

Université de Montréal

Pharmacocinétique et métabolisme de la clomipramine chez les chats

par

Chantal Lainesse

Département de Biomédecine Vétérinaire

Faculté de Médecine Vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D)
en sciences vétérinaires

Décembre, 2006

© Chantal Lainesse, 2006



SF

607

054

2007

v.009

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Pharmacocinétique et métabolisme
de la clomipramine chez les chats**

présentée par
Chantal Lainesse

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Jacques G. Lussier, président-rapporteur
Michèle Y. Doucet, directrice de recherche
Diane Frank, co-directrice de recherche
Éric Troncy, membre du jury
Ronald Johnson, examinateur externe
Mario Jacques, représentant du doyen de la FES



Résumé

Les troubles de comportement sont fréquents chez les chats domestiques. Bien que la clomipramine, un antidépresseur tricyclique, soit recommandée pour le traitement de nombreux problèmes comportementaux félines, il n'existe aucune donnée pharmacologique permettant de déterminer une posologie efficace chez cette espèce. Il en résulte une grande variabilité de l'efficacité clinique et de l'incidence des effets secondaires dans la population féline suite à l'administration de ce xénobiotique.

Ce programme doctoral, visant à investiguer l'origine de cette variabilité clinique, inclut trois études de clomipramine chez les chats. Une **première étude** de pharmacocinétique classique a permis d'observer une grande variabilité interindividuelle du niveau de sédation et des paramètres de pharmacocinétique (CV 20-60%) de la clomipramine et de la desméthylclomipramine (DCMP) chez un nombre limité de chats après une seule administration intraveineuse et orale. Les résultats de cette étude suggèrent qu'il existe une variation dans l'absorption et le métabolisme de la clomipramine dans la population féline.

Une **deuxième étude** de pharmacocinétique de population de la clomipramine avait pour buts de quantifier la variabilité interindividuelle des paramètres et de trouver une ou des covariables pouvant expliquer cette variabilité parmi 76 chats. Bien que les résultats de cette étude aient confirmé une grande variabilité des paramètres de pharmacocinétique (CV 66-124%) de la clomipramine et de la DCMP dans la population féline étudiée, aucune corrélation entre les covariables physiologiques, comportementales et pathologiques documentées et les paramètres de pharmacocinétique n'a été détectée.

Cependant, une différence significative du ratio métabolique ($ASC_{0-24h} \text{ DCMP} / ASC_{0-24h}$)

clomipramine) et de la clairance totale de la clomipramine entre les chats mâles et femelles a été observée.

Une **troisième étude** de métabolisme *in vitro* avait pour buts d'identifier les principaux métabolites formés lors de la biotransformation de la clomipramine par les microsomes de rats, chiens et chats, et de comparer les profils métaboliques entre les espèces, ainsi qu'entre les chats mâles et femelles. Contrairement aux chiens et aux rats, très peu de DCMP a été formée par les microsomes félins, et les résultats préliminaires de cette dernière étude suggèrent que les chattes métabolisent la clomipramine plus efficacement et plus rapidement que les chats.

D'après les résultats obtenus lors de ce programme doctoral, la grande variabilité interindividuelle des paramètres de pharmacocinétique de la clomipramine chez les chats est multifactorielle, et semble être responsable, en partie, de l'imprévisibilité des effets cliniques observés suite à l'administration de la clomipramine aux patients félins.

Puisqu'il serait difficile d'éliminer tous les facteurs influençant cette variabilité, un suivi des concentrations plasmatiques de la clomipramine chez les chats permettrait un ajustement individualisé des posologies et une vérification, si nécessaire, de la cause de l'échec thérapeutique (non observance de la prescription versus patient non répondeur).

Ce suivi permettrait une amélioration de l'utilisation clinique de la clomipramine chez les chats et aiderait à diminuer la frustration qui émane d'une thérapie à tâtons.

Mots-clés : pharmacocinétique, métabolisme, clomipramine, desméthylclomipramine, chat, chien, variabilité interindividuelle, sexe, posologie

Abstract

Behavioral problems are frequently encountered in domestic cats. Although clomipramine, a tricyclic antidepressant, is currently being recommended for the treatment of several feline behavioral problems, there is no pharmacokinetic data available to determine an efficacious dose for this species. Consequently, there is a large variability in the clinical efficacy and incidence of side effects associated with the administration of clomipramine in cats.

In order to investigate the source of this clinical variability, this PhD program includes three feline studies of clomipramine. The **first** pharmacokinetic study showed a large interindividual variability in the level of sedation and pharmacokinetic parameters (CV 20-60%) of clomipramine and desmethylclomipramine (DCMP) in a limited number of cats, after single-dose intravenous and oral administrations. The results of this study suggest the presence of a variation in the absorption and metabolism of clomipramine between cats.

The objectives of the **second** pharmacokinetic study of clomipramine were to quantify the interindividual variability in pharmacokinetic parameters and to find one or more covariables that would account for this variability in a population of 76 cats. Although results from this study confirmed a large interindividual variability in the pharmacokinetic parameters (CV 66-124%) of clomipramine and DCMP in this feline population, no correlation between physiological, behavioral and pathological covariables and mean pharmacokinetic parameter estimates was detected. However, a significant difference in the mean metabolic ratio ($AUC_{0-24h} \text{ DCMP} / AUC_{0-24h} \text{ clomipramine}$) and total clomipramine clearance between male and female cats was observed.

The objectives of the **third** study of clomipramine were to identify the main metabolites formed during the *in vitro* biotransformation of clomipramine by rat, dog and cat microsomes, and compare the metabolic profiles between species as well as between feline genders. Compared to dogs and rats, very little DCMP was formed by the feline microsomes, and preliminary results from this study suggest that female cats metabolize clomipramine faster and more efficiently than male cats.

According to the above findings, the wide interindividual variability of the pharmacokinetic parameters of clomipramine in cats is multifactorial and seems to be responsible, in part, for the unpredictable clinical effects observed following the administration of clomipramine to feline patients. Since it would be difficult to eliminate all factors affecting this variability, therapeutic drug monitoring of clomipramine would allow individualized dosage adjustments and the investigation, if necessary, of possible causes of therapeutic failure (owner non compliance versus non-responders). Therapeutic drug monitoring could improve clinical use of clomipramine in cats by alleviating most of the frustration that comes from making dosage adjustments by trial and error.

Keywords : pharmacokinetic, metabolism, clomipramine, desmethylclomipramine, cat, dog, interindividual variability, dosage, gender

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	iii
Abstract	v
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures	xv
Liste des sigles et des abréviations.....	xix
Introduction	1
Chapitre 1 – Principaux troubles de comportement félin.....	7
1.1 Anxiété.....	7
1.1.1 Stimuli provoquant de l’anxiété.....	7
1.1.2 Domestication des chats.....	8
1.1.3 Pathophysiologie de l’anxiété	8
1.1.4 Régulation des monoamines	10
1.2 Fréquences des comportements.....	12
1.3 Marquage urinaire	13
1.4 Agressivité	15
1.5 Troubles compulsifs et stéréotypies.....	16
1.5.1 Types de troubles compulsifs.....	17
1.5.2 Syndrome d’hyperesthésie féline	17
1.5.3 Alopecie psychogénique	18
1.6 Syndrome d’anxiété de séparation	18
1.7 Vocalisation excessive	19
Chapitre 2 – Modalités de traitement	21
2.1 Modifications environnementales	21
2.1.1 Enrichissement environnemental	21
2.1.2 Bac à litière	22
2.1.3 Interactions sociales	23
2.1.4 Thérapie phéromonale.....	23

2.2 Thérapie comportementale.....	24
2.2.1 Conditionnement d'apprentissage.....	24
2.2.2 Contre-conditionnement.....	25
2.2.3 Désensibilisation.....	25
2.2.4 Extinction.....	25
2.3 Chirurgie.....	26
2.4 Traitement pharmacologique.....	28
2.4.1 Hormones.....	28
2.4.1.1 Modes d'action.....	28
2.4.1.2 Pharmacocinétique.....	29
2.4.1.3 Efficacité clinique et effets secondaires.....	29
2.4.2 Anxiolytiques.....	30
2.4.2.1 Modes d'action.....	30
2.4.2.2 Pharmacocinétique.....	31
2.4.2.3 Efficacité clinique et effets secondaires.....	32
2.4.3 Antidépresseurs.....	34
2.4.3.1 Modes d'action.....	35
2.4.3.2 Pharmacocinétique.....	36
2.4.3.3 Efficacité clinique et effets secondaires.....	37
Chapitre 3 – Antidépresseurs tricycliques.....	41
3.1 Modes d'action des ADT.....	42
3.2 Amitriptyline.....	42
3.2.1 Pharmacocinétique.....	43
3.2.2 Efficacité clinique.....	43
3.3 Imipramine.....	43
3.4 Clomipramine.....	44
3.4.1 Modes d'action.....	44
3.4.2 Effets secondaires.....	45
3.4.3 Utilisation de la clomipramine chez les humains.....	47
3.4.4 Utilisation de la clomipramine chez les chiens.....	48
3.4.5 Utilisation de la clomipramine chez les chats.....	50

Chapitre 4 – Pharmacocinétique de la clomipramine	56
4.1 Pharmacocinétique classique	57
4.1.1 Modélisation.....	58
4.1.2 Cinétique linéaire et non linéaire	58
4.1.3 Modélisation compartimentale.....	59
4.1.4 Modélisation non compartimentale.....	63
4.1.5 Modélisation physiologique.....	64
4.2 Paramètres de pharmacocinétique.....	65
4.2.1 Clairance	65
4.2.2 Aire sous la courbe.....	67
4.2.3 Volume de distribution.....	68
4.2.4 Temps de demi-vie.....	70
4.2.5 Cmax et Tmax.....	71
4.3 Pharmacologie clinique.....	71
4.4 Méthode d'échantillonnage.....	72
4.5 Pharmacocinétique classique de la clomipramine.....	75
4.6 Pharmacocinétique de population	78
4.7 Pharmacocinétique de population de la clomipramine	84
Chapitre 5 – Métabolisme de la clomipramine	87
5.1 Cinétique de l'activité enzymatique.....	89
5.2 Cytochromes P450	91
5.3 Polymorphisme génétique.....	93
5.4 Enzymes métaboliques de phase II	95
5.5 Métabolisme de phase I de la clomipramine.....	97
5.5.1 Rôles des métabolites de la clomipramine	100
5.6 Techniques d'étude de métabolisme <i>in vitro</i>	101
Méthodologies.....	105
Projet 1. Pharmacocinétique classique de la clomipramine chez les chats.....	105
Projet 2. Pharmacocinétique de population de la clomipramine chez les chats.....	109
Projet 3. Étude de métabolisme <i>in vitro</i> de la clomipramine	115

Résultats par articles	121
Article 1. Pharmacokinetics of clomipramine and desmethylclomipramine after single-dose intravenous and oral administrations in cats.....	121
Article 2. Effects of physiological covariables on pharmacokinetic parameters of clomipramine in a large population of cats after a single oral administration.	140
Article 3. Comparative oxidative metabolic profiles of clomipramine in cats, rats and dogs : a preliminary <i>in vitro</i> study.	164
Discussion	179
Conclusions	202
Sources documentaires	205

Liste des tableaux

Tableau I – Principaux neurotransmetteurs cérébraux impliqués dans la pathophysiologie de l’anxiété.....	9
Tableau II – Principales différences entre le marquage urinaire et la miction inappropriée chez les chats.....	14
Tableau III – Différents types d’agressivité féline identifiés par les spécialistes en comportement animal.....	15
Tableau IV – Principaux troubles de comportement majoritairement rencontrés, sans exclusivité, selon le sexe du chat en ordre décroissant d’importance.....	20
Tableau V – Approches thérapeutiques par modifications environnementales et thérapie comportementale de divers troubles de comportement chez les chats.....	27
Tableau VI – Paramètres de pharmacocinétique du diazépam chez l’humain, le chien et le chat, après une administration intraveineuse et orale.....	32
Tableau VII – Paramètres de pharmacocinétique de la fluoxétine chez l’humain, le chien et le chat, après une administration intraveineuse et orale.....	36
Tableau VIII – Principaux effets secondaires associés avec l’administration de la clomipramine en ordre décroissant de fréquence observés chez les humains (H), chiens (C) et les chats (Ch).....	46
Tableau IX – Protocoles expérimentaux de sept études évaluant l’efficacité clinique de la clomipramine chez les chats démontrant différents troubles de comportement. L’efficacité rapportée représente le pourcentage de chats démontrant une réponse favorable d’après les critères d’efficacité de chaque étude, sauf pour l’étude de King et al, 2004, où l’efficacité est le pourcentage de diminution de la fréquence de marquage par rapport au placebo.....	52

Tableau X – Paramètres de pharmacocinétique de la clomipramine et de la desméthylclomipramine chez l'humain et le chien après une administration intraveineuse et orale.....	76
Tableau XI – Le métabolisme hépatique par les enzymes de phase I et II produit des métabolites polaires assurant l'élimination d'un médicament dans l'urine ou la bile, par diverses réactions enzymatiques.	89
Tableau XII – Protocole de l'étude de pharmacocinétique de la clomipramine chez 6 chats incluant les différentes voies d'administration, les doses et les temps d'échantillonnage de sang des deux phases expérimentales effectuées à deux semaines d'intervalle.....	105
Tableau XIII – Critères d'inclusion et d'exclusion de l'étude de pharmacocinétique de population de la clomipramine chez les chats.....	109
Tableau XIV – Échéancier du patient lors de l'étude de pharmacocinétique d'une population de chats normaux ou démontrant des troubles de comportement.....	110
Tableau XV – Covariables physiologiques, comportementales et pathologiques utilisées pour faire des corrélations avec les paramètres de pharmacocinétique de l'étude de la population féline, par méthode STS.....	113
Tableau XVI – Scores de sédation attribués aux chats six heures après l'administration de la clomipramine, en comparaison avec le comportement observé pré-administration lors de la prise de sang pour analyse hématologique.....	114
Tableau XVII – Conditions d'incubation du métabolisme <i>in vitro</i> de la dextrométhorphanne par les microsomes de rats, de chiens et de chats mâles ainsi que de chats femelles (Essai #1 – contrôles positifs).....	118

Tableau XVIII – Conditions d'incubation du métabolisme <i>in vitro</i> de la clomipramine utilisées pour les préparations microsomales de chaque espèce (rats, chiens ou chats mâles, ou chats femelles) (Essai #2).....	119
---	-----

Tableau XIX – Conditions d'incubation du métabolisme <i>in vitro</i> de la clomipramine utilisées pour les préparations microsomales de chats mâles et femelles respectivement (Essai #3).....	120
---	-----

ARTICLE 1

Table 1. Pharmacokinetic parameters of clomipramine estimated from a two compartment model in plasma of 6 cats following i.v. administration of a single dose of 0.25 mg/kg of clomipramine.....	136
---	-----

Table 2. Individual and mean pharmacokinetic parameters estimated from non compartmental analysis of plasma concentrations of clomipramine from healthy cats given a single oral dose of clomipramine (n=5) at 0.5 mg/kg.....	137
--	-----

Table 3. Individual and mean pharmacokinetic parameters estimated from non compartmental analysis of plasma concentrations of desmethylclomipramine from healthy cats given a single dose of clomipramine i.v. (n=6) and oral (n=5) at 0.25 mg/kg and 0.5 mg/kg respectively.....	137
--	-----

Table 4. Estimated individual and mean bioavailability (F) in five cats from AUC_{0-30h} of clomipramine using conventional non compartmental analysis versus after deconvolution.....	138
---	-----

ARTICLE 2

Table1. Anxiety score chart for the evaluation of the degree of anxiety in cats during a one hour behavioral consultation.....	159
---	-----

Table 2. Weight dependent dosing chart for the administration of 5 mg tablets of clomipramine (Clomicalm®) to cats during a pharmacokinetic study.....	159
---	-----

Table 3. Recorded covariables and selected pharmacokinetic parameter estimates of clomipramine (CMP) and desmethylclomipramine (DCMP) from 76 cats enrolled in the pharmacokinetic study after a single dose clomipramine administration.....	160
--	-----

Table 4. Mean population pharmacokinetic parameter estimates for clomipramine and desmethylclomipramine (DCMP) after one oral dose of approximately 0.5 mg/kg of clomipramine in 76 cats using non compartmental analysis.....	161
---	-----

Table 5. Results of p values from parametric (student t test, ANOVA) or non parametric (Mann-Whitney-Wilcoxon, Kruskal-Wallis) statistical tests used to detect differences between pharmacokinetic parameters of clomipramine and DCMP, and recorded covariables from a population of 76 cats after a single oral administration of Clomicalm®.....	161
---	-----

ARTICLE 3

Table 1. Desmethylclomipramine concentrations (μM) produced by incubation of rat, dog, male and female cat liver microsomes with 100 μM clomipramine over time.....	176
--	-----

Table 2. Comparative metabolic ratios of DCMP (MRD), hydroxylated CMP (MRH) and N-oxide (MRO) at 1, 2, 4 and 6 hr incubation periods in rats, dogs, male and female cat liver microsomes, calculated from measured peak areas.....	176
---	-----

Liste des figures

- Figure 1** – Niveau d’implication de la pharmacocinétique (PC) et de la pharmacodynamie (PD) en relation avec la dose, la concentration plasmatique (Cp) et l’effet d’un xénobiotique.....2
- Figure 2** – Mécanismes d’action et d’autorégulation des monoamines biogéniques par le neurone synaptique.....11
- Figure 3** – Pourcentages des principaux troubles de comportement rencontrés chez les chats domestiques selon la littérature.....12
- Figure 4** – Exemples d’enrichissements environnementaux exploitant les comportements normaux des chats et l’utilisation de l’espace vertical.....22
- Figure 5** – Différence entre les chats mâles et femelles du pourcentage de réponse favorable aux prostagènes (satisfaction du propriétaire), au diazépam et à la buspirone (diminution de la fréquence du marquage de > 75%) pour le marquage urinaire.....33
- Figure 6** – Structure moléculaire du chlorhydrate de clomipramine.....44
- Figure 7** – Graphiques extraits de l’article de King et collègues (2004), démontrant l’efficacité clinique de la clomipramine pour le traitement du marquage urinaire chez les chats d’après le nombre d’épisodes de marquage par jour (A) et le score d’évaluation globale (B) selon les propriétaires, comparés au groupe placebo.....53
- Figure 8** – Représentation graphique de la disposition d’un médicament dans le corps mettant en évidence les principales composantes, soit l’absorption, la distribution, le métabolisme et l’excrétion après une administration parentérale et orale.....56

- Figure 9** – Modélisation à trois compartiments démontrant, de façon générale, la disposition d'un médicament dans le corps après une administration extravasculaire.....60
- Figure 10** – Profils des concentrations plasmatiques (C_p) versus le temps en graphique semilogarithmique représentant des modèles à un compartiment après une administration intraveineuse (A) et orale (B). Un modèle à deux compartiments (C) illustre les phases de distribution (pente α) et d'élimination (pente β) après une administration intraveineuse.....62
- Figure 11** – Modèle physiologique prenant en considération le débit sanguin (Q) aux principaux organes, les volumes tissulaires (V) et l'élimination du xénobiotique par le foie, les reins et les intestins dans les fèces.....64
- Figure 12** – Courbe de concentrations plasmatiques (C) versus le temps (T) sectionnée en trapèzes pour le calcul de l'aire sous la courbe.....67
- Figure 13** – Graphique représentant la corrélation entre la concentration plasmatique (C_p) du médicament et la réponse clinique.....72
- Figure 14** – Une longueur extraveineuse de cathéter de 15 cm d'un Intracath® (30.5 cm, 19 GA, Becton Dickinson) correspondant à une longueur intraveineuse de 9 cm, a permis d'obtenir un échantillonnage de sang fiable pendant 30 heures lors d'une étude de pharmacocinétique classique, lorsque le cathéter a été inséré de 3 à 5 cm du creux thoracique dans la veine jugulaire des chats.....75
- Figure 15** - Structure du modèle pharmacostatistique utilisé pour l'approche analytique de la pharmacocinétique de population.....79
- Figure 16** – Modèle pharmacophysiologique à quatre molécules utilisé par Gex-Fabry et ses collègues (2000) pour représenter la disposition de la clomipramine et ses principaux métabolites dans leur étude de pharmacocinétique de population.....85

Figure 17 - Graphique de la relation hyperbolique entre la vitesse de la réaction enzymatique (V) et la concentration du substrat (S), décrite par la cinétique enzymatique de Michaelis-Menten.....90

Figure 18 – Représentations graphiques de la transformation Eadie-Hofstee de l'activité enzymatique Michaelis-Menten démontrant une réaction catalysée par un enzyme (A) et par au moins deux enzymes (B).....91

Figure 19 – Biotransformation de la clomipramine par le système microsomal de phase I et de phase II chez les humains.....98

Figure 20. Protocole de préparation des microsomes à partir des foies de cinq chats mâles utilisés dans l'étude de métabolisme *in vitro* de la clomipramine chez les chats.....116

ARTICLE 1

Fig.1. Mean log plasma concentration versus time curves for clomipramine (■) and desmethylclomipramine (□) in cats following a single dose intravenous administration of 0.25mg/kg of clomipramine to 6 healthy cats.....138

Fig.2. Individual log plasma concentration versus time curves for clomipramine (■) and desmethylclomipramine (□) in five cats following a single oral dose of 0.5 mg/kg of clomipramine139

ARTICLE 2

Fig.1. Plasma concentrations versus time curves for clomipramine (CMP) and desmethylclomipramine (DCMP) after a single oral dose of approximately 0.5 mg/kg of clomipramine in 76 cats.....162

Fig. 2. Semilog dispersion graphs of the area under the curve (AUC_{0-24h}) of clomipramine (CMP) and desmethylclomipramine (DCMP) versus the sedation score observed in the first 24 hours after a single oral administration of approximately

0.5 mg/kg of clomipramine in 76 cats.....163

ARTICLE 3

Fig. 1. Individual metabolic profiles of metabolite peak areas versus time from the biotransformation of 100 μ M of clomipramine by pooled male rat (A) and dog (B) microsomes.....177

Fig. 3. Pathway ratio (peak area of metabolite at 1hr incubation over peak area of clomipramine at time 0) of desmethylclomipramine (DCMP), hydroxyclopramine (Hydroxy-CMP) and N-oxide from the biotransformation of 100 μ M of clomipramine by pooled male rat, dog and cat, and female cat microsomes.....177

Fig. 4. Desmethylclomipramine (DCMP) concentrations versus time curves after incubation of 100 μ M of clomipramine with pooled male (\circ) and female (\square) cat microsomes178

Fig. 5. Individual metabolic profiles of metabolite peak areas versus time from the biotransformation of 100 μ M of clomipramine by pooled male (A) and female (B) cat microsomes.....178

Liste des sigles et des abréviations

ADT : antidépresseur(s) tricyclique(s)

ANOVA : analyse de variance (analysis of variance)

ARN : acide ribonucléique

ASC : aire sous la courbe (area under the curve AUC)

C : concentration

cAMP : adénosyl-monophosphate cyclique (cyclic adenosyl-monophosphate)

CCPA : Comité Canadien de Protection des Animaux

CÉUA : Comité d'Éthique de l'Utilisation des Animaux

Cl : clairance (clearance)

cm : centimètre

C_{max} : concentration plasmatique maximale

C_{min} : concentration plasmatique minimale

CMP : clomipramine

C_p : concentration plasmatique (plasma concentration)

CT : concentrations-temps

CV : coefficient de variation

CYP : cytochrome(s) P

D : dose

DCMP : desméthylclomipramine

ELISA: (enzyme-linked immunosorbent assay)

F : biodisponibilité

GABA : acide gamma-aminobutyrique (gamma-aminobutyric acid)

h: heure

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazineethanesulfonique (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)

HPLC : chromatographie liquide de haute performance (high performance liquid chromatography)

i.m. : intramusculaire

IMAO : inhibiteurs des monoamines oxidases

IP₃ : inosite triphosphate

ISRS : inhibiteur(s) sélectif(s) du recaptage de la sérotonine

IU : unité(s) internationale(s) (international unit(s))

i.v. : intraveineux

k_a : constante d'absorption

KCl : chlorure de potassium

k_{el} : constante d'élimination

kg : kilogramme(s)

LOD : limite de détection (limit of detection)

LOQ : limite de quantification (limit of quantification)

M : molaire

mg : milligramme(s)

min : minute(s)

mL : millilitre(s)

MS : spectrométrie de masse (mass spectrometry)

m/z : ratio de la masse sur la charge

NA : noradrénaline

NADPH : nicotinamide adénosine diphosphate réduite (reduced nicotinamide adenoside diphosphate)

NAT : N-acétyltransférase

ng : nanogramme(s)

NMDA : N-méthyl-d-aspartate

NRS : système NADPH régénérateur (NADPH regenerating system)

PBS : solution tampon de phosphate (phosphate buffer solution)

PC : pharmacocinétique

PD : pharmacodynamie

PgP : phosphoglycoprotéines (P glycoprotein)

p.o. : oral

psi : livre par pouce carré (pound per square inch)

RH : substrat

RM : ratio métabolique (metabolic ratio MR)

rpm : rotation(s) par minute

SNC : système nerveux central

STS : (standard two-stage)

SULT : sulfotransférase

t : temps

$T_{1/2}$: temps de demi-vie

T_{max} : temps pour atteindre la concentration maximale

TMS : temps moyen de séjour (mean residence time MRT)

tsp : cuillère à thé (teaspoon)

μg : microgramme(s)

UGT : uridine glucuronyltransférase

μL : microlitre(s)

μM : micromolaire(s)

V : volt

V_{ss} : volume de distribution à l'équilibre (volume of distribution at steady-state)

X^2 : Chi carré

5-HT : sérotonine (5-hydroxytryptamine)

*J'aimerais dédier cette thèse à mon mari,
Jeff, à mes trois beaux enfants, Mitchell,
Mackenzie et Megan, et à la mémoire de ma
mère, Roselyne.*

Remerciements

Au terme d'une aventure qui a duré moins de quatre ans, je me dois de remercier les nombreuses personnes et organismes qui m'ont supportée intellectuellement, émotionnellement et financièrement, sans qui ce programme doctoral n'aurait pas eu lieu.

Je voudrais tout d'abord remercier ma directrice de recherche, Dre Michèle Doucet, pour sa camaraderie, son expertise et son esprit critique et ouvert. Elle a su m'inspirer tout en me cédant les rênes. Je tiens également à remercier ma co-directrice, Dre Diane Frank, qui a réussi à me garder en contact avec la réalité pratique par sa convivialité et son expertise. J'aimerais aussi exprimer ma reconnaissance envers Ariane Santamaria-Bouvier, Julie-Hélène Fairbrother et Marie-Andrée Ballaux-Veillette qui ont si énergiquement collaboré aux trois projets de recherche.

Merci aux Professeurs Pierre-Louis Toutain et Alain Bousquet-Mélou pour avoir partagé avec moi leur expertise sur la pharmacocinétique de population, et au Dr Alastair Cribb pour avoir mis les techniques de métabolisme *in vitro* en perspective.

Un remerciement spécial pour l'appui financier du Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada et de l'Académie des Médecins Vétérinaires du Québec sans qui ce programme doctoral aurait pris beaucoup plus de temps à compléter.

Finally, I wish to thank my husband and my three wonderful children for their relentless support and encouragements, which have made this all worthwhile. I love you.

Introduction

Problématique

Les troubles associés à l'anxiété sont communs chez les humains et sont de plus en plus reconnus chez les animaux de compagnie. Le marquage urinaire, l'agressivité intra-spécifique, la vocalisation excessive et les troubles compulsifs font partie d'une liste grandissante de problèmes comportementaux chez les chats. Plusieurs classes de médicaments sont proposées dans la littérature pour aider à contrôler ces problèmes, malheureusement aucune approche pharmacologique actuelle n'a été démontrée comme étant entièrement efficace et prévisible chez les patients félins.

La clomipramine, un antidépresseur tricyclique, semble avoir un effet clinique bénéfique pour le traitement de divers troubles de comportement chez le chat. Toutefois, il n'existe aucune donnée pharmacologique permettant de déterminer des posologies sécuritaires et efficaces chez cette espèce. Il en résulte une grande variabilité de l'efficacité clinique et de l'incidence des effets secondaires adverses se traduisant par une frustration de la part du propriétaire et occasionnant des pertes de vies animales importantes lorsque l'euthanasie devient la seule option envisageable.

Plusieurs questions demeurent sans réponse... D'où vient cette variabilité clinique entre les chats? Dépend-elle des concentrations plasmatiques de la clomipramine, de son métabolite ou des deux? Existe-t-il un ou des facteurs pouvant identifier les chats qui répondent bien à la clomipramine versus les chats qui répondent moins bien? Comment peut-on identifier les chats susceptibles d'avoir des effets secondaires importants? Sur quoi est basée la dose de Clomicalm® actuellement recommandée aux chats démontrant des troubles de comportement?

Programme doctoral

En pharmacologie clinique, il est sous-entendu que l'effet d'un xénobiotique est lié à la concentration plasmatique (C_p) et que celle-ci est en équilibre avec la concentration au site d'action. Le manque apparent de cette relation pour certains médicaments ne contredit pas cette hypothèse, mais met en évidence l'importance de prendre en considération le temps que le médicament prend pour se rendre au site d'action et le temps requis par les récepteurs pour éliciter une réponse pharmacologique. Ainsi, la variabilité interindividuelle de la réponse thérapeutique d'un médicament pour une même dose administrée peut dépendre de la pharmacocinétique (PC) (absorption, distribution, métabolisme et excrétion), de la pharmacodynamie (PD) (affinité pour les récepteurs, quantité de récepteurs) ou des deux (Fig. 1).

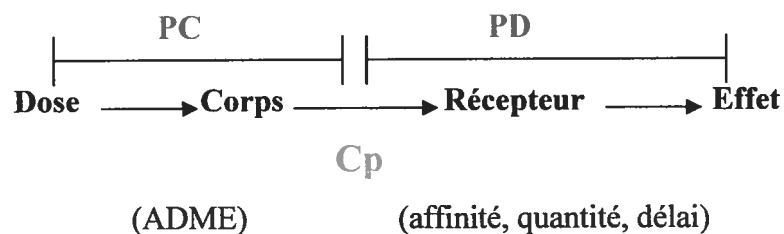


Figure 1 – Niveau d'implication de la pharmacocinétique (PC) et de la pharmacodynamie (PD) en relation avec la dose, la concentration plasmatique (C_p) et l'effet du xénobiotique

(Rowland & Tozer, 1995). ADME = absorption, distribution, métabolisme, excrétion

Une fois le médicament administré, ces facteurs influencent la quantité du principe actif atteignant le site d'action et l'intensité de l'action pharmacologique respectivement, d'où l'importance de mesurer les C_p , plutôt que de simplement considérer la dose pour la détermination d'une posologie efficace d'un médicament.

Dans le cas de la clomipramine, la dose recommandée par le fabricant du produit vétérinaire aux États-Unis (Novartis Animal Health Inc, Greensboro, NC) est de 2.5 et 5 mg par jour pour les chats de 3 à 6 kg, et 6 à 12 kg respectivement, basée sur une étude féline de toxicité de 28 jours effectuée par les chercheurs de la compagnie américaine. Cette recommandation, bien que non homologuée pour cette espèce en Amérique de Nord, correspond à une étendue de doses de 0.41 à 0.83 mg/kg, puisque le comprimé de 5mg n'est sécable qu'en deux. Suite à l'utilisation de la clomipramine par les vétérinaires pour le traitement des troubles de comportement de leurs patients félins, des études cliniques ont tenté d'évaluer son efficacité en utilisant cette posologie recommandée. Les résultats de ces études ont démontré une grande variabilité dans la réponse clinique (thérapeutique et adverse) entre les chats après l'administration du Clomicalm®. Ainsi, une étude, mesurant les Cp de la clomipramine, semblait nécessaire pour l'estimation des paramètres de pharmacocinétique et l'évaluation d'une corrélation entre la variabilité clinique et ces paramètres dans la population de chats. Ce genre d'étude est connu sous le nom d'étude de *pharmacocinétique de population*.

La pharmacocinétique de population analyse une population hétérogène de patients et a pour but de détecter les facteurs physiologiques ou pathologiques pouvant expliquer la variabilité des paramètres de pharmacocinétique, afin de prédire, en partie, le niveau de réponse clinique en tenant compte des covariables identifiées. L'investigation de la pharmacocinétique de population par approche pharmacostatistique nécessite une connaissance préalable de la disposition du principe actif par modélisation compartimentale, ainsi que de ses paramètres de pharmacocinétique de base. Cette information n'étant pas disponible pour la clomipramine chez les chats, le programme

doctoral débute donc par une étude de pharmacocinétique classique sur un nombre limité de chats, essentielle pour effectuer une telle modélisation pour cette espèce. Cette étude intitulée *Pharmacokinetics of clomipramine and desmethylclomipramine after single-dose intravenous and oral administrations in cats* a été publiée dans le Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 29: 271-278, en août 2006.

Les résultats de cette première étude ont permis d'entreprendre une étude de pharmacocinétique de population de la clomipramine chez les chats selon les deux hypothèses suivantes :

- 1) il existe une variabilité interindividuelle dans les paramètres de pharmacocinétique de la clomipramine et de la desméthylclomipramine (DCMP) dans la population de chats;
- 2) dans le cas d'une variabilité statistiquement significative, il existe une ou des covariables pour expliquer ces différences.

Les objectifs étaient de détecter et quantifier la variabilité interindividuelle dans les paramètres de pharmacocinétique de la clomipramine dans un grand nombre de chats et d'identifier une ou des covariables pouvant expliquer cette variabilité. Cette étude intitulée *Effects of physiological covariables on pharmacokinetic parameters of clomipramine in a large population of cats after a single oral administration* a été acceptée pour publication dans le Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics en novembre 2006.

Cheminement scientifique

C'est à la suite d'une analyse statistique détaillée que plusieurs autres études ont été envisagées en tant que troisième volet de ce programme de doctorat pour tenter

d'expliquer l'origine de la variabilité interindividuelle entre chats et entre espèces, observée dans les deux premières études. Les facteurs de disposition identifiés comme responsables de la grande variabilité des paramètres de pharmacocinétique de la clomipramine et de la DCMP étaient l'absorption et le métabolisme de la clomipramine, mis en évidence par la présence d'une absorption discontinue biphasique et la grande variabilité dans l'exposition interne à la DCMP entre les chats respectivement. Ainsi, une étude évaluant les facteurs pouvant influencer l'étendue et la vitesse d'absorption de la clomipramine, et une étude investiguant les différences de clairance, de volume de distribution et de biodisponibilité systémique de la DCMP entre les chats étaient envisagées comme possibilité de troisième projet.

Cependant, ce sont les études de métabolisme de la clomipramine chez les humains, démontrant une grande variabilité interindividuelle dans la biotransformation de cet antidépresseur tricyclique par les cytochromes P450, qui ont influencé le choix du troisième projet. Ainsi, la dernière étude de ce programme ciblait le métabolisme *in vitro* de la clomipramine chez les chats, chiens et rats qui avait les hypothèses suivantes:

- 1) il existe une variabilité interspécifique dans le profil métabolique de la biotransformation de la clomipramine entre les chats, chiens et rats ;
- 2) il existe une différence de profil métabolique de la biotransformation de la clomipramine entre les chats mâles et femelles.

Cette dernière étude avait donc pour but d'identifier les principaux métabolites formés par la biotransformation microsomale de la clomipramine chez les chats et les chiens, et de confirmer ceux des rats rapportés dans la littérature, ainsi que de comparer les profils métaboliques de la clomipramine entre les espèces et entre les chats mâles et femelles.

Cette étude intitulée *Comparative oxidative metabolic profile of clomipramine in cats, rats and dogs : a preliminary in vitro study* a été soumise pour publication dans The Veterinary Journal en janvier 2007.

Impact pharmacologique et clinique

Le but de ce programme doctoral était d'élucider les facteurs expliquant la variabilité de la Cp et des paramètres de pharmacocinétique de la clomipramine afin d'orienter des études subséquentes sur la relation PC-PD et les effets cliniques à long terme chez les chats associés avec l'administration de cet antidépresseur tricyclique et par conséquent, améliorer son utilisation clinique chez cette espèce.

Contribution particulière

Chacun des projets a fait l'objet de planification, exécution, analyse des résultats et rédaction d'article majoritairement effectuées par l'auteure de cette thèse. Les coauteures incluent la directrice et codirectrice de recherche qui ont offert leur expertise et support, essentiels au développement de ces études. Les autres collaborateurs ont contribué au volet de chimie analytique des projets.

Chapitre 1 – Principaux troubles de comportement félin

L'étude du comportement animal est souvent comparée à la psychologie humaine et partage ainsi plusieurs traitements et modalités. La psychologie animale n'est pas une nouvelle discipline mais elle connaît une émergence récente marquée. Le nombre grandissant d'euthanasies ou d'abandons à des refuges dû aux problèmes comportementaux incite les vétérinaires à aider les propriétaires à mieux gérer les troubles de comportement de leur compagnon félin. Mais quelle est la cause de tous ces troubles affligeant les chats domestiques?

1.1 Anxiété

L'anxiété est définie comme une émotion diffuse de danger ou de menace perçu ou réel (Odendaal, 1997; Frank & Dehasse, 2003). Tout comme chez l'humain, l'anxiété est à l'origine de plusieurs manifestations pathopsychologiques chez le chat (Frank & Dehasse, 2003). Une connaissance approfondie des causes et conséquences de l'anxiété féline aide à améliorer la qualité de vie des chats anxieux.

1.1.1 Stimuli provoquant de l'anxiété

Il existe plusieurs stimuli provoquant de l'anxiété chez le chat, qui est alors en état d'alerte constant (Hetts, 1991; Luescher et al., 1991). Un stimulus peut être de nature environnementale ou sociale, externe ou interne (Cooper, 1997; Crowell-Davis et al., 1997; Sawyer et al., 1999; Frank & Dehasse, 2003; Waisglass et al., 2006). Il est possible qu'un trouble de comportement en engendre un autre, chez le même chat, ou chez un colocataire félin (Frank & Dehasse, 2003). Le confinement intérieur, les conflits intraspécifiques, le déménagement, la rénovation, un nouvel objet (chaise, sofa) ou animal (chat, chien), une nouvelle personne (bébé, colocataire), ou un changement dans la routine

du chat ou du propriétaire sont des sources d'anxiété importantes qui engendrent chez certains chats des troubles de comportement (Beaver, 2003; Frank & Dehasse, 2003; Neilson, 2003; Tynes et al., 2003)

1.1.2 Domestication des chats

Contrairement aux croyances populaires, le chat est une espèce sociale. Ceci est mis en évidence par l'organisation de groupes sociaux observés chez les chats sauvages (Crowell-Davis et al., 1997). Le chat sauvage démontre des comportements d'affiliation (toilettage, contact corporel, partage de nourriture), de chasse (prédation), de territorialité (marquage, conflits) et de reproduction (accouplement, élevage des chatons) (Crowell-Davis et al., 1997). De par ses origines, il est raisonnable de présumer que ces comportements font aussi partie du répertoire normal de comportements chez le chat domestique. Le chat domestique stérilisé possède par contre, un territoire imposé et plus restreint qu'il doit partager avec des membres humains et animaux (qu'il n'aurait peut-être pas choisis) et n'a plus besoin de chasser pour se nourrir. Cet arrangement est souvent toléré, cependant, un dérangement de l'équilibre social entraîne parfois des problèmes de comportement chez certains chats de nature anxieuse qui, par conséquent, manifestent des problèmes d'adaptation. Ainsi, il semblerait que la domestication ait aboli la nécessité d'exprimer certains comportements normaux des chats, sans toutefois avoir nécessairement aboli le besoin inné de les manifester.

1.1.3 Pathophysiologie de l'anxiété

La pathophysiologie de l'anxiété est reliée à divers neurotransmetteurs cérébraux comme la sérotonine (5-HT), la noradrénaline (NA), la dopamine, l'acide gamma-aminobutyrique (GABA), le glutamate et l'acétylcholine (Boothe, 2001). Leurs modes

d'action et leur implication dans la pathophysiologie de l'anxiété sont présentés dans le Tableau I.

