Neurosci.* **21**: 321-4. 1996.

Yates, M., Leake, A., Tricou, B.J., Lowy, M., Perline, R. and Ferrier, I.N. 5-HT₂ receptor changes in major depression. *Biol. Psychiat.* **27**: 489-96. 1990.

Zeller, E.A. and Barsky, A.J. In vivo inhibition of liver and brain monoamine oxydase inhibitors. *Psychosomatics* **26**: 240-51. 1985.