Tableau I - Principaux neurotransmetteurs cérébraux impliqués dans la pathophysiologie de l'anxiété

Neurotransmetteurs	Modes d'action	Récepteurs	Implication neuropsychologique
Acétylcholine	excitation excitation/inhibition	nicotinique muscarinique (M1 & M2)	antagonisée par plusieurs psychotropes causant des effets secondaires
Glutamate	excitation	N-méthyl-D-aspartate (NMDA)	responsable d'agressivité et de troubles compulsifs; inhibé par les barbituriques, les progestagènes et la dextrométhorphan
Acide gamma-aminobutyrique	inhibition	chlorure (GABA)	agit au niveau du cortex cérébral et système limbique; stimulée par les benzodiazépines et barbituriques
Dopamine	excitation/inhibition	dopaminergique (D1 & D2)	responsable des stéréotypies, Parkinson's et dépression
Noradrénaline	excitation/inhibition	adrénergique (α , β)	agit au niveau du centre d'éveil et d'humeur, responsable de dépression/tendances maniaques
Sérotonine	excitation/inhibition	sérotoninergique (5-HT ₁₋₇)	responsable des variations d'humeur et comportement, réponse à l'anxiété, éveil/sommeil, activité motrice

(Nicholl, 2004)

Le neurotransmetteur le plus impliqué dans les variations d'humeur et de comportement, et de réponse à l'anxiété est la **sérotonine** (Jacobs, 1991; Rueter et al., 1997). Cette

monoamine biogénique est synthétisée dans le cerveau à partir du tryptophane (Boothe, 2001). Les neurones sérotoninergiques du système nerveux central (SNC) arborent des fonctions différentes dépendant du type de récepteurs dans la synapse (Boothe, 2001). Sept familles de récepteurs, 5-HT₁ à 5-HT₇, et 16 sous-familles ont été identifiées jusqu'à présent (Folk & Mora, 2003; Nicholl, 2004). Un des récepteurs, le 5-HT₃, est ionique et agit rapidement, tandis que les six autres récepteurs sont de type métabotrope (protéine G) (Sanders-Bush et al., 2003; Nicholl, 2004). Ces derniers déclenchent une cascade de réactions à l'aide de messagers secondaires, comme l'adénosyl monophosphate cyclique (cAMP) et l'inosite triphosphate (IP₃) et prennent par conséquent, plus de temps à effectuer leur action finale (Sanders-Bush et al., 2003; Nicholl, 2004). Récemment, une étude a identifié deux récepteurs (5-HT_{1A} et 5-HT_{2C}) offrant des effets modulateurs opposés quant à l'expression de l'agressivité chez les chats (Hassanain et al., 2003).

1.1.4 Régulation des monoamines

La régulation des monoamines biogéniques (5-HT et NA) est complexe (Fig. 2). Le neurone présynaptique synthétise, conserve dans ses vésicules et libère les monoamines par exocytose dans la fente synaptique (Kandel et al., 2000). Les monoamines agissent sur les divers récepteurs postsynaptiques (proches ou éloignés) pour effectuer leur action. Un maintien adéquat de l'homéostasie monoaminergique est assuré, entre autres, grâce aux mécanismes autorégulateurs du neurone présynaptique qui recapte la sérotonine et la NE accumulées dans la fente et les élimine par monoamine oxydase dans la mitochondrie (Kandel et al., 2000; Boothe, 2001; Nicholl, 2004).

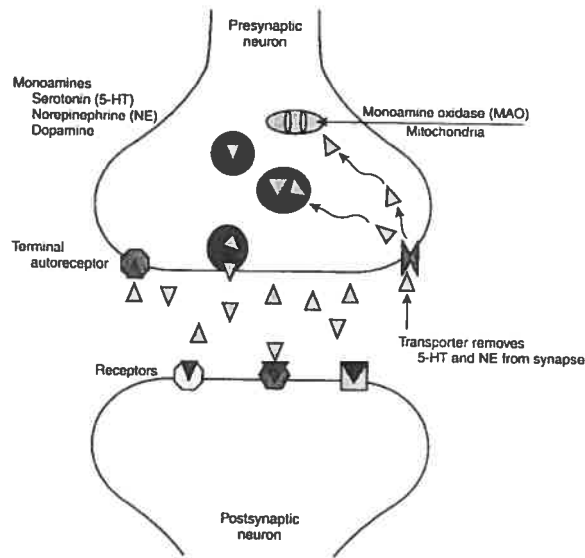


Figure 2 – Mécanismes d'action et d'autorégulation des monoamines biogéniques par le neurone synaptique. Extrait de Boothe, 2001.

Ainsi, depuis 1967, la théorie de Schildkraut affirme qu'une déficience des neurotransmetteurs monoamines biogéniques chez les humains entraîne une dépression (Schildkraut et al., 1967). Cette théorie serait également à l'origine de l'anxiété chez les animaux quoiqu'elle n'ait jamais été investiguée (Boothe, 2001; Overall, 2001; Beaver, 2003).

De nombreuses études expérimentales ciblant les différentes fonctions et l'emplacement des récepteurs sérotoninergiques, ont certainement amélioré nos connaissances sur les nombreux mécanismes d'action de cet important neurotransmetteur et son rôle dans la pathophysiologie de plusieurs maladies cérébrales comme la dépression et l'anxiété, réfutant ainsi l'explication simpliste de Schildkraut. Dans les prochaines décennies, la neurocomplexité de la sérotonine continuera à faire l'objet de plusieurs autres études humaines et animales qui utiliseront des techniques avant-gardistes comme la

microdialyse, la tomographie et la résonance magnétique dans l'ultime but d'améliorer le traitement pharmacologique des maladies affectives.

1.2 Fréquences des comportements

Le marquage urinaire, l'agressivité inter et intraspécifique, la vocalisation excessive, le syndrome d'anxiété de séparation et les troubles compulsifs sont des troubles de comportement les plus fréquemment rencontrés chez les chats domestiques. Les pourcentages de ces principaux troubles sont représentés dans la Figure 3 qui a été compilée à partir de plusieurs sources bibliographiques.

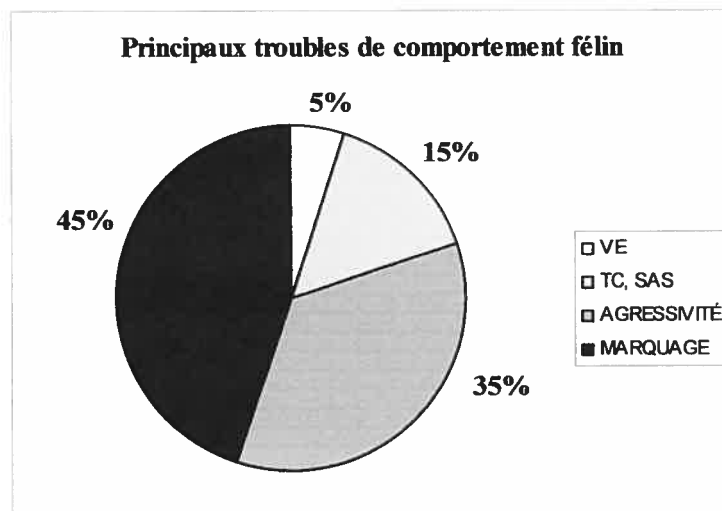


Figure 3 – Pourcentages des principaux troubles de comportement rencontrés chez les chats domestiques selon la littérature (Luescher et al., 1991; Cooper, 1997; Crowell-Davis et al., 1997; Overall, 1997; Schwartz, 2002; Beaver, 2003). VE=vocalisation excessive; TC=troubles compulsifs; SAS=syndrome d'anxiété de séparation

C'est à l'aide de questionnaires détaillés et d'exams médicaux et analytiques que le vétérinaire peut éliminer les problèmes pathophysiologiques avant de procéder à l'élaboration d'un protocole de traitement comportemental individuel et rationnel (Borchelt, 1991; Reisner, 1991). De plus, la communication entre le propriétaire et le

vétérinaire est primordiale pour assurer un succès thérapeutique et nécessite une étroite complicité entre les deux parties.

1.3 Marquage urinaire

Le marquage urinaire est le problème comportemental le plus commun chez les chats domestiques (Beaver, 2003; Simpson & Papich, 2003). Le mâle intact représente le seul cas où le marquage, sous contrôle hormonal, est éthologiquement normal (Ohmiya & Mehendale, 1984). Le comportement devient un problème quand une population de chats stérilisés démontre des tendances de marquage. Selon maintes études cliniques antérieures, cette population de marqueurs est estimée à 13% de mâles castrés et 5% de femelles stérilisées (Hart & Cooper, 1984; Beaver, 1989; Dehasse, 1997).

Bergman et coll. (2002) ont conclu que la raison principale du faible taux de succès dans le traitement du marquage urinaire chez les chats est la difficulté qu'ont les vétérinaires à reconnaître les critères distinguant le marquage urinaire des autres problèmes de malpropreté, comme la miction inappropriée. Par conséquent, ce problème engendre le plus d'abandon aux refuges pour animaux et/ou le plus d'euthanasie de tous les troubles de comportement félin (Patronek et al., 1996). Les critères distinguant le marquage urinaire de la miction inappropriée sont indiqués dans le Tableau II (Seskel & Lindeman, 1998).

Cette distinction est importante puisque les modalités de traitement sont différentes.

L'analyse d'urine, la radiographie simple ou de contraste, l'échographie et la cystoscopie sont des outils essentiels mis à la disposition du vétérinaire pour faire la distinction entre les problèmes médicaux et comportementaux (Buffington et al., 1997; Tynes et al., 2003).

Cependant, la présence de maladie n'engendre pas automatiquement l'exclusion d'un trouble de comportement puisqu'une physiopathogénèse peut entraîner un cercle vicieux d'élimination inappropriée.

Tableau II - Principales différences entre le marquage urinaire et la miction inappropriée chez les chats.

Critères	Marquage urinaire	Miction inappropriée
Posture du chat	debout ou accroupi, tremblement de la queue, piétinement des pattes arrières; miction incomplète	accroupi; miction complète
Quantité d'urine	faible	grande
Lieu	surfaces verticales; 33% horizontales avec importance sociale (porte, sac, lit)	surfaces horizontales seulement
Relation avec litière	normale	aversion/préférence
Interaction intraspécifique	agressivité passive et active	difficulté d'accès à la litière
Raisons	territoire/statut; anxiété; défécation normale	élimination; défécation inappropriée

(adapté et traduit de Seskel & Lindeman, 1998)

La confusion entourant l'élimination inappropriée est multidimensionnelle et inclut probablement bien plus que le manque d'expertise du vétérinaire à reconnaître les signes de marquage, tel que suggéré par l'équipe de Bergman (2002). Il est important de mentionner qu'en moyenne, le propriétaire attend huit mois avant de consulter un vétérinaire pour un problème de malpropreté (Beaver, 1989). La chronicité du problème rend la détection de la cause de l'anxiété et l'identification des signes cliniques (critères) particulièrement difficiles. La mauvaise combinaison de traitement pharmacologique et de thérapie comportementale, l'impatience et le manque de coopération du propriétaire, la difficulté à éliminer la cause d'anxiété (nouveau bébé) et le grand nombre de chats en cohabitation, contribuent également à l'échec thérapeutique du marquage urinaire.

1.4 Agressivité

L'agressivité est le deuxième trouble de comportement félin le plus fréquemment présenté au vétérinaire ainsi que la deuxième plus grande cause d'abandon ou d'euthanasie (Borchelt & Voith, 1987; Patronek et al., 1996; Crowell-Davis et al., 1997). L'agressivité est définie comme un acte affectif qui menace ou incite un contact physique ou psychologique malfaisant (Frank & Dehasse, 2003). Plusieurs types d'agressivité font partie du comportement normal du chat. L'agressivité devient problématique lorsqu'elle se manifeste en excès ou de façon non inhibée (Borchelt & Voith, 1987; Schwartz, 1994; Crowell-Davis et al., 1997; Frank & Dehasse, 2003). Un contexte d'anxiété ou d'insécurité territoriale peut facilement déclencher un comportement indésirable chez un chat à tempérament excitable ou hyperactif (Reisner et al., 1994).

L'agressivité féline se divise en deux grandes catégories: l'agressivité intraspécifique (chat/chat) et l'agressivité interspécifique (chat/humain). Ces catégories se subdivisent en différents types dépendant de leur contexte et/ou stimulus (Tableau III).

Tableau III - Différents types d'agressivité féline identifiés par les spécialistes en comportement animal.

Agressivité intraspécifique	Agressivité interspécifique
de peur ou d'autodéfense	de jeu
de jeu	aux caresses
de prédation	de peur ou d'autodéfense
de substitution	de substitution
de dispersion	territoriale
hiérarchique ou de dominance	irritable
territoriale	sexuelle
maternelle	pathologique ou idiopathique
offensive	
irritable	
entre mâles	
sexuelle	

(Borchelt & Voith, 1987; Crowell-Davis et al., 1997; Frank & Dehasse, 2003)

Une étude rétrospective à la fin des années '80, comptant 170 cas problématiques félins, a démontré que le portrait typique d'un agresseur était un chat mâle, castré, âgé de 3 ans (Beaver, 1989). Cependant, 23% de la population d'agresseurs était des femelles stérilisées; la plupart des chats étaient de race mixte, tandis que le siamois était le chat de race pure le plus souvent représenté (Beaver, 1989).

Tout comme le marquage urinaire, il est important d'éliminer toute cause pathophysiologique qui pourrait expliquer les changements d'humeur du chat agressif (Reisner, 1991; Frank & Dehasse, 2003). Comparativement au chien, les causes médicales incitant des agressions chez les chats sont beaucoup moins fréquentes (Beaver, 1989). Toutefois, les maladies neurologiques impliquant la douleur, les tumeurs, les infections/inflammations cérébrospinales et les endocrinopathies font partie d'un répertoire de déclencheurs potentiels d'agressivité chez le chat (Borchelt & Voith, 1987; Beaver, 1989). Ainsi, le rôle du vétérinaire consiste à bien identifier le type d'agressivité, en portant attention au langage corporel et à la séquence des actes de l'agresseur, afin de formuler un protocole de traitement approprié, tout en considérant la sécurité du propriétaire et du chat, ainsi que les attentes du propriétaire face à sa relation avec son compagnon félin.

1.5 Troubles compulsifs et stéréotypies

Les troubles compulsifs appartiennent à la catégorie des troubles typiquement anormaux où l'animal est incapable de s'adapter à son milieu (Odendaal, 1997). Les stéréotypies sont définies comme étant des séquences de mouvements ou de comportement, répétitifs, hors contexte, sans but, exécutées à une fréquence et/ou une durée excessives, provoquées par des stimuli d'anxiété (Luescher et al., 1991; Overall &

Dunham, 2002; Luescher, 2003). Contrairement aux humains où les troubles compulsifs sont généralement déclenchés par des pensées obsessionnelles, ce sont les stimuli externes qui déclenchent les troubles compulsifs chez les animaux de compagnie (Odendaal, 1997).

1.5.1 Types de troubles compulsifs

La domestication de l'espèce animale a fait croître le nombre d'espèces et de types de troubles compulsifs diagnostiqués chez les animaux de compagnie (Odendaal, 1997). La course, les sauts, le secouement de la tête et/ou de la patte, le mouvement sporadique de la queue, la course pour attraper sa queue ou le fait de figer font partie de la catégorie de troubles compulsifs **locomoteurs** chez les chats (Luescher, 2003). Des exemples de troubles compulsifs **oraux** incluent le miaulement persistant, la tétée ou l'ingestion de laine, de tissu ou autres (pica), le léchage excessif et le mâchonnement des pattes, des orteils, des griffes ou de la queue (automutilation) (Luescher, 2003; Virga, 2003). Les troubles compulsifs **agressifs ou névrosés** comme l'automutilation des pattes ou de la queue, ou une violente griffade à la gueule, souvent accompagnée de grognement et d'agression dirigée vers l'humain sont les comportements les plus destructifs et imprévisibles (Luescher et al., 1991). Selon une étude rétrospective de 126 chats, 50% des chats développent leur trouble compulsif avant l'âge d'un an, tout comme les humains qui développent leur trouble obsessionnel compulsif à l'adolescence, c'est-à-dire l'âge de la maturité sociale (Overall & Dunham, 2002).

1.5.2 Syndrome d'hyperesthésie féline

Le syndrome d'hyperesthésie féline est une condition particulière qui comprend plusieurs types de trouble compulsif. Le syndrome se manifeste de façon erratique par une augmentation de l'activité motrice (course, saut, mordillement des flancs, pattes ou queue) accompagnée d'un « roulement » de la peau dans la région lombaire et de mouvements

exagérés de la queue, de léchage et de vocalisation excessifs, et de spasmes des muscles thoracolombaires (Beaver, 2003, Virga, 2003).

1.5.3 Alopécie psychogénique

L'alopécie psychogénique est une forme d'automutilation par léchage excessif et mâchonnement qui est élicitée par un stimulus provoquant de l'anxiété et devient un trouble compulsif lorsque le stimulus n'est plus nécessaire pour le déclenchement du comportement (Virga, 2003; Waisglass et al., 2006). L'équivalent humain est la trichotillomanie (Virga, 2003). L'alopécie psychogénique féline peut être causée par un problème d'origine dermatologique ou un comportement de substitution face à une anxiété et affecte la région abdomino-inguinale et/ou médiale des pattes antérieures (Sawyer et al., 1999; Waisglass et al., 2006). Selon Schwartz (2002), il semblerait que les chattes soient plus aptes à s'automutiler que les chats. De plus, le confinement à l'intérieur accentue le problème (Virga, 2003).

Les allergies alimentaires ou parasitaires, les atopies, les dermatophytoses, les ectoparasitoses et les alopécies endocriniennes ne sont que quelques exemples de conditions cliniquement semblables à l'alopécie psychogénique qui sont par contre, beaucoup plus fréquentes (Sawyer et al., 1999; Waisglass et al., 2006). En effet, dans une étude de 21 chats avec dermatoses, seulement 2% des chats avaient une alopécie psychogénique (Waisglass et al., 2006). Ainsi, il importe au vétérinaire de bien investiguer la source potentielle du prurit avant de conclure que son patient a un problème comportemental.

1.6 Syndrome d'anxiété de séparation

Bien moins fréquent chez le chat que chez le chien, le syndrome d'anxiété de séparation est tout de même un problème de comportement connu chez cette espèce

(Schwartz, 2003). La manifestation de ce trouble peut être immédiatement avant, pendant et/ou à l'arrivée de la personne pour laquelle le chat a un attachement émotif profond (Schwartz, 2003). Le seul facteur responsable de cette condition, selon Schwartz (2003), est la domestication des chats qui, au fil des années, a génétiquement sélectionné des compagnons de plus en plus dépendants de leur propriétaire.

Le profil typique du chat souffrant d'un syndrome d'anxiété de séparation est une femelle adulte ou gériatrique, confinée à l'intérieur sans aucun compagnon félin, contrairement au chien qui fait souvent partie d'une famille hébergeant plusieurs chiens (Schwartz, 2002, 2003). La miction inappropriée (habituellement sur le lit du propriétaire), défécation inappropriée, vocalisation excessive, destruction par griffade et léchage excessif sont des manifestations fréquentes faisant partie du syndrome d'anxiété de séparation chez le chat (Schwartz, 2002). La chatte a souvent recours aux troubles affectifs introvertis comme l'automutilation/léchage excessif pour l'expression de son anxiété, tandis que le chat s'adonne à la destruction des objets de la maison (Schwartz, 2002).

1.7 Vocalisation excessive

La vocalisation excessive est un comportement indésirable pour le propriétaire mais souvent normal pour le chat. Ce « miaulement de demande » pour avoir accès à l'extérieur, de l'attention ou pour être nourri peut être perpétué par inadvertance par le propriétaire qui succombe facilement aux demandes du chat (Beaver, 2003). Chez le chat âgé, ce comportement fait partie du syndrome cognitif félin (Beaver, 2003). Cependant, l'hyperthyroïdisme et le diabète, ainsi que la douleur peuvent également être la cause du miaulement excessif.

Tous ces troubles de comportement peuvent se manifester seuls ou en combinaison, et affliger autant le chat que la chatte. Le Tableau IV est un résumé des principaux troubles de comportement classés, sans exclusivité, selon le sexe du chat.

Tableau IV - Principaux troubles de comportement majoritairement rencontrés, sans exclusivité, selon le sexe du chat en ordre décroissant d'importance.

Sexe	Troubles	Références
Femelle	Trouble compulsif (alopécie ou pica)	Virga, 2003; Waisglass et al., 2006
	Syndrome d'anxiété de séparation	Schwartz, 2002
	Vocalisation excessive	Beaver, 2003
Mâle	Marquage urinaire	Hart & Cooper, 1984; Dehasse, 1997
	Agressivité intraspécifique	Beaver, 1989
	Vocalisation excessive	Beaver, 2003

Le vétérinaire doit donc faire la distinction entre le comportement normal du chat, les problèmes pathologiques et les troubles de comportement avant d'entreprendre un traitement individualisé. Cependant, bien que les troubles de comportement soient décrits de façon détaillée dans la littérature et que des profils typiques soient élaborés, chaque chat « troublé » est un cas particulier, nécessitant une investigation profonde de son environnement et de la nature de ses interactions. Puisque les chats varient dans leur capacité d'adaptation aux stimuli provoquant de l'anxiété, il est important de capter, à l'aide d'une caméra vidéo, les activités journalières du chat dans son milieu habituel. La domestication a vraisemblablement dérobé le chat de ses opportunités d'exercer son comportement normal: maternel, territorial et de chasse. Le confinement intérieur a engendré de l'anxiété qui se manifeste par des problèmes de comportement pour plusieurs chats. Il importe donc d'améliorer la qualité de vie de nos compagnons félins en aidant ceux-ci à retrouver leurs comportements ancestraux dans nos maisons.

Chapitre 2 – Modalités de traitement

L'approche thérapeutique a pour buts d'éliminer le stimulus provoquant l'anxiété chez le patient félin et de sélectionner, si nécessaire, un médicament psychotrope qui influencera les neurotransmetteurs, en particulier, la sérotonine, afin d'apaiser le trouble de comportement. L'importance de récolter des données objectives telles que la fréquence, la durée et l'intensité du problème est primordiale pour établir un protocole de traitement complet. Il existe trois approches thérapeutiques recommandées pour apaiser l'anxiété chez le chat: les modifications environnementales, la thérapie comportementale et le traitement pharmacologique. Sur quoi sont ainsi basées ces recommandations et existe-t-il une recette magique?

2.1 Modifications environnementales

Les modifications environnementales ont pour but de diminuer l'anxiété émotionnelle du chat en lui procurant des opportunités d'exprimer ses comportements normaux dans la maison. Plusieurs spécialistes en comportement animal recommandent de fournir une atmosphère de plénitude en ce qui concerne les bacs à litière, les endroits d'alimentation, de relaxation et de cachette, les jouets et l'espace vertical (Landsberg, 1991; Cooper, 1997; Frank & Dehasse, 2003; Virga, 2003).

2.1.1 Enrichissement environnemental

Le chat confiné nécessite un enrichissement environnemental répondant à ses besoins sociaux et physiques, entre autres, des opportunités de marquage facial et visuel, de chasse (prédation) et de jeu individuel. Le simple fait d'augmenter l'espace vertical, à l'aide de tablettes aux murs, surtout dans les foyers hébergeant plusieurs chats, peut

permettre à un chat anxieux de relaxer en augmentant ses possibilités de trouver un endroit sécuritaire. Il est également possible d'inciter le chat à exercer, au cours de la journée, ses capacités de chasse en cachant des morceaux de nourriture dans divers endroits à travers la maison, au lieu de lui offrir un bol *ad libitum* (Fig. 4).



Figure 4 – Exemples d'enrichissements environnementaux exploitant les comportements normaux des chats et l'utilisation de l'espace vertical. (Courtoisie du Dre Sabine Schroll, avec permission.)

2.1.2 Bac à litière

Le bac à litière est une importante source d'anxiété pour certains chats (Olm & Houpt, 1988; Cooper, 1997). Il existe plusieurs volets à la relation du chat avec son bac à litière, dont le nombre, l'endroit, le substrat et l'hygiène du bac (Olm & Houpt, 1988; Cooper, 1997). Le nombre de bacs à litière recommandé est un de plus que le nombre de chats habitant dans la même maison (Olm & Houpt, 1988; Beaver, 1989; Cooper, 1997). L'endroit idéal pour le bac à litière est différent pour chaque chat, d'où l'importance de mettre les bacs à divers endroits dans la maison. Il est important d'éviter les endroits bruyants continus (endroit achalandé) ou intermittents (laveuse à linge ou fournaise), d'éviter de déranger le chat quand il est dans la litière et d'assurer un accès au bac en tout temps (obstacles, conflits intraspécifiques) (Cooper, 1997). De plus, il est important que

tout changement de substrat se fasse de façon progressive (Olm & Houpt, 1988) ou de style «cafétéria», c'est-à-dire en offrant différents types de substrat en même temps pour déterminer la préférence du chat (Cooper, 1997). La fréquence de nettoyage du bac à litière la plus recommandée, dans les cas de malpropreté, est une fois par jour pour enlever les selles et l'urine (litière agglomérante) et une fois par semaine pour le nettoyage complet du bac et changement de litière (Olm & Houpt, 1988; Cooper, 1997; Litster, 2000; Tynes et al., 2003).

2.1.3 Interactions sociales

L'augmentation des interactions sociales intra et interspécifiques positives aident à favoriser un milieu calme pour le chat. Les jeux interactifs, les caresses et le toilettage sont des exemples peu coûteux mais efficaces pour créer une relation apaisante entre le propriétaire et son compagnon félin (Landsberg, 1991; Virga, 2003). La séparation physique et visuelle des chats en animosité aide à diminuer le niveau d'anxiété (Beaver, 2003). Finalement, il est possible qu'une simple diminution du nombre de chats habitant sous le même toit puisse favoriser un environnement plus paisible (Neilson, 2003).

2.1.4 Thérapie phéromonale

Un autre moyen de modifier l'environnement pour apaiser l'anxiété chez les chats est l'utilisation de plus en plus populaire de la thérapie phéromonale (Ogata & Takeuchi, 2000; Pageat & Gauthier, 2003). En général, les phéromones allomarquantes synthétisées ont démontré leur capacité de diminuer la fréquence de marquage urinaire de 50 à 90 % en permettant l'atteinte d'une complicité sociale féline et humaine (Ogata & Takeuchi, 2000; Kakuma & Bradshaw, 2001; Pageat & Gauthier, 2003). La « phéromonothérapie » a également été suggérée pour diminuer l'anxiété causée par le

transport, la pose de cathéters intraveineux, l'hospitalisation, la surpopulation dans les chatteries et lors des consultations vétérinaires (Pageat & Gauthier, 2003). Cependant, aucune étude sur les phéromones n'est basée sur des preuves scientifiques prouvant leur efficacité dans ces situations.

2.2 Thérapie comportementale

Une thérapie comportementale est un processus par lequel des principes d'apprentissage sont utilisés pour effectuer un changement de comportement chez l'individu (Beaver, 2003). La progression des modifications est souvent lente et l'alliance, la motivation et les attentes du propriétaire doivent être prises en considération pour assurer un succès thérapeutique (Beaver, 2003). Il existe deux sortes de conditionnement : le conditionnement classique (répondant) et le conditionnement d'apprentissage (opérant) (Mills, 1997, Beaver, 2003, Frank & Dehasse, 2003).

2.2.1 Conditionnement d'apprentissage

Le conditionnement d'apprentissage façonne le comportement animal en utilisant des récompenses (renforcements) ou des aversions (punitions) qui suivent l'action, contrairement au conditionnement classique où le stimulus neutre est donné avant l'action désirée (Mills, 1997). La punition sert à arrêter un comportement indésirable tandis que le renforcement (positif ou négatif) encourage le comportement convoité (Mills, 1997; Beaver, 2003). Le renforcement positif est le conditionnement d'apprentissage le plus recommandé par les spécialistes en comportement animal (Beaver, 2003). La probabilité de manifestation d'un comportement est accrue par des récompenses comme la nourriture, l'herbe à chats, l'attention et les interactions sociales données immédiatement en conséquence de l'acte (Mills, 1997; Beaver, 2003).

2.2.2 Contre-conditionnement

Le contre-conditionnement est une thérapie comportementale très populaire pour le traitement de divers problèmes félines dont le but est de renforcer un comportement incompatible avec le comportement indésirable (Mills, 1997; Beaver, 2003; Virga, 2003). Il est important de sélectionner un comportement relaxant pour diminuer le niveau de tension chez le chat anxieux ou de conflit entre les chats. L'alimentation est un outil de contre-conditionnement populaire puisqu'il est difficile de se lécher excessivement ou de mordre en mangeant (Beaver, 2003; Frank & Dehasse, 2003).

2.2.3 Désensibilisation

La désensibilisation est efficace chez les chats qui démontrent une grande anxiété de peur face à un endroit, un humain ou un autre chat (Cooper, 1997; Mills, 1997; Beaver, 2003; Virga, 2003). La désensibilisation graduelle consiste à rendre le chat de plus en plus confortable face au stimulus en lui offrant des récompenses (Beaver, 2003). La combinaison du contre-conditionnement et de la désensibilisation constitue un pilier important de thérapie comportementale pour les troubles de comportement félin.

2.2.4 Extinction

L'extinction s'applique plus particulièrement pour les chats qui recherchent constamment l'attention de leur propriétaire (Beaver, 2003). L'extinction du comportement est possible en enlevant tous les renforcements qui ont potentiellement servi à perpétuer le comportement indésirable (Beaver, 2003). Il est possible, par contre, que le chat persiste ou empire dans les premières semaines du traitement mais la persévérance du propriétaire à ignorer le comportement s'avérera efficace (Beaver, 2003).

2.3 Chirurgie

La stérilisation est recommandée par la majorité des vétérinaires pour le marquage urinaire et l'agressivité intraspécifique (Hart & Cooper, 1984; Borchelt & Voith, 1987; Olm & Houpt, 1988; Beaver, 1989; Knol & Egberink-Alink, 1989; Chapman, 1991; Cooper, 1997; Crowell-Davis et al., 1997; Houpt, 1997; Frank & Dehasse, 2003). L'efficacité de la stérilisation à réduire la fréquence et l'intensité de ces troubles est de 90% chez les chats (Beaver, 1989; Knol & Egberink-Alink, 1989). Il n'y a, par contre, aucune chirurgie efficace contre l'agressivité du chat envers son propriétaire (Frank & Dehasse, 2003). Contrairement au chien, l'âge au moment de la chirurgie n'influence aucunement le potentiel d'agression chez les chats (Hart & Cooper, 1984; Borchelt & Voith, 1987). Les spécialistes recommandent l'onxyectomie uniquement pour les griffades excessives et pour diminuer l'intensité des blessures infligées aux propriétaires susceptibles d'infections (Borchelt & Voith, 1987; Landsberg, 1991; Frank & Dehasse, 2003).

Le Tableau V présente une compilation des différentes combinaisons possibles de traitements recommandés pour les divers troubles de comportement chez les chats selon la littérature.

Tableau V - Approches thérapeutiques par modifications environnementales et thérapie comportementale de divers troubles de comportement chez les chats.

Approches thérapeutiques	Marquage	Agressivité		VE	TC	SAS
	urinaire	intra	inter	attention	AP, auto-mutilation	griffade/malpropreté
Modifications environnementales						
<i>Enrichissement</i>						
poteaux, tablettes et cachettes	X	X	X	X	X	X
jouets	X	X	X	X	X	X
exercice	X	X	X	X	X	X
<i>Bac à litière</i>						
nombre	X	X				
endroit	X	X				
substrat	X					
hygiène	X					
<i>Intéactions sociales</i>						
<i>interspécifiques</i>						
augmentation		X			X	X
confinement	X		X			
horaire stable	X		X	X	X	X
<i>intraspécifiques</i>						
augmentation			X			
diminution	X	X			X	
séparation	X	X			X	
<i>Phéromones</i>	X	X	X	X	X	X
Thérapies comportementales						
<i>Conditionnement</i>						
renforcement positif	X	X	X		X	
renforcement négatif						
punition		X	X		X	
aversion	X	X	X		X	X
<i>Contre-conditionnement</i>	X	X	X	X	X	
<i>Désensibilisation</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Extinction</i>				X		
Chirurgie						
<i>Stérilisation</i>	X	X				

(Hart & Cooper, 1984; Borchelt & Voith, 1987; Olm & Houpt, 1988; Beaver, 1989; Knol & Egberink-Alink, 1989; Landsberg, 1991; Cooper, 1997; Mills, 1997; Okata & Takeuchi, 2000; Kakuma & Bradshaw, 2001; Beaver, 2003; Frank & Dehasse, 2003; Neilson et al., 2003; Pageat & Gauthier, 2003; Tynes et al., 2003; Virga, 2003). VE=vocalisation excessive; TC=troubles compulsifs; SAS=syndrome d'anxiété de séparation; AP=alopécie psychogénique; intra=intraspécifique; inter=interspécifique.

2.4 Traitement pharmacologique

Les modifications environnementales et la thérapie comportementale sont des moyens efficaces pour contrer plusieurs comportements indésirables. Il est souvent nécessaire, par contre, d'ajouter au protocole de modifications comportementales, un traitement pharmacologique pour assurer un plus grand succès thérapeutique (Gauthier, 2001). Au fil des années et avec la découverte de nouveaux médicaments, la pharmacothérapie pour troubles de comportement animal s'est concentrée sur l'origine du problème, c'est-à-dire l'anxiété. Il est important de noter que l'utilisation de tous les médicaments recommandés pour le traitement des troubles de comportement chez les chats se fait hors du cadre de l'homologation officielle gouvernementale au Canada et aux Etats-Unis (Neilson, 2003).

2.4.1 Hormones

Le traitement hormonal est le plus ancien traitement préconisé pour divers troubles de comportement chez les chats (Gerber & Sulman, 1964). Vu la réduction du marquage urinaire et de l'agressivité suite à la castration des chats, l'utilisation des progestagènes est devenue populaire pour le traitement de ces comportements indésirables. Pendant plus de 20 ans, ces hormones ont été utilisées, parfois sans discrimination, pour leurs effets antiandrogéniques (Chesney, 1976; Hart, 1980; Olm & Houpt, 1988; Knol & Egberink-Alink, 1989).

2.4.1.1 Modes d'action

Les progestagènes synthétiques interagissent avec les récepteurs GABA dans le SNC pour produire des effets similaires aux barbituriques et aux benzodiazépines (Boothe, 2001; Seksel, 2002). En plus de leur effet tranquilisant à l'hypothalamus et au système

limbique, elles imitent la progestérone en supprimant la production de la testostérone, par inhibition de 5- α -stéroïde réductase chez les chats intacts (Hart, 1980; Knol & Egberink-Alink, 1989; Hart et al., 1993; Seksel, 2002), antagonisant ainsi le comportement agressif et le marquage urinaire (Hart et al., 1993). Le mécanisme par lequel il agit sur les troubles de comportement des mâles stérilisés et de certaines femelles est très peu compris (Knol & Egberink-Alink, 1989; Seksel, 2002).

2.4.1.2 Pharmacocinétique

Aucune étude de pharmacocinétique de l'acétate de médroxyprogestérone et de l'acétate de mégestrol chez les chats n'a été publiée dans la littérature.

2.4.1.3 Efficacité clinique et effets secondaires

Une efficacité de 30% de l'hormonothérapie pour le marquage urinaire a été observée dans une étude comprenant 43 chats (Hart, 1980). Cette étude a également identifié deux facteurs importants influençant le succès thérapeutique, soit le sexe et la cohabitation (Hart, 1980). Ainsi, les mâles ont mieux répondu au traitement hormonal (48%) que les femelles (13%) et les chats habitant seul (50%) étaient plus aptes à atténuer leur comportement que les chats habitant avec d'autres chats (18%) (Hart, 1980). Une autre étude de 60 cas de marquage urinaire chez les chats a démontré une efficacité clinique des progestagènes de 42% (Cooper et Hart, 1992). Les résultats de ces études doivent être interprétés avec prudence puisque le critère utilisé pour déterminer l'efficacité clinique de ce xénobiotique était simplement la satisfaction du propriétaire c'est-à-dire sa perception subjective de l'amélioration du problème. De plus, aucun sujet contrôle n'a été utilisé pour évaluer l'importance de l'effet placebo.

Les effets secondaires adverses associés à l'administration des prostagènes sont nombreux; parmi ceux-ci le diabète, le pyomètre, le carcinome mammaire et la suppression de la moelle osseuse et/ou de l'axe adrénocortical sont les plus graves (Hart, 1980; Knol & Egberink-Alink, 1989; Boothe, 2001; Seksel, 2002). Heureusement, l'amélioration des connaissances éthologiques félines et l'arrivée de nouveaux médicaments ciblant l'anxiété avec des effets secondaires moins menaçants ont contribué à estomper sa popularité.

2.4.2 Anxiolytiques

Le traitement anxiolytique pour les troubles de comportement félin a débuté dans les années '80, suite aux nombreux effets secondaires adverses et le peu d'efficacité observés avec l'administration des progestagènes (Cooper & Hart, 1992). L'utilisation des benzodiazépines et des azaspiroones pour le traitement de problèmes d'anxiété et de phobie chez les humains a suscité un grand intérêt pour ces mêmes problèmes rencontrés chez les animaux de compagnie (Marder, 1991; Hart, 1996; Simpson & Papich, 2003).

Les premiers agents anxiolytiques utilisés chez les chats furent les benzodiazépines, principalement le **diazépam** (Marder, 1991; Boothe, 2001; Simpson & Papich, 2003; Virga, 2003). Parmi les azaspiroones, la **buspirone** est l'agent anxiolytique qui a suscité de l'intérêt dès le début des années '90 chez les chats (Hart et al., 1993).

2.4.2.1 Modes d'action

L'interaction du diazépam avec les nombreux récepteurs GABA dans le SNC produit des effets sédatifs et anticonvulsivants en attribuant une hyperpolarisation inhibitrice aux membranes neurales, tandis qu'il semblerait que les effets de modifications comportementales et la stimulation d'appétit seraient dus aux influences directes du

médicament sur l'hypothalamus et le système limbique, et/ou attribués à la décharge de neurotransmetteurs monoamines par le GABA (Cooper & Hart, 1992; Center et al., 1996; Boothe, 2001; Simpson & Papich, 2003). De plus, la relaxation musculaire est vraisemblablement causée par les effets de cette benzodiazépine sur la transmission de neurone internuncial (Center et al., 1996). Une dépendance physiologique et comportementale a été démontrée pour le diazépam chez l'humain et les animaux de compagnie (Cooper & Hart, 1992; Hart et al., 1993).

La buspirone est très différente du diazépam puisqu'elle n'a pas d'effet sédatif, anticonvulsivant et myorelaxant (Marder, 1991; Hart et al., 1993). De plus, elle n'engendre pas de dépendance (Marder, 1991; Hart et al., 1993). Son mode d'action se concentre sur une interaction avec les récepteurs présynaptiques et postsynaptiques 5-HT_{1A}, augmentant ainsi l'activité de la sérotonine (Marder, 1991; Boothe, 2001; Simpson & Papich, 2003; Mealey et al., 2004). Elle engendre également des effets dopaminergiques (Marder, 1991; Boothe, 2001; Simpson & Papich, 2003).

2.4.2.2 Pharmacocinétique

Le diazépam administré oralement est absorbé lentement; il est très liposoluble, traverse la barrière hématoencéphalique facilement et est fortement lié aux protéines (Center et al., 1996; Boothe, 2001). Le métabolisme hépatique se fait par conjugaison et par oxydation pour donner des métabolites actifs comme le nordiazépam et l'oxazépam respectivement (Boothe, 2001; Simpson & Papich, 2003). Les principaux paramètres de pharmacocinétique du diazépam chez les humains, chiens et chats sont présentés dans le Tableau VI, mettant en évidence les différences interspécifiques de disposition de cette benzodiazépine, principalement la clairance.

Tableau VI - Paramètres de pharmacocinétique du diazépam chez l'humain, le chien et le chat après une administration intraveineuse et orale.

Paramètres	Cl (L/h · kg)	Vss (L/kg)	T½ (h)	F (%)	Références
Humain	0.023	0.89-1.2	43 (D); 86 (ND)	94	Klotz et al., 1976; Divoll et al., 1983; Greenblatt et al., 1989
Chien	3.42	5.6	2.5 (D); 3 (ND)	74-100	Klotz et al., 1976
Chat	0.28	0.95-2.0	5.5 (D); 21 (ND)	50	Cotler et al., 1984

Cl=clairance; Vss=volume de distribution à l'équilibre; T½=temps de demi-vie d'élimination; F=biodisponibilité; D=diazépam; ND=nordiazépam

Très peu est connu de la pharmacocinétique de la buspironne chez les chats.

L'équipe de Mealey (2004) a récemment réalisé une étude féline sur la pharmacocinétique de cet azaspironne après une administration orale et transdermique. Ces auteurs ont conclu que l'absorption après l'administration transdermique était très faible puisque le test d'ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) n'a pu détecter des Cp significatives (Mealey et al., 2004). Cependant, ce xénobiotique a été rapidement absorbé par le système gastrointestinal félin atteignant un pic plasmatique deux heures après son administration orale (Overall, 1997; Mealey et al., 2004). Chez l'humain, l'effet de premier passage par hydroxylation et déalkylation est très prononcé et forme plusieurs métabolites, résultant en une biodisponibilité de 4-5% (Sakr & Andheria, 2001). Une étude féline de pharmacocinétique après une administration intraveineuse et orale de la buspironne est nécessaire pour déterminer l'ampleur de l'effet de premier passage chez cette espèce.

2.4.2.3 Efficacité clinique et effets secondaires

Le marquage urinaire (Olm & Houpt, 1988; Cooper & Hart, 1992; Hart et al., 1993; Hart, 1996; Cooper, 1997; Neilson, 2003; Mealey et al., 2004), l'agressivité inter et intraspécifique (Crowell-Davis, 1997; Overall, 1997; Schwartz, 1999; Frank & Dehasse,

2003), le syndrome d'anxiété de séparation (Marder, 1991; Schwartz, 2002) et l'alopecie psychogénique (Sawyer et al., 1999; Virga, 2003) sont des comportements pour lesquels le diazépam et la buspirone ont été utilisés avec un certain succès chez les chats.

L'utilisation de ces xénobiotiques a principalement été basée sur des études cliniques démontrant une efficacité du traitement anxiolytique, définie comme étant une diminution de la fréquence de marquage de > 75%, de 74% pour le diazépam (Cooper & Hart, 1992) et de 55% pour la buspirone (Hart et al., 1993) avec une grande variabilité dans la réponse clinique entre les chats. L'équipe de Hart (1993) a démontré, tout comme pour le traitement hormonal, des différences entre les sexes dans la réponse clinique après l'administration de la buspirone sans toutefois offrir d'explication pour cette variation (Fig. 5). Aucun dimorphisme sexuel dans l'efficacité clinique n'a été documenté suite à l'administration du diazépam chez les chats.

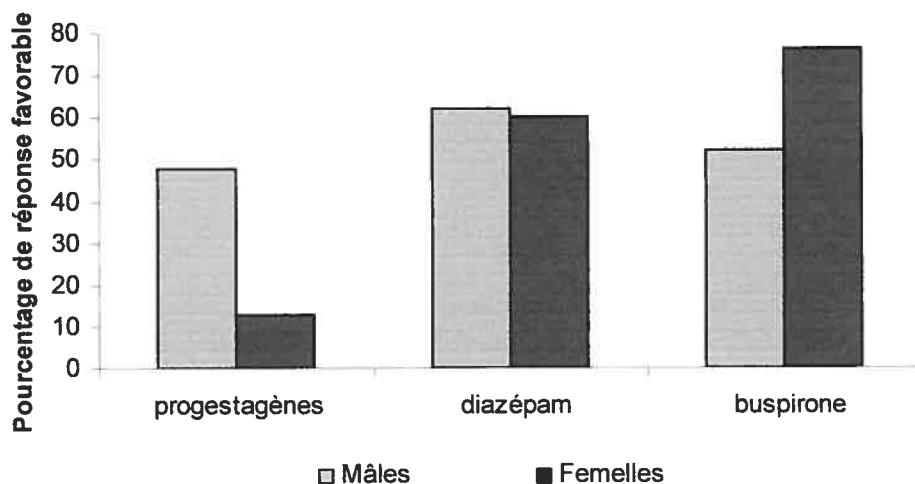


Figure 5 – Différence entre les chats mâles et femelles de pourcentage de réponse favorable aux progestagènes (satisfaction du propriétaire), au diazépam et à la buspirone (diminution de la fréquence du marquage de > 75%) pour le contrôle du marquage urinaire. Traduit de l'article de Hart et al., 1993.

Les effets secondaires du diazépam chez les chats incluent la sédation, l'ataxie, la somnolence, la stimulation d'appétit, le gain de poids, l'apprentissage limité, l'hyperactivité paradoxale et rarement la nécrose hépatocellulaire (Marder, 1991; Cooper & Hart, 1992; Center et al., 1996; Hart, 1996; Simpson & Papich, 2003). Center et coll. (1996) suggèrent que l'intoxication hépatique observée chez 11 chats a été causée par une déficience de conjugaison glucuronique et de désintoxication glutathionique des métabolites actifs et inactifs. La buspirone possède peu d'effets secondaires. Ceux-ci incluent une diminution des inhibitions (pouvant augmenter l'agressivité intraspécifique), une plus grande affection envers le propriétaire, une faible sédation ou agitation, des vomissements et une tachycardie (Marder, 1991; Hart et al., 1993; Cooper, 1997; Overall, 1997; Boothe, 2001; Simpson & Papich, 2003). Cet agent anxiolytique est utile surtout en combinaison avec un apprentissage conditionné puisqu'il ne semble pas affecter la mémoire (Hart et al., 1993; Overall, 1997; Simpson & Papich, 2003).

Malheureusement, tout comme pour le traitement hormonal, il n'existe aucune étude contrôlée et à double insu évaluant l'efficacité clinique des anxiolytiques de façon objective, c'est-à-dire permettant l'élimination des facteurs pouvant biaiser l'interprétation de l'efficacité clinique, dans le traitement des troubles de comportement félin. De plus, aucune étude de la relation pharmacocinétique-pharmacodynamique (PC/PD) n'a été effectuée pour tenter de corréler la C_p , plutôt que la dose, aux effets thérapeutiques. Ainsi, les résultats des études sur les anxiolytiques doivent être interprétés avec prudence.

2.4.3 Antidépresseurs

Les antidépresseurs les plus utilisés en médecine vétérinaire sont les inhibiteurs de monoamine oxidase (IMAO), les antidépresseurs tricycliques (ADT) et les inhibiteurs

sélectifs du recaptage de la sérotonine (ISRS) (Overall, 1997; Boothe, 2001; Simpson & Papich, 2003). La sélégiline est le seul IMAO homologué au Canada et aux États-Unis pour le traitement de problèmes cognitifs chez le chien gériatrique (Simpson & Papich, 2003). L'imipramine, l'amitriptyline et la clomipramine sont les ADT les plus utilisés en médecine vétérinaire et font l'objet du Chapitre 3. Parmi les ISRS, la fluoxétine, la fluvoxamine, la paroxétine et le citaprolam sont les plus populaires (Boothe, 2001; Simpson & Papich, 2003).

2.4.3.1 Modes d'action

La théorie de Schildkraut unifie tous les antidépresseurs par leur action directe ou indirecte sur les récepteurs de monoamines biogéniques du SNC, comme la NA et la dopamine, mais plus particulièrement la sérotonine (Schildkraut et al., 1967). Les IMAO préviennent la dégradation intracellulaire des monoamines cérébrales par déamination oxydative dans la mitochondrie du neurone présynaptique, tandis que les ADT et les ISRS se concentrent sur l'inhibition du recaptage de la NA (ADT) et de la sérotonine (ADT et ISRS) par les transporteurs présynaptiques, et la désensibilisation des récepteurs postsynaptiques (Milgram et al., 1995; Boothe, 2001). Quoique leur mode d'action diffère, les trois classes d'antidépresseurs ont pour effet d'augmenter la concentration de la sérotonine dans la région intersynaptique, prolongeant ainsi les effets antidépresseurs de la sérotonine (Boothe, 2001). Les ISRS augmentent également la sensibilité postsynaptique des récepteurs sérotoninergiques ajoutant ainsi à leur efficacité (Boothe, 2001). De tous les antidépresseurs, les ISRS possèdent des effets négligeables sur l'inhibition du recaptage de la NA et de la dopamine et ont très peu d'affinité pour les récepteurs anticholinergiques,

adrénergiques et antihistaminiques produisant ainsi peu d'effets secondaires (Gerlowski & Jain, 1983).

2.4.3.2 Pharmacocinétique

Les chercheurs d'une étude de pharmacocinétique de la sélégiline chez le chien ont observé une biodisponibilité de 9%, un temps de demi-vie d'une heure et une clairance de 9.6 L/h·kg chez cette espèce (Mahmood et al., 1994), cependant aucune étude de pharmacocinétique de la sélégiline (L-déprényl) chez les chats n'est publiée dans la littérature.

La fluoxétine est lipophile et possède un grand volume de distribution. Le Tableau VII met en évidence les différences de disposition de la fluoxétine entre les humains, chiens et chats. Les résultats canins et félins sont extraits d'études pilotes effectuées par le Laboratoire Eli Lilly, fabricant de la fluoxétine (Prozac®) (Pasloske, 2003).

Tableau VII - Paramètres de pharmacocinétique de la fluoxétine chez l'humain, le chien et le chat après une administration intraveineuse et orale.

Paramètres	Cl (L/h · kg)	V _{ss} (L/kg)	T _{1/2} (h)	F (%)	Références
Humain	0.576	27	34-50 (Fl); 150-200 (NF)	70	Bolo et al., 2000; Schenker et al., 1988
Chien	0.36	39	6-10 (Fl); 48-57 (NF)	72	Lilly Research Laboratories Internal Studies, 2003; Somni et al., 1987
Chat	0.384	19	34 (Fl); 51 (NF)	100	Lilly Research Laboratories Internal Studies, 2003

Cl=clairance; V_{ss}=volume de distribution à l'équilibre; T_{1/2}=temps de demi-vie d'élimination; F=biodisponibilité; Fl=fluoxétine; NF=norfluoxétine; ND=non disponible

Une étude féline de pharmacocinétique par Ciribassi et coll. (2003) a démontré un temps de demi-vie de 47 heures pour la fluoxétine et de 55 heures pour la norfluoxétine après une administration orale de la fluoxétine et une biodisponibilité transdermale de 10% relativement à l'administration orale. La fluoxétine est métabolisée par le foie par déméthylation et le métabolite actif, norfluoxétine, est aussi monosélectif pour les récepteurs de la sérotonine (Boothe, 2001).

2.4.3.3 Efficacité clinique et effets secondaires

La sélégéline est utilisée hors homologation pour les problèmes cognitifs de chats âgés, et l'agressivité interspécifique féline (Boothe, 2001; Simpson & Papich, 2003). Malheureusement, aucune étude scientifique sur l'efficacité clinique de la sélégéline pour le traitement de ces troubles de comportement félin n'a été effectuée jusqu'à présent. Ainsi, quoique cet IMAO soit recommandé pour le traitement des troubles de comportement félin dans plusieurs livres et articles de revue de littérature, son utilisation n'est basée que sur des évidences empiriques (cas cliniques) plutôt que sur des preuves scientifiques.

La fluoxétine est populaire pour le traitement des troubles obsessionnels compulsifs, des attaques d'anxiété, de la dépression, de l'anorexie et de la boulimie chez les humains (Figgitt & McClellan, 2000). Chez les chiens, les ISRS semblent être bénéfiques pour l'agressivité de dominance envers le propriétaire, l'agressivité intraspécifique et les troubles compulsifs (Simpson & Papich, 2003). La fluoxétine est utilisée hors homologation pour les chats démontrant des troubles de comportement comme le marquage urinaire, l'agressivité interspécifique, l'hyperesthésie, l'alopecie psychogénique, les troubles compulsifs et le syndrome d'anxiété de séparation (Jacobs,

1991; Luescher et al., 1991; Pryor et al., 2001; Overall & Dunham, 2002; Schwartz, 2002; Frank & Dehasse, 2003; Luescher, 2003; Neilson, 2003; Simpson & Papich, 2003; Virga, 2003). Une étude clinique contrôlée, à double insu a démontré une efficacité clinique en réduisant la fréquence de marquage de >70%, dans 90% des cas, après 8 semaines d'administration orale de la fluoxétine chez 9 chats (Pryor et al., 2001). Une autre étude plus récente effectuée à double insu utilisant la clomipramine comme contrôle positif, a démontré une efficacité clinique (diminution de la fréquence de marquage de > 90%) de 44%, 69% et 100% après 8, 16 et 32 semaines de traitement à la fluoxétine respectivement (Hart et al., 2005). Ces auteurs ont donc conclu qu'avec un traitement suffisamment long, presque tous les chats devraient atteindre une réduction significative du nombre d'épisodes de marquage urinaire (Hart et al., 2005). Malheureusement, bien que le protocole expérimental de cette étude ait inclus un groupe contrôle, ces auteurs ont omis d'utiliser un groupe placebo pour mesurer cet effet biaisé.

L'usage de la fluvoxamine et du citalopram prend également de l'envergure pour le traitement de différentes conditions pathopsychologiques d'anxiété humaines et animales (Bolo et al., 2000; Figgitt & McClellan, 2000; Boothe, 2001; Simpson & Papich, 2003). Cependant, aucune étude scientifique n'a encore évalué l'efficacité clinique de ces ISRS pour le traitement des troubles de comportement chez les chats.

Les effets secondaires adverses de la sélégiline rapportés dans la littérature humaine sont non spécifiques et incluent principalement le vomissement et la diarrhée, l'anorexie et la léthargie (Boothe, 2001). La combinaison de la sélégiline avec un ADT ou ISRS est déconseillée puisqu'elle engendre une condition grave et même fatale observée chez les patients humains, appelée le syndrome sérotoninergique, se manifestant par une

hypertension, une hyperthermie, des hallucinations, de l'agitation et des convulsions (Nieuwstraten et al., 2006). Quoique cette combinaison n'ait pas provoqué ce syndrome chez le chien, il est prudent d'éviter la synergie potentielle des antidépresseurs en respectant un temps de répit suffisamment long de 2 et 5 semaines entre l'administration d'un ADT et d'un IMAO, et entre un ISRS et un IMAO respectivement (Boothe, 2001; Simpson & Papich, 2003). Les effets secondaires de la fluoxétine sont peu nombreux et transitoires chez les chats et incluent une diminution d'appétit, des vomissements et de la léthargie (Pryor et al., 2001; Hart et al., 2005).

En général, les recommandations pour le traitement des troubles de comportement chez les chats sont facilement accessibles dans les livres de références ainsi que dans les nombreux articles abordant le sujet. Cependant, la majorité des études publiées dans la littérature évaluant l'efficacité clinique des trois approches thérapeutiques reposent sur l'expérience des spécialistes en comportement animal, des évidences empiriques biaisées par l'évaluation subjective des propriétaires et des extrapolations d'études cliniques humaines, plutôt que sur des preuves scientifiques. Ceci dit, les modifications environnementales et la thérapie comportementale sont des approches qui nécessitent une personnalisation du traitement et bénéficient de l'expérience des spécialistes pour assurer un succès thérapeutique. De plus, l'utilisation de ces deux approches n'engendre pas d'effets secondaires pouvant mettre fin au traitement, mais plutôt un changement des modifications environnementales et/ou du type de thérapie comportementale afin de trouver la combinaison idéale pour chaque patient. Il n'existe ainsi aucune recette magique.

En ce qui concerne l'utilisation de médicaments pour contrer l'anxiété, une approche individualisée est également recherchée. Cependant, l'efficacité clinique d'un médicament nécessite une étude rigoureusement planifiée (placebo, à double insu) mesurant la Cp du médicament afin d'assurer un succès thérapeutique et minimiser la toxicité.

Malheureusement, aucune étude de PC/PD n'a été effectuée pour le traitement des troubles de comportement chez les chats avec les anxiolytiques et antidépresseurs considérés jusqu'à maintenant.

Chapitre 3 – Antidépresseurs tricycliques

Les informations générales sur les applications cliniques, les modes d'action, les paramètres de pharmacocinétique et le métabolisme des antidépresseurs tricycliques, sont principalement obtenues des nombreuses études in vivo et in vitro humaines et murines. Quelques études canines de pharmacocinétique et d'efficacité clinique sont rapportées dans la littérature pour la clomipramine. Sept études d'efficacité clinique chez le chat sont à l'origine de l'application clinique et du régime posologique de la clomipramine pour cette espèce. Malheureusement, aucune donnée de pharmacocinétique n'est disponible pour cet ADT chez les chats.

Les ADT les plus populaires sont les amines tertiaires, soit l'**imipramine**, l'**amitriptyline** et la **clomipramine** (Overall, 1997; Boothe, 2001; Simpson & Papich, 2003). Ils possèdent une structure qui ressemble à celle des phénothiazines et quoique leurs actions pharmacologiques soient distinctes, ils partagent les mêmes effets secondaires (Boothe, 2001; Simpson & Papich, 2003). Les amines secondaires cliniquement utilisées chez les humains sont les métabolites de l'imipramine et de l'amitriptyline, soit la desipramine et la nortriptyline respectivement (Boothe, 2001). Il existe de grandes différences inter et intraspécifiques dans les effets cliniques pour l'ensemble des ADT (Overall, 2001; Potter & Hollister, 2004). Chez le patient humain, les ADT sont utilisés pour traiter l'agoraphobie, l'énurésie juvénile, la narcolepsie, les peurs, les phobies et la dépression modérée à grave (Gex-Fabry et al., 2000). Le seul agent homologué au Canada pour l'espèce animale est la clomipramine (Clomicalm®)

approuvée pour le traitement de l'anxiété de séparation et les troubles compulsifs chez les chiens.

3.1 Modes d'action des ADT

L'imipramine est le premier ADT à avoir démontré un potentiel antidépresseur de par ses effets hypnotiques et sédatifs; l'amitriptyline et la clomipramine sont des dérivés de l'imipramine (Potter & Hollister, 2004). Ils produisent tous un effet antidépresseur en exerçant leur influence sur les récepteurs présynaptiques de la sérotonine et de la NA à différentes intensités (Boothe, 2001; Potter & Hollister, 2004). L'amitriptyline a une affinité plus grande pour les adrénoccepteurs, tandis que l'imipramine a une affinité égale pour les adrénoccepteurs et récepteurs sérotoninergiques (Simpson & Papich, 2003). En ce qui concerne la clomipramine, celle-ci est l'ADT le plus sélectif pour l'inhibition du recaptage de la sérotonine, tandis que son métabolite actif, la DCMP, cible les récepteurs de la NA (Benfield et al., 1980). De plus, tous ces agents et leurs métabolites actifs ont des affinités variées pour les récepteurs antimuscariniques, antihistaminiques, et adrénergiques (α_1 , α_2 et β) cérébraux et extracérébraux, responsables des nombreux effets secondaires observés (Benfield et al., 1980; Boothe, 2001).

3.2 Amitriptyline

Quoique son usage soit hors homologation, l'amitriptyline est un agent très populaire pour le traitement de troubles de comportement félin comme le marquage urinaire, l'agressivité intraspécifique ou redirigée envers le propriétaire, la vocalisation excessive, l'alopecie psychogénique et le syndrome d'anxiété de séparation (Cooper, 1997; Sawyer et al., 1999; Landsberg, 2001; Overall & Dunham, 2002; Schwartz, 2002; Frank & Dehasse, 2003).

3.2.1 Pharmacocinétique

Certains paramètres de pharmacocinétique de l'amitriptyline chez le chat ont été récemment établis par une étude qui avait pour but de comparer les absorptions orale et transdermique (Mealey et al., 2004). L'équipe de Mealey (2004) a remarqué que l'absorption orale de l'amitriptyline était rapide atteignant un pic plasmatique deux heures post-administration, mais que son absorption transdermique, pour la même dose, était trop faible pour générer des Cp quantifiables par ELISA. Ainsi, d'autres études de pharmacocinétique de cet ADT sont nécessaires pour valider l'utilisation de l'administration transdermique chez les chats.

3.2.2 Efficacité clinique

L'efficacité thérapeutique de l'amitriptyline pour le traitement des troubles de comportement chez le chat semble être anecdotique puisqu'aucune étude rapportant des évidences scientifiques sur son efficacité clinique chez cette espèce n'a été publiée dans la littérature. Quoique ses effets anticholinergique, anti-inflammatoire et analgésique sur la vessie soient observés chez l'humain et le rat, rendant l'amitriptyline utile pour le traitement de la cystite idiopathique interstitielle humaine (Chew et al., 1998; Achar et al., 2003), deux études contrôlées chez les chats avec problèmes idiopathiques du tractus urinaire n'ont rapporté aucun bénéfice de cet ADT pour cette espèce (Kraijer et al., 2003; Kruger et al., 2003).

3.3 Imipramine

L'imipramine, ayant une activité plus sérotoninergique et moins anticholinergique que l'amitriptyline, est recommandée pour le syndrome d'anxiété de séparation et la miction inappropriée associée à cette anxiété chez les chiens (Simpson & Papich, 2003).

Bien que plusieurs sources documentaires mentionnent l'imipramine comme ADT pouvant être utile pour contrer les problèmes comportementaux chez les chats, aucune étude d'efficacité ou de pharmacocinétique n'est disponible pour supporter ces recommandations chez cette espèce.

3.4 Clomipramine

Le chlorhydrate de clomipramine est une base faible avec un pKa de 9.5 (Fig. 6).

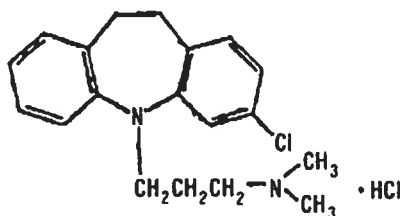


Figure 6 – Structure moléculaire du chlorhydrate de clomipramine. Le poids moléculaire est de 351.3 g/mole et la formule chimique est $C_{19}H_{23}ClN_2 \cdot HCl$ (Clomicalm®, Novartis Animal Health Inc., Greensboro, NC, ÉU).

3.4.1 Modes d'action

Le mécanisme d'inhibition du recaptage de la sérotonine et de la NA de la clomipramine a pour effet d'augmenter la concentration des monoamines dans la fente synaptique dès les premières administrations. Une augmentation de ces substances endogènes précipite un processus d'autorégulation qui diminue la synthèse présynaptique de la sérotonine et de la NA, provoquant ainsi une baisse temporaire de la concentration monoaminergique dans la fente (Potter & Hollister, 2004). Pour expliquer le délai de quatre à six semaines des effets antidépresseurs observés chez les patients autant animaux qu'humains, des études ont démontré qu'une administration chronique de la clomipramine entraînait une désensibilisation des autorécepteurs présynaptiques sérotoninergiques (5-

HT₁) et adrénérgiques (α_2) favorisant ainsi le maintien d'une concentration de sérotonine et de NA élevée dans la fente synaptique (Potter, 1996). Cependant, le blocage des mécanismes d'inactivation physiologique ne semblait pas répondre à toutes les questions concernant l'effet antidépresseur de la clomipramine. Plus tard, des études ont identifié d'autres récepteurs pré et postsynaptiques qui subissent une adaptation neurophysiologique à l'augmentation de monoamines et qui sembleraient contribuer au délai et à l'efficacité thérapeutique observés chez les patients (Couture et al., 2001; Pariante & Miller, 2001; Galeotti et al., 2002; Alfonso et al., 2004; Potter & Hollister, 2004; Yamada et al., 2005; White et al., 2005). La diminution du nombre des récepteurs postsynaptiques adrénérgiques (β) et sérotoninergiques (5-HT₂), et l'augmentation de la sensibilité de plusieurs autres récepteurs de la sérotonine ne sont que quelques exemples démontrant la neuroplasticité du SNC en réponse à l'administration de la clomipramine, favorisant ainsi un succès thérapeutique (Couture et al., 2001; Galeotti et al., 2002; Alfonso et al., 2004; Potter & Hollister, 2004; Yamada et al., 2005; White et al., 2005; Wilson & Argyropoulos, 2005).

3.4.2 Effets secondaires

Les effets secondaires associés à l'administration de la clomipramine sont nombreux chez toutes les espèces. Il semblerait cependant, que l'intensité et la fréquence des effets secondaires soient plus faibles chez les chiens que chez les humains et les chats (Overall, 1994; Hewson et al., 1998a; Moon-Fanelli & Dodman, 1998; White et al., 1999; Reich et al., 2000; Seksel & Lindeman, 2001; Crowell-Davis et al., 2003; King et al., 2000b). Les principaux effets secondaires rapportés dans les études humaines, canines et félines sont présentés dans le Tableau VIII.

Tableau VIII - Principaux effets secondaires associés à l'administration de la clomipramine en ordre décroissant de fréquence, observés chez les humains (H), chiens (C) et chats (Ch).

Effets	Signes cliniques	Espèces	Références
antihistaminiques	sédation, léthargie	H, C, Ch	McTavish & Benfield, 1990; Seksel & Lindeman, 1998; Pacher et al., 1999; King et al., 2000a, b, c; Litster, 2000; Landsberg, 2001; King et al., 2004; Potter & Hollister, 2004; Hart et al., 2005; Mertens et al., 2006
antimuscariniques	dilatation des pupilles, constipation, rétention urinaire	H, C, Ch	McTavish & Benfield, 1990, Overall, 1997; Pfeiffer et al., 1999; Gex-Fabry et al., 2000; King et al., 2000a, b, c; Litster, 2000; Boothe, 2001; Landsberg, 2001; Simpson & Papich, 2003; King et al., 2004; Landsberg & Wilson, 2005; Mertens et al., 2006
adrénergiques	tachycardie, hypotension posturale, arythmies, torsade de pointe, augmentation de la pression intraoculaire	H, C	Yokota et al., 1987; Hashimoto et al., 1990; McTavish & Benfield, 1990; Pacher et al., 1999; Pouchelon et al., 2000; El-Demerdash & Mohamadin, 2004; Potter & Hollister, 2004; Kobayashi et al., 2004; Pacher & Keeskemeti, 2004
gastrointestinaux	diarrhée, vomissements	H, C, Ch	McTavish & Benfield, 1990, Overall, 1997, King et al., 2000a, b, c, King et al., 2004; Landsberg & Wilson, 2005; Mertens et al., 2006
sexuels	diminution de la libido	H	McTavish & Benfield, 1990; Boscarino & Parfitt, 2002
antinociceptifs	analgésie	H	Gherlardini et al., 2001, Abdel-Salam, 2003, Bach-Rojecky, 2003
cérébraux	irritabilité, agitation, convulsions, tremblements, analgésie, perte de mémoire	H	Koella et al., 1979; McTavish & Benfield, 1990; Pacher et al., 1999; de Carvalho et al., 2002; Potter & Hollister, 2004; Kobayashi et al., 2004
endocriniens	hypothyroïdie, hyperglycémie	H, C	Gulikers & Panciera, 2003; Sugimoto et al., 2003; McCracken et al., 2005
immunologiques	anti-inflammatoire, immunorégulation	H	Maes, 2001, Ying et al., 2002; Abdel-Salam, 2003
hépatiques	hépatotoxicité	H	Carvajal et al., 2002
hématologiques	dyslipidémie, diminution de l'agrégation plaquettaire	H	Villeneuve et al., 1986, Holmes et al., 2005
oncologiques	activité cytostatique	H	Sauter, 1989, Daley et al., 2005
pulmonaires	hypertension	H	Liu et al., 2002
idiopathiques	hypersensibilité	H	Nishimura et al., 2005

Les contre-indications à l'usage de la clomipramine sont reliés à ses diverses affinités pour d'autres récepteurs causant les nombreux effets secondaires adverses et à l'usage de

médications concomitantes comme la cimétidine, la sélégiline, les corticostéroïdes et le phénobarbital (Boothe, 2001; Simpson & Papich, 2003).

3.4.3 Utilisation de la clomipramine chez les humains

Depuis plus de 60 ans, la clomipramine a été recommandée pour le traitement d'une panoplie de désordres affectifs humains comme entre autres, la dépression, l'anxiété et les troubles obsessionnels compulsifs (Quitkin et al., 1984; Kelly & Myers, 1990; McTavish & Benfield, 1990; DUAG, 1999; Gex-Fabry et al., 2000; Broocks et al., 2003; McCracken et al., 2005). Une variabilité interindividuelle significative de l'efficacité et de l'incidence des effets secondaires est cliniquement observée après l'administration d'une même dose de clomipramine aux patients (de Cuyper et al., 1981; Vandel et al., 1982; McTavish & Benfield, 1990; Noguchi et al., 1993; DUAG, 1999; Gex-Fabry et al., 2000). La relation entre l'effet clinique et la Cp de la clomipramine et de la DCMP est la cible de maintes opinions divergentes. Deux études des années '80, mesurant la relation entre les Cp de la clomipramine et de la DCMP et la réponse clinique chez des patients humains, ont conclu qu'il existe une corrélation linéaire définitive entre les deux (Vandel et al., 1982; Faravelli et al., 1984). En contraste, l'équipe de Sallee (1997) n'a démontré aucune corrélation entre les Cp de la clomipramine et de la DCMP, et l'efficacité clinique, tandis qu'une étude au Danemark deux ans plus tard, observe une corrélation linéaire faible entre ces deux paramètres (DUAG, 1999). Ces derniers auteurs concluent qu'une corrélation statistiquement significative existe entre le ratio Cp clomipramine/DCMP et la présence et l'intensité d'effets secondaires adverses (DUAG, 1999). Ils suggèrent qu'une accumulation du DCMP associé à un traitement à long terme serait à l'origine des effets secondaires (DUAG, 1999). Vandel et coll. (1982) avaient également remarqué qu'un

ratio élevé (>1) de Cp clomipramine/DCMP était associé à une réduction des effets secondaires et à une meilleure efficacité clinique.

Au fil des années, des chercheurs ont identifié plusieurs facteurs influençant ce ratio chez l'humain, dont le sexe, l'âge, la cigarette et l'ethnicité (Noguchi et al., 1993; Gex-Fabry et al., 2000; Stage et al., 2002; Mulder et al., 2003; Hildebrandt et al., 2003). De plus, les physiopathogénèses des divers types de maladie affective semblent bénéficier de différentes doses de clomipramine, allant de 25 à 75 mg pour le traitement de l'anxiété et jusqu'à 300 mg pour les troubles obsessionnels compulsifs (DUAG, 1999; Gex-Fabry et al., 1999; Hildebrandt et al., 2003). La grande variabilité interindividuelle du niveau de la réponse clinique étant multifactorielle, la détermination des Cp de la clomipramine et de la DCMP est requise pour minimiser les effets secondaires et assurer un suivi thérapeutique individualisé chez les patients humains (de Cuyper et al, 1981; Vandael et al., 1982; Noguchi et al., 1993; DUAG, 1999; Gex-Fabry et al., 2000). En effet, chaque trouble affectif possède une étendue spécifique de Cp de la clomipramine considérée efficace pour la majorité des répondeurs (Gex-Fabry et al., 1999).

3.4.4 Utilisation de la clomipramine chez les chiens

La clomipramine est recommandée pour le syndrome d'anxiété de séparation, la phobie du tonnerre et les troubles compulsifs chez les chiens (Overall, 1994; Hewson et al., 1998b; Moon-Fanelli & Dodman, 1998; King et al., 2000c; Seksel & Lindeman, 2001; Overall & Dunham, 2002; Crowell-Davis et al., 2003; Luescher, 2003). Une étude contrôlée et à double insu, incluant 49 chiens a démontré que la clomipramine n'était pas efficace pour enrayer les signes reliés à l'anxiété causée par la séparation chez les chiens (Podberscek et al., 1999). Cependant, l'équipe de King (2000c) a démontré certains bénéfices de cet ADT aidant à contrôler la destruction, la défécation et la miction

inappropriée associées à l'anxiété de séparation canine, dans une étude contrôlée et à double insu de 95 chiens. Le désaccord entre les deux études est vraisemblablement relié, entre autres, aux différentes thérapies comportementales recommandées en concomitance avec l'administration de la clomipramine, aux différents critères subjectifs utilisés pour l'évaluation de l'efficacité thérapeutique de la clomipramine et au pouvoir des tests statistiques. Malheureusement, aucun contrôle mesurant la contribution de cet ADT au succès thérapeutique sans avoir recours à la thérapie comportementale n'a été évaluée par ces deux études canines. Ainsi, les résultats doivent être interprétés avec prudence. En effet, King et coll. (2000c) suggèrent que d'autres études utilisant des critères objectifs d'évaluation de l'efficacité clinique sont nécessaires pour clarifier l'implication de la clomipramine dans la résolution des signes reliés à l'anxiété de séparation chez les chiens.

En ce qui concerne les chiens courant après leur queue de façon compulsive, une résolution de 75% ou plus du problème après trois mois de traitement avec la clomipramine a été démontré chez neuf chiens sur 12 (Moon-Fanelli & Dodman, 1998). Par contre, la clomipramine n'a pas aidé à contrer significativement l'agressivité interspécifique de 28 chiens envers les membres de la famille (White et al., 1999).

Il semble être difficile d'obtenir un consensus en ce qui concerne l'efficacité thérapeutique de la clomipramine entre les études chez les humains et les chiens. La complexité pharmacodynamique de cet ADT, le petit nombre de sujets, l'évaluation subjective de son efficacité et les différences fondamentales de protocole expérimental entre les études contribuent grandement à la divergence des résultats.

3.4.5 Utilisation de la clomipramine chez les chats

La clomipramine est recommandée pour les principaux troubles de comportement félin comme le marquage urinaire, l'agressivité, la vocalisation excessive et les troubles compulsifs (Dehasse, 1997; Seksel & Lindeman, 1998; Litster, 2000; King et al., 2004; Landsberg & Wilson, 2005; Hart et al., 2005; Mertens et al., 2006). Sept études cliniques ont démontré son efficacité à réduire la fréquence de plusieurs troubles de comportement avec une variabilité interindividuelle marquée du succès thérapeutique et de l'incidence d'effets secondaires adverses (Tableau IX). Cinq études sur sept ont utilisé une étendue de doses pour accommoder le fractionnement du comprimé en quart et en moitié. Cependant, les deux études les plus récentes ont administré un liquide formulé sur mesure pour chaque chat à une dose exacte de 0.5 mg/kg. Une de ces études avait pour but d'utiliser la clomipramine comme contrôle positif pour l'évaluation de l'efficacité clinique de la fluoxétine dans le traitement du marquage urinaire (Hart et al., 2005). Aucune différence d'efficacité à diminuer la fréquence de marquage entre les deux antidépresseurs n'a été observée. Cependant, la clomipramine n'a été administrée qu'à six chats dans cette étude et aucun sujet placebo n'a été utilisé, rendant ainsi l'interprétation des résultats difficiles concernant l'efficacité de cet ADT par ces auteurs.

Seulement deux études ont utilisé des groupes placebo et ont été effectuées à double insu. La plus récente avait pour but d'investiguer l'efficacité de la clomipramine pour le traitement de l'alopecie psychogénique (Mertens et al., 2006). Les auteurs ont conclu qu'il n'y avait aucune différence entre le groupe clomipramine et le groupe placebo d'après l'évaluation objective de la différence de fréquence de léchage excessif entre les deux groupes. Cependant, plus de la moitié des propriétaires ont remarqué une amélioration d'au moins 50% dans la condition du pelage et du comportement de leur chat

(Mertens et al., 2006). Les auteurs identifient la difficulté du diagnostic de l'alopecie psychogénique, la posologie administrée et la durée de l'étude comme facteurs potentiellement responsables de l'échec thérapeutique (Mertens et al., 2006).

Tableau IX - Protocoles expérimentaux de sept études évaluant l'efficacité clinique de la clomipramine chez les chats démontrant différents troubles de comportement. L'efficacité rapportée représente le pourcentage de chats démontrant une réponse favorable d'après les critères d'efficacité de chaque étude, sauf pour l'étude de King et al, 2004, où l'efficacité est le pourcentage de diminution de la fréquence de marquage par rapport au placebo.

Auteurs	Nombre de chats	Comportements	Durée du traitement	Dose administrée (mg/kg/jour)	Placebo	À double insu	Autres traitements	Suivi clinique	Critères d'efficacité	Efficacité rapportée
Dehase, 1997	26 18 M : 8 F	marquage	7 jours	5 mg/chat (7 mg/kg)	non	non	non	fréquence documentée de marquage avant (5 jrs) et après; sondage téléphonique	diminution de la fréquence de marquage > 75% comparée au prétraitement (placebo)	80% des chats
Seksel & Lindeman, 1998	11 7 M : 4 F	marquage; automutilation; vocalisation; agression	6 mois	0.2-0.55	non	non	modifications environnementales; thérapie comportementale	sondage téléphonique	satisfaction du propriétaire de la diminution de la fréquence	90% des chats
Lister, 2000	14 11 M : 3 F	marquage; vocalisation et léchage excessif	1 mois	0.34-1.32	non	non	non	sondage téléphonique	satisfaction du propriétaire de la diminution de la fréquence	43% des chats
King et al, 2004	67 groupe 1 (17); groupe 2 (15); groupe 3 (18); groupe 4 (17) 54 M : 13 F	marquage	3 mois	0.125-0.25 (groupe 2); 0.25-0.5 (groupe 3); 0.5-1.0 (groupe 4)	oui (groupe 1)	oui	modifications environnementales; thérapie comportementale	fréquence documentée de marquage avant (14 jrs) et après; sondage téléphonique; examen physique et comportemental	diminution de la fréquence comparé au placebo; score global d'amélioration	64% (groupe 2), 72% (groupe 3); 85% (groupe 4)
Landsberg & Wilson, 2005	25 18 M : 7 F	marquage	1 mois	0.3-0.83	non	non	non	fréquence documentée de marquage avant (14 jrs) et après; sondage téléphonique	diminution de la fréquence de marquage > 75% comparé au prétraitement	80% des chats
Hart et al, 2005	6 (7 M:F)	marquage	4 mois	0.5 (liquide)	non	oui	non	fréquence de marquage avant (7 jrs) et après documentée; sondage téléphonique	diminution de la fréquence de marquage > 75% comparé au prétraitement	83% des chats
Mertens et al, 2006	25 11 M : 14 F	alopécie psychogénique	2 mois	0.5 (capsule avec liquide)	oui	oui	oui	fréquence documentée de lachage avant (7 jrs) et après; sondage téléphonique; examens physique, dermatologique et comportemental	scores de d'alopecie et de repousse de poils; satisfaction du propriétaire	aucune différence avec placebo mais 50% de diminution du lachage de comportement d'après les propriétaires

M=male, F=femelle, jrs=jours

Cette étude démontre clairement les divergences de résultats obtenus suite à une évaluation subjective (du propriétaire) versus une évaluation objective (fréquence).

La deuxième étude contrôlée avait comme objectif de déterminer la dose idéale pour le traitement du marquage urinaire chez les chats (King et al., 2004). Cette étude en parallèle a mesuré l'efficacité clinique en comparant trois doses de clomipramine administrées aux groupes de chats sélectionnés aléatoirement (King et al., 2004). Les auteurs ont conclu, d'après la capacité de diminuer le nombre de marquage comparativement au placebo (Fig. 7A) et le score d'évaluation globale (Fig. 7B), qu'une dose de 0.25 à 0.5 mg/kg (moderate dose) de clomipramine assurerait un succès thérapeutique et une incidence d'effets secondaires adverses acceptables pour le traitement du marquage urinaire et possiblement pour l'agressivité intraspécifique, peu importe l'âge et le sexe du patient (King et al., 2004).

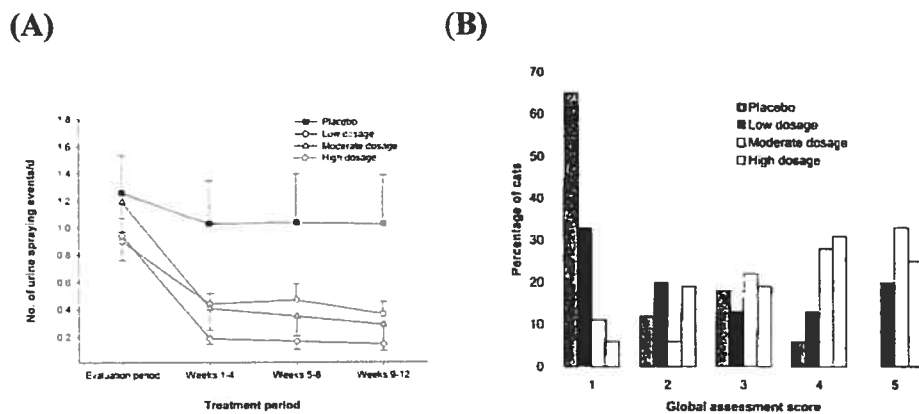


Figure 7 – Graphiques extraits de l'article de King et coll. (2004) démontrant l'efficacité clinique de la clomipramine pour le traitement du marquage urinaire chez les chats d'après le nombre d'épisodes de marquage par jour (A) et le score d'évaluation globale (B) selon les propriétaires, comparés au groupe placebo.

Scores : 1= pas de réponse ou détérioration; 2= amélioration insuffisante; 3= amélioration marquée; 4= disparition de la majorité des signes; 5= disparition de tous les signes.

Cependant, ces auteurs n'ont offert aucune explication quant à la grande variabilité interindividuelle observée dans la réponse clinique pour les trois doses administrées, mais ont simplement fait une recommandation universelle d'une dose pouvant être doublée pour le même poids.

Malheureusement, bien que cette étude ait été contrôlée et à double insu, King et ses collègues du CLOFUS (Clomipramine in Feline Urine Spraying) ont corrélié les effets thérapeutiques avec l'administration de différentes doses plutôt que de mesurer les C_p correspondantes. Comme mentionné plus tôt, ce protocole expérimental ne prend pas en considération les nombreux facteurs pouvant influencer la disposition du médicament dans le corps ainsi que les particularités pharmacodynamiques des récepteurs contribuant à l'effet pharmacologique. De plus, l'influence sur le succès thérapeutique des modifications environnementales et de la thérapie comportementale recommandées en même temps que l'administration de la clomipramine, n'a pas été évaluée.

Il est possible que la grande variabilité interindividuelle de l'effet thérapeutique observée dans les sept études félines antérieurement rapportées ait été causée par les différents protocoles d'étude utilisés, les différentes doses ou formulations de clomipramine administrées pour un même poids, le manque de conformité et d'objectivité dans l'évaluation de l'efficacité clinique, la fiabilité de la collaboration et la validité des interprétations des propriétaires. D'autres facteurs possiblement responsables incluent le petit nombre d'individus participant aux études, les différences de chronicité et d'intensité/fréquence des troubles de comportement, les modifications environnementales et thérapies comportementales non contrôlées pour leur influence sur le succès

thérapeutique et le petit nombre de protocole scientifique (études à double insu avec placebo). Cependant, cette variabilité peut être également causée par les différences de disposition du médicament entre les chats, soit l'absorption, la distribution, le métabolisme et/ou l'excrétion. Une étude de pharmacocinétique de la clomipramine chez les chats est donc nécessaire pour vérifier cette hypothèse.

Chapitre 4 – Pharmacocinétique de la clomipramine

Malgré les nombreuses études sur l'efficacité clinique de la clomipramine chez les chats, plusieurs questions demeurent toujours sans réponse. À quelle dose doit-on débiter le traitement? Quel ajustement de la dose doit-on faire selon le statut pathophysiologique du patient? En cas d'échec thérapeutique, comment savoir si la dose doit être augmentée, l'intervalle diminué ou si un changement de médicament est requis? Est-ce qu'un suivi des Cp est nécessaire pour la clomipramine chez les chats, comme chez les humains?

La pharmacocinétique utilise des modèles mathématiques et quelques fois physiologiques pour quantifier le temps et le mouvement d'un médicament en utilisant les principes de base de disposition *in vivo* (Fig. 8) (Riviere, 1999; Boothe, 2001).

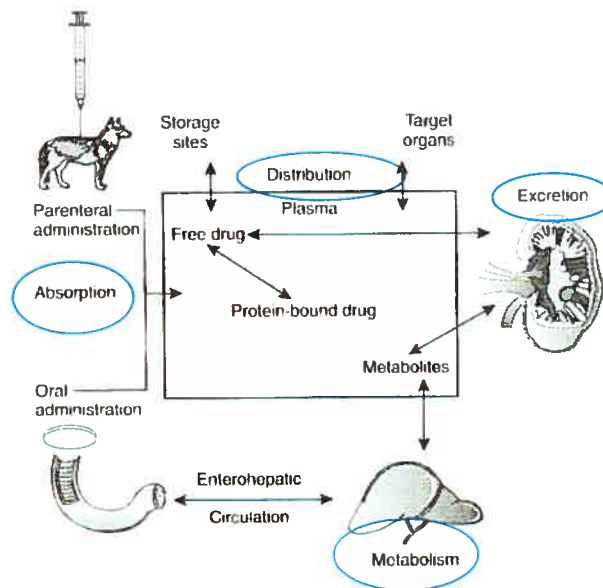


Figure 8 – Représentation graphique de la disposition d'un médicament dans le corps mettant en évidence les principales composantes de pharmacocinétique, soit l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion après une administration parentérale et orale.

(Extrait de Boothe, 2001)

La qualité de l'information générée dépend de la méthode d'échantillonnage, du nombre et des temps de prises de sang, de la méthode analytique et du modèle sélectionné (Shargel & Yu, 1999). La pharmacocinétique classique se concentre sur la modélisation et l'estimation des paramètres de pharmacocinétique (Shargel & Yu, 1999). La pharmacocinétique de population prend en considération les facteurs physiologiques et pathologiques des individus faisant partie d'une population cible, pour quantifier la variabilité interindividuelle des paramètres de pharmacocinétique, en utilisant un modèle structural et pharmacostatistique (Riviere & Martin-Jiménez, 1999). La pharmacologie clinique utilise les paramètres de pharmacocinétique pour l'élaboration de posologies et le suivi des thérapies individualisées, ainsi que la détermination de temps de retrait des médicaments administrés aux animaux de consommation (Riviere, 1999; Boothe, 2001).

4.1 Pharmacocinétique classique

La pharmacocinétique est basée sur des profils de Cp d'un médicament *in vivo* versus le temps (profil CT) (Riviere, 1999; Shargel & Yu, 1999). Ces profils mettent en évidence des phases correspondant à l'absorption, la distribution et l'élimination (métabolisme et excrétion) (Riviere, 1999; Shargel & Yu, 1999). C'est à partir de ces profils que les doses, les intervalles thérapeutiques et les temps de retrait sont calculés. Bien que la Cp ne corresponde pas nécessairement à la concentration tissulaire, qui est hétérogène et beaucoup plus difficile à mesurer, on suppose qu'à l'équilibre, les changements de Cp représentent des changements tissulaires relatifs (Shargel & Yu, 1999). Ainsi, l'intensité des effets pharmacologiques ou toxiques au site récepteur peut être reliée à la Cp. Cependant, il est important de considérer les fonctions physiologiques de l'individu qui peuvent être affectées par la maladie, l'environnement, l'alimentation, l'âge

et le sexe en interprétant les résultats de pharmacocinétique (Riviere, 1999). Il appartient au vétérinaire d'utiliser les paramètres de pharmacocinétique connus pour un médicament donné et de faire des ajustements selon le statut physiologique (composition corporelle en fluide et en gras) et pathologique (déshydratation, insuffisance cardiaque, rénale ou hépatique) du patient pour calculer la dose optimale individuelle, de façon judicieuse (Riviere, 1999).

4.1.1 Modélisation

La pharmacocinétique utilise la modélisation, concept virtuel ou hypothèse mathématique, basée sur le profil des Cp (variables dépendantes) en fonction du temps (variable indépendante) d'un médicament administré par voie intraveineuse (i.v.) ou extravasculaire, pour tenter d'illustrer son devenir pharmacologique *in vivo* (Riviere, 1999; Shargel & Yu, 1999). La modélisation donne une représentation visuelle du mouvement pharmacologique d'un médicament dans le corps à l'aide de compartiments reliés. Elle permet d'utiliser des équations différentielles pour quantifier les changements de concentration de chaque compartiment et calculer les constantes de pharmacocinétique nécessaires pour décrire le processus adéquatement (Shargel & Yu, 1999). Le but de la modélisation est de produire une série d'équations permettant de prédire les Cp d'un médicament (Dyer, 1996; Riviere, 1999). Il existe trois grands types de modèles pharmacocinétiques : linéaire, non-linéaire et physiologique (Riviere & Martin-Jiménez, 1999; Shargel & Yu, 1999).

4.1.2 Cinétique linéaire et non linéaire

Il existe deux types de réaction, soit une réaction d'ordre zéro qui est non-linéaire, et une réaction de premier ordre qui est linéaire (Dyer, 1996; Riviere & Martin-Jiménez, 1999; Shargel & Yu, 1999). La linéarité signifie que la quantité de médicament diminue

de façon constante proportionnellement à la quantité du médicament restant dans le corps en fonction du temps, selon l'équation suivante :

$$1) \Delta C_p / \Delta t = -k_{el} C_p$$

où k_{el} est la constante d'élimination de premier ordre (min^{-1} ou hr^{-1}) (Riviere & Martin-Jiménez, 1999; Shargel & Yu, 1999).

La non-linéarité signifie que l'élimination est indépendante de la C_p du médicament, représentée selon l'équation suivante :

$$2) \Delta C_p / \Delta t = -k_{el0}$$

où k_{el0} est la constante d'élimination d'ordre zéro (mg/mL/min), celle-ci variant avec le temps (Shargel & Yu, 1999). Une saturation des enzymes métaboliques peut engendrer une cinétique d'ordre zéro, cependant, ce phénomène est rare pour les doses thérapeutiques de la majorité des médicaments. La modélisation la plus courante suppose donc un processus linéaire et compartimental qui représente le corps comme une série de compartiments communiquant entre eux de façon bidirectionnelle, chacun arborant une distribution uniforme du médicament (Dyer, 1996; Riviere & Martin-Jiménez, 1999; Shargel & Yu, 1999).

4.1.3 Modélisation compartimentale

Il existe trois principaux types de compartiments : le compartiment central (1), périphérique (2) et profond (3) (Fig. 9) (Riviere & Martin-Jiménez, 1999; Shargel & Yu, 1999). La modélisation permet de déterminer le nombre de compartiments nécessaires pour représenter la disposition du médicament dans le corps de façon adéquate.

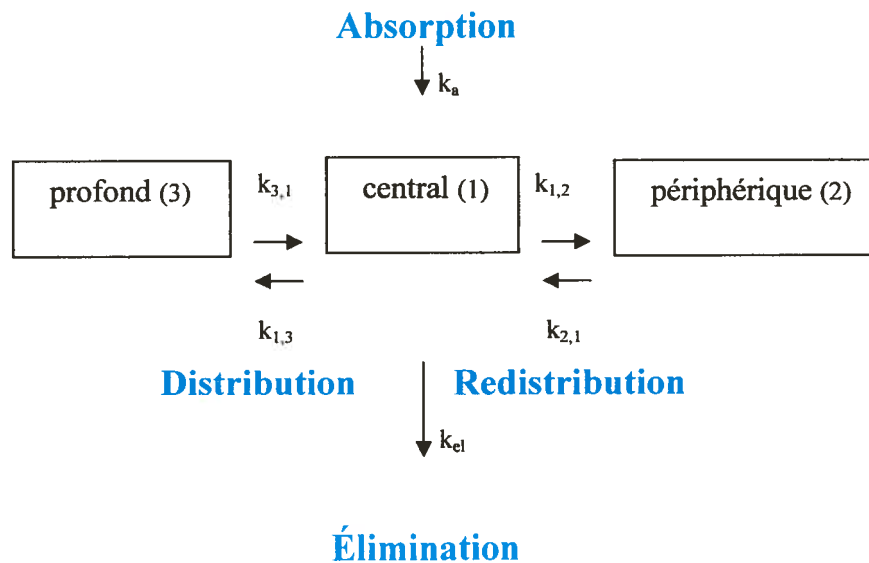


Figure 9 - Modélisation à trois compartiments démontrant, de façon générale, la disposition d'un médicament dans le corps après une administration extravasculaire. Les constantes k_{ij} représentent le mouvement du xénobiotique d'un compartiment à l'autre tandis que k_a et k_{el} sont les constantes d'absorption et d'élimination respectivement (Riviere & Martin-Jiménez, 1999; Shargel & Yu, 1999).

Le compartiment central représente la circulation sanguine et les tissus hautement perfusés, comme le foie et les reins, qui s'équilibrent rapidement avec le sang. Quoiqu'il soit possible que l'élimination d'un médicament se fasse par d'autres organes que le foie et les reins, en général, on suppose une élimination exclusive à partir de ce compartiment (Shargel & Yu, 1999). Le compartiment périphérique comprend les tissus moins bien perfusés, comme le muscle, et le compartiment profond représente les espaces adipeux et osseux où peuvent s'accumuler certains médicaments (Shargel & Yu, 1999). Ce troisième compartiment est particulièrement important pour les résidus tissulaires chez les animaux de consommation puisque cet espace sert de réservoir et prolonge le séjour du médicament dans le corps (Riviere, 1999).

Le modèle à **un** compartiment est la façon la plus simple de décrire le devenir d'un médicament (Shargel & Yu, 1999). Après une administration intraveineuse (i.v.), le profil CT, illustré en graphique semilogarithmique, représente une ligne droite ne démontrant aucune phase de distribution, puisque le médicament est présumé être uniformément distribué seulement dans le compartiment central dont l'élimination est la pente, k ou k_{el} (Fig. 10A). L'équation suivante décrit ce processus monocompartimental :

$$3) C_p = C_{p_0} e^{-kt}$$

où C_p est la concentration plasmatique au temps t et C_{p_0} est la concentration au moment de l'injection ($t = 0$) (Shargel & Yu, 1999).

Le modèle à **un** compartiment d'un médicament administré par voie extravasculaire possède une phase d'absorption influencée par la distribution et l'élimination du médicament absorbé (Riviere, 1999; Boothe, 2001). Le pic d'absorption est atteint lorsque l'absorption est égale à l'élimination et la distribution est à l'équilibre. La constante de vitesse d'absorption (k_a) est généralement supérieure à la vitesse d'élimination (k_{el}) (Fig. 10B).

Le modèle à **deux** compartiments reflète le mouvement d'un médicament entre deux espaces virtuels (central et périphérique). Cette modélisation représente le processus de plusieurs médicaments administrés par voie i.v. (Fig. 10C) (Riviere & Martin-Jiménez, 1999; Shargel & Yu, 1999).

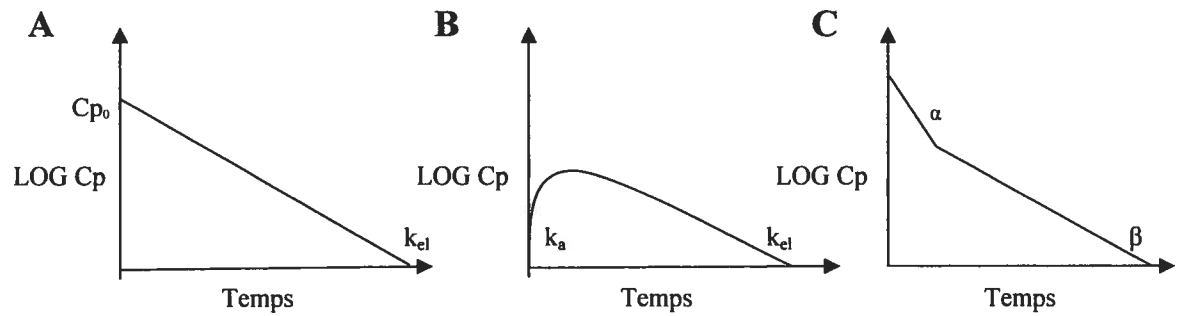


Figure 10 – Profils des concentrations plasmatiques (C_p) versus le temps en graphique semilogarithmique représentant des modèles à un compartiment après une administration intraveineuse (A) et orale (B). Un modèle à deux compartiments (C) illustre les phases de distribution (pente α) et d'élimination (pente β) après une administration intraveineuse (Riviere, 1999; Boothe, 2001). C_{p0} =concentration au temps 0; k_{el} =constante d'élimination, k_a =constante d'absorption; α et β =constantes de distribution et d'élimination d'un modèle à deux compartiments respectivement.

La phase de distribution représente le déclin rapide de la C_p du compartiment central reflétant le transfert initial du médicament dans le compartiment périphérique ou tissulaire (Dyer, 1996; Riviere & Martin-Jiménez, 1999; Shargel & Yu, 1999; Boothe, 2001). La phase d'élimination du médicament à deux compartiments est plus lente que la phase d'élimination d'un médicament à un compartiment à cause de la redistribution du compartiment périphérique au compartiment central (Shargel & Yu, 1999). L'équation logarithmique suivante est dérivée de la représentation plasmatique du modèle bicompartimental :

$$4) C_p = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$$

où A est l'intercepte y de la phase de distribution extrapolée à zéro et B est l'intercepte y de la phase d'élimination extrapolée à zéro (Shargel & Yu, 1999). Il est possible de ne pas pouvoir identifier la phase de distribution lorsque trop peu d'échantillons sont récoltés durant cette phase initiale.

Le modèle à **trois** compartiments ajoute un compartiment profond (tissus osseux ou adipeux) mais peut aussi être le réservoir de médicament étroitement lié aux protéines tissulaires (Shargel & Yu, 1999). Le regroupement de compartiments par tissus ayant des processus semblables en un ou deux compartiments est plus fréquemment utilisé que le modèle à trois compartiments (Riviere & Martin-Jiménez, 1999). L'équation exponentielle suivante est dérivée d'une représentation graphique d'un modèle tricompartmental :

$$7) C_p = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t} + Ce^{-\lambda t}$$

où A, B et C sont les interceptes y extrapolés des courbes des compartiments central, périphérique et profond respectivement; α , β et λ sont les pentes des courbes correspondantes (Shargel & Yu, 1999).

4.1.4 Modélisation non compartimentale

Les modèles non-compartimentaux sont basés sur une théorie classique de statistique du moment qui analyse également les C_p à partir d'un profil CT (Riviere & Martin-Jiménez, 1999). Il est présumé qu'il existe au moins un compartiment et que des réactions de premier ordre sont présentes, mais la spécification du nombre de compartiments n'est pas nécessaire pour faire les calculs (Riviere & Martin-Jiménez, 1999). L'utilisation de cette modélisation est de plus en plus populaire suite au développement de logiciels spécialisés. De ce concept émane de nouveaux paramètres de pharmacocinétique dont le temps moyen de séjour (TMS) des molécules de médicament dans le corps, et l'aire sous la courbe du moment (ASCM), représentant l'aire sous la courbe (ASC) en fonction du temps (Rowland & Tozer, 1995). Cette modélisation, tout comme la modélisation compartimentale, a ses limites en présumant que l'élimination est de premier ordre et ne vient que du compartiment central, excluant mathématiquement la possibilité d'un

réservoir de médicament d'où une certaine élimination est physiologiquement possible (Riviere & Martin-Jiménez, 1999).

4.1.5 Modélisation physiologique

Les différents types de modélisation mentionnés jusqu'à présent prennent très peu en considération les structures anatomiques et physiologiques du corps. Le modèle physiologique, par contre, offre une représentation plus réelle des différents espaces impliqués dans le devenir d'un principe actif, puisqu'il prend en considération le débit sanguin distribuant les médicaments aux différentes parties du corps (Fig.11) (Gerlowski & Jain, 1983; Riviere & Martin-Jiménez, 1999; Shargel & Yu, 1999).

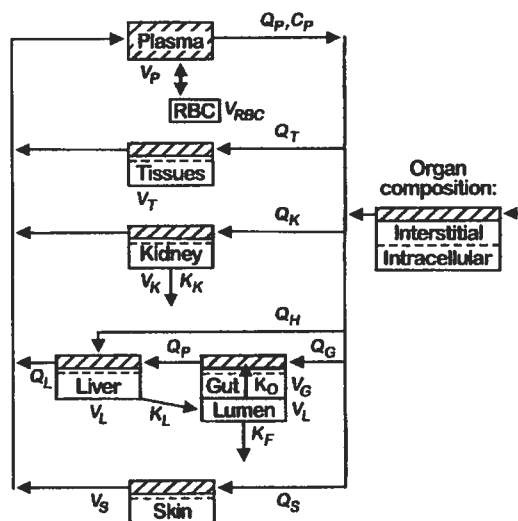


Figure 11 – Modèle physiologique prenant en considération le débit sanguin (Q) aux principaux organes, les volumes tissulaires (V) et l'élimination du xénobiotique par le foie (K_L), les reins (K_K) et les intestins dans les fèces (K_F). Le symbol K_0 représente la vitesse d'absorption après une administration orale. (Extrait de Riviere, 1999)

Cependant, le ratio de partition tissu : plasma à l'équilibre, le débit sanguin aux organes, le volume des tissus impliqués et les constantes de liaisons tissulaires *in vivo* sont des

informations difficiles à obtenir mais nécessaires pour la réalisation d'un modèle de perfusion (Riviere & Martin-Jiménez, 1999; Shargel & Yu, 1999). C'est pour cette raison que ce modèle, quoiqu'idéal, est encore très peu utilisé. Contrairement aux modèles compartimentaux et non-compartimentaux, le modèle physiologique est capable de prédire la concentration tissulaire d'un médicament, de plus, il offre la possibilité d'extrapoler à l'humain les données de pharmacocinétique générées à l'aide d'un modèle animal (Riviere & Martin-Jiménez, 1999; Shargel & Yu, 1999).

4.2 Paramètres de pharmacocinétique

Il existe plusieurs paramètres de pharmacocinétique aidant à caractériser la vitesse, l'étendue et le volume de disposition d'un médicament dans le corps après une administration i.v. ou extravasculaire, estimés par modélisation compartimentale ou non-compartimentale à l'aide de plusieurs logiciels dont le WinNonlin® Professional, Version 4.1 (Pharsight Corp., Palo Alto, CA). Les principaux paramètres estimés incluent la clairance (Cl), l'aire sous la courbe (ASC), le volume de distribution (Vss), la concentration maximale (Cmax) et le temps nécessaire pour atteindre la concentration maximale (Tmax). Le temps de demi-vie ($T_{1/2}$) et la biodisponibilité (F) sont des paramètres hybrides calculés à partir des paramètres estimés par le programme de modélisation.

4.2.1 Clairance

La clairance (Cl) représente le volume total de sang qui est purgé du médicament par unité de temps (Dyer, 1996; Riviere, 1999; Shargel & Yu, 1999; Toutain & Bousquet-Mélou, 2004a). La clairance totale regroupe tous les types d'élimination dont principalement les clairances rénale et hépatique, et est un indice de l'efficacité d'élimination du médicament par ces organes (Riviere, 1999; Toutain & Bousquet-Mélou,

2004a). Elle est un paramètre robuste qui dépend du débit sanguin aux organes d'élimination, de la capacité d'extraction des enzymes et de la liaison du xénobiotique aux protéines plasmatiques (Rowland & Tozer, 1995). La clairance est mesurée adéquatement après une administration i.v. et peut être calculée, entre autres, à partir de la dose administrée et de l'ASC estimée d'un individu:

$$8) Cl = \text{Dose} / \text{ASC} \text{ (Riviere, 1999).}$$

Elle permet de calculer la dose de maintien d'un médicament pour un individu en utilisant la Cl du xénobiotique retrouvée dans la littérature pour la même espèce ou par allométrie, et la Cp désirée:

$$9) \text{Dose} = Cl \times Cp \text{ (Riviere, 1999).}$$

La clairance intrinsèque est définie comme la capacité métabolique des enzymes hépatiques et contribue à la qualité d'extraction spécifique à chaque paire substrat-enzyme (Rowland & Tozer, 1995; Shargel & Yu, 1999). Les problèmes hépatiques, rénaux et cardiovasculaires, et les interactions médicamenteuses, inhibant ou induisant les enzymes métaboliques, influencent la clairance intrinsèque (Rowland & Tozer, 1995). Une discussion plus approfondie du métabolisme hépatique des médicaments est réservée pour le Chapitre 5 de cette thèse.

Le rein est la voie principale d'excrétion des médicaments et comprend la filtration glomérulaire, la sécrétion tubulaire active et la résorption tubulaire (Riviere & Martin-Jiménez, 1999). De plus, le cortex rénal possède plusieurs enzymes, comme les cytochromes P450 et la glutathione-S-tranférance, responsables du métabolisme et de la détoxification de plusieurs xénobiotiques (Lash, 1994). La clairance rénale peut varier selon des conditions physiologiques et pathologiques affectant le débit sanguin aux reins,

la liaison protéinique du médicament et le pH urinaire, ainsi que les interactions médicamenteuses pouvant influencer l'excrétion des xénobiotiques (Riviere & Martin-Jiménez, 1999; Boothe, 2001).

4.2.2 Aire sous la courbe

L'aire sous la courbe (ASC) est la superficie totale qui se trouve sous la courbe du profil CT. Elle est calculée à partir de la méthode trapézoïdale (Fig. 12) et extrapolée à l'infinité selon l'équation suivante par modélisation compartimentale ou non-compartimentale:

$$10) \text{ASC}_{0-\infty} = ((0+C_1)/2 \times (T_1-T_0)) + ((C_1+C_2)/2 \times (T_2-T_1)) + ((C_2+C_3)/2 \times (T_3-T_2)) + ((C_3+C_4)/2 \times (T_4-T_3)) + ((C_4+C_5)/2 \times (T_5-T_4)) + ((C_5+C_6)/2 \times (T_6-T_5)) + \dots + C_{\text{dernier}}/\text{pente}$$

où C = concentration plasmatique et T = temps (Dyer, 1996; Riviere & Martin-Jiménez, 1999; Shargel & Yu, 1999).

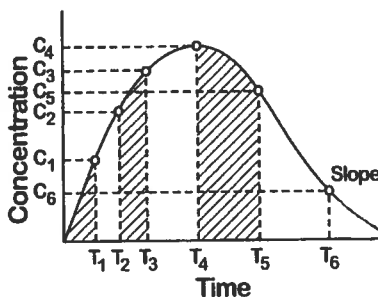


Figure 12 – Courbe de concentrations plasmatiques (C) versus le temps (T), sectionnée en trapèzes pour le calcul de l'aire sous la courbe. (Extrait de Riviere, 1999)

Elle représente la quantité totale du xénobiotique qui atteint la circulation sanguine ou l'exposition interne de l'individu au médicament dans le temps (Shargel & Yu, 1999).

L'ASC peut être utilisée pour calculer le volume de distribution (Vss), la Cl et la biodisponibilité (F) selon:

$$11) V_{ss} = \text{Dose} / k_{el} \times ASC_{0-\infty}$$

$$12) Cl = \text{Dose} / ASC_{0-\infty} \text{ et}$$

$$13) F = ASC_{p.o.} / ASC_{i.v.} \times 100, \text{ respectivement (Riviere, 1999).}$$

4.2.3 Volume de distribution

Le volume de distribution apparent donne une mesure de l'ampleur de la distribution d'un médicament dans l'organisme (Riviere, 1999; Toutain & Bousquet-Mélou, 2004c). Il est qualifié « d'apparent » puisqu'il ne correspond pas à un volume réel mais plutôt à un volume virtuel dans lequel le médicament est présumé y être uniformément distribué (Shargel & Yu, 1999). Seul le médicament libre (non-lié aux protéines plasmatiques) est distribué aux tissus par la circulation sanguine selon des limites de perfusion ou de diffusion. La distribution aux tissus ayant une bonne perméabilité au xénobiotique est généralement influencée par la perfusion sanguine, tandis que la distribution d'un médicament aux tissus ayant une faible perméabilité au médicament est influencée par la diffusion (Shargel & Yu, 1999). De plus, l'affinité des récepteurs tissulaires au xénobiotique peut également influencer la vitesse de redistribution (k_{21}) au compartiment central.

Diverses conditions physiologiques et pathologiques peuvent influencer la quantité de liquide extracellulaire et de protéines plasmatiques ainsi que la perfusion aux tissus, ayant pour effet de faire varier le volume de distribution d'un médicament (Shargel & Yu, 1999). Par conséquent, dans ces conditions, un ajustement de posologie est généralement nécessaire pour les médicaments à faible volume de distribution.

Il existe plusieurs types de volume de distribution. Le volume central (V_c) est utilisé pour calculer la dose initiale ou de charge d'un médicament à cinétique linéaire, pour atteindre la C_p désirée après une administration i.v.:

$$14) V_c = \text{Dose} / C_{p0} \text{ (Riviere \& Martin-Jiménez, 1999; Toutain \& Bousquet-Mélou, 2004c).}$$

Le volume de distribution à l'équilibre, V_{ss} , est atteint lorsque le taux de médicament allant du compartiment central au compartiment périphérique est égal au taux du médicament allant du compartiment périphérique au compartiment central (Riviere & Martin-Jiménez, 1999; Shargel & Yu, 1999). Ce paramètre est dépendant des facteurs hémodynamiques et des propriétés du médicament qui influencent la distribution, mais est indépendant du taux d'élimination (ex. insuffisance rénale) selon la formule mathématique suivante:

$$15) V_{ss} = V_c \times (k_{12} + k_{21}) / k_{21} \text{ (Riviere \& Martin-Jiménez, 1999; Shargel \& Yu, 1999).}$$

Enfin, le volume de distribution par étendue ou V_β prend en considération la constante de vitesse d'élimination β du profil CT dans un modèle linéaire à deux compartiments. Ce volume est semblable au V_{ss} donc représente le volume de distribution à l'équilibre mais contrairement à ce dernier, V_β tient compte des influences pathophysiologiques sur l'élimination du médicament:

$$16) V_\beta = k_{el} V_c / \beta \text{ (Riviere \& Martin-Jiménez, 1999; Shargel \& Yu, 1999).}$$

Ainsi, les proportions relatives des divers volumes de distribution, soit $V_c < V_{ss} < V_\beta$, sont importantes à retenir pour bien interpréter les paramètres auxquels les différents auteurs font mention dans la littérature.

4.2.4 Temps de demi-vie

Ce paramètre de pharmacocinétique, exprimé en unité de temps (minutes ou heures), est le plus fréquemment utilisé en clinique et représente le temps nécessaire pour que la Cp du médicament diminue de moitié une fois que la Cp a atteint l'équilibre (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004b). Dans un modèle linéaire, le temps de demi-vie est une constante donc indépendante de la Cp du médicament en tout temps (Riviere & Martin-Jiménez, 1999; Shargel & Yu, 1999). Il est calculé à partir de la constante d'élimination, k_{el} ou β , par la méthode compartimentale à un ou deux compartiments respectivement:

$$17) T_{1/2} = 0.693/k_{el} \text{ ou } T_{1/2} = 0.693/\beta \text{ (Toutain \& Bousquet-Mélou, 2004b).}$$

La constante d'absorption (k_a) est généralement supérieure à la constante d'élimination. Cependant, il existe des situations, par exemple pour les formulations à libération lente, où k_a est beaucoup plus petit que k_{el} et le temps de demi-vie calculé à partir de cette dernière constante, ne reflète plus le taux d'élimination mais plutôt le taux d'absorption (Toutain & Bousquet, 2004b). Cette situation est connue sous le nom de phénomène de « flip-flop » où le taux d'absorption, plutôt que de l'élimination, limite la disposition du médicament (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004b).

Le temps de demi-vie peut également être calculé à partir du Vss et de la Cl selon l'équation suivante:

$$18) T_{1/2} = 0.693 \times V_{ss} / Cl \text{ (Rowland \& Tozer, 1995; Toutain \& Bousquet-Mélou, 2004b).}$$

Ainsi, ce paramètre est directement proportionnel au Vss mais inversement proportionnel à la Cl. Il est donc considéré comme paramètre hybride influencé par plusieurs facteurs physiologiques et pathologiques en même temps.

Ce paramètre peut être utilisé pour calculer les intervalles de doses (τ), l'accumulation du médicament ($R = 1/1 - 0.5^{\tau/T_{1/2}}$), le temps pour atteindre une C_p à l'équilibre ($5 \text{ à } 6 \times T_{1/2}$) et les temps de retrait pour les médicaments administrés à doses multiples, d'où sa popularité auprès des vétérinaires (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004b).

Cependant, de par sa nature multidimensionnelle, ce paramètre doit être interprété avec prudence. La capacité d'élimination d'un médicament est évaluée plus adéquatement par la clairance plutôt que par le temps de demi-vie (Toutain et Bousquet-Mélou, 2004a).

De plus, dans un modèle non-linéaire, le temps de demi-vie n'est plus une constante mais varie selon la C_p du médicament avec le temps, rendant ce paramètre difficile à interpréter (Shargel & Yu, 1999; Toutain & Bousquet-Mélou, 2004b). Le TMS remplace le temps de demi-vie dans une modélisation non-compartimentale (Rowland & Tozer, 1995).

4.2.5 C_{max} et T_{max}

Ces paramètres sont estimés directement à partir du profil CT et représentent l'étendue et la vitesse d'absorption après une administration extravasculaire respectivement.

4.3 Pharmacologie clinique

Pour la majorité des médicaments, il existe une corrélation entre la C_p et la réponse clinique du patient, permettant de prédire les effets thérapeutiques et toxiques (Fig. 13).

En pharmacologie clinique, les paramètres de pharmacocinétique sont très utiles pour élaborer une posologie efficace et sécuritaire dans une approche de thérapie individualisée.

Le suivi des C_p est particulièrement important pour les médicaments à faible indice thérapeutique, pour les médicaments dont les effets thérapeutiques sont difficiles à évaluer cliniquement, et pour évaluer les effets sur les C_p d'une administration concomitante de médicaments.

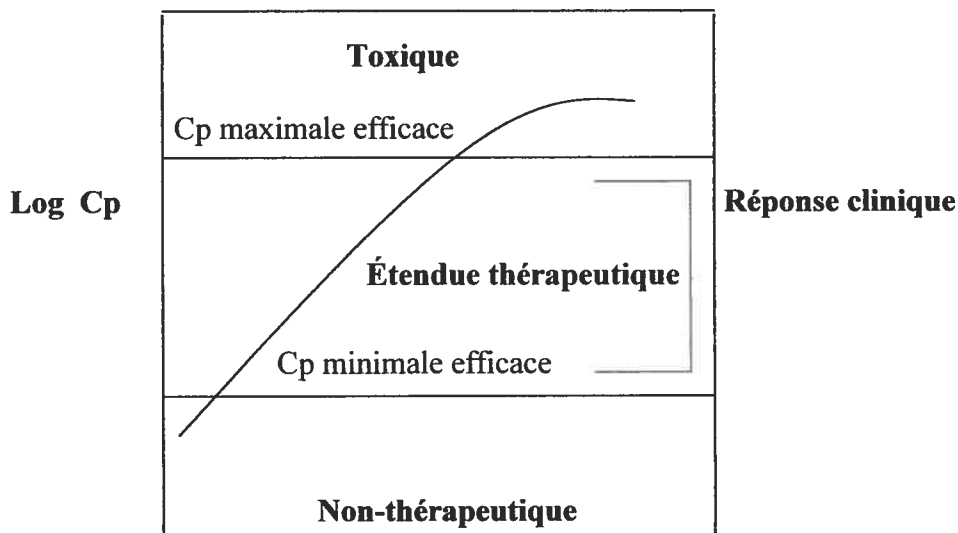


Figure 13 – Graphique représentant la corrélation entre la concentration plasmatique (Cp) du médicament et la réponse clinique. L'atteinte des Cp à l'équilibre à l'intérieur de l'étendue thérapeutique est importante pour assurer un succès thérapeutique et minimiser la toxicité. (Traduit de Boothe, 2001)

Dans le cas de la clomipramine, un suivi des Cp du principe actif et de la DCMP est pratique courante en médecine humaine, à cause de la grande incidence d'effets secondaires adverses et la grande variabilité de la réponse clinique parmi les patients humains. Cependant, quoiqu'une grande variabilité interindividuelle de la réponse clinique soit observée chez les chats après l'administration de cet ADT, il n'existe aucune étude de pharmacocinétique vérifiant la présence d'une variabilité interindividuelle des Cp et des estimés de paramètres de pharmacocinétique de la clomipramine et de la DCMP pour cette espèce.

4.4 Méthode d'échantillonnage

La validité des données et du profil CT utilisés pour la modélisation en pharmacocinétique dépend en grande partie de la méthode d'échantillonnage et du nombre

de prises de sang par phase cinétique. Il est donc important de minimiser l'anxiété des sujets échantillonnés afin de réduire la possibilité de modification des comportements cinétiques du médicament utilisé (Albarellos et al., 2003). Un minimum de cinq prises de sang par phase pour un médicament administré par voie extravasculaire (absorption, distribution et élimination) ou i.v. (distribution et élimination) est idéal. Les temps d'échantillonnage quoique standardisés, s'adaptent à la voie d'administration. Ainsi, la création d'un profil CT pour une administration i.v. nécessitera plusieurs échantillons de sang récoltés dès l'administration du médicament, tandis que pour une administration orale, la dernière phase devra être échantillonnée plus tard. De plus, le nombre de prises de sang et la quantité de plasma récoltée dépendront de l'espèce ciblée. Une étude de pharmacocinétique sur le cheval de 500 kg aura une méthodologie différente de celle d'un chat de 5 kg, cette dernière étant adaptée pour minimiser les procédures invasives (fréquence et intensité) sans compromettre la validité des résultats.

Plusieurs méthodes sont préconisées pour obtenir de multiples échantillons de sang chez le chat (Cochrane et al., 1989; Martin & Rand, 1999; Beal & Hughes, 2000; Albarellos et al., 2003; Gibbon et al., 2003). La technique idéale permet de nombreuses prises de sang faciles à exécuter, peu douloureuses et provoquant le moins d'anxiété possible pour le chat pendant 24 à 48 heures, avec un minimum de dommage causé au vaisseau sanguin (Albarellos et al., 2003). Plusieurs chercheurs utilisent un long cathéter jugulaire qui nécessite une immobilisation temporaire du patient par sédation pour l'insérer correctement. Martin et Rand (1999) ont légèrement modifié la méthode pédiatrique de Seldinger pour l'adapter aux patients félins. Ces auteurs utilisent un introducteur, dilateur et stylet pour assurer l'introduction adéquate d'un cathéter 20GA de huit cm de

long en polyuréthane (Martin & Rand, 1999). Ces cathéters sont fastidieux à poser nécessitant plusieurs étapes et une anesthésie générale du chat. Ils sont aussi dispendieux. La canalisation jugulaire décrite par Albarellos et coll. (2003) par contre, utilise deux cathéters soit le Jelco® (20GA, 32mm) et l'Intracat® (22GA, 20.3cm). L'aiguille du Jelco® est utilisée comme guide pour l'Intracat® puisque les auteurs affirment que l'aiguille 19GA fournie avec l'Intracat® est trop grosse pour la veine jugulaire féline (Albarellos et al., 2003).

Les prises de sang à travers les cathéters nécessitent deux seringues pour éviter une contamination de l'échantillon par l'héparine pour les analyses. Le premier échantillon de sang, équivalent à au moins deux fois le volume interne du cathéter, est retiré à l'aide d'une seringue contenant de l'héparine (Martin & Rand, 1999; Albarellos et al., 2003). Le deuxième échantillon est ensuite récolté pour les analyses (Martin & Rand, 1999; Albarellos et al., 2003). Le premier échantillon de sang-héparine est ré-infusé au chat pour minimiser une perte de sang inutile (Martin & Rand, 1999).

Une simple méthode de cathétérisation jugulaire féline, inspirée des méthodologies antérieurement décrites, utilisant un seul cathéter 19GA de 30.5 cm de long, muni d'une aiguille 17GA (Intracath®, BD Vialon™ Radiopaque Material, Becton Dickinson, Utah), a été adaptée afin de permettre l'obtention de multiples échantillons sanguins lors d'une étude de pharmacocinétique classique (Lainesse et al., *The Veterinary Record*, sous impression) (Fig. 14).



Figure 14 – Une longueur extraveineuse de cathéter de 15 cm d'un Intracath® (30.5 cm, 19GA, Becton Dickinson) correspondant à une longueur intraveineuse de 9 cm, a permis d'obtenir un échantillonnage de sang fiable pendant 30 heures lors d'une étude de pharmacocinétique classique, lorsque le cathéter a été inséré de 3 à 5 cm du creux thoracique dans la veine jugulaire des chats. (Extrait de Lainesse et al., *The Veterinary Record*, sous impression)

4.5 Pharmacocinétique classique de la clomipramine

Les paramètres de pharmacocinétique de la clomipramine sont connus chez l'humain, le rat (modèle animal) et le chien (Faigle & Dieterle, 1973; Evans et al., 1980; McTavish & Benfield, 1990; Hewson et al., 1998a; King et al., 2000a; King et al., 2000b; Weigmann et al., 2000). Les différences interspécifiques humaines et canines dans les paramètres de pharmacocinétique de la clomipramine sont remarquables (Tableau X). En général, la Cl est plus lente, le Vss est plus grand et par conséquent, le temps de demi-vie est plus long chez l'humain que chez le chien (deCuyper et al, 1981; Hewson et al., 1998a; King et al., 2000a). L'absorption orale de la clomipramine est bonne, mais subit un effet de premier passage important qui réduit sa biodisponibilité dans les deux espèces (Evans et al., 1980; Hewson et al., 1998a; Gex-Fabry et al., 2000; King et al., 2000a). Le temps de demi-vie de la DCMP est plus rapide chez les chiens démontrant peu

d'accumulation après de multiples doses contrairement à ce que l'on observe chez l'humain (King et al., 2000b).

Tableau X - Paramètres de pharmacocinétique de la clomipramine et de la desméthylclomipramine chez l'humain et le chien après une administration intraveineuse et orale.

Paramètres	Humain	Canin	Références
Clomipramine			
Cl (L/h·kg)	0.65	1.40	deCuyper et al., 1981; Hewson et al., 1998; King et al., 2000a
Vss (L/kg)	16.6	3.7	deCuyper et al., 1981; Hewson et al., 1998; King et al., 2000a
Temps de demie-vie (h)	20	5	deCuyper et al., 1981; Hewson et al., 1998; King et al., 2000a
F (%)	50	16	Evans et al., 1980; Kuss & Jungkunz, 1986; Hewson et al., 1998; King et al., 2000a
Desméthylclomipramine			
Temps de demi-vie (h)	43	1.5	deCuyper et al., 1981; Hewson et al., 1998
Tmax	4	3	de Cuyper et al., 1981; Hewson et al., 1998; King et al., 2000a

Cl=clairance; Vss=volume de distribution à l'équilibre; F=biodisponibilité; Tmax=temps pour atteindre la concentration maximale.

L'excrétion de la clomipramine chez le chien est biliaire, tandis qu'elle est principalement urinaire (80%) chez l'humain (Cooper, 1997; Boothe, 2001). La Cl de la clomipramine chez le chien est égale à son débit hépatique et est deux fois plus rapide que la Cl humaine (deCuyper et al., 1981; Simpson & Papich, 2003). Ainsi, le débit sanguin au foie affectera la pharmacocinétique canine, tandis que la liaison aux protéines plasmatiques influencera la pharmacocinétique de la clomipramine chez les humains. De plus, compte tenu de la contribution importante du foie à l'élimination de la clomipramine chez l'homme et le chien, une insuffisance hépatique aura plus d'effet sur la diminution de la clairance du principe actif qu'une insuffisance rénale. La grande liposolubilité de la clomipramine lui

permet une distribution importante dans les tissus périphériques et sa liaison de plus de 95% aux protéines plasmatiques permet une disposition variable et prolongée chez l'humain et le chien (Cooper, 1997; Overall, 1997; Gex-Fabry et al., 2000; King et al., 2000b; Boothe, 2001).

Une étude comparant les concentrations plasmatiques et cérébrales chez les rats a démontré une plus grande concentration de la clomipramine et de la DCMP dans les tissus cérébraux à l'équilibre, jusqu'à 10 fois la valeur plasmatique (Weigmann et al., 2000). Les auteurs concluent que les Cp à l'équilibre de la clomipramine et de son métabolite actif reflètent bien les concentrations cérébrales et que les tissus du cerveau ne semblent pas agir comme réservoir pour l'ADT ou son métabolite (Weigmann et al., 2000).

Plusieurs études humaines ont démontré une variabilité interindividuelle significative (30-50%) dans les paramètres de pharmacocinétique de la clomipramine et de la DCMP, plus particulièrement la Cl de la clomipramine, et une grande variabilité, de l'ordre de 10 à 15 fois, pour les Cp de ces deux entités chimiques dans la population de patients humains (de Cuyper et al., 1981; Vandel et al., 1982; Noguchi et al., 1993; DUAG, 1999; Gex-Fabry et al., 2000). Les études canines de pharmacocinétique ont également démontré une variabilité interindividuelle dans les Cp et l'ASC de la clomipramine et de la DCMP (3 à 4 fois) dans un nombre limité de chiens (Hewson et al., 1998a; King et al., 2000a). En considérant la grande variabilité interindividuelle de pharmacocinétique observée chez l'humain et le chien, et compte tenu des particularités du métabolisme hépatique du chat, il est judicieux d'éviter l'extrapolation des données canines et humaines aux patients félins.

4.6 Pharmacocinétique de population

La pharmacocinétique de population est apparue à la fin des années '70, suite aux difficultés de modélisation rencontrées et aux strictes exigences qu'imposait la planification d'une étude de pharmacocinétique classique (Bonate, 2005). Plus particulièrement, la pharmacocinétique de population a été développée pour l'analyse des données peu nombreuses, récoltées de chaque individu lors du suivi des Cp d'un médicament en milieu clinique (Bonate, 2005). Cependant, elle est maintenant couramment utilisée dans les études cliniques humaines et animales, et pour le développement de nouveaux médicaments en industrie pharmaceutique (Rosenbaum et al., 1995; Vozech et al., 1996; Martin-Jiménez & Riviere, 1998; Bonate, 2005).

Contrairement à la pharmacocinétique classique, les avantages de la pharmacocinétique de population incluent une population hétérogène cible de patients, un petit nombre de prises de sang par individu, une quantification de la variabilité inter et intraindividuelle, une caractérisation de l'influence des covariables (conditions physiologiques, environnementales ou pathologiques) sur les paramètres de pharmacocinétique et la prédiction individuelle de posologie selon le statut pathophysiologique du patient, par l'intermédiaire d'un modèle pharmacostatistique (Sheiner et al., 1977; Rosenbaum et al., 1995; Martin-Jiménez & Riviere, 1998; Bonate, 2005; Roy & Ette, 2005). Ce modèle pharmacostatistique est paramétrique et comprend un modèle de pharmacocinétique à effets fixes et un modèle statistique à effets aléatoires (Sheiner et al., 1977; Martin-Jiménez & Riviere, 1998; Bonate, 2005; Roy & Ette, 2005) (Fig. 15).

MODÈLE PHARMACOSTATISTIQUE DE POPULATION

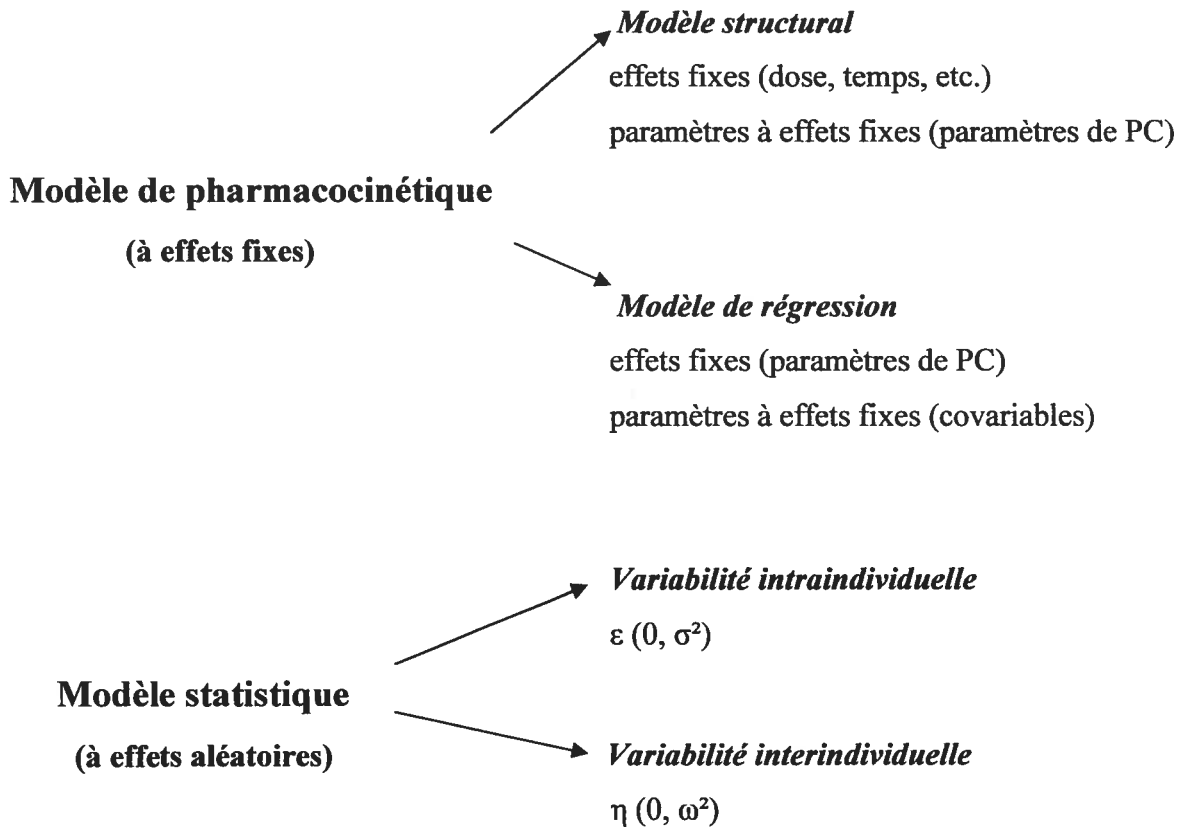


Figure 15 – Structure du modèle pharmacostatistique utilisé pour l’approche analytique de la pharmacocinétique de population (Martin-Jiminez & Riviere, 1998). PC=pharmacocinétique

Dans le **modèle de pharmacocinétique**, un *modèle structural* conventionnel est choisi avec comme exemples d’effets fixes, la dose et le temps (mesurés sans erreur) et des paramètres à effets fixes comme l’ASC, la Cl et le Vss (Sheiner et al., 1977; Riviere, 1999). Ces paramètres à effets fixes quantifient l’influence de la dose et du temps sur la variable indépendante soit la Cp du médicament selon l’équation du modèle monocompartimentale et linéaire (Riviere, 1999).

Le modèle de pharmacocinétique comprend également un *modèle de régression* dont les paramètres de pharmacocinétique deviennent les variables dépendantes et les effets fixes sont des covariables physiologiques, environnementales et pathologiques. Les paramètres

à effets fixes de ce modèle de régression sont représentés par une variable θ (téta) qui est mesurée par le logiciel et quantifie l'influence des covariables sur les paramètres de pharmacocinétique (Sheiner et al., 1977; Riviere, 1999).

Le **modèle statistique** comprend les effets aléatoires inter et intraindividuels. Les *effets aléatoires interindividuels* sont mesurés pour chacun des paramètres de pharmacocinétique choisis, préalablement estimés par le modèle de régression, et quantifie la différence η (éta) entre la valeur estimée d'un individu et la valeur de la population suivant une distribution normale centrée réduite, avec une moyenne de zéro et une variance de ω^2 , selon les équations de régression linéaire suivantes :

$$19) \ln ASC_i = \theta_{ASC,1} + \theta_{ASC,2} \cdot cov_1 + \theta_{ASC,3} \cdot cov_2 + \dots + \theta_{ASC,n} \cdot cov_{n-1} + \eta_{ASC_i}$$

$$20) \ln Cl_i = \theta_{Cl,1} + \theta_{Cl,2} \cdot cov_1 + \theta_{Cl,3} \cdot cov_2 + \dots + \theta_{Cl,n} \cdot cov_{n-1} + \eta_{Cl_i}$$

$$21) \ln V_{ss_i} = \theta_{V_{ss},1} + \theta_{V_{ss},2} \cdot cov_1 + \theta_{V_{ss},3} \cdot cov_2 + \dots + \theta_{V_{ss},n} \cdot cov_{n-1} + \eta_{V_{ss}_i}$$

où ASC_i , Cl_i et V_{ss_i} sont l'aire sous la courbe, la clairance, et le volume de distribution à l'équilibre de chaque individu respectivement, cov est la variable à effets-fixes et θ est la constante de proportionnalité qui quantifie l'influence de la covariable sur le paramètre de pharmacocinétique (Sheiner & Beal, 1980; Sheiner & Beal, 1981; Sheiner & Beal, 1983; Riviere, 1999). La construction de ce modèle est progressive dont le but est de minimiser la valeur des moindres carrés (Sheiner & Beal, 1980).

Les *effets aléatoires intraindividuels* caractérisent la différence entre la valeur prédite et estimée du paramètre de pharmacocinétique mesuré pour chaque individu. La variabilité intraindividuelle quantifie l'influence du rythme circadien et/ou de la variation journalière physiologique et l'influence de l'erreur analytique et/ou du choix de modèle structural (Sheiner & Beal, 1977; Martin-Jiménez & Riviere, 1998). Cette quantification de la valeur

intraindividuelle ou résiduelle est désignée par ε (epsilon) et suit une distribution normale centrée réduite, avec une moyenne de zéro et une variance σ^2 :

$$22) C_{p_{ij}} = E(C_{p_{ij}}) + \varepsilon_{ij}$$

où $C_{p_{ij}}$ est la concentration plasmatique observée de chaque individu (i) au temps j et C_{p_i} est concentration plasmatique attendue pour chaque individu (i) au temps j (Sheiner & Beal, 1980; Sheiner & Beal, 1981; Sheiner & Beal, 1983; Riviere, 1999).

Ce type d'analyse est paramétrique et peut être effectué par différents logiciels dont le programme NONMEM (non-linear mixed effects model), WinNonmix, Version 2.0.1. (Pharsight Corp, Palo Alto, CA) créé par Lewis Sheiner pour estimer les effets fixes et aléatoires par la méthode des moindres carrés et multiples algorithmes (Sheiner & Beal, 1977; Sheiner & Beal, 1980; Sheiner & Beal, 1981; Sheiner & Beal, 1983).

Contrairement à la méthode traditionnelle à deux-étapes (standard two-stage - STS) où une corrélation entre covariables et paramètres de pharmacocinétique peut être détectée par analyse statistique conventionnelle, cette approche pharmacostatistique permet non seulement de détecter une corrélation mais de quantifier l'influence de plusieurs covariables à la fois sur les paramètres de pharmacocinétique (Riviere, 1999). De plus, elle permet de quantifier la variabilité dans la population en distinguant l'influence de la variabilité entre les individus et celle causée par la variabilité résiduelle (erreur analytique) (Riviere, 1999).

Il existe trois importants critères qui régissent la qualité de l'analyse par approche de pharmacocinétique de population qui sont semblables aux critères de la pharmacocinétique classique. Ceux-ci incluent le nombre de prises de sang par individu, le temps d'échantillonnage et enfin le nombre total d'individus représentant la population de patients (Ette et al., 1995b; Roy & Ette, 2005). De façon générale, le nombre total

d'individus représentant la population est plus important que le nombre de prises de sang échantillonnées par individu (Ette et al., 1995b; Roy & Ette, 2005). Les paramètres de pharmacocinétique de population sont efficacement estimés quand un très grand nombre d'individus n'a que deux prises de sang échantillonnées par individu, contrairement à la pharmacocinétique classique qui nécessite en moyenne 12 à 15 prises de sang par individu (Riviere, 1999; Roy & Ette, 2005). L'équipe de al-Banna (1990) a remarqué que l'addition d'un troisième échantillon par individu augmentait l'exactitude et la précision des valeurs estimées pour les effets aléatoires. Ette et coll. (1995a) a investigué, par simulation, les temps idéaux d'échantillonnage de ces trois prises de sang et ont suggéré que la première prise de sang soit échantillonnée le plus tôt possible après l'administration du médicament et que la dernière prise de sang soit entre 1.4 et 3 fois le temps de demi-vie (Ette et al., 1995a). Ces auteurs ont également remarqué que le temps exact d'échantillonnage de la troisième prise de sang n'était pas critique à l'estimation des paramètres de pharmacocinétique de population, donc pouvait varier entre les deux autres temps fixes (Ette et al., 1995a, b). L'addition de plus de trois prises de sang par individu ne semblait pas augmenter la robustesse de l'analyse (Roy & Ette, 2005).

Il existe quatre désavantages à l'approche de pharmacocinétique de population. Le premier désavantage est le biais que peuvent entraîner les corrélations non identifiées de certaines covariables prédictives entre eux sur les inférences, entraînant ainsi une diminution de l'efficacité statistique (Nedelman, 2005). Les conditions cliniques non standardisées d'où les données sporadiques sont récoltées, peuvent également entraîner une problématique de la validité des valeurs documentées. De plus, le coût de l'étude peut parfois être exorbitant à cause du grand nombre d'individus nécessaires pour obtenir une population représentative (Nedelman, 2005). Finalement, le choix d'un seul modèle

structural représentant l'ensemble de la population est limitant, surtout dans le cas de médicaments à disposition complexe (Riviere, 1999).

L'application de la pharmacocinétique de population en médecine vétérinaire est de plus en plus grandissante. La méthode Bayésienne prédictive de posologie individuelle est un exemple utilisant les données récoltées selon l'approche pharmacostatistique:

$$23) \frac{\sum (P_{pop} - P_{ind})^2}{\sigma^2 P_{pop}} + \frac{\sum (C_{p_{obs}} - C_{p_{ind}})^2}{\sigma^2 C_{p_{obs}}}$$

où P_{pop} et P_{ind} représentent les valeurs des paramètres estimés par approche de pharmacocinétique pour la population et pour l'individu respectivement, tandis que $C_{p_{obs}}$ et $C_{p_{ind}}$ représentent les Cp observées et estimées à partir du modèle de pharmacocinétique individualisé (classique) du patient respectivement (Rosenbaum et al., 1995; Riviere, 1999). Le produit $\sigma^2 P_{pop}$ est la variance des différentes valeurs des paramètres de pharmacocinétique de population et le produit $\sigma^2 C_{p_{obs}}$ est la variance des Cp observées (Riviere, 1999).

Bien que la pharmacocinétique de population offre des avantages importants en représentant la population cible, c'est-à-dire celle nécessitant un traitement pharmacologique plutôt que d'une population saine comme c'est le cas pour la pharmacocinétique classique, sa complexité mathématique et son manque de flexibilité structurale limitent son utilisation. Cependant, le développement de logiciels encore plus spécialisés et adaptés pour accommoder une plus grande variabilité interindividuelle des profils CT aidera à contrer ses limites paramétriques dans le futur.

4.7 Pharmacocinétique de population de la clomipramine

Au cours des années, les facteurs physiologiques (âge et sexe), démographiques (ethnie), environnementaux (tabac, alcool) et pharmacologiques (interactions médicamenteuses), ainsi que le polymorphisme génétique et l'observance de la posologie par le patient ont tous été détectés comme covariables potentielles responsables de la grande variabilité interindividuelle des paramètres de pharmacocinétique de la clomipramine dans la population humaine et par conséquent, la grande variabilité dans la réponse clinique (Gex-Fabry et al., 1990; Noguchi et al., 1993; Shimoda et al., 1995; DUAG, 1999; Gex-Fabry et al., 2000; Hildebrandt et al., 2003; Mulder et al., 2003; Consoli et al., 2005; Shah, 2005). En 2000, l'équipe de Gex-Fabry a utilisé l'approche de pharmacocinétique de population pour caractériser la disposition de la clomipramine et de ses métabolites afin d'y intégrer l'influence de ces facteurs sur la variabilité interindividuelle observée avec l'administration de la clomipramine. À l'aide de modèles pharmacophysiologiques à deux (clomipramine et DCMP) et à quatre (clomipramine, DCMP, hydroxycloimipramine et hydroxydesméthylclomipramine) molécules, ils ont démontré la possibilité de prédire la clairance de la clomipramine à partir des valeurs de l'ASC (Fig. 16). Ils ont également détecté une variabilité interindividuelle de clairance de 50-60% et une variabilité résiduelle de 30% (Gex-Fabry et al., 2000). Par contre, des distributions multimodales identifiant des sous-populations de patients avec des capacités métaboliques différentes n'ont pas été observées au moyen d'histogrammes de clairances de déméthylation et d'hydroxylation de la clomipramine chez les 30 patients étudiés (Gex-Fabry et al., 2000). Ainsi, les auteurs ont conclu que la variabilité interindividuelle des paramètres de pharmacocinétique dans la population humaine est multifactorielle, causée non seulement par le polymorphisme des cytochromes responsables du métabolisme de la

clomipramine mais aussi par plusieurs autres covariables en même temps, d'où la recommandation du suivi thérapeutique des Cp pour ce médicament (Gex-Fabry et al., 2000).

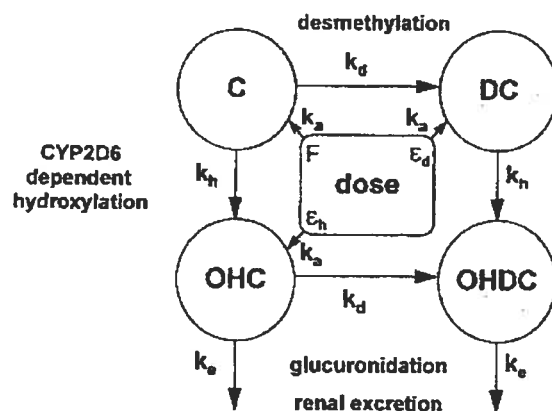


Figure 16 - Modèle pharmacophysiologique à quatre molécules utilisé par Gex-Fabry et coll. (2000) pour représenter la disposition de la clomipramine et ses principaux métabolites dans leur étude de pharmacocinétique de population. Après une absorption orale de la dose par le tractus gastrointestinal, la clomipramine (C) subit un effet de premier passage d'où la formation de la desméthylclomipramine (DC) et de l'hydroxyclopmipramine (OHC) est représentée par les fractions de dose, ϵ_d et ϵ_h respectivement, et la fraction de la dose restante atteignant la circulation sanguine est la biodisponibilité (F). (Extrait de Gex-Fabry et al., 2000). OHDC = hydroxydesméthylclomipramine; k_a , k_d , k_h , k_e = constantes de vitesse d'absorption, de déméthylation, d'hydroxylation et d'élimination respectivement.

Aucune étude de pharmacocinétique de population de ce genre n'a été publiée pour les patients félins et canins afin de cerner la cause de la variabilité interindividuelle observée de la réponse clinique suite à l'administration du Clomicalm® chez ces espèces. La connaissance des paramètres de pharmacocinétique de la clomipramine et les facteurs influençant ces paramètres pourrait, en partie, expliquer cette variabilité et potentiellement améliorer l'utilisation de cet ADT pour les chats démontrant des troubles de

comportement. De plus, il est important d'entreprendre des études qui ciblent non seulement l'espèce mais la population hétérogène de patients qui bénéficieront du traitement pharmacologique. Compte tenu de l'importance du suivi des Cp du principe actif et de son métabolite chez les humains, est-il nécessaire de faire de même pour les chats, vu l'imprévisibilité de la réponse clinique et de la fréquence des effets secondaires suite à l'administration du Clomicalm®? Est-il possible que le métabolisme soit également un contributeur important de cette variabilité entre les chats?

Chapitre 5 – Métabolisme de la clomipramine

L'élimination d'un médicament est souvent une source de variabilité interindividuelle des paramètres de pharmacocinétique puisque les enzymes hépatiques sont facilement influencées par les conditions pathophysiologiques du patient et par conséquent, sont responsables, en partie, de la variabilité observée de la réponse clinique et de l'incidence des effets secondaires, comme c'est le cas pour la clomipramine administrée aux patient humains. Qu'en est-il du métabolisme de la clomipramine chez les chats? La DCMP est-elle, d'abord et avant tout, un métabolite quantitativement et qualitativement significatif chez cette espèce, comme il a été démontré chez l'humain? Pourquoi les chiens semblent-ils manifester moins d'effets secondaires que les humains et les chats? Existe-t-il des profils métaboliques différents entre les espèces pour cet ADT?

L'élimination d'un médicament inclut le métabolisme et l'excrétion (Rowland & Tozer, 1995; Riviere, 1999). Le métabolisme d'un xénobiotique est le processus par lequel le médicament est chimiquement converti en un ou des métabolites polaires pour faciliter son excrétion dans l'urine ou la bile (Shargel & Yu, 1999). Cette biotransformation nécessite habituellement un ou des enzymes qui se retrouvent principalement dans le foie, mais qui sont aussi localisés dans les reins, le cerveau, les intestins et les poumons (Shargel & Yu, 1999). Le métabolisme hépatique est influencé par plusieurs facteurs incluant le débit sanguin au foie et la liaison du médicament aux protéines plasmatiques (Rowland & Tozer, 1995; Riviere, 1999; Shargel & Yu, 1999; Tibbitts, 2003). Seules les molécules de médicaments non liées sont métabolisées par les enzymes hépatiques exposés et contribuent à la clairance du médicament (Rowland & Tozer, 1995). Typiquement, le débit sanguin au foie, exprimé en mL/min·kg, varie de façon inversement proportionnelle à

la taille de l'espèce (Tibbitts, 2003). Le débit sanguin hépatique équivaut à 30% du débit cardiaque ($CO = 180 \times \text{poids corporel (kg)}^{-1.9}$) et expose le foie à une C_p variable de médicament selon la vitesse du débit (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004a). L'extraction totale (E) d'un médicament permet une comparaison entre espèces de la capacité hépatique et rénale d'élimination d'un xénobiotique, en tenant compte du débit cardiaque (CO) selon l'équation suivante:

$$24) E = Cl_{tot}/CO \quad (\text{Toutain \& Bousquet-Mélou, 2004a}).$$

Une extraction rapide d'un médicament suggère que les enzymes sont en quantité suffisante et d'efficacité supérieure pour un substrat administré et que seule la quantité de médicament présenté au foie influence la capacité métabolique (Riviere, 1999). Une extraction lente, par contre, dépend de la liaison du médicament aux protéines plasmatiques et n'est pas influencée par le débit sanguin au foie (Riviere, 1999). La capacité métabolique limitée des enzymes hépatiques est généralement causée par une quantité insuffisante d'enzymes disponibles (saturation des enzymes), un transport biliaire inadéquat ou une faible diffusion du médicament au site de biotransformation (Riviere, 1999).

Le métabolisme hépatique comprend deux phases distinctes, soit la phase I incluant les réactions des cytochromes P450 (CYP) et des monooxygénases de flavine (FMO), et la phase II incluant principalement la glucuronidation, l'acétylation, la conjugaison avec la glutathione, la sulfonation et la méthylation (Price & Stevens, 1989; Murray, 2000; Correia, 2004; Samer et al., 2005) (Tableau XI).

Tableau XI - Le métabolisme hépatique par les enzymes de phase I et II produit des métabolites polaires assurant l'élimination d'un médicament dans l'urine ou la bile, par diverses réactions enzymatiques.

Phase	Enzymes	Réactions
I	CYP	Oxydation
		Réduction
		Hydrolyse
	FMO	N-oxydation
		Amine oxydases
II	UGT	Désydrogénation
		Glucuronidation
		Acétylation
		Sulfonation
		Conjugaison avec la glutathione
SULT	GST	Méthylation
	SAM	

(Correia, 2004) CYP=cytochromes P450; FMO=monoxygénases de flavine; UGT=uridine glucuronyltransférase ; NAT=N-acétyltransférase; SULT=sulfotransférase; GST=glutathione-S-transférase; SAM=S-adenosyl-méthionine

5.1 Cinétique de l'activité enzymatique

La cinétique enzymatique présume, de façon générale, qu'une molécule de médicament ou de substrat interagit avec une molécule d'enzyme pour former un complexe substrat-enzyme (Shargel & Yu, 1999). Ce complexe intermédiaire entraîne une série de réactions formant un ou des métabolites (Shargel & Yu, 1999). Lorsque la Cp du médicament est faible comparativement à la concentration des enzymes, il y a suffisamment d'enzymes pour catalyser la réaction et le taux de métabolisme est de premier ordre (Shargel & Yu, 1999). Cependant, une saturation des enzymes entraîne un processus d'ordre zéro lorsque la concentration du médicament est plus élevée que la quantité d'enzymes disponibles et que la réaction atteint un taux maximum de métabolisme (Shargel & Yu, 1999). La cinétique de l'activité enzymatique est représentée par une courbe hyperbolique (Fig.17) et suit l'équation de Michaelis-Menten suivante :

$$25) V = V_{\max} \times S / (K_m + S);$$

où V représente la vitesse de la réaction en unité de poids du métabolite formé par mg de protéine enzymatique par unité de temps, pour une concentration donnée d'un substrat.

V_{\max} est le taux maximum de métabolisme, S est la concentration du substrat et K_m est la constante de Michaelis-Menten, représentant la concentration du substrat lorsque la moitié du V_{\max} est atteinte (Rowland & Tozer, 1995; Shargel & Yu, 1999).

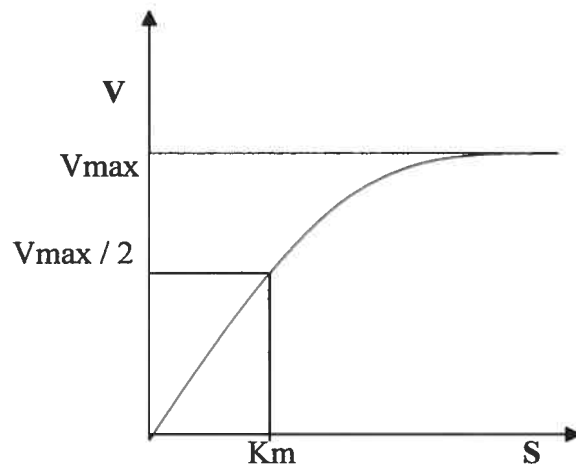


Figure 17 –Graphique de la relation hyperbolique entre la vitesse de la réaction enzymatique (V) et la concentration du substrat (S), décrite par la cinétique enzymatique de Michaelis-Menten. Le K_m est la concentration du substrat lorsque la vitesse de la réaction est la moitié de V_{\max} . (Rowland & Tozer, 1995).

Il est possible d'estimer les paramètres V_{\max} et K_m à l'aide d'une représentation réciproque du graphique de Michaelis-Menten par le graphique de Lineweaver-Burke ($1/V$ versus $1/S$), les transformations de Eadie-Hofstee (V/S versus V) ou de Hanes-Wolff (S versus S/V) (Thomson, 1979; Shargel & Yu, 1999; Campbell et al., 2005). Ces graphiques permettent également de déterminer si la réaction enzymatique est catalysée par un enzyme (ligne droite) ou par au moins deux enzymes (deux lignes droites) (Campbell et al., 2005) (Fig. 18).

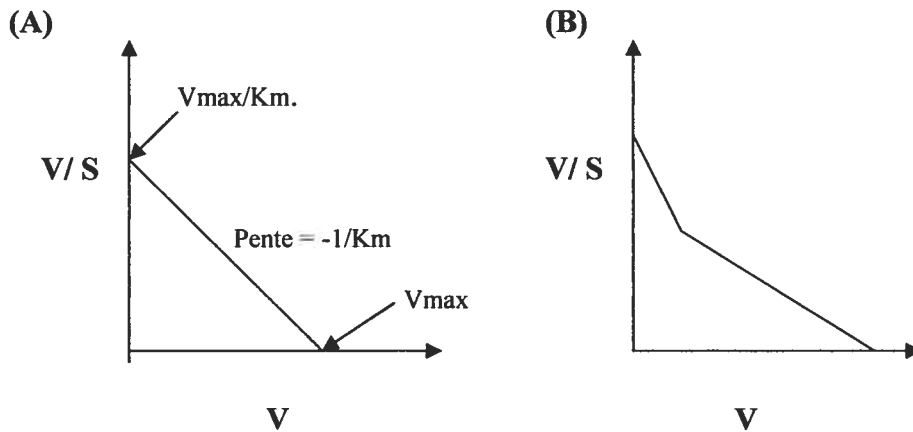


Figure 18 – Représentations graphiques de la transformation Eadie-Hofstee de l'activité enzymatique Michaelis-Menten, démontrant une réaction catalysée par un enzyme (A) et par au moins deux enzymes (B). (Campbell et al., 2005).

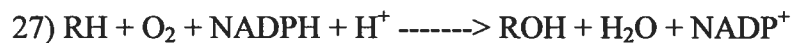
Sur le graphique de Eadie-Hofstee, la clairance intrinsèque (Cl_{int}) est l'intercepte sur l'axe des y et est calculée à partir de l'équation suivante, lors d'une réaction de premier ordre :

$$26) Cl_{int} = V_{max}/K_m \text{ (Campbell et al., 2005).}$$

5.2 Cytochromes P450

Les CYP, enzymes de phase I, sont des protéines contenant un noyau de hème et sont situés sur la surface cytosolique du réticulum endoplasmique lisse (Murray, 2000). Quantitativement, le foie est le site de biotransformation par les CYP le plus important, cependant, les intestins, les reins et les poumons sont aussi des sites connus de métabolisme de phase I (Fersht, 1985; Murray, 2000). La quantité d'enzymes par mg de protéine hépatique est semblable entre les chiens et les humains, plus que chez les chats (Maugras & Reichart, 1979), mais moins que chez les rats, singes et cochons d'inde (Tibbitts, 2003). La quantité de CYP dans le foie par contre, ne prédit pas nécessairement la capacité métabolique des CYP d'une espèce comparativement à une autre pour un même substrat, selon Tibbitts (2003).

Ces enzymes catalysent les réactions d'oxydation et de réduction des produits endogènes, des médicaments et des toxines (Tibbitts, 2003; Samer et al., 2005). Il y a des centaines de CYP identifiés chez l'humain, ces enzymes étant classés selon une nomenclature de familles (premier chiffre), de sous-familles (lettre) et d'isoenzymes (dernier chiffre) selon leur séquence d'acides aminés (Fersht, 1985; Murray, 2000). L'activité cytochromique nécessite le NADPH (nicotinamide adénosine diphosphate réduite) comme cofacteur et le NADPH-cytochrome P450 reductase comme coenzyme (Fersht, 1985; Murray, 2000). La réaction oxydo-réductive inclut le transfert d'électrons du NADPH au NADPH-cytochrome P450 reductase et ensuite au CYP. Cette réaction entraîne une activation réductive d'un atome d'oxygène suivi de son insertion dans le substrat selon l'équation suivante :



où RH est le substrat endogène ou médicament (Fersht, 1985; Murray, 2000). Les CYP ont des substrats spécifiques pouvant se chevaucher d'un enzyme à l'autre, et différer d'une espèce à l'autre (Fersht, 1985; Correia, 2004).

Les enzymes qui métabolisent les médicaments font partie des familles de CYP 1 à 4, ceux qui métabolisent les substances endogènes, des familles CYP 5 et plus (Fersht, 1985; Murray, 2000). Plusieurs enzymes sont inductibles par une variété de médicaments et de contaminants environnementaux, ce qui a pour conséquence d'accélérer la biotransformation hépatique de plusieurs xénobiotiques (Murray, 2000). Ceci est un avantage si les métabolites ne sont pas toxiques et sont rapidement éliminés par la bile ou les reins. Par ailleurs, une production rapide de métabolites actifs ou toxiques peut contribuer à une augmentation de l'efficacité ou de la toxicité du médicament respectivement (Rowland & Tozer, 1995). Certains autres médicaments inhibent

directement un ou plusieurs CYP pouvant ralentir de façon significative le métabolisme d'un médicament concomitant et par conséquent, augmenter son efficacité ou sa toxicité (Fersht, 1985; Murray, 2000). Ainsi, la connaissance des principaux enzymes responsables de la biotransformation d'un xénobiotique est importante afin de prédire les facteurs pouvant influencer son efficacité thérapeutique et incidence d'effets secondaires.

5.3 Polymorphisme génétique

La pharmacogénétique est la science qui explique les effets héréditaires influençant la réponse clinique aux médicaments ainsi que les profils de pharmacocinétique (Brøsen, 2004; Samer et al., 2005). Le polymorphisme des CYP est particulièrement important lorsque le médicament est biotransformé à plus de 50% par un ou plusieurs enzymes polymorphiques, quand il s'agit d'un médicament à indice thérapeutique étroit, ou quand l'activité ou l'incidence/intensité des effets secondaires dépend d'un métabolite formé par un enzyme polymorphique (Samer et al., 2005). Depuis plus de 50 ans, les chercheurs reconnaissent l'importance du polymorphisme génétique des enzymes hépatiques de phase I et II comme facteur important de variabilité interindividuelle clinique observée et des paramètres de pharmacocinétique de plusieurs médicaments (Poolsup et al., 2000; Burchell, 2003; Brøsen, 2004).

Le polymorphisme génétique se définit comme une différence dans l'expression génétique, pouvant être d'un seul acide aminé, d'une fréquence de plus de 1% dans la population et qui génère une distribution bimodale dans la capacité métabolique des xénobiotiques (Poolsup et al., 2000; Samer et al., 2005). Ainsi, le polymorphisme permet la classification d'au moins deux groupes d'individus dans une population, soit les métaboliseurs lents (PM, poor metabolizers) et les métaboliseurs rapides (EM, extensive metabolizers) (Poolsup et al., 2000; Samer et al., 2005). Les CYP2D6 et CYP2C19 sont

les isoenzymes les plus reconnus pour leur polymorphisme génétique de la biotransformation du débrisoquine/spartéine et du S-méphénytoïne respectivement chez les humains (Wrighton et al., 1993; Bertilsson et al., 1997; Poolsup et al., 2000; Yokono et al., 2001; Brøsen, 2004). Un trait récessif autosomal du CYP2C19 est responsable de la sous-population de métaboliseurs lents dans 5% et 20% de la population caucasienne et asiatique respectivement, tandis qu'environ 7 à 9% de la population caucasienne et 1% de la population asiatique font partie des métaboliseurs lents lorsque l'expression du CYP2D6 est absente ou inadéquate à cause de mutations sur le chromosome 22 (Nielsen et al., 1992; Wrighton et al., 1993; Bertilsson et al., 1997; Yokono et al., 2001; Brøsen, 2004). Ce dernier isoenzyme démontre une hétérogénéité allélique importante dans le foie, les intestins et les reins (Brandon et al., 2003; Brøsen, 2004).

L'isoenzyme CYP3A4 est le plus abondant des CYP présents dans les microsomes humains et est responsable de la biotransformation d'un grand nombre de médicaments (Wrighton et al., 1993). Quoique le polymorphisme génétique n'ait jamais été démontré pour le CYP3A4, la présence de multiples sites d'attachement pour les substrats rend cet enzyme susceptible aux interactions médicamenteuses (Wrighton et al., 1993).

Chez le chien, les CYP ne sont pas aussi bien caractérisés que les CYP identifiés chez l'humain et le rat (Trepanier, 2003). Quelques CYP canins ont démontré la présence de polymorphisme, cependant la base génétique de la variation n'a pas encore été caractérisée (Trepanier, 2003). Sept sous-familles de CYP, comprenant huit isoenzymes sont présentement connues dans la population canine (Cribb, 2003). Souvent des isoenzymes comparables (orthologues) entre les chiens et les humains métabolisent les

mêmes substrats cependant, il est possible qu'un substrat métabolisé par un enzyme chez l'homme soit métabolisé par plusieurs enzymes chez le chien (Tibbitts, 2003).

Chez les rats, il y a des différences remarquables dans l'expression constitutive des CYP entre les sexes et les étapes de développement (Cribb, 2003). Ces différences sont aussi présentes chez les humains mais très peu est connu de ces différences chez les chiens et les chats (Gex-Fabry et al., 1990; Yamada & Sugimoto, 2002; Fernandez-Guasti et al., 2003; Consoli et al., 2005; Haduch et al., 2006). En effet, une étude comparative *in vitro* de l'activité microsomale canine, féline et équine a démontré une grande variabilité interspécifique dans la capacité métabolique des microsomes face à différents substrats sans aucune différence significative entre les sexes d'une même espèce (Chauret et al., 1997).

Chez le chat, quatre études *in vitro* ont démontré une capacité hépatique inférieure des CYP félins pour différents substrats, comparée à d'autres espèces (Hietanen & Vainio, 1973; Maugras & Reichart, 1979; Khalil et al., 2001; Kamali et al., 1999). Cette variabilité interspécifique significative complique l'interprétation des études utilisant des substrats ou inhibiteurs humains dans le but de comparer les capacités métaboliques et la spécificité des CYP avec d'autres espèces (Tibbitts, 2003). Contrairement aux chiens et aux rats, il n'existe aucune étude de caractérisation moléculaire et génétique du système microsomal des chats pour identifier les différents isoenzymes présents dans le foie félin. Ainsi, la raison pour laquelle la capacité métabolique du système des CYP de chats est inférieure aux autres espèces est inconnue.

5.4 Enzymes métaboliques de phase II

La nomenclature des enzymes de phase II est semblable à celle des CYP comprenant des familles, des sous-familles et des isoenzymes (Burchell, 2003). L'enzyme

microsomal de conjugaison, l'uridine glucuronyltransférase (UGT), nécessite l'acide glucuronique comme cofacteur (Burchell, 2003). Les isoenzymes de glucuronidation sont responsables de la détoxification des xénobiotiques mais peuvent également causer des toxicités médicamenteuses (Burchell, 2003). Tous les enzymes de phase II sont également sujets au polymorphisme génétique chez l'humain (Chiu & Huskey, 1998; Burchell, 2003; Glatt & Mehl, 2004; Hernandez et al., 2006). De plus, une déficience des N-acétyltransférases (NAT), des sulfotransférases (SULT) et des UGT est reconnue dans la population de chiens, cochons et chats respectivement, ayant pour conséquence de ralentir l'élimination des xénobiotiques spécifiques à ces enzymes, pouvant ainsi causer des toxicités significatives chez ces espèces (Hietanen & Vainio, 1973; Court & Greenblatt, 1997a, b; Trepanier et al., 1997; Chiu & Huskey, 1998; Lin et al., 2004). La déficience féline en glucuronidation de l'acétaminophène semblerait être causée par une déficience quantitative et qualitative de l'isoenzyme UGT1A6 (Court & Greenblatt, 1997a, b; Court, 2000). Une nouvelle technique de clonage a permis d'identifier les gènes *UGT1A* exprimés dans le foie félin (Court & Greenblatt, 2000). Seulement deux isoenzymes ont été reconnus chez le chat, comparativement à 18 chez l'humain, soit les orthologues UGT1A1 et UGT1A2 (Court & Greenblatt, 2000; Burchell, 2003). Une analyse immunohistochimique a confirmé la présence d'un orthologue félin du UGT1A6 possédant cependant, cinq mutations génétiques délétères de l'exon 1 (Court & Greenblatt, 2000). Court et Greenblatt (2000) ont qualifié cet isoenzyme de pseudogène non-fonctionnel et ont suggéré que l'origine de cette évolution mutagénique du UGT1A6 est la faible exposition de cet isoenzyme aux phytoalexins retrouvés dans les plantes, suite au régime alimentaire carnivore des chats (Court & Greenblatt, 2000).

5.5 Métabolisme de phase I de la clomipramine

La biotransformation de la clomipramine est complexe. Cet ADT tertiaire subit une N-déméthylation et une hydroxylation aromatique chez l'humain (Nielsen et al., 1996; Wu et al., 1998) et le rat (Krüger et al., 1986). La déméthylation entraîne la formation de la DCMP. La clomipramine et la DCMP sont ensuite hydroxylées pour former le 2- et 8-hydroxyclopmipramine et le 2- et 8- hydroxydesméthylclomipramine (hydroxyDCMP) (Balant-Gorgia et al., 1986; Wu et al., 1998; Brøsen, 2004). La DCMP peut être de nouveau déméthylée pour former la didesméthylclomipramine (DiDCMP) (Nielsen et al., 1992). Les métabolites hydroxylés sont excrétés sous forme de conjugués glucuronidés dans l'urine à 2% et 5% pour l'hydroxyclopmipramine et l'hydroxyDCMP respectivement (Faigle & Dieterle, 1973; Nielsen et al., 1994). L'excrétion des métabolites par la bile chez les rats et les chiens est plus rapide que par l'urine chez les humains (Faigle & Dieterle, 1973).

Plusieurs études humaines *in vivo* ont démontré l'implication du CYP2D6 comme isoenzyme principalement responsable de l'hydroxylation de la clomipramine et de la DCMP, tandis que les CYP3A4, CYP2C19, CYP2C9 et CYP1A2 ont été identifiés comme isoenzymes catalysant la déméthylation (Balant-Gorgia et al., 1986; Nielsen et al., 1996; Wu et al., 1998; Yokono et al., 2001; Bertilsson et al., 2002; Grasmäder et al., 2004; Vandel et al., 2004) (Fig. 19).

Une étude *in vitro* a également démontré la présence du N-oxyde formé par les FMO présentes dans les microsomes de rats (Krüger et al., 1986). Ces enzymes catalysent l'oxydation au niveau de l'atome d'azote, de soufre et de phosphore plutôt que l'atome de carbone (Wrighton et al., 1993). Aucune étude humaine de métabolisme de la clomipramine ne mentionne la présence de ce métabolisme et son importance est inconnue.

Krüger et coll. (1986) ont remarqué que la déméthylation et la N-oxydation augmentaient linéairement avec l'augmentation de la concentration de la clomipramine, tandis qu'une saturation d'hydroxylation était observée, sauf pour la formation du 8-hydroxyclozapramine (Krüger et al., 1986).

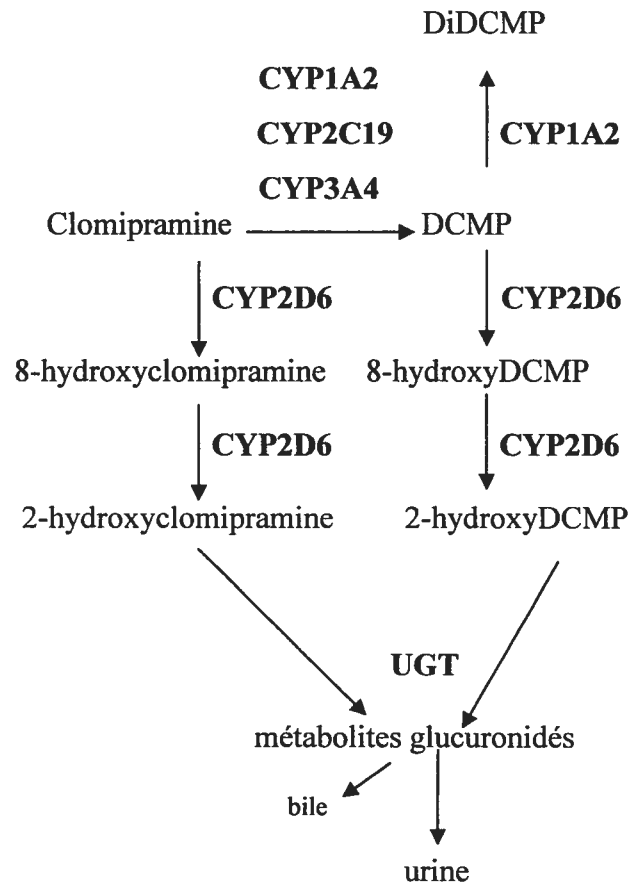


Figure 19 – Biotransformation de la clomipramine par le système microsomal de phase I et de phase II chez les humains (Nielsen et al., 1996). DCMP=desméthylclomipramine; hydroxyDCMP

=hydroxydesméthylclomipramine; DiDCMP=didesméthylclomipramine; CYP=cytochrome P450; UGT=uridine glucuronyltransférase

Ainsi, ces nombreuses études humaines et murines (modèle animal) de métabolisme expliquent, en partie, pourquoi le polymorphisme génétique (CYP2D6, CYP2C19) et les interactions médicamenteuses (CYP3A4) sont d'importants facteurs entraînant une grande

variabilité interindividuelle dans la réponse clinique et des paramètres de pharmacocinétique de cet ADT dans la population humaine.

L'âge peut également influencer la réponse clinique aux antidépresseurs. Les personnes âgées ont tendance à accumuler la DCMP de par leur capacité d'hydroxylation inférieure et par conséquent, exhiber plus d'effets secondaires (Stage et al., 2002). Les adolescents et jeunes adultes ont une faible réponse liée aux antidépresseurs noradrénergiques comparée aux antidépresseurs sélectifs pour les récepteurs sérotoninergiques (Mulder et al., 2003). Des chercheurs ont suggéré que l'immaturation des systèmes noradrénergiques à l'adolescence serait à l'origine de l'échec thérapeutique souvent rencontré chez ces patients avec l'utilisation de la nortriptyline (Mulder et al., 2003).

Les différences de réponse clinique antiobsessionnelle entre les sexes avec l'administration de la clomipramine suggèrent une relation possible entre le métabolisme, le sexe et l'efficacité clinique de cet antidépresseur (Gex-Fabry et al., 1990; Mundo et al., 1999; Hildebrandt et al., 2003). Les résultats de plusieurs études ont démontré que les femmes ont une capacité d'hydroxylation inférieure aux hommes et tendent à accumuler plus de DCMP avec une administration chronique de la clomipramine (Gex-Fabry et al., 1990; Mundo et al., 1999; Hildebrandt et al., 2003). Contrairement à l'humain, une activité enzymatique d'hydroxylation benzylique supérieure a été observée chez la femelle du rat comparé au mâle dans la biotransformation de la clomipramine (Krüger et al., 1986). Aucun dimorphisme sexuel des paramètres de pharmacocinétique de la clomipramine n'a été établi chez les chiens (King et al., 2000a). Chez les chats, une étude de métabolisme *in vitro* a tout dernièrement identifié une différence statistiquement significative d'activité métabolique entre les microsomes de chats mâles et femelles pour plusieurs substrats (Van

Beusekom et al., 2006). Il n'existe par contre, aucune étude féline ou canine *in vivo* identifiant des différences entre les sexes dans la réponse clinique après l'administration de la clomipramine, ou *in vitro*, démontrant des différences de capacité de biotransformation de cet ADT par les microsomes entre les sexes de ces espèces.

5.5.1 Rôles des métabolites de la clomipramine

Le rôle des métabolites de la clomipramine est important à déterminer afin d'identifier l'influence des métabolites actifs sur le succès thérapeutique et l'incidence des effets secondaires après l'administration de la clomipramine. L'équipe de Benfield (1980) a démontré la grande affinité de la DCMP pour l'inhibition du recaptage de la NE et de la dopamine plutôt que de la sérotonine, dans une étude murine *in vivo*. Cette étude a également démontré par méthode *in vitro* l'activité antimuscarinique de la DCMP sur les muscles lisses gastrointestinaux (Benfield et al., 1980). La déméthylation est considérée comme l'avenue métabolique la plus significative quant à l'incidence des effets secondaires chez les humains (Hewson et al., 1998a; Gex-Fabry et al., 2000; King et al., 2000b; Boothe, 2001). Le ratio métabolique (RM), calculé selon l'équation $C_p \text{ DCMP} / C_p \text{ clomipramine}$ dans les études cliniques ou selon $ASC \text{ DCMP} / ASC \text{ clomipramine}$ dans les études de pharmacocinétique, est souvent manipulé à l'aide de jus de pamplemousse (inhibiteur des phosphoglycoprotéines intestinales) ou d'inhibiteurs des CYP pour atteindre le plus petit ratio possible afin de minimiser les effets secondaires et assurer un succès thérapeutique (Härtter et al., 1995; Shimoda et al., 1995; Nielsen et al., 1996; Oesterheld & Kallepalli, 1997). Le RM moyen des ASC a été calculé à 2.5 et 0.33 pour les humains et les chiens respectivement (Shimoda et al., 1995; King et al., 2000a). Cette remarquable différence entre les deux RM explique le peu d'effets secondaires observés

chez les chiens comparativement aux humains et confirme le besoin de déterminer le RM pour les chats plutôt que de recourir à une extrapolation interspécifique.

Ce n'est que depuis 1995 que l'importance thérapeutique et toxique des autres métabolites a été investiguée (Nuñez & Perel, 1995). Des chercheurs ont démontré le rôle inhibiteur du recaptage de la sérotonine et de la NA du métabolite 8-hydroxyclo mipramine (Nuñez & Perel, 1995). Son action thérapeutique était comparable à celle de la clomipramine, cependant, l'hydroxyclo mipramine et l'hydroxyDCMP possédaient un dixième de l'affinité de la clomipramine et de la DCMP pour les récepteurs antimuscariniques, respectivement. Ces auteurs ont ainsi suggéré que les métabolites hydroxylés contribuent de façon significative au succès thérapeutique, sans toutefois causer des effets secondaires importants (Nuñez & Perel, 1995). L'équipe de Gex-Fabry (1990) a suggéré qu'une capacité d'hydroxylation affaiblie permettrait l'augmentation dramatique de la Cp de la DCMP (jusqu'à 10 fois ou plus), accompagnée par une modeste augmentation de la Cp de la clomipramine.

5.6 Techniques d'étude de métabolisme *in vitro*

Plusieurs études ont démontré l'importance de la récolte et du refroidissement (à l'azote liquide) immédiats du foie après la chirurgie ou l'euthanasie, et la conservation des morceaux de foie à -80°C pour la préservation du potentiel métabolique de ces spécimens (Wrighton et al., 1993). L'avantage de la méthode microsomale est la simplicité de la technique jumelée au coût abordable d'une méthode bien établie (Bertrand et al., 2000; Brandon et al., 2003). Cependant, il existe plusieurs désavantages qui briment l'utilisation universelle des techniques *in vitro* par les autorités régulatrices comme alternative aux

méthodes *in vivo* dans le dépistage de nouvelles entités chimiques (Brandon et al., 2003). Le principal désavantage de la préparation microsomale est sa représentation incomplète de la biotransformation *in vivo*, excluant les phosphoglycoprotéines qui régissent le transport des médicaments à l'intérieur de la cellule intacte et la plupart des enzymes de phase I et II, sauf les CYP et les UGT (Brandon et al., 2003). De plus, seule une analyse **qualitative** de la biotransformation d'un xénobiotique est possible à cause des contraintes des conditions d'incubation et des mesures d'analyse quantitative (Brandon et al., 2003). Néanmoins, les microsomes sont utiles pour l'identification de métabolites et pour les comparaisons des profils métaboliques entre individus et espèces (Brandon et al., 2003).

L'importance des conditions expérimentales des incubations *in vitro* est souvent sous-estimée (Bertrand et al., 2001). Les principaux facteurs régissant le succès d'une étude de métabolisme *in vitro* incluent l'addition du cofacteur approprié nécessaire pour débiter et maintenir une réaction métabolique de phase I, la température de la solution microsomale, la présence d'oxygène, la quantité et la qualité des CYP disponibles pour la réaction métabolique et la concentration du substrat (Bertrand et al., 2001). Le β -NADPH est le cofacteur requis pour procurer l'énergie nécessaire aux microsomes pendant une incubation d'environ une heure, tandis que le système régénérateur NADPH, incluant le β -NADP, le glucose 6-phosphate et le glucose 6-phosphate déshydrogénase, est idéalement utilisé comme source d'énergie renouvelable pour les réactions nécessitant des incubations excédant une heure (Brandon et al., 2003).

Il existe deux méthodes *in vitro* pour l'évaluation du métabolisme de phase I. La première est la **méthode de formation de métabolites** utilisée pour mesurer la Cl_{int} *in*

in vitro des microsomes hépatiques ou hépatocytes (Jones & Houston, 2004). Cette technique utilise plusieurs concentrations de substrats sous condition linéaire, en fonction de la concentration protéinique microsomale et du temps (Jones & Houston, 2004). En général, les incubations sont courtes et les concentrations microsomales faibles pour respecter les exigences de l'équation de Michaelis-Menten présumant une consommation de <10% du substrat (Jones & Houston, 2004). Ainsi, les problèmes d'instabilité de la préparation enzymatique, des liaisons non-spécifiques et d'inhibition du métabolisme par les métabolites formés sont exclus des contraintes de la méthode de formation des métabolites (Jones & Houston, 2004). Cependant, le plus grand désavantage de cette approche est qu'elle nécessite une connaissance antérieure des profils métaboliques du médicament étudié pour assurer une prédiction exacte et précise de la clairance intrinsèque (Jones & Houston, 2004). Ce problème devient encore plus significatif lorsque plusieurs avenues métaboliques sont impliquées (Jones & Houston, 2004).

L'épuisement du substrat est la deuxième approche *in vitro* qui permet de caractériser la consommation du médicament dans le temps (Jones & Houston, 2004). Cette méthode est particulièrement populaire auprès des compagnies pharmaceutiques puisqu'elle permet un dépistage rapide d'entités chimiques pour lesquelles une caractérisation cinétique et une quantification des métabolites ne sont pas nécessaires (Jones & Houston, 2004). Elle exige une consommation d'au moins 20% du substrat durant la période totale d'incubation pour que l'épuisement du substrat soit distingué de la variabilité causée par la méthode analytique et la sensibilité de l'instrument (Jones & Houston, 2004). Par conséquent, les temps d'incubation sont plus longs et les concentrations microsomales plus élevées que pour la méthode de formation des métabolites (Jones & Houston, 2004).

Aucune étude de métabolisme *in vitro* ou *in vivo* évaluant l'importance qualitative et/ou quantitative des métabolites de la clomipramine chez les chiens et les chats après l'administration de la clomipramine n'est publiée dans la littérature. Existe-t-il donc des différences de biotransformation de cet ADT entre ces deux espèces?

Méthodologies

Projet 1. Pharmacocinétique classique de la clomipramine chez les chats

Sujets

Six chattes adultes stérilisées, de 1.5 à 4 ans, pesant entre 3.8 et 5.2 kg, ont fait partie de la première étude. Les chattes étaient logées dans des cages individuelles situées dans un local dont la température, l'humidité et la lumière étaient réglées selon les normes du Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA). Toutes les procédures étaient approuvées par le Comité d'Éthique de l'Utilisation des Animaux (CÉUA) de l'Université de Montréal. Les chattes étaient nourries deux fois par jour avec une diète commerciale sèche (Iams® Original) et avaient accès à de l'eau et à une litière propre *ad libitum*.

Protocole de l'étude

Cette étude comprenait deux phases expérimentales de pharmacocinétique, orale (p.o) et intraveineuse (i.v.), effectuées à deux semaines d'intervalle, dont les particularités sont présentées dans le Tableau XII.

Tableau XII - Protocole de l'étude de pharmacocinétique de la clomipramine chez 6 chats incluant les différentes voies d'administration, les doses et les temps d'échantillonnage de sang des deux phases expérimentales effectuées à deux semaines d'intervalle.

Phase	Voie d'administration	Dose	Temps (heures)
1	oral	2.5 mg*	0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 30
2	intraveineuse	0.25 mg/kg**	0, 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 30

*Clomicalm® comprimé de 5mg obtenu de Novartis Animal Health Canada Inc., On, Canada dose correspondant à approximativement à 0.5 mg/kg;**Anafranil® injectable de 12.5mg/mL, Novartis Farma S.p.A., Va, Italy

Deux cuillères à thé (10 mL) d'une diète commerciale en conserve (Iams® Original) ont été données aux chats immédiatement après l'administration p.o. afin de prévenir les vomissements, tandis qu'une administration de 5 mL de saline a suivi l'administration i.v. pour s'assurer que tout le médicament avait traversé le cathéter. Un repas complet de nourriture sèche (60g ou ½ tasse) a été servi quatre heures après l'administration de clomipramine.

Observations, examen médical et résultats de laboratoire

Toutes les chattes ont subi un examen médical, une hématologie et un profil biochimique avant chaque phase et à la fin de l'étude. Les paramètres de température, du pouls et de la respiration (TPR), et le poids corporel ont été documentés avant et après chaque phase. Le niveau de sédation suite à l'administration de la clomipramine a été subjectivement évalué et documenté à chaque temps d'échantillonnage pendant les deux phases. Une légère sédation était caractérisée par un repos en position sternale (avec ou sans les yeux fermés) et une réaction normale au son et au toucher. Une sédation modérée était également caractérisée par la présence du sommeil en position sternale, mais une difficulté à éliciter une réaction aux stimuli externes, tandis que les signes d'une sédation profonde étaient un sommeil en position latérale et une absence de toute réaction.

Échantillonnage de sang

Dix-huit à 20 heures avant le début de chaque phase expérimentale, un cathéter jugulaire (Intracath®, BD Vialon™ Radiopaque Material, Becton Dickinson, Utah) de 19GA et 30.5 cm de long a été inséré, sous légère sédation, dans la veine jugulaire droite de chaque chat selon une technique antérieurement décrite (Lainesse et al., The Veterinary Record, sous

impression), sauf pour une chatte de la Phase 1. À cause des difficultés de cathétérisation, un cathéter de 22GA et de 20.3 cm de long (Intracath®, BD Vialon™ Radiopaque Material, Becton Dickinson, Utah) a été inséré dans la veine fémorale de cette dernière. Une solution d'héparine (10 IU/ml Hepalean®; Organon Canada Ltd) a été administrée toutes les quatre heures afin d'assurer un bon fonctionnement des cathéters en prévenant la formation de caillots. La technique de deux-seringues de Martin et Rand (1999) a été adaptée et utilisée pour récolter 1.5 à 2 mL de sang à chaque temps d'échantillonnage. Chaque échantillon a été centrifugé à 1800 x g pendant 10 minutes pour extraire le plasma qui a immédiatement été congelé à -20°C jusqu'à l'analyse.

Analyses des Cp de la clomipramine et de la DCMP

Les Cp de la clomipramine et de la DCMP ont été mesurées par HPLC (high performance liquid chromatography) selon une méthode antérieurement décrite pour des échantillons humains (Palego et al, 2000) puis adaptée pour le plasma félin.

Calculs des paramètres de pharmacocinétique

L'analyse de pharmacocinétique des Cp de la clomipramine et de la DCMP a été possible grâce au logiciel WinNonlin® Professional (Version 4.1), en utilisant les approches compartimentales et non-compartimentales. Les ASC, TMS et temps de demi-vie ont été estimés pour chaque voie d'administration, pour les deux analytes. La Cl et le V_{ss} de la clomipramine ont été déterminés pour la voie i.v., tandis que le C_{max} et le T_{max} du principe actif ont été estimés pour la voie orale seulement. Le C_{max} et T_{max} de la DCMP ont été déterminés pour les deux voies. Le temps de demi-vie de la clomipramine a été calculé selon l'équation $0.693/k_{el}$, à partir du profil CT de chaque chatte, tandis que la

biodisponibilité (F) de la clomipramine a été calculée en tenant compte de la différence de dose entre les voies d'administration i.v. et p.o., selon l'équation $F = (ASC_{p.o} \times Dose_{i.v} / ASC_{i.v} \times Dose_{p.o}) \times 100$, supposant une cinétique linéaire de la clomipramine chez les chats. Le RM était calculé selon le ratio de l'ASC de la DCMP sur l'ASC de la clomipramine. Des statistiques descriptives (NCSS 2001) ont été utilisées pour trouver les moyennes, écart-types et CV% pour chaque paramètre de pharmacocinétique estimé.

Projet 2. Pharmacocinétique de population de la clomipramine chez les chats

Sujets

Des chats de diverses races et des deux sexes appartenant à des foyers comprenant un ou plusieurs chats, âgés d'au moins six mois et pesant entre 2 et 10 kg ont été inclus dans cette deuxième étude. Des chats normaux et des chats démontrant des troubles de comportement ont été sélectionnés d'après une liste de critères d'inclusion et d'exclusion (Tableau XIII).

Tableau XIII - Critères d'inclusion et d'exclusion de l'étude de pharmacocinétique de population de la clomipramine chez les chats.

Critères d'inclusion	Critères d'exclusion
âgé de > 6 mois	arythmies, hypertension
stérilisé	hyperthyroïdisme
durée du trouble de > 1 mois	syndrome urinaire félin
fréquence du trouble d'au moins une fois/semaine	mégacolon, constipation
aucun médicament psychotrope dans les 30 jours précédant l'étude	médication concomitante (cimétidine, IMAO, glucocorticoïdes)
	glaucome
	convulsions

Les troubles de comportement incluait le marquage urinaire sur des surfaces verticales, l'élimination inappropriée causée par l'anxiété, l'agression intra et interspécifique, les troubles compulsifs, l'anxiété généralisée et la vocalisation excessive, d'une durée d'au moins un mois et d'une fréquence d'au moins une fois par semaine. Les chats normaux ont été sélectionnés aléatoirement d'une colonie de recherche tandis que les chats avec troubles de comportement ont été référés par des vétérinaires locaux.

Un formulaire détaillé d'observations du comportement (fréquence, intensité et gravité) a été rempli par le propriétaire de chaque chat une semaine avant l'étude. Une consultation comportementale avec une spécialiste en comportement animal a également servi pour la sélection des participants à cette étude et un score d'anxiété, non validé mais utilisé comme base d'observation clinique, a été assigné par la même personne, à tous les chats après une période d'observation de 30 à 60 minutes. Le consentement écrit de chaque propriétaire a été obtenu pour la participation de leur(s) chat(s) à l'étude. Le Tableau XIV illustre l'échéancier du patient durant cette étude.

Tableau XIV - Échéancier du patient lors de l'étude de pharmacocinétique d'une population de chats normaux ou démontrant des troubles de comportement.

Procédures	Pré-étude	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jours 7, 14, 21 & 28
Questionnaire comportemental	*	*			
Consultation comportementale		*			
Examen médical	*	*			
Hémato/biochimie/T4		*			
ECG/Écho vessie		*			
Analyse d'urine		*			
Séance filmée		*			
Score d'anxiété		*			
Hospitalisation		*	*	*	
Étude (prises de sang)			*	*	
Retour au propriétaire				*	
Suivi téléphonique					*

Si tous les résultats hématologiques et urinaires étaient dans les limites établies par le Laboratoire de Pathologie Clinique de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal, les chats sélectionnés étaient logés individuellement dans une cage située dans un local où la température, la lumière et l'humidité étaient réglées selon les normes

du CCPA. Toutes les procédures ont été antérieurement approuvées par le CÉAU de l'Université de Montréal. Les chats ont été nourris deux fois par jour ¼ tasse (30g) d'une diète commerciale sèche (Iams® Original) avec accès *ad libitum* à de l'eau et à une litière propre. Le TPR, le poids et l'appétit ainsi que la fréquence d'urine et de fèces ont été documentés pendant les trois jours d'hospitalisation.

Protocole de l'étude

Un jeûne avec eau de 16 à 18 heures était nécessaire avant le début de l'étude. Le matin de la deuxième journée, chaque chat a reçu une portion d'un comprimé de clomipramine équivalant à une dose entre 0.31 et 0.62 mg/kg d'après un tableau poids-dose préétabli (voir Article 2, Tableau 2, p159). Tout comme pour l'étude de pharmacocinétique classique (Projet 1), deux cuillères à thé (10 mL) d'une diète commerciale en conserve (Iams® Original) ont suivi l'administration orale du comprimé de Clomicalm® dans le but de prévenir les vomissements. Cinq échantillons de sang (1.5 à 2 mL chaque) ont été récoltés par ponction directe de la veine jugulaire ou saphène aux temps 1, 3, 6, 12 et 24 heures post administration. Ces temps d'échantillonnage ont été sélectionnés à partir des profils CT du Projet 1, comme étant les temps représentant le mieux la courbe cinétique moyenne de la disposition de la clomipramine chez les chats. Un repas complet (60 g ou ½ tasse) de diète sèche (ou diète spéciale normalement offerte à la maison) a été servi à tous les chats après la prise de sang du temps d'échantillonnage de 3 heures post administration. Chaque échantillon de sang a été centrifugé à 1800 x g pendant 10 minutes pour extraire le plasma qui a immédiatement été congelé à -20°C jusqu'à l'analyse.

Analyses des Cp de la clomipramine et de la DCMP

Les Cp de la clomipramine et de la DCMP ont été mesurées par une combinaison de chromatographie liquide et de spectrométrie de masse (LC-MS/MS) spécialement adaptée pour cette étude.

Calculs des paramètres de pharmacocinétique et analyses statistiques

Une analyse non-compartmentale a été utilisée pour estimer les paramètres de pharmacocinétique individuels de la clomipramine et de la DCMP pour chaque chat à l'aide du logiciel WinNonlin®, Professional, Version 4.1. L'exposition interne à la clomipramine et au métabolite était mesurée selon les valeurs estimées de l'ASC_{0-24h}. Puisque le choix d'un modèle structural commun pour représenter tous les profils CT des chats de l'étude n'était pas possible selon l'approche pharmacostatistique, la technique STS a servi à calculer les moyennes, écarts type et coefficients de variation des paramètres de pharmacocinétique de la population féline de l'étude à l'aide de statistiques descriptives. Les méthodes statistiques paramétriques comme le test de t, l'analyse des variances (ANOVA) et la régression linéaire ont permis d'évaluer les différences et corrélations potentielles entre les covariables sélectionnées, les doses en mg par kg et les paramètres de pharmacocinétique de la clomipramine (ASC_{0-24h}, C_{max}, T_{max}, Cl/F and V_{ss}/F) et de la DCMP (ASC_{0-24h}, C_{max} and T_{max}), et le RM. De nombreuses covariables physiologiques, comportementales et pathologiques de la population de chats de l'étude ont été utilisées pour investiguer la possibilité de corrélation entre ces covariables et les valeurs moyennes estimées des paramètres de pharmacocinétique de la population féline de l'étude (Tableau XV).

Tableau XV - Covariables physiologiques, comportementales et pathologiques utilisées dans l'établissement des corrélations avec les paramètres de pharmacocinétique de l'étude de population féline, par méthode STS.

Covariables			
Physiologiques	Comportementales	Pathologiques	Autres
race, sexe, âge et catégories d'âge*, poids, TPR, hémocrite, protéines totales, urée, créatinine, alcaline phosphatase, alanine transférase, électrolytes (sodium, potassium et calcium), thyroxine (T4), pH et densité urinaire.	absence ou présence de trouble, type, durée, fréquence, intensité du trouble, score d'anxiété.	anomalies hématologiques, biochimiques ou urinaires.	score de sédation, dose en mg par kg.

*juvenile (< 1.5 an), adulte (1.55 à 6.99 ans), gériatrique (7 ans et plus); STS=méthode à deux-étapes; TPR=température, pouls et respiration.

Une transformation logarithmique des données quantitatives était effectuée, si nécessaire. Des méthodes non-paramétriques ont été utilisées quand la robustesse des méthodes paramétriques était compromise. Les tests de comparaisons ont été effectués à l'aide du Tukey-Kramer, et le test du Chi carré (X^2) a permis de détecter des associations entre les données qualitatives. Un test ANOVA à deux voies a été utilisé pour évaluer les interactions possibles entre deux covariables sur les paramètres de pharmacocinétique de la clomipramine et de la DCMP. Pour toutes les analyses statistiques, $p < 0.05$ était le niveau de signification (NCSS 2001-Pass 2002). Les différences entre les sous-populations de paramètres de pharmacocinétique basées sur les points suggérés par le programme C.A.MAN (Computer-assisted analysis of mixtures) (Böhning et al, 1992) ont été investiguées.

Un score de sédation a été attribué à chaque chat selon les signes cliniques observés six heures post-administration (Tableau XVI). Ce temps a été sélectionné à priori selon les observations effectuées lors de la première étude de pharmacocinétique d'où six heures était le temps d'échantillonnage démontrant une sédation pour les cinq chats après l'administration orale de la clomipramine. Les valeurs estimées de l'ASC_{0-24h} de la

clomipramine et de la DCMP ont été corrélées avec les scores de sédation en utilisant une analyse de régression.

Tableau XVI - Scores de sédation attribués aux chats six heures après l'administration de la clomipramine, en comparaison avec le comportement observé pré-administration lors de la prise de sang pour analyse hématologique.

Score de sédation	Signes cliniques
0	aucun changement de comportement
1	plus coopératif, moins de résistance à la prise de sang, plus calme mais alerte
2	dort en position sternale, répond au son et toucher
3	dort profondément en position latérale, ne répond pas au son et toucher

Projet 3. Étude de métabolisme *in vitro* de la clomipramine

Microsomes hépatiques

Les microsomes hépatiques de rats Sprague-Dawley mâles (n = 111) et de chiens Beagle mâles (n = 5) (20 mg/ml) ont été obtenus de Gentest-BD Biosciences (San Jose, CA). Les foies de 10 chats, cinq mâles et cinq femelles, âgés entre 2 et 12 ans, ont été récoltés après une euthanasie pour raison de surpopulation, et les morceaux de foie de 1 cm² ont immédiatement été congelés dans l'azote liquide et conservés à - 80 °C jusqu'au moment d'homogénéisation. Toutes les procédures ont été approuvées par le CÉUA de l'Université de Montréal. Les microsomes de chats mâles et femelles ont été préparés par centrifugation différentielle selon une méthode antérieurement décrite (Cribb et al, 1996) mais adaptée à cette étude. La Figure 20 représente le protocole utilisé pour les microsomes de chats mâles. Le même protocole a été utilisé pour la préparation des microsomes de chats femelles. La concentration protéinique des fractions microsomales de chaque sexe a été déterminée par spectrophotométrie selon le protocole de Lowry et collègues (1951) en utilisant la trousse de détermination protéinique de Bio-Rad DC (Bio-Rad Laboratories), et l'albumine sérique bovine (BSA) comme standard interne.

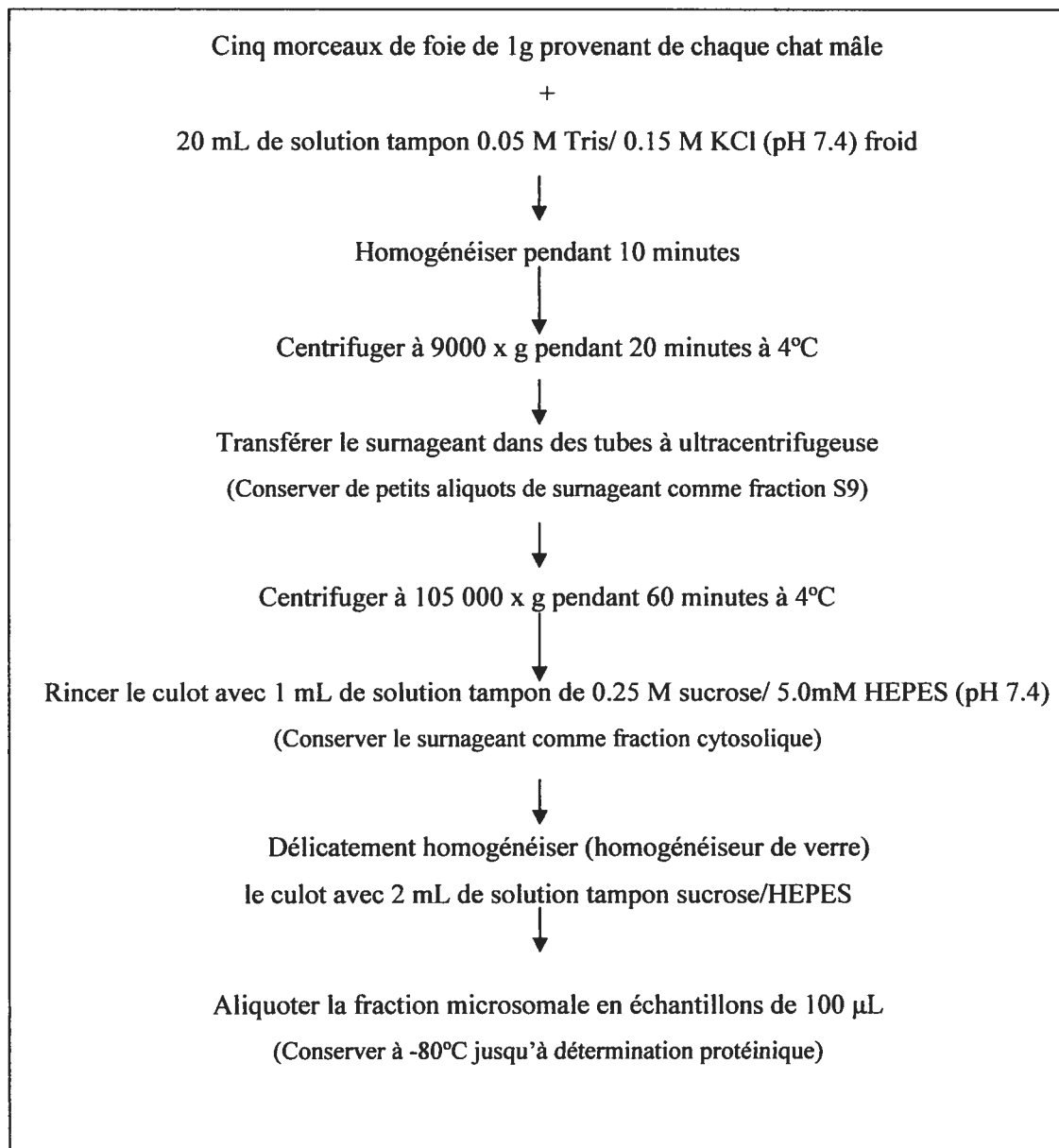


Figure 20 - Protocole de préparation des microsomes à partir des foies de cinq chats mâles utilisés dans l'étude du métabolisme *in vitro* de la clomipramine chez les chats.

Conditions d'incubations

Trois séries de réactions métaboliques *in vitro* ont été effectuées avec les microsomes de chaque espèce par méthode d'épuisement du substrat. Les tableaux XVII, XVIII et XIX

démontrent les conditions d'incubation de chaque série. Toutes les réactions ont été effectuées en duplicata. La biotransformation de la dextrométhorphanne a servi de contrôle positif dans l'investigation de l'activité enzymatique des préparations microsomales de chaque espèce. La solution tampon de phosphate (PBS) (pH 7.4) a été utilisée pour ajuster le volume final à 200 μ L de toutes les solutions. La concentration microsomale finale pour chaque espèce était de 1 mg/mL. Le PBS, les microsomes et les différentes concentrations des deux substrats (dextrométhorphanne ou clomipramine) ont été incubés pendant 5 minutes à 37 °C dans un bain-marie (VWR™) avec oscillations à 40 rpm. Pendant ce temps, les solutions A (1.3mM NADP⁺, 3.3 mM glucose-6-phosphate) et B (0.4 U/mL glucose-6-phosphate déshydrogénase and 3.3 mM chlorure de magnésium) composant le système régénérateur (NRS) obtenu de la compagnie Gentest-BD Biosciences, ont été mélangées et incubées à 37 °C pendant 5 minutes. L'addition du NRS au mélange microsomes-substrat avait pour effet de débiter la réaction métabolique à 37 °C dans le bain-marie. Les contrôles négatifs appropriés (sans microsome, sans NRS ou microsomes bouillis) servaient à détecter la biotransformation non-spécifique. Les réactions étaient arrêtées par l'addition de 3 volumes de méthanol au temps requis et les solutions finales ont été vortexées et centrifugées pendant 5 minutes à 12 000 x g à température ambiante. Tous les échantillons ont été congelés à -20 °C jusqu'à l'analyse.

Détermination quantitative et qualitative de la clomipramine et de ses métabolites

La quantification de la clomipramine et de la DCMP, et l'identification des multiples métabolites formés lors de la biotransformation de la clomipramine par les microsomes ont été déterminées par spectrométrie de masse en tandem avec une trappe ionique.

Analyses descriptives et comparatives des données.

Les profils métaboliques ont été évalués et comparés en décrivant les différents métabolites détectés pour chaque espèce par l'utilisation d'histogrammes. Les ratios des avenirs métaboliques, calculés à partir de la moyenne de l'aire du pic du métabolite formé au temps t sur la moyenne de l'aire du pic de la clomipramine au temps 0, ont été utilisés pour évaluer l'importance relative de chaque avenue métabolique (déméthylation, hydroxylation, N-oxydation) par rapport au métabolisme oxydatif global pour chaque espèce, et ont permis de faire des comparaisons qualitatives préliminaires entre les espèces et entre les chats mâles et femelles. La vitesse de déméthylation (DCMP (μM)/mg protéine microsomale/min) a également été calculée pour faire des comparaisons interspécifiques.

Tableau XVII - Conditions d'incubation du métabolisme *in vitro* de la dextrométhorphone par les microsomes de rats, de chiens et de chats mâles ainsi que de chats femelles (Essai #1 - contrôles positifs).

Espèce	#	PBS (μL)	Mics (10mg/mL) (μL)	Substrat 500 μM dextromé- thorphone (μL)	NRS Solution (μL)	Volume total (μL)	Méthanol (μL)	Temps (min)
Rat	1,2	148	20	20	12	200	800	60
Chien	3,4	148	20	20	12	200	800	60
Chat mâle	5,6	148	20	20	12	200	800	60
Chat femelle	7,8	148	20	20	12	200	800	60

PBS=solution tampon de phosphate; Mics=microsomes; NRS=solution régénératrice de NADPH; μL =microlitre; μM =micromolaire

Tableau XVIII - Conditions d'incubation du métabolisme *in vitro* de la clomipramine utilisées pour les préparations microsomales de chaque espèce (rats, chiens ou chats mâles, ou chats femelles) (Essai #2).

#	PBS (μL)	Mics (10 mg/mL) (μL)	Substrat 1000 μM CMP (μL)	NRS (μL)	Volume total (μL)	Méthanol (μL)	Temps (min)
1,2	180	20			200	600	0
3,4	168	20		12	200	600	60
5,6	160	20	20		200	600	60
7,8	148	20 (bouillis)	20	12	200	600	60
9,10	148	20	20	12	200	600	0
11,12	148	20	20	12	200	600	5
13,14	148	20	20	12	200	600	15
15,16	148	20	20	12	200	600	30
17,18	148	20	20	12	200	600	45
19,20	148	20	20	12	200	600	60

#	PBS (μL)	Mics (10 mg/mL) (μL)	Substrat 100 μM CMP (μL)	NRS (μL)	Volume total (μL)	Méthanol (μL)	Temps (min)
21,22	148	20	20	12	200	600	0
23,24	148	20	20	12	200	600	5
25,26	148	20	20	12	200	600	15
27,28	148	20	20	12	200	600	30
29,30	148	20	20	12	200	600	45
31,32	148	20	20	12	200	600	60

PBS=solution tampon de phosphate; Mics=microsomes; CMP=clomipramine; NRS=système régénérateur de NADPH; min=minutes; μM =micromolaire; μL =microlitre.

Tableau XIX - Conditions d'incubation du métabolisme *in vitro* de la clomipramine utilisées pour les préparations microsomales de chats mâles et femelles respectivement (Essai #3)

# mâles	PBS (µL)	Mics (10 mg/ml) (µL)	Substrat 1000µM CMP (µL)	NRS (µL)	Volume total (µL)	Méthanol (µL)	Temps (min)
1,2	180	20			200	600	0
3,4	148	20	20	12	200	600	0
5,6	148	20	20	12	200	600	30
7,8	148	20	20	12	200	600	60
9,10	148	20	20	12	200	600	90
11,12	148	20	20	12	200	600	120
13,14	148	20	20	12	200	600	180
15,16	148	20	20	12	200	600	240
17,18	148	20	20	12	200	600	360

# femelles	PBS (µL)	Mics (10 mg/ml) (µL)	Substrat 1000µM CMP (µL)	NRS (µL)	Volume total (µL)	Méthanol (µL)	Temps (min)
19,20	180	20			200	600	0
21,22	148	20	20	12	200	600	0
23,24	148	20	20	12	200	600	30
25,26	148	20	20	12	200	600	60
27,28	148	20	20	12	200	600	90
29,30	148	20	20	12	200	600	120
31,32	148	20	20	12	200	600	180
33,34	148	20	20	12	200	600	240
35,36	148	20	20	12	200	600	360

PBS=solution tampon de phosphate; Mics=microsomes; CMP=clomipramine; NRS=système régénérateur de NADPH; min=minutes; µM=micromolaire; µL=microlitre.

Résultats par articles

Article 1. (Projet 1)

Pharmacokinetics of clomipramine and desmethylclomipramine after single-dose intravenous and oral administrations in cats.

Chantal Lainesse¹ BSc, DVM, Diane Frank² DVM, dipl ACVB, Valentina Meucci³

PharmD, Luigi Intorre³ DVM, Giulio Soldani³ MD and Michèle Doucet¹ DVM, DVSc, dipl ACVIM, dipl ACVCP.

¹Département de biomédecine vétérinaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, QC, Canada; ²Département de sciences cliniques, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, QC, Canada; ³Dipartimento di Clinica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Pisa, Pisa, Italia.

Référence:

Lainesse et al. 2006. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **29**, 271-278.

ABSTRACT

A crossover study was performed in 6 adult spayed cats to determine the pharmacokinetics of clomipramine and its metabolite, desmethylclomipramine (DCMP) after intravenous (0.25mg/kg) and oral (0.5mg/kg) single-dose administrations. Plasma clomipramine and DCMP were measured by HPLC at regular intervals for up to 30 hours. Intravenous clomipramine best fit a two-compartmental model yielding an elimination rate constant of 0.037 to 0.09 h⁻¹ from which a mean half-life of 12.3 hours was calculated. Mean clomipramine AUC_{0-∞} (ng · h/ml), clearance (L/h · kg), V_{ss} (L/kg) and MRT (h) values were 652.5, 0.393, 5.0 and 13.5 respectively. Compartmental modeling for clomipramine,

after oral administration, and DCMP after both administrations, produced wide parameter estimates and plots of residuals indicated poor goodness of fit. Non-compartmental analysis yielded mean $AUC_{0-30\text{ h}}$ ($\text{ng} \cdot \text{h/ml}$), C_{max} (ng/ml) and T_{max} (h) of 948.3, 87.5 and 6.2 for clomipramine, and 613.8, 34.8 and 12.8 for DCMP respectively after oral administration. Clomipramine bioavailability was 90%. The present study showed marked pharmacokinetic variability for clomipramine and DCMP through biphasic absorption and potential genetic variability in clomipramine metabolism. It was concluded that population pharmacokinetics would allow better characterization of clomipramine variability that may explain the variability in clinical response noted in cats.

Key words: pharmacokinetics, clomipramine, desmethylclomipramine, cat, antidepressant

INTRODUCTION

Clomipramine is the most potent and selective serotonin re-uptake inhibitor of the tertiary amines from the tricyclic antidepressant family (Boothe, 2001). Desmethylclomipramine (DCMP), an active hepatic metabolite, displays mostly noradrenergic activity and has been identified as responsible for the majority of the side-effects in humans (Benfield et al, 1980, Gex-Fabry et al, 2000). Clomipramine has been used for the treatment of anxiety, fear, phobias, severe depression and obsessive-compulsive behaviors in human patients (Gex-Fabry et al, 2000, McTavish & Benfield, 1990) and also to treat separation anxiety, compulsive behaviors and dominance-related aggression in dogs (Podberscek et al, 1999, Seksel & Lindeman, 2001, White et al, 1999). Although labeled for use in cats only in Australia, clomipramine is used in several countries for the treatment of feline anxiety-related problems such as urine spraying, intercat aggression, excessive vocalization and compulsive behaviors (King et al, 2004, Landsberg & Wilson, 2005, Litster, 2000, Pryor et

al, 2001, Seksel & Lindeman, 1998). Several clinical studies in a limited number of cats have demonstrated clomipramine's efficacy to reduce the frequency and/or intensity of many feline behavioral disorders especially urine spraying (Dehasse, 1997, King et al, 2004, Landsberg, 2001, Landsberg & Wilson, 2005, Litster, 2000, Pryor et al, 2001, Seksel & Lindeman, 1998) although marked interindividual variability in the therapeutic outcome and incidence of side-effects has been observed. Main antihistaminic, adrenergic and antimuscarinic clomipramine-induced side-effects observed in cats are sedation, decreased appetite, pupil dilation, constipation and occasionally urinary retention (King et al, 2004, Landsberg, 2001, Landsberg & Wilson, 2005, Litster, 2000, Pfeiffer et al, 1999, Pryor et al, 2001).

Human studies also show a significant interindividual variation in the clinical efficacy of clomipramine (de Cuyper et al, 1981; Vandael et al, 1982; DUAG, 1999, Gex-Fabry et al, 2000). A large 10-15-fold interindividual variability in plasma concentrations of both clomipramine and DCMP, especially after oral administration, has been attributed to environmental and genetic factors (de Cuyper et al, 1981, Gex-Fabry et al, 2000). Hence, therapeutic drug monitoring in human patients has become a valuable tool to adjust individual posology (Gex-Fabry et al, 2000, DUAG, 1999, Noguchi et al, 1993, Vandael et al, 1982). A moderate three to fourfold interindividual variability has also been reported in concentrations of clomipramine and DCMP in dogs (King et al, 2000a). However, more rapid elimination of clomipramine and DCMP and low incidence of observed clinical side-effects do not warrant the need for therapeutic drug monitoring in this species (Hewson et al, 1998, King et al, 2000a). To the authors' knowledge, clomipramine pharmacokinetic studies have not been reported in cats. Such studies may be useful to explain the apparent

individual variation in therapeutic outcome and manifestations of side-effects, and to assess the need for therapeutic drug monitoring in this species.

This study was conducted to determine the pharmacokinetic parameters of clomipramine and its metabolite, DCMP, in the plasma of cats after single-dose intravenous and oral administrations to provide some insight into the possible explanation for the clinical variability observed in this species.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Six healthy adult spayed female cats, 1.5 to 4 years of age, weighing between 3.8 and 5.2 kg were used in this study. Cats were housed in appropriate sized individual cages in an air controlled room that conformed to accepted guidelines for lighting, temperature and humidity by the Canadian Council on Animal Care (CCAC). All procedures were approved by the Comité d'éthique de l'utilisation des animaux (CÉUA) of the Université de Montréal. Cats were fed a commercial dry diet twice a day and had access to water and a clean litter box *ad libitum*.

Study design

Each cat received clomipramine orally and intravenously, after a 12 hour fast, following a crossover design with a two-week washout period. Phase 1 consisted of one oral (p.o.) administration of ½ tablet/cat of a 5 mg tablet of clomipramine (Clomicalm®, Novartis Animal Health Canada Inc., On, Canada) given with two teaspoons of wet commercial cat food to prevent emesis; the final dose range was 0.49 to 0.58 mg/kg. Phase 2 consisted of an intravenous (i.v.) bolus to these same cats of 0.25 mg/kg/cat of clomipramine

chlorhydrate 12.5 mg/ml (Anafranil®, Novartis Farma S.p.A., Va, Italy) administered through the jugular catheter followed by a 5 ml saline flush (0.9% Sodium chloride Injection USP, Baxter Corporatum, On, Canada). Cats were fed a full meal four hours after each clomipramine administration.

Observations, physical examinations and laboratory data

A physical examination, complete blood count and biochemistry profile were performed on all cats prior to each phase and at the end of the second phase of the study.

Temperature, pulse and respiration rates were evaluated for each cat before and after both phases. Body weights were measured 24 hours prior to each phase. A subjective evaluation of level sedation of clomipramine was performed on all cats after oral and intravenous administrations at each blood sampling times. Signs of mild sedation were considered to be resting in sternal recumbency, responsive to light noise or touch stimuli and no vocalization. Moderate sedation signs were sleep and non-responsiveness to light noise or touch stimuli.

Blood sampling

Eighteen to 20 hours prior to each phase, a 19GA, 30.5 cm Intracath® catheter with wire stylet (BD Vialon™ Radiopaque Material, Becton Dickinson, Utah) was placed in the jugular vein of all cats, except for one cat in Phase 1 which had a 22GA, 20.3 cm Intracath® catheter with wire stylet (BD Vialon™ Radiopaque Material, Becton Dickinson, Utah) inserted in the right femoral vein. Sedation consisted of an intramuscular injection of 0.5 mg/kg acepromazine (Atravet®; Ayerst Veterinary Laboratories) and 0.1 mg/kg butorphanol (Torbugesic®; Wyeth Animal Health) followed 20 to 40 minutes later

by a ketamine (Ketalean®; Bimeda-MTC Animal Health Inc) (5 mg/kg) and diazepam (Diazepam Injection USP; Sabex®) (0.2 mg/ml) mixture given intravenously. Catheters were flushed at least every 4 hours with 1 ml of 10 IU/ml heparin-saline solution (Hepalean®; Organon Canada Ltd) to ensure patency.

Blood sampling times for Phase 1 (p.o) were 0 (pre-administration), 15, 30, 60 minutes and 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24 and 30 hours post-treatment, whereas blood sampling times for Phase 2 (i.v.) were 0 (pre-administration), 5, 15, 30 and 60 minutes and 2, 4, 6, 8, 12, 24, 30 hours post-treatment. A modified two-syringe technique was used to collect 1.5-2 ml of blood at each sampling time (Martin & Rand, 1999). Plasma was harvested and frozen at -20°C until analyzed.

Measurement of plasma clomipramine and desmethylclomipramine concentrations

Clomipramine, desmethylclomipramine, prometazine, triethylamine and sodium hydroxide were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Acetonitrile, methanol and hexane were of HPLC grade and the other reagents were of analytical grade (Baker Analyzed® Reagent, J. T. Baker, Deventer, Holland). Standard stock solutions (10µg/ml) of clomipramine, desmethylclomipramine and prometazine were prepared in methanol and were stored at – 20°C until analysis.

Plasma concentrations of clomipramine and desmethylclomipramine were assayed using a previously published method (Palego and others, 2000) with slight modifications. The HPLC analysis was performed on a Jasco system consisting of a 980PU pump, a 975UV-Vis detector (Jasco, Tokyo, Japan). The column was a Spherisorb C₁₈, 150x4 mm, 3.5 µm (Waters, Milford, MA) with a pre-column filled with the same material. The mobile phase consisted of 45% acetonitrile and 55% 0.01 M triethylamine in distilled water, with the pH

adjusted to 3.0 by dropwise addition of 85% phosphoric acid. The mobile phase was filtered via a Millipore (Milford, MA) system and degassed. The flow-rate was set at 1.2 ml/min and the wavelength at 210 nm. Standard curves were constructed using control serum harvested from untreated cats. Aliquots of the stock solutions of clomipramine and desmethylclomipramine were added to 0.5 ml of serum to achieve drug concentrations equivalent to 10, 25, 50, 100, 250 and 500 ng/ml. Following addition of 10 μ l of the internal standard (prometazine 5 μ g/ml in methanol), the tubes were vortex-mixed for 30 seconds. Sodium hydroxide 5.0 M (500 μ l) and hexane (3 ml) were added to this mixture. The tube was capped, vortex-mixed for 30 seconds and centrifuged for 3 min at 3000 rpm. The organic layer was transferred into a fresh tube and the extraction procedure was repeated two more times. At the end of the third extraction, the organic phase was dried under nitrogen gas at 40°C. Prior to injection, the resulting residue was reconstituted with 50 μ l of methanol. The samples were vortex-mixed for 30 seconds and an aliquot (20 μ l) was injected onto the chromatographic system. Standard curves were obtained weekly by plotting the peak-area ratios of the drugs to internal standard against drug concentrations. Serum samples (0.5 ml) from treated cats were subjected to the extraction procedure described above and clomipramine and desmethylclomipramine concentrations were determined from the linear regression line of the standard data. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for both clomipramine and desmethylclomipramine were 1 ng/ml and 5 ng/ml, respectively. The recoveries of clomipramine, desmethylclomipramine and prometazine were 80 \pm 3%, 82 \pm 2% and 79 \pm 3%, respectively. The intra- and inter-assay coefficients of variation (CV) were <10% for each compound.

Pharmacokinetic calculations

Pharmacokinetic analysis of clomipramine and DCMP plasma concentrations was performed with WinNonlin® Professional, Version 4.1 (Pharsight Corp., Palo Alto, CA), using compartmental and non-compartmental approaches. The AUC (area under the concentration versus time curve), MRT (mean residence time) and $t_{1/2}$ (elimination half-life) were determined for each route of administration for both clomipramine and DCMP. Clomipramine clearance (Cl) and volume of distribution at steady-state (V_{ss}) were determined for the i.v. route and maximum plasma concentration (C_{max}) and time to reach maximum plasma concentration (T_{max}) for the p.o. route. In addition, DCMP C_{max} and T_{max} were determined for both i.v. and p.o. routes. Half-life was calculated as $0.693/k_{el}$, where k_{el} was the elimination rate constant of the terminal phase of the plasma concentration versus time curve. Bioavailability (F) of clomipramine was calculated by adjusting for the dose difference between the i.v. and p.o. administrations, assuming linearity, according to the following equation:

$$F = \frac{AUC_{p.o.} \times Dose_{i.v.}}{AUC_{i.v.} \times Dose_{p.o.}} \times 100$$

The metabolic ratio (MR) was determined as the ratio of DCMP AUC to clomipramine AUC.

RESULTS

Clomipramine was well tolerated by all cats, however, a difference in manifestation of side-effects was evident. While all cats had dilated pupils two hours after both administrations, the oral route resulted in two out of five cats (Cats C and F) with no signs of sedation and 3/5 cats demonstrating mild sedation (resting in sternal recumbency, eyes

closed, responsive to light noise or touch stimuli and little to no vocalization). After i.v. administration, none (Cat C) to mild (Cats B, D and F) and moderate sedation (Cats A and E) (asleep, non-responsive to light noise or touch stimuli) were evident. Cat E demonstrated prolonged sedation effect after oral and i.v. administrations of 96 and 48 hours respectively as evidenced by decreased appetite and lethargy. One cat was excluded from the study due to malfunctioning and accidental removal of the femoral catheter prior to the beginning of the oral phase. All vital signs and biochemistry values remained within normal range throughout the study.

Mean log concentration versus time curve demonstrated variability between subjects for clomipramine and DCMP after i.v. administration (Fig.1). Compartmental analysis of clomipramine yielded a two-compartmental model after i.v. administration for all six cats (Table 1). Compartmental modeling for clomipramine, after oral administration, and DCMP, after both intravenous and oral administrations, produced wide parameter estimates while plots of residuals and of predicted values indicated poor goodness of fit. Non-compartmental individual and mean pharmacokinetic parameter estimates for clomipramine and DCMP following single-dose i.v. and p.o. administrations are summarized in Tables 2 and 3, respectively. Clomipramine plasma concentrations after oral administration demonstrated non-continuous absorption phases in all cats, evident as double peaks (Fig. 2). Bioavailability (F) of clomipramine was estimated after non-compartmental and deconvolution (WinNonlin® Professional, Version 4.1, Pharsight Corp., Palo Alto, CA) analyses (Table 4).

Following i.v. administration, the contribution of the extrapolated part of the $AUC_{0-\infty}$ was acceptably low for clomipramine (mean, 10.7%; range, 5-15%; n = 6) but very large for DCMP (mean, 45%; range 11-88%; n = 6). After oral administration, the extrapolated part

of $AUC_{0-\infty}$ was large for clomipramine (mean, 22 %; range, 8-46%, n = 5) and unavailable for Cats B, C and E for DCMP but large for Cat D (34%) and Cat F (23%). Hence, mean experimental MR and F values were calculated from mean $AUC_{0-30\text{ h}}$ for both clomipramine and DCMP. Mean clomipramine $AUC_{0-30\text{ h}}$ after i.v. administration from non-compartmental analysis was $572.2 \pm 82.3\text{ ng} \cdot \text{h/ml}$.

DISCUSSION

Clomipramine is frequently used for the treatment of anxiety-related behaviors in cats, especially urine spraying, with unpredictable outcome. To the authors' knowledge, this is the first pharmacokinetic study of clomipramine reported in cats. The time to peak plasma concentration of clomipramine in cats was longer than in humans (T_{max} of 3h) (Evans et al, 1980, Gex-Fabry et al, 2000) and dogs (T_{max} of 1.2h) (Hewson et al, 1998, King et al, 2000a). Clomipramine appears to have a large steady-state volume of distribution (V_{ss}) in all three species, however, in humans the V_{ss} is considerably larger (16.6L/kg) (Gex-Fabry et al, 2000) than in cats and dogs (3.7 L/kg) (King et al, 2000a). Clomipramine MRT after oral administration in cats was four times longer than canine MRT (3 h) (King et al, 2000a) and four times shorter than human MRT (47.2 h) (Herrera et al, 2000). Not surprisingly, in light of the above differences, mean feline terminal plasma half-life of clomipramine was more than double the reported canine terminal plasma half-life (5 h) (King et al, 2000a) but less than the average human terminal plasma half-life of 20 h (Evans et al, 1980, Gex-Fabry et al, 2000).

After i.v. administration, two subgroups of cats can be identified through differences in their clomipramine pharmacokinetic profiles. Cats A, B and F appear to eliminate the parent drug slightly faster than Cats C, D and E as evidenced by higher clearance, lower

MRT and lower terminal plasma half-life. On average, during this terminal phase of elimination, approximately 6.3% of the residual amount of clomipramine was eliminated per hour in these cats or 8.4% for Cats A, B and F and 4.3% for Cats C, D and E. Consequently, Cats A, B and F had lower overall exposure (AUC and AUMC) to clomipramine than the other subgroup as well as the lowest values of DCMP AUC, AUMC and MRT. Reasons for the differences in pharmacokinetic parameters between these two subgroups are unknown and do not seem to correlate with clinical manifestations of side-effects observed. Intraindividual variability may also have contributed to such pharmacokinetic variation. However, as none of the treatments were repeated in the same cat, it was not possible to assess this variability.

Mean feline body clearance of clomipramine was low according to overall established extraction ratio breakpoint values (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004). Assuming that plasma clearance equals blood clearance, and cardiac output for an average sized 4.5 kg cat is approximately $135 \text{ ml/kg} \cdot \text{min}$ ($180 \times \text{body weight}^{-0.19}$) or $8 \text{ L/h} \cdot \text{kg}$, the mean feline overall extraction ratio (E) for clomipramine was 5% (total clearance/cardiac output \times 100). This value represents the percentage of clomipramine being cleared by the body during a single passage through the clearing organs and is proportional to the body clearance. This is a desirable extraction ratio for a drug given orally since little clomipramine will be metabolized by a first-pass effect. As it is estimated that 30% of the cardiac output is diverted to the liver (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004), the feline clomipramine clearance in this study was six times slower than the estimated feline hepatic blood flow of $2.4 \text{ L/h} \cdot \text{kg}$. Interestingly, the human and dog clomipramine clearances are $0.65 \text{ L/h} \cdot \text{kg}$ (Gex-Fabry et al, 2000) and $1.4 \text{ L/h} \cdot \text{kg}$ (King et al, 2000a), respectively. In

comparison to the cat, clomipramine clearances for a 70kg person and 20 kg dog are considered to be medium ($E = 13\%$) and medium to high ($E = 23\%$), respectively. Consequently, a higher bioavailability (F), through a lower overall extraction ratio, is expected for cats compared to humans and more so compared to dogs. As such, mean feline clomipramine F from this study was 90%, whereas human F has been reported to be 50% (Gex-Fabry et al, 2000) and canine F to be 16% (King et al, 2000a). This interspecies variation may reflect differences in the extent of the first-pass effect, widely recognized in humans (Evans et al, 1980, Gex-Fabry et al, 2000) and also reported in dogs (King et al, 2000a, King et al, 2000b). Intravenous and oral $AUC_{0-\infty}$ values with different administered doses must be cautiously compared as nonlinear pharmacokinetic studies have been reported in some humans and dogs during steady-state, believed to be caused by a tendency for saturation of hydroxylating enzymes in the liver (DUAG, 1999, Kuss & Jungkunz, 1986, King et al, 2000b). Although the extent of plasma protein binding of clomipramine in cats was not measured in this study, it is possible that it may also have contributed to interspecies variation especially in differences in clearance and volume of distribution.

The presence of a double peak during the absorption phase for all cats, after oral administration, resulted in a wide interindividual variability in bioavailability.

Deconvolution analysis better reflected the entry signal through the gastrointestinal tract of the individual absorptions and accurately measured the rate and extent of the bioavailability by taking into account the presence of the double peak, compared to non-compartmental analysis. The presence of these non-continuous, biphasic absorption patterns may have been related to a food effect. Clomipramine is lipophilic with a high

solubility and is known to be completely absorbed through the gastrointestinal tract in humans (Faigle & Dieterle, 1973). Although all cats were fasted for more than 12 hours, the two teaspoons of wet food given after administration of the drug to prevent emesis may have resulted in an initial portion of the dissolved medication passing into the intestine where it was quickly absorbed (first peak). A second larger portion of the dose may have been delayed by gastric retention of the food-clomipramine mixture and may have later passed into the duodenum (second peak). If the two teaspoons given with clomipramine were not sufficiently large to be considered a meal, the interdigestive migrating motility complex which occurs in a fasted stomach could offer another explanation for the presence of double peaks (Yin et al, 2003). This phenomenon has been described for ranitidine in humans (Yin et al, 2003) and alprazolam in rats (Wang et al, 1999). However, clomipramine's high solubility would make this explanation less likely (Ansari et al, 2004). Secondary distal absorption or enterohepatic recycling can also cause double peaks (Yin et al, 2003). In this study, double peaks were not evident after i.v. administration which precludes enterohepatic recycling. A pharmacokinetic study between fed and fasted dogs did not show evidence of the double peak effect and concluded that the presence of food upon clomipramine administration should not cause any clinically important differences (King et al, 2000a). Further studies are needed in cats to assess the influence of feeding on clomipramine absorption and pharmacokinetic parameters, as well as the clinical significance of these findings.

Desmethylclomipramine is the main metabolite known to be responsible for most of the adrenergic and anticholinergic side effects in humans, compared to the serotonergic effect of clomipramine (Benfield et al, 1980, Oesterheld & Kallepalli, 1997, King et al, 2000a).

Therefore, DCMP plasma concentrations are used as an indication of the therapeutic outcome and incidence of side-effects in human patients (Gex-Fabry et al, 1990, Oesterheld & Kallepalli, 1997). All feline DCMP pharmacokinetic parameter estimates were highly variable (CV 22-58 %). Compared to other species, T_{max} was longer than in humans (T_{max} of 4 h) (Evans et al, 1980, Gex-Fabry et al, 2000) and dogs (T_{max} of 1-3 h) (King et al, 2000a, Hewson et al, 1998)). This longer feline DCMP T_{max} may reflect a slower gastrointestinal absorption of clomipramine and/or a slower demethylation process by cats compared to humans and dogs. A low metabolic ratio (MR) correlates with successful clinical outcome and lower incidence of side-effects in humans (Gex-Fabry et al, 1990, Oesterheld & Kallepalli, 1997, Nielsen et al, 1996). The average human MR is 2.5 (Gex-Fabry et al, 2000), compared to 0.33 for the dog (King et al, 2000a). The wide interindividual variation in pharmacokinetic parameters and high metabolic ratio are important reasons justifying therapeutic drug monitoring in humans. Genetic polymorphism and environmental factors influencing the cytochrome P450 enzymes responsible for the metabolism of clomipramine are major contributors of pharmacokinetic and clinical variabilities in humans (Gex-Fabry et al, 1990, Grasmäder et al, 2004). Although a moderate canine interindividual variability is identified, a rapid elimination of clomipramine and low metabolic ratio result in fewer side-effects in the canine patient, hence the lack of the need for therapeutic drug monitoring in this species. Despite an 8 fold difference in the clomipramine dose between the cat (0.5 mg/kg) and the dog (4 mg/kg), mean canine desmethylclomipramine C_{max} of 42.7 ng/ml was similar to the feline C_{max} from this study (King et al, 2000a). Furthermore, the mean overall exposure to the metabolite (AUC_{0-30 h}) was almost five times greater in the cat than in the dog (131.7 ng/ml) (King et al, 2000a) and resulted in a feline metabolic ratio of 0.64, twice that of the

canine MR. This difference may result from a more extensive demethylation potential, a lesser hydroxylating ability, and/or an expected weaker glucuronidation capacity of cats compared to dogs for this drug, as suggested by King and others, 2004. Moreover, this MR for cats may have been underestimated in this study since it was calculated using $AUC_{0-30\text{ h}}$ and not $AUC_{0-\infty}$. A lower MR was noted after i.v. clomipramine administration in cats compared to the MR value obtained after oral administration. As the fraction of a dose converted to a metabolite is independent of the route of administration when metabolism primarily occurs within the liver (Rowland & Tozer, 1995) and assuming first-order elimination, this difference in MR between p.o. and i.v. administrations seen in this study may reflect a partial gastrointestinal metabolism by the feline intestinal wall. A direct correlation between MR and intensity of side-effects could not be established in this study. Further detailed studies are needed to characterize subgroup differences and establish the presence of a concentration-effect relationship in cats.

In summary, the wide interindividual variability in pharmacokinetic parameter estimates for clomipramine and especially DCMP, observed in this study, may partly explain the variability in therapeutic response and severity of side-effects seen in cats with clomipramine use. A greater bioavailability and metabolic ratio, as well as a slower clearance for clomipramine and possibly DCMP in cats, could potentially result in an increase in side-effects or sensitivity of some cats compared to dogs. On the other hand, a lower feline MR may lessen the need for therapeutic drug monitoring (TDM) in cats as required in humans. Further studies are required to validate the need for TDM use in cats. Furthermore, medical and behavioral conditions may alter pharmacokinetic parameter estimates as seen in dogs (Hewson et al, 1998) and human patients (Gex-Fabry et al, 2000,

McTavish and Benfield, 1990) thus cautious intraspecific extrapolation between healthy and troubled cats should be exercised. In order to further characterize the feline interindividual pharmacokinetic variability, a population pharmacokinetic study would take into account pathophysiological variables and metabolic studies may detect a feline genetic polymorphism in clomipramine metabolism as seen in humans. Further investigations into potential causes of the pharmacokinetic variability are warranted.

Table 1. Pharmacokinetic parameters of clomipramine estimated from a two compartment model in plasma of 6 cats following i.v. administration of a single dose of 0.25 mg/kg of clomipramine.

Cat	A	B	C	D	E	F	Mean	SD	CV%
Parameter									
AUC (h . ng/ml)	570.2	541.7	777.8	687.8	795.7	542.0	652.5	117.2	18.0
Alpha (1/h)	0.488	0.790	0.830	0.462	0.416	0.462	0.575	0.184	32.1
Beta (1/h)	0.085	0.090	0.050	0.042	0.037	0.076	0.063	0.023	36.5
A (ng/ml)	86.0	91.4	146.3	89.9	102.3	75.7	98.6	24.9	25.3
B (ng/ml)	33.4	38.5	29.3	20.6	20.4	28.7	28.5	7.1	25.0
Cmax (ng/ml)	119.4	130.0	175.6	110.5	122.7	104.4	127.1	25.4	20.0
K10 (1/h)	0.209	0.240	0.230	0.161	0.150	0.193	0.197	0.036	18.4
AUMC(hxhxnng/ml)	5008.1	4853.9	12586.2	12235.3	15422.7	5338.5	9240.8	4706.7	50.9
MRT (h)	8.78	8.96	16.18	17.8	19.38	9.85	13.49	4.83	35.8
Vss (L/kg)	4	4	5	6	6	5	5	0.9	17.9
K12 (1/h)	0.166	0.342	0.477	0.223	0.199	0.164	0.262	0.124	47.4
K21 (1/h)	0.198	0.298	0.180	0.120	0.100	0.182	0.180	0.070	38.8
Cl (L/kg . h)	0.438	0.461	0.321	0.363	0.314	0.461	0.393	0.069	17.5
t1/2 (h)	8.2	7.7	13.9	16.5	18.7	9.1	12.3	4.7	38.0

AUC = area under the concentration vs time curve from 0- ∞ ; Cmax= maximal plasma concentration; AUMC=area under the moment curve; MRT=mean residence time; Vss= estimated volume of distribution at steady-state; Cl=clearance; t1/2=terminal half-life; SD=standard deviation; CV=coefficient of variation

Table 2. Individual and mean pharmacokinetic parameters estimated from non compartmental analysis of plasma concentration of clomipramine from healthy cats given a single dose of clomipramine oral (n=5) at 0.5 mg/kg respectively.

Cat	A	B	C	D	E	F	Mean	SD	CV %
oral									
AUC ₀₋₈ (ng · h/ml)	NDA	1050.8	1349.2	810.6	2011.9	1650.7	1374.6	475.9	34.6
AUC _{0-30 h} (ng · h/ml)	NDA	565.2	1003.5	734.2	1593.9	844.6	948.3	394.7	41.6
Cmax (ng/ml)	NDA	25.8	85.7	65.2	148.0	113.0	87.5	46.4	53.0
Tmax (h)	NDA	12.0	4.0	6.0	6.0	3.0	6.2	3.5	56.3
AUMC _{0-30 h} (ng · h ² /ml)	NDA	9569.7	9681.4	8174.9	18598.0	7300.7	10664.9	4544.8	42.6
MRT _{0-30 h} (h)	NDA	16.9	9.7	11.1	11.7	8.6	11.6	3.2	27.7

AUC = area under the concentration vs time curve; Cmax= maximal plasma concentration; Tmax=time at maximal plasma concentration; AUMC=area under the moment curve; MRT=mean residence time; SD=standard deviation; CV=coefficient of variation; NDA=no data available.

Table 3 - Individual and mean pharmacokinetic parameters estimated from non-compartmental analysis of plasma concentrations of desmethylclomipramine from healthy cats given a single dose of clomipramine i.v.(n=6) and oral (n=5) at 0.25 mg/kg and 0.5 mg/kg respectively.

Cat	A	B	C	D	E	F	Mean	SD	CV %
i.v.									
AUC _{0-30 h} (ng · h/ml)	105.0	181.8	181.0	229.1	253.0	217.7	194.6	52.0	26.7
Cmax (ng/ml)	21.4	32.2	8.5	11.1	9.2	13.8	16.0	9.2	57.4
Tmax (h)	1.0	8.0	4.0	12.0	8.0	6.0	6.5	3.8	58.2
AUMC _{0-30 h} (ng · h ² /ml)	1008.4	1679.3	2791.2	3300.6	3816.7	2770.9	2561.2	1040.1	40.6
MRT _{0-30 h} (h)	9.6	9.2	15.4	14.4	15.1	12.7	12.7	2.7	21.5
MR	0.21	0.34	0.26	0.42	0.39	0.43	0.4	0.1	19.0
oral									
AUC _{0-30 h} (ng · h/ml)	NDA	238.5	517.1	687.4	1060.2	565.6	613.8	298.8	48.7
Cmax (ng/ml)	NDA	17.1	29.1	37.9	53.8	36.0	34.8	13.4	38.5
Tmax (h)	NDA	24.0	12.0	12.0	12.0	4.0	12.8	7.2	55.9
AUMC _{0-30 h} (ng · h ² /ml)	NDA	5217.8	6790.2	10041.6	16200.4	6831.1	9016.2	4382.4	48.6
MRT _{0-30 h} (h)	NDA	21.9	13.1	14.6	15.3	12.1	15.4	3.8	24.9
MR	NDA	0.42	0.52	0.94	0.67	0.67	0.64	0.20	30.4

AUC=area under the concentration vs time curve; Cmax= maximal plasma concentration; Tmax=time at maximal plasma concentration; AUMC=area under the moment curve; MRT=mean residence time; MR=metabolic ratio; SD=standard deviation; CV=coefficient of variation; NDA=no data available.

Table 4. Estimated individual and mean bioavailability (F) in five cats using the $AUC_{0-30\text{ h}}$ of clomipramine and desmethylclomipramine using conventional non compartmental analysis versus after deconvolution.

Method	Non-compartmental analysis					Mean	SD	CV%
Cat	B	C	D	E	F			
F%	53.3	72.1	67.4	121.9	83.6	79.6	26.0	32.6
Method	After deconvolution					Mean	SD	CV%
Cat	B	C	D	E	F			
F%	64.0	91.4	70.0	138.0	86.8	90.0	29.1	32.3

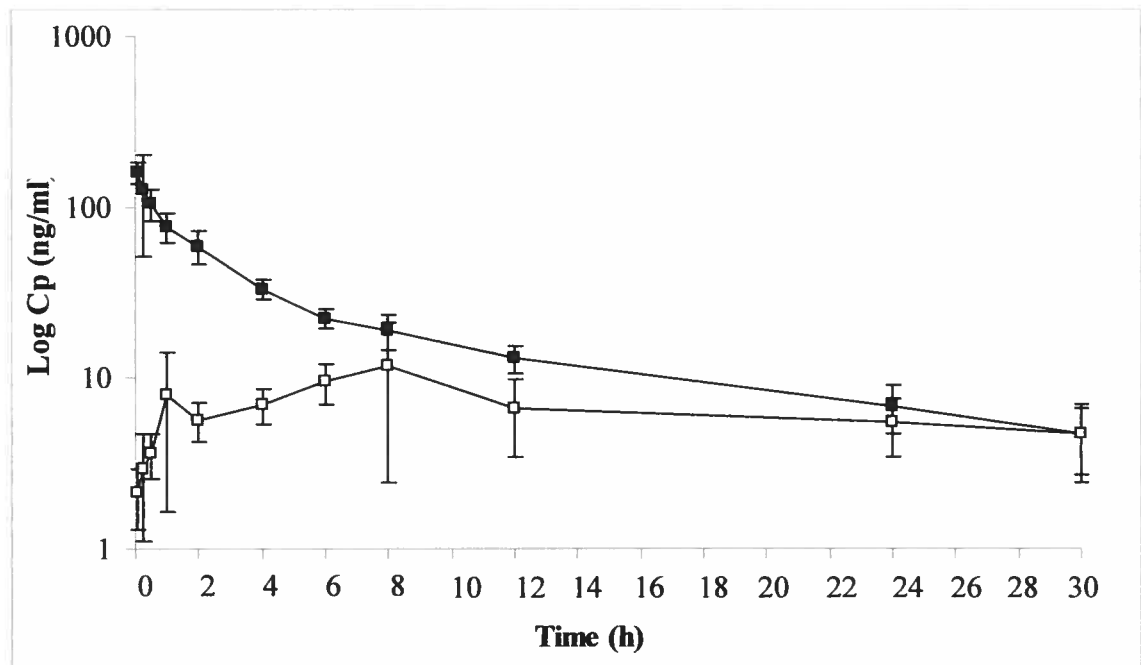


Fig. 1. Mean log plasma concentration versus time curves for clomipramine (■) and desmethylclomipramine (□) in cats following single dose intravenous administration 0.25 mg/kg of clomipramine to 6 healthy cats. Error bars represent standard deviations. Cp = plasma concentration; h = hours.

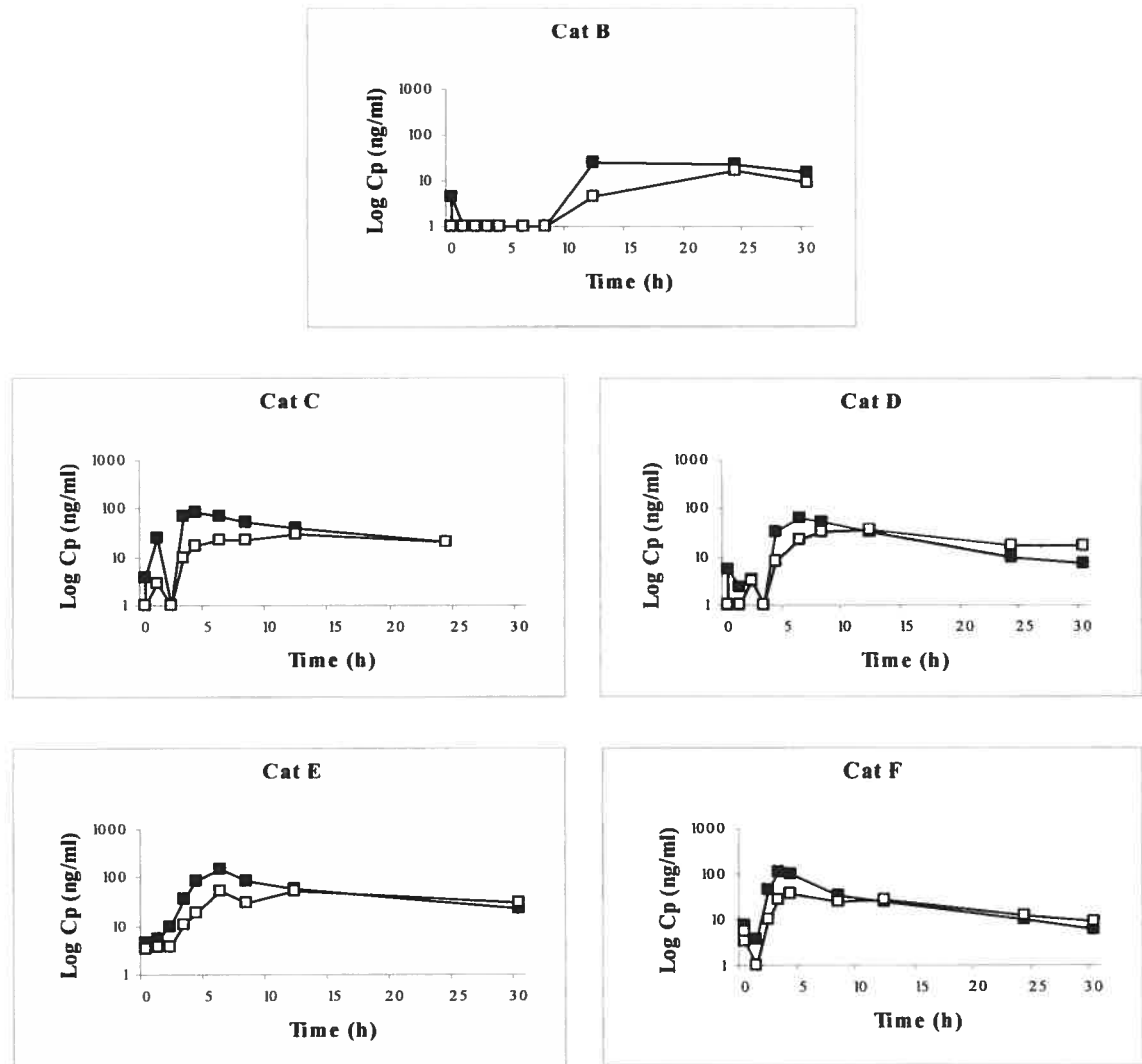


Fig. 2. Individual log plasma concentration versus time curves for clomipramine (■) and desmethylclomipramine (□) in five cats following a single oral dose of 0.5 mg/kg of clomipramine. Cp = plasma concentration; h = hours.

Article 2. (Projet 2)

Effects of physiological covariables on pharmacokinetic parameters of clomipramine in a large population of cats after a single oral administration.

Chantal Lainesse¹ DVM, MSc, Diane Frank² DVM, DACVB, Francis Beaudry¹, BSc, PChem and Michèle Doucet¹ DVM, DVSc, DACVIM, DACVCP.

¹Département de biomédecine vétérinaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, QC, Canada; ²Département de sciences cliniques, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, QC, Canada, J2S 7C6

Référence:

Lainesse et al. 2007. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **30**, 116-126.

ABSTRACT

This study was conducted to confirm an interindividual variability in pharmacokinetic parameters of clomipramine in a large population of cats and to identify potential covariables that would explain the presence of such pharmacokinetic variability after a single dose of Clomicalm®. Clomipramine hydrochloride was administered orally according to a weight-dose chart from 0.32 to 0.61 mg/kg, to 76 cats and five blood samples were then taken by direct venipuncture at 1, 3, 6, 12, and 24 hours. Plasma concentrations of clomipramine and desmethylclomipramine (DCMP) were measured by LC-MS/MS. The Standard Two-Stage technique was used to assess differences and detect correlations between pharmacokinetic parameter estimates and individual covariables. A large interindividual variability in all pharmacokinetic parameters (CV% 64-124) was

detected. Statistically significant gender-related differences were detected in MR and Cl/F, where female cats had a higher mean MR (0.53) and faster Cl/F (0.36 L/h·kg) than males (0.36 and 0.21 L/h·kg respectively). No correlation could be found between clomipramine AUC_{0-24h} or DCMP AUC_{0-24h} and sedation scores. Further feline studies are required to assess these findings after multiple dosing of clomipramine and DCMP to allow clinical extrapolation.

Key words: pharmacokinetics, clomipramine, behavior, cat, population.

INTRODUCTION

Clomipramine hydrochloride (CMP), a tricyclic antidepressant, is a selective serotonin (5-HT) reuptake inhibitor while its active metabolite, desmethylclomipramine (DCMP), has shown to preferentially inhibit norepinephrine reuptake from the presynaptic neuron in an *in vitro* rat cerebral cortex synaptosome model (Benfield et al, 1980). Over the years and through animal models and human clinical trials, several other receptors have shown to be involved in the delayed mode of action of this class of antidepressant such that the mixed monoaminergic effect that maintains functional homeostasis also includes desensitization of presynaptic 5-HT autoregulators and heteroreceptors, downregulation of postsynaptic β -adrenoceptors and increased sensitivity of several postsynaptic 5-HT subtypes (Potter, 1996).

Clomipramine has been used for the treatment of anxiety, fear, phobias, severe depression and obsessive-compulsive behaviors in human patients (Gex-Fabry et al, 2000, McTavish & Benfield, 1990) and is recommended as an adjunct treatment for several behavioral problems such as urine marking, aggression, excessive vocalization and compulsive behaviors in cats (King et al, 2004, Landsberg & Wilson, 2005, Litster, 2000, Pryor et al,

2001, Seksel & Lindeman, 1998), separation anxiety, storm phobia and compulsive behaviors in dogs (Crowell-Davis, 2003, Gauthier et al, 2005, Luescher, 2003, Overall & Dunham, 2002, Podberscek et al, 1999, Seksel & Lindeman, 2001), and compulsive feather picking in birds (Grindlinger & Ramsay, 1991, Juarbe-Diaz, 2000).

In human patients, DCMP plasma concentrations are used to monitor and adjust therapy since a low ratio of DCMP C_p / CMP C_p correlates with successful clinical outcome and lower incidence of side effects (Gex-Fabry et al, 1990, Nielsen et al, 1996, Oesterheld & Kallepalli, 1997). A study in humans demonstrated metabolic differences between sexes and ages reflecting a decreased hydroxylation and glucuronidation clearances in female patients and in older patients (Gex-Fabry et al, 1990). Throughout the years, genetic metabolic polymorphism, physiological (age and gender), and environmental (smoking, alcohol consumption and comedication) factors as well as patient compliance have been identified as potential covariables to explain the variability in pharmacokinetic parameters observed in human patients (Gex-Fabry et al, 1990; Nogushi et al, 1993; Shimoda et al, 1995, DUAG, 1999, Gex-Fabry et al, 2000, Hildebrandt et al, 2003, Mulder, et al, 2003, Shah, 2005, Consoli et al, 2005). Consequently, the wide array of potential influences on plasma concentration of clomipramine and DCMP has led to the requirement for therapeutic drug monitoring in human patients who are prescribed clomipramine (Gex-Fabry, 2000). In dogs, it has been speculated that the rapid clearance of clomipramine and low DCMP plasma concentrations contribute to the fewer side-effects observed clinically in the canine patient thus precluding the need for therapeutic drug monitoring of clomipramine in this species (King et al, 2000a). To date, no gender differences in clinical manifestations or pharmacokinetic parameters have been recognized in dogs.

The pharmacokinetics of oral and intravenous clomipramine has recently been reported in cats (Lainesse et al, 2006). Large interindividual variabilities (CV% 28-56) in all estimated pharmacokinetic parameters, especially the area under the curve (AUC), time to reach maximal plasma concentration (T_{max}), maximum plasma concentration (C_{max}) and bioavailability (F) of clomipramine and AUC, C_{max} and T_{max} of DCMP after oral administration were observed. Possible factors responsible for this variability were thought to be drug absorption, as evidenced by erratic, biphasic absorption patterns of clomipramine and/or hepatic metabolism (Lainesse et al, 2006). In comparison with previous canine studies (Hewson et al, 1998; King et al, 2000a), the cat had a greater oral F and metabolic ratio (MR), defined as the AUC of DCMP over AUC of CMP, and a slower clearance of clomipramine (Lainesse et al, 2006). These differences may explain the greater frequency of side effects or sensitivity of some cats compared to dogs when clomipramine is used clinically.

The objectives of this study were to confirm an interindividual variability in pharmacokinetic parameters of clomipramine in a large population of cats and to identify potential covariables that would explain the presence of such pharmacokinetic variability after a single dose of Clomicalm®.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Single or multi-household cats of various breeds and either sex that were at least 6 months old, weighed between 2 and 10 kg and had been neutered at least two months prior to this prospective clinical study, were enrolled. Normal cats and those suffering from a behavioral problem (troubled cats) were selected for the study. Behavioral problems

included spraying on vertical surfaces, inappropriate urination with an anxiety provoking stimulus, intra- and interspecific aggression, compulsive behaviors, general anxiety and excessive vocalization that had at least one-month duration and a frequency of at least once a week. Cats presenting with arrhythmias, cardiac disease, hypertension, hyperthyroidism, megacolon or history of constipation, feline lower urinary tract disorder, liver disease, seizures or glaucoma, or which had received psychotropic medication, cimetidine, monoamine oxidase inhibitors or glucocorticoids within 30 days of the study were not enrolled in this study. Normal cats were selected randomly from a research colony, whereas troubled cats were referred by local veterinarians. Owners were asked to fill out a pre-study one-week daily observation form on which they noted frequency, intensity and severity of the behavioral problems. When possible, they were also asked to videotape the cat in its own environment showing the behavioral problem and/or social interactions with the other animals in the house. A one hour consultation by a veterinary behaviorist was performed on all referred troubled cats to determine their eligibility for the study. An anxiety score (Table 1) was assigned to each cat within a 60 minute observation period. Written consent was obtained from the owner for participation in the study.

A physical examination and blood work including a complete blood count (CBC) and feline serum biochemistry panel were performed for each cat. A bladder ultrasound, cystocentesis/urinalysis and electrocardiogram were also performed at the start of the study. Cats with abnormal findings were not enrolled in the study. Body weights were carefully recorded using a calibrated Heine pediatric scale. After enrollment in the study, cats were hospitalized and housed in appropriately sized individual cages in an air controlled room that conformed to accepted guidelines for lighting, temperature and humidity by the Canadian Council on Animal Care. They were fed 60 g ($\frac{1}{2}$ cup) of a well

balanced commercial diet (Iams® Original) once a day in the morning with *ad libitum* access to water and a clean litter box with clay substrate (Saular®). Daily weights, temperature, respiration and pulse rates as well as monitoring of feed intake, urination and defecation were performed throughout the three day-hospitalization.

Study design

The study protocol was approved by the Comité d'Éthique de l'Utilisation des Animaux (CÉUA) of the Université de Montréal in accordance with the standards of the Canadian Council on Animal Care. A pre-administration plasma sample was collected (time 0) at the same time as the CBC and biochemistry panel on day 1. Cats were food-fasted for 16-18 hours prior to the start of the pharmacokinetic phase. On the morning of day 2, each cat received a portion of a 5 mg clomipramine tablet (Clomicalm®, Novartis Animal Health Canada Inc., Mississauga, Ontario) corresponding to a dose ranging from 0.31 to 0.62 mg/kg according to a previously set weight/dose chart (Table 2). Cats were given clomipramine orally followed by two teaspoons (10 ml) of a canned commercial diet (Iams® Original) to reduce the risk of emesis. Five 1.5 to 2 ml blood samples were then collected by direct venipuncture from either jugular or saphenous veins at times 1, 3, 6, 12 and 24 hours post-administration. Blood samples were placed in 3 ml glass tubes containing lithium heparin (BDVacutainer™, Franklin Lakes, NJ) and centrifuged for 10 minutes using a Beckman TJ-6 centrifuge at 1800g. The plasma was immediately separated in three 300 ul aliquots and stored at -20 °C until analyzed. A meal (60 g) of dry food (Iams® Original) was given to all cats after the 3 hour blood sample with the exception of six cats that were fed 60g of their own previously prescribed diet brought

from home. All subjects were returned to their owner after collection of the 24-hour blood sample.

Recorded covariables

Physiological covariables included breed, sex, age, weight, temperature, respiration, pulse, hematocrit, total solids, and urea, creatinine, serum alkaline phosphatase, alanine transferase, electrolytes (sodium, potassium and calcium) and thyroxidine (T4) values as well as urine pH and specific gravity. Behavioral covariables included the type, duration, frequency and intensity of the behavioral problem, recorded from the pre-study questionnaire by owners of troubled cats, as well as the anxiety score assigned to each cat. Any hematological, urinary or metabolic abnormalities, not contraindicating the use of clomipramine, were recorded as the pathological covariables. A sedation score was assigned to each cat according to a numerical rating scale at 6 hours post clomipramine administration. A score of 0 was assigned to cats showing no behavioral changes compared to pre-administration observations. Cats that were more cooperative, less resistant to blood sampling, calm but alert were assigned a score of 1 and cats that were sleeping in sternal recumbency, less responsive to sound and touch were given a score of 2. A score of 3 was given to cats sleeping in lateral recumbency and non responsive to external stimulation.

Measurement of plasma clomipramine and desmethylclomipramine concentrations

Clomipramine, desmethylclomipramine and the internal standard promethazine were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA). Chemicals, including acetonitrile, methanol and formic acid, were purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA).

The HPLC system consisted of an autosampler Varian 9100 (Palo Alto, CA, USA) and a Water 625 pump (Milford, MA, USA). The LC-MS/MS system used was a *PESciex* API 3⁺ (*Applied Biosystem/MDS Sciex*, Concord, ON, Canada). Data was acquired on an Apple™ Macintosh® (Silicon Valley, CA, USA) equipped with operation system 7.4. Data acquisition and analyses were performed using MassChrom 1.0 (Concord, ON, Canada). Calibration curves were calculated from the equation $y = ax + b$, as determined by weighted (1/x) linear regression of the calibration line constructed from the peak-area ratios of the drug and the internal standard. The analytical range of the calibration curves was set at 1 to 500 ng/ml.

Using a protein precipitation method, clomipramine and DCMP were extracted from feline plasma. A total of 50 µl of sample was mixed with 250 µl of internal standard solution (10 ng/ml of promethazine in acetonitrile) in a 1.5 ml centrifuge tube. The sample was then vortexed vigorously and then allowed to rest for 10 minutes at room temperature prior to centrifugation. Samples were centrifuged at approximately 12000g for 10 minutes and 250 µl of the supernatant was transferred into an injection vial.

An isocratic mobile phase was used with a Thermo Hypersil Phenyl 100 x 2 mm with particle size of 5 µm column. The mobile phase consisted of acetonitrile and 0.5% formic acid in water at a ratio of 80:20. The flow rate was fixed at 0.7 ml/min and the eluent was split 1:10 prior to introduction into the electrospray source. Twenty µl of the extracted sample was injected and the total run time was set at 2.5 min.

Mass Spectrometry Conditions

The mass spectrometer was interfaced with the HPLC system using a pneumatic assisted electrospray ion source. The N₂ pressure of the nebulizer gas was set at 40 psi and the ESI

electrode was set to 4000V. The declustering potential was set at 15V and the collision energy (E_{lab}) at 18V. The collision gas used was argon at 2.7×10^{14} molecules/cm². The SRM transitions were m/z 315 \rightarrow 86 and 301 \rightarrow 71 and 285 \rightarrow 86 for clomipramine, DCMP and promethazine, respectively. The dwell time was set at 200 msec and the pause time at 5 msec. A simple experiment described by King et al, (2000) was performed and showed negligible impact from ionization suppression on the quantification precision and accuracy caused by possible competition for ionization by extracted endogenous substances.

Precision and accuracy

The reproducibility of the method was evaluated by analyzing six replicates of feline plasma samples fortified with clomipramine and DCMP at the nominal concentration of 1, 50 and 500 ng/ml in three analytical runs. The precision was evaluated and the CV% observed was 6.5, 5.3 and 4.1 at 1, 50 and 500 ng/ml, respectively and the accuracy observed was, 109.4%, 112.8% and 96.6% at 1, 50 and 500 ng/ml, respectively for clomipramine. The CV% observed was 4.5, 7.0 and 5.6 at 1, 50 and 500 ng/ml, respectively and the accuracy observed was, 92.3%, 112.0% and 97.7% at 1, 50 and 500 ng/ml, respectively for DCMP. The limit of quantification was set at 1 ng/ml for both clomipramine and DCMP. Recovery from the protein precipitation technique was > 95%.

Pharmacokinetic and statistical analyses

Noncompartmental analysis was used to estimate individual pharmacokinetic parameters of clomipramine and DCMP for each cat (WinNonlin® Professional, Version 4.1,

Pharsight Corp., Palo Alto, CA). Overall exposure to clomipramine and DCMP in the first 24 hours post-administration was measured using the respective AUC_{0-24h} values.

The STS technique included descriptive statistics used to calculate means, standard errors and coefficients of variation of pharmacokinetic parameter estimates for the study population. The data was assessed for normality by visual inspection of distributions and histograms, and by Kolmogorov-Smirnov and D'Agostino Omnibus tests. The use of statistical parametric methods such as the student t-test, analysis of variance (ANOVA) and linear regression were used to evaluate potential differences and correlations between various selected individual recorded covariables, doses in mg per kg and pharmacokinetic parameters of clomipramine (AUC_{0-24h} , C_{max} , T_{max} , Cl/F and V_{ss}/F) and DCMP (AUC_{0-24h} , C_{max} and T_{max}) and MR (AUC_{0-24h} DCMP / AUC_{0-24h} clomipramine). Selected covariables included sex, breed, trouble (presence or absence of a behavioral problem), age in years, weight in kg, anxiety score and sedation score. Age categories, defined as juvenile (< 1.5), adult (1.55 to 6.99) and geriatric (7 and over) were also evaluated for differences in pharmacokinetic parameters of both analytes. Non parametric methods (Mann-Whitney-Wilcoxon (MWW), Kolmogorov-Smirnov (KS) and Kruskal-Wallis (KW)) were used when assumptions for the use of parametric methods were not met. Logarithmic transformations of quantitative data were performed where necessary to achieve either normality of the distribution, homoscedasticity supported by the Modified-Levene Equal-Variance test or relationship linearity. Tukey-Kramer Multiple Comparison test was used when significant statistical difference was observed between groups. Associations between qualitative data (sex, breed, trouble, sedation score, anxiety score and age category) were assessed via Chi square (X^2) analysis. A Two-way ANOVA was used to evaluate possible interactions between two covariables on pharmacokinetic

parameters of clomipramine and DCMP. For all statistical analyses, $p < 0.05$ was taken as the level of significance (NCSS 2001-Pass 2002).

An investigation in differences between potential subpopulations of pharmacokinetic parameters was based on cut-off points suggested by the C.A.MAN program (Computer-assisted analysis of mixtures, Böhning et al, 1992).

RESULTS

Seventy-nine cats were available to participate in this study. Three troubled cats (two male, one female) were not enrolled either because of the presence of cardiac arrhythmias or elevated serum alkaline phosphatase and aspartate aminotransferase concentrations. Of the remaining 76 selected cats, 41 cats (54%) were males. The ages ranged from 10 months to 16 years with a mean age of 4.7 years \pm 3.15. Seven cats (9%) were considered juvenile, 51 were adults (67%) and 18 cats (24%) were geriatric. The weights ranged from 2.9 to 9.2 kg (mean of 5.1 kg \pm 1.30). The majority (93%) of the cats were of domestic breeds. No hematological, endocrine, cardiovascular or urinary problems were detected in any of the cats. Weights and vital signs (TPR) remained within normal limits in all cats during their three-day hospitalization at the University.

Normal and troubled cat populations were not matched for sex, age or breed. The normal population ($n = 39$) included 44% males with a mean age of 3.4 years \pm 1.80, where 77% were adults. All cats from this normal population were of domestic breed. Thirty-seven normal cats (95%) had anxiety scores of 1.5 or less out of 10. One normal cat had an anxiety score of 3.5 and another cat had a score of 2 (Table 3). The troubled, client-owned cat population ($n = 37$) included 65% of males with a mean age of 6.0 years \pm 3.72, where 54% were geriatric (Table 3). Thirty-two cats were of domestic breed; one Siamese, one

Tonkinese, two Persians and one Himalayan were also enrolled in this study and displayed some of the highest anxiety scores. The most common behavioral problem encountered was urine spraying (51%), followed by inter-cat aggression (22%), general anxiety (19%) and aggression directed toward the owner (8%). The majority of households had two cats ($n = 20$) whereas 11 homes had four cats or more. In the troubled cat population, 62% were indoor-only cats. Mean anxiety score of normal cats (0.75 ± 0.74) was significantly different from that of troubled cats (2.14 ± 1.63) (ANOVA, $p = 0.0003$). There was no significant difference in anxiety scores between sexes, weights and ages among the troubled cats.

In general, the troubled population was heavier (X^2 ; $p = 0.01$) and older (X^2 ; $p < 0.001$) than the normal population, however, similar mean clomipramine doses were administered to both populations (KW; $p = 0.56$). Female cats were lighter (KW; $p = 0.0007$), however, mean female (0.48 mg/kg) and male (0.50 mg/kg) doses did not differ significantly (KW; $p = 0.7$). No association was observed between age category and sex (X^2 ; $p = 0.09$).

Orally administered clomipramine was well tolerated by all 76 cats. All cats had dilated pupils at 1, 3 and 6 hours after administration. During blood sampling, diarrhea was present in 16% of the cats. Other non specific signs such as loss of appetite and reduced micturition were also evident in 20% of the cats. Sedation scores ranged from 0 to 2 (Table 3). There was no association between the sedation score and sex, breed, age category, or presence/absence of a behavioral problem (X^2 ; all p values > 0.05).

Pharmacokinetic results

Concentration-time profiles of clomipramine and DCMP of all 76 cats are represented in Figure 1 where proposed clomipramine and DCMP C_{max} subpopulations are represented

by horizontal lines. Estimated C_{max} cut-off points in ng/ml are <100, 100-200 and >200 for clomipramine, and < 30 and >30 for DCMP. Common covariables distinguishing one C_{max} subpopulation from another were not detected for either analyte. Moreover, dose in mg per kg did not influence clomipramine or DCMP C_{max} subpopulations (KW; $p = 0.07$ and $p = 0.11$ respectively). Statistical analyses, however, showed that clomipramine and DCMP C_{max} subpopulations influenced clomipramine and DCMP AUC_{0-24h} , Cl/F and V_{ss}/F (KW; all p values <0.001) but not T_{max} 's.

The AUC_{0-24h} , mean residence time ($MRT_{last} = AUMC_{0-24h}/AUC_{0-24h}$), C_{max} and T_{max} were determined for both clomipramine and DCMP for each cat, whereas Cl/F and V_{ss}/F were estimated for clomipramine only. Individual recorded covariables and selected pharmacokinetic parameter estimates for both analytes from 76 cats are shown in Table 3. Means, medians and ranges of main pharmacokinetic parameters and of MR were estimated for this feline population and varied considerably between cats (Table 4). Internal exposure as estimated by AUC_{0-24h} of clomipramine or DCMP did not correlate with the sedation score (Fig. 2).

Table 5 displays p values from parametric and non parametric statistical analyses used to detect differences between the pharmacokinetic parameters of clomipramine and DCMP, and recorded covariables. A statistically significant gender-related difference was detected in MR and Cl/F , where female cats had a higher mean MR (0.53) and faster Cl/F (0.36 L/h·kg) than males (0.36 and 0.21 L/h·kg respectively). Differences in MR between DCMP C_{max} subpopulations (KW; $p = 0.02$) were also apparent. There was no interaction between gender and DCMP C_{max} subpopulation that could have influenced MR results (Two-way ANOVA; $p = 0.08$).

Although a positive linear correlation was established between doses (mg per kg) and clomipramine AUC_{0-24h} ($p = 0.02$) and T_{max} ($p = 0.001$), these relationships were very weak ($r = 0.28$ and $r = 0.36$ respectively). An equally weak negative correlation was also detected between doses and MR values ($r = -0.26$; $p = 0.02$). No other linear correlation could be established between the recorded covariables and the pharmacokinetic parameters of clomipramine or its demethylated metabolite in the 76 cats after this single oral administration.

DISCUSSION

The use of the STS technique in this study allowed for the identification of differences between pharmacokinetic parameter estimates and individual feline characteristics. The main advantage of this technique was its simplicity, however, it did not allow the exploration of multidimensional relationships between population characteristics and pharmacokinetic parameters, as would have been possible with the pharmacostatistical model of a population pharmacokinetic approach (Martin-Jiménez & Riviere, 1998).

Mean clomipramine and DCMP AUC_{0-24h} and C_{max} measured in this study were within the same range as previously reported in a pharmacokinetic clomipramine study in five healthy cats (Lainesse et al, 2006). The mean Cl/F and V_{ss}/F estimates of clomipramine of this study when adjusted for the previously reported 90% bioavailability were slightly slower ($0.3 \text{ L/h}\cdot\text{kg}$) and smaller (2.1 L/kg) respectively than the estimates measured in the previous intravenous and oral pharmacokinetic study (Lainesse et al, 2006). However, bioavailability is closer to 69% when data from one subject (outlier with F of 121.9 %) is excluded from the calculation of the mean F from the previous study. Hence correction of

Cl/F using this F value yields very similar Cl values of 0.376 and 0.393 L/h·kg between the present and previously published study respectively. This adjustment does not account, however, for the discrepancy between the V_{ss} and V_{ss}/F estimates of the two studies. Besides the fact that Cl and V_{ss} are best estimated after intravenous administration, differences could also be related to the smaller number of samples as well as the shorter length of time (24 versus 30 hours) blood was collected from each cat of the present study, the differences in analytical method (HPLC versus LC-MS/MS), or the wide interindividual variability in pharmacokinetic parameter estimates.

Highly variable absorption phases with or without lags were observed among the 76 concentration-time profiles. Thus, it is suspected that the majority of the cats manifested a biphasic absorption phase similar to the one previously reported in the literature (Lainesse et al, 2006), as the same methodology surrounding the administration of clomipramine was used in both studies. The suggested food effect from the two teaspoons of canned food given immediately after oral administration of the clomipramine tablet may have contributed to the interindividual variability of the observed concentration-time curves and hence pharmacokinetic parameters of clomipramine and DCMP. The fewer blood sampling points before 1 hour and between 1 and 6 hours in this study may have masked the presence of such double peak absorption from most pharmacokinetic curves. Detailed absorption studies exploring the influence of food on the rate and extent of absorption of clomipramine could provide useful insight in the cause of a biphasic pattern in cats and explain, in part, the interindividual variability observed in clinical responses and pharmacokinetic parameters in clomipramine-treated cats.

It has been suggested that fear or stress may alter clomipramine disposition in dogs (Hewson et al, 1998) or clomipramine effects in rats (Consoli et al, 2005) and this may

also have contributed to the variable absorption phase influenced by stress-related physiological changes in gastric emptying, especially for the anxious cats of the study. A more prolonged period of acclimatization before blood sampling may have been helpful in decreasing the extent of the variability observed in this study, however, the appropriate length of time needed to acclimatize an anxious cat to its hospital setting has not yet been determined, and may possibly be indefinite and/or cause unacceptable distress to the cat. There was no correlation established between pharmacokinetic parameters of clomipramine or DCMP and the anxiety score in this cat population, suggesting that anxious cats did not show different clomipramine dispositions when compared to normal cats. Although this anxiety score has not been validated a priori, it was constructed from compiled observational information on signs compatible with feline anxiety (Beaver, 2003) and used as a subjective evaluation tool in this study to distinguish normal from anxious cats.

The Clomicalm® 5 mg tablet, labeled for use only in dogs in North America, is the smallest dosage form available for veterinary use. This tablet is frequently split in quarters to accommodate for patient size, as it is often the case in feline clinical practice, even though the 5 mg tablet is only half-scored. The use of a previously set weight/dose chart in this study allowed for dosing of the antidepressant in a way that represented clinical use of this drug. This resulted in a two-fold difference in dose per kg of bodyweight within a given weight range. Since scoring is important to ensure proper homogenous distribution of the medication within the tablet, it is possible that some of the pharmacokinetic variability may have also been caused by potential uneven dosing from splitting the tablet in quarters for most subjects. Veterinarians prescribing clomipramine to cats should be

aware that the variability in pharmacokinetic profiles may be related to inaccurate dosing as well as interindividual variations.

In this study, a significantly higher mean metabolic ratio and faster mean clomipramine Cl/F were estimated in female cats compared to male cats. These findings could indicate the possibility of a higher female clomipramine demethylation or hydroxylation potential. This finding is all the more interesting as all cats were neutered between 6 months to one year of age suggesting that gender differences in metabolic capabilities may be determined *in utero* and/or perinatally. Such findings offers the possibility of individualization of the clomipramine dose according to the sex of the cat, however, metabolic feline studies evaluating these gender-related differences in pharmacokinetic parameters are required to support this hypothesis. Metabolic differences between ages seen in humans (Gex-Fabry et al, 1990, Mulder et al, 2003) and rats (Fernandez-Guasti et al 2003), were not detected between Cl/F values and age categories in this cat population.

No statistically significant difference was detected in sedation scores between male and female cats after a single dose of clomipramine. A pharmacokinetic study of DCMP after intravenous administration may further show potential gender differences in the clearance of this metabolite but the lack of correlation between the sedation score and DCMP pharmacokinetic parameters, may question the importance of this metabolite in the cat as responsible for the immediate manifestation of side-effects. The establishment of a relationship between sedation and DCMP AUC_{0-24h} or C_{max} after only one dose could have provided useful predictive insight into clinical manifestations of the intensity and incidence of an important adverse effect, such as sedation, in cats. However, the establishment of a relationship between therapeutic effects and plasma concentrations of

clomipramine, DCMP or a combination of these has long been controversial in human studies and was thought to be largely dependent on study design, sample selection and quantification (Vandel et al, 1982; Faravelli et al, 1984; Quitkin et al, 1984; Pollock et al, 1993; DUAG, 1999; Charlier et al, 2000). It is possible that the sedation scores after a single dose may not have been an appropriate pharmacodynamic marker to detect a concentration-effect relationship or sufficiently discriminate to detect subtle differences between cats, however, since sedation is often the cause of owner's lack of compliance with clomipramine, the sedation score was chosen a priori as a means to detect early clinical effects of this antidepressant.

Moreover, extrapolation of these results to steady-state conditions cannot be done as only one dose was given and metabolite accumulation as seen in human patients over time (Nielsen et al, 1996), although not observed in dogs (Hewson et al, 1998), may occur in cats and contribute to the complexity of the concentration-effect relationship of this antidepressant. It is also possible that plasma and cerebral MRs differ, as less DCMP is expected to cross the blood brain barrier (BBB) than clomipramine due to its decrease in lipophilicity from demethylation as was shown in an *in vivo* rat study (Weigmann et al, 2000). The neurophysiological complexity of the pharmacodynamic relationship between susceptible receptors and availability of the active drug or metabolite at the site of action requires the evaluation of plasma concentrations of clomipramine and DCMP after multiple dosing and an appropriately sampled E compartment (e.g. brain) to adequately estimate relationships that directly affect therapeutic success with the chronic administration of this drug.

In conclusion, this study has shown a wide pharmacokinetic variability in clomipramine and DCMP after one oral administration of Clomicalm® to 76 cats. Suggested explanations for such variability include differences in absorption caused by a food effect, delayed gastric emptying or differences in doses administered, and/or hepatic metabolism due to a gender-related difference in clomipramine metabolic potential. The lack of correlation between sedation scores and clomipramine and/or DCMP pharmacokinetic parameters such as AUC_{0-24h} and C_{max} may have been a consequence of the administration of only one dose of clomipramine, hysteresis, a shallow sampling compartment and/or the lack of importance of DCMP as the main cause of side-effects in cats. Multiple dosing studies are required to characterize this wide interindividual pharmacokinetic variability for clinical extrapolation. The results from this current study support the further testing of gender-related differences in metabolic capabilities for the biotransformation of this tricyclic antidepressant.

Table 1. Anxiety score chart for evaluation of the degree of anxiety in cats during a one hour behavioral consultation.

Behavior during consultation	Score
Low head carriage	0.5
Ears pulled back	0.5
Avoiding eye contact	0.5
Dilated pupils	0.5
Low body posture	0.5
Lowered tail / tail tucked	0.5
Tail twitch / flicking	0.5
Piloerection	0.5
Sweating (palmar, plantar)	0.5
Ears/skin twitch	0.5
Repetitive swallowing	0.5
Drooling	0.5
Licking lips	0.5
Panting	1
Hissing	0.5
Hiding/no exploring	0.5
Vocalization	0.5
Easily startled/hyper reactive	0.5
Repetitive grooming	0.5
Maximum score	10
Cat's score	

Table 2. Weight dependent dosing chart for administration of 5 mg tablets of clomipramine (Clomicalm®) to cats during a pharmacokinetic study.

Weight (kg)	Amount of tablet	Percentage of tablet (%)	Dose range (mg/kg)
2.01-4.00	1/4	25	0.31-0.62
4.01-6.00	1/2	50	0.42-0.62
6.01-8.00	3/4	75	0.47-0.62
8.01-10.00	1	100	0.50-0.62

Table 3. Recorded covariables and selected pharmacokinetic parameter estimates of clomipramine (CMP) and desmethylclomipramine (DCMP) from 76 cats enrolled in the pharmacokinetic study after a single dose clomipramine administration.

Cats without a behavioral problem (normal; n = 39)												
Cat #	Weight (kg)	Sex	Age (yrs)	Breed	Problem	Anxiety score	Sedation score	CMP AUC ₀₋₂₄ (ng·h/ml)	CMP C _{max} (ng/ml)	CMP C _{U/F} (L/h·kg)	DCMP AUC ₀₋₂₄ (ng·h/ml)	DCMP C _{max} (ng/ml)
1	5.02	F	3.9	DSH	N/A	0	0	326.05	36.7	0.299	185.3	11.2
2	4.49	F	2.75	DSH	N/A	0	0	112.20	32	0.535	215.6	23.9
3	6.58	M	7	DSH	N/A	1	1	113.30	21.9	0.714	30.65	4.4
4	4.04	F	5	DSH	N/A	0.5	0.5	1044.95	108.4	0.149	540.65	39.9
5	4.37	F	1	DSH	N/A	1.5	1.5	856.55	109.7	0.160	214.6	13.1
6	4.16	F	4	DSH	N/A	0	0	510.50	44.5	0.264	237.4	18.7
7	3.99	M	1	DSH	N/A	0.5	0.5	727.10	83.9	0.100	299.1	20.6
8	4.45	F	7	DMH	N/A	1.5	1.5	590.40	49.9	0.180	190.2	11
9	6.17	F	7	DMH	N/A	1	1	596.45	35.4	0.113	533.2	32.8
10	4.15	F	5	DLH	N/A	0	0	674.80	82	0.193	230.25	17.7
11	5.41	M	3	DSH	N/A	0	0	283.95	41.7	0.277	79.8	11.4
12	4.71	M	5	DMH	N/A	0.5	0.5	427.00	65.8	0.255	13.85	3.9
13	4.73	F	6	DSH	N/A	0	0	416.65	34.7	0.233	215.5	15.3
14	3.81	F	2	DSH	N/A	0	0	145.30	38.6	0.577	72.15	23.7
15	4.91	M	2.5	DSH	N/A	0.5	0.5	2223.10	153.7	0.041	597.3	33.9
16	4.81	F	2	DMH	N/A	0	0	970.30	111.4	0.083	358.6	18.2
17	5.75	F	1.75	DSH	N/A	0.5	0.5	412.30	56.5	0.174	152.55	10.9
18	5.48	M	2.4	DMH	N/A	0	0	479.65	34.6	0.146	447.6	27.1
19	5.39	M	7	DSH	N/A	1.5	1.5	820.75	124.3	0.093	248.95	25.6
20	6.06	M	4	DMH	N/A	1.5	1.5	1421.35	133	0.066	644.3	48.5
21	4.55	M	2.8	DMH	N/A	1.5	1.5	395.15	44.1	0.286	105.15	9.4
22	4.68	M	4	DMH	N/A	1	1	951.45	95.7	0.107	422.45	21.4
23	3.79	F	1.4	DSH	N/A	0	0	57.35	10.7	1.451	21.7	2.8
24	3.53	F	2	DSH	N/A	0.5	0.5	121.65	37.2	0.793	166.1	28.1
25	3.77	F	2	DSH	N/A	0.5	0.5	504.20	69.5	0.159	579.55	42.3
26	3.66	F	3.7	DSH	N/A	1	1	483.55	66.6	0.191	490.2	37.4
27	5.28	M	1.9	DSH	N/A	0	0	514.60	40.6	0.152	255.85	17.9
38	4.98	M	1.25	DMH	N/A	0.5	0	575.15	72.5	0.161	204.75	18.6
42	4.4	F	2.4	DMH	N/A	1.5	1	369.20	37.2	0.318	103.2	5.8
43	4.37	F	3.6	DMH	N/A	0.5	1	459.65	58.7	0.275	209.95	17.8
44	4.53	M	1.9	DSH	N/A	3.5	1	619.55	67.9	0.199	299.1	47.8
46	4.83	M	4.83	DLH	N/A	1	0	320.35	29.8	0.290	131.9	9.9
57	4.68	M	2.4	DMH	N/A	0.5	1	386.10	47.2	0.278	59.1	3.8
58	4.11	F	2.3	DSH	N/A	2	0	864.75	165.4	0.146	546.5	37.1
63	4.67	F	3.25	DSH	N/A	1.5	0	541.65	94.5	0.193	98.55	12.5
64	4.24	F	2.8	DSH	N/A	0.5	0	746.15	134.6	0.189	69.9	11.5
65	9.24	M	5.7	DSH	N/A	0	0	750.10	54.4	0.065	243.1	15.1
66	5.82	F	2.7	DMH	N/A	1	0	571.70	61.1	0.120	224.1	15.2
68	4.92	M	1.7	DSH	N/A	1	0	623.35	95.2	0.163	203.4	14.4
Mean	5.3	44%	3.4			0.75	0.50	589.96	68.8	0.261	254.925641	20.015385
±SD	1.03		1.80			0.74	0.56	390.34	38.4	0.256	176.1713773	12.246708
Cats with a behavioral problem (anxious; n = 37)												
Cat #	Weight	Sex	Age	Breed	Problem	Anxiety score	Sedation score	CMP AUC ₀₋₂₄ (ng·h/ml)	CMP C _{max} (ng/ml)	CMP C _{U/F} (L/h·kg)	DCMP AUC ₀₋₂₄ (ng·h/ml)	DCMP C _{max} (ng/ml)
28	4.6	M	8	DLH	A	1.5	0	341.45	36.0	0.304	103.5	6.5
29	5.13	M	2.75	S	GA	7	1	1142.25	159.9	0.078	431.3	26.6
30	9.04	M	3	DMH	A	1.5	1	493.90	84.4	0.122	138.35	15.8
31	6.67	M	8.4	DMH	M	2.5	0	452.45	63.5	0.180	127.31	11.37
32	4.26	F	2	DMH	AO	3	1	1033.45	114.1	0.117	470.3	37.9
33	3.86	M	2.4	DMH	M	1.5	1	79.45	11.2	1.010	39.45	4.2
34	6.44	M	3.3	DSH	A	1	1	377.30	37.9	0.217	112.8	6.8
35	5.6	M	9.9	T	M	2.5	0	122.25	21.9	0.571	16.2	4.1
36	3.49	F	0.8	DMH	AO	1.5	1	89.30	11.7	1.117	40.2	4.8
37	5.21	M	1.9	DSH	A	2.5	0	351.35	37.7	0.230	154.9	10.6
39	6.35	M	5.8	DSH	A	0.5	1	1171.60	147.6	0.063	497.5	28.5
40	6.51	F	7.6	DMH	M	1	0	2386.20	176.7	0.031	465.6	26.2
41	6.66	M	2.6	DSH	M	0.5	2	1672.05	170.7	0.030	730.7	38.3
45	6.27	M	12.7	DSH	M	2.5	0	772.60	88.3	0.128	292.8	17.6
47	4	M	2.2	P	M	4.5	1	1002.95	155.9	0.075	75.46	8.9
48	5.93	F	6.2	DSH	M	3	1	492.15	40.5	0.101	504.3	28.2
49	4.39	F	3.75	DSH	M	2.5	1	39.10	9.8	2.483	3.45	2.3
50	3.91	M	1.9	DSH	GA	5.5	0	618.40	39.3	0.102	471.6	36.4
51	3.89	F	5	DSH	M	1	0	550.00	73.2	0.129	378.65	29.6
52	6.33	M	7	DSH	M	0	1	4184.50	348.7	0.016	1055.9	51.8
53	5.57	M	6.25	DSH	GA	3.5	1	2092.30	167.4	0.036	480.05	25.7
54	7.17	M	8.7	DSH	A	0.5	1	660.50	78.0	0.084	303.55	22.6
55	2.99	M	5.25	P	M	5.5	1	414.35	33.6	0.301	199.05	14.1
56	5.6	F	5	DMH	M	1	1	539.25	61.3	0.143	301.25	23.6
59	6.5	M	5.4	DSH	M	2.5	0	5226.20	366.8	0.015	1265.25	60.8
60	2.91	F	1.3	H	M	2.5	0	1100.90	149.5	0.103	505.1	49.1
61	5.68	M	9	DMH	M	0.5	0	360.65	66.8	0.211	148.9	12.1
62	5.42	F	11.4	DMH	M	1.5	0	538.95	52.8	0.148	223.8	17
67	3.14	F	1	DMH	AO	1	0	265.45	27.7	0.446	85.8	6.8
69	4.23	M	12.75	DMH	GA	3.5	1	119.90	21.3	1.087	50.75	6.5
70	8.55	M	5.4	DSH	M	2.5	1	629.10	66.7	0.094	277.35	24.1
71	6.33	M	10.4	DLH	M	4	1	862.05	141.7	0.095	504.3	30.3
72	7.82	F	7.25	DSH	A	1	1	270.10	62.1	0.230	63.55	11.2
73	5.2	M	15.75	DMH	A	0.5	1	798.20	82.8	0.115	224.1	16.9
74	3.9	F	4.25	DMH	M	1	1	5223.50	358.4	0.051	1381.85	71.5
75	4.2	F	9.75	DSH	M	2.5	1	671.90	75.6	0.190	329.6	19
76	3.74	M	4.75	DSH	A	0	1	613.35	51.3	0.080	153.6	8.1
Mean	5.3	65%	6.0			2.14	0.68	1020.52	99.8	0.285	340.76	22.050541
±SD	1.52		3.72			1.63	0.53	1278.79	92.3	0.465	326.604116	16.530672

M=males; F=females; DSH=domestic short hair; DMH=domestic medium hair; DLH=domestic long hair; S=Siamese; GA=generalized anxiety; M=marking; AO=aggression with owner.

Table 4. Mean population pharmacokinetic parameter estimates for clomipramine and desmethylclomipramine (DCMP) after one oral dose of approximately 0.5 mg/kg of clomipramine in 76 cats using non-compartmental analysis.

Parameter	Mean	SD	CV%	Median	Range
Clomipramine					
AUC _{0-24h} (ng·h/ml)	799.6	953.5	119	545.8	39.1- 5226.2
C _{max} (ng/ml)	84.0	71.2	85	64.7	9.8 - 366.8
Cl/F (L/h·kg)	0.26	0.3	124	0.16	0.02 - 2.4
V _{ss} /F (L/kg)	1.9	1.7	89	1.5	0.2 - 9.2
T _{max} (h)	3.0	1.9	64	3.0	1.0 - 6.0
DCMP					
AUC _{0-24h} (ng·h/ml)	296.7	262.3	88	223.9	3.45 - 1381.9
C _{max} (ng/ml)	21.0	14.4	69	17.9	2.3 - 60.8
T _{max} (h)	7.1	5.3	76	6.0	1.0 - 24.0
MR	0.4	0.29	66	0.4	0.03 - 1.92

AUC_{0-24h}: Area under the curve from 0 to 24 hours; C_{max}: maximum plasma concentration; Cl/F: clearance over bioavailability; V_{ss}/F: steady-state volume of distribution over bioavailability; T_{max}: time at maximal plasma concentration; MR: metabolic ratio (AUC DCMP/AUC clomipramine); SD: standard deviation; CV: coefficient of variation.

Table 5 - Results of p values from parametric (student t test, ANOVA) or non parametric (Mann-Whitney-Wilcoxon, Kruskal-Wallis) statistical tests used to detect differences between pharmacokinetic parameters of clomipramine and DCMP, and recorded covariables from a population of 76 cats after a single oral administration of Clomicalm®. Significant statistical differences (shaded areas) were set at p<0.05.

Covariables	Parameters								
	AUC-CMP	AUC-DCMP	C _{max} -CMP	C _{max} -DCMP	T _{max} -CMP	T _{max} -DCMP	CMP Cl/F	CMP V _{ss} /F	MR
sex	0.19	0.77	0.37	0.52	0.68	0.38	0.047	0.71	0.03
trouble ¹	0.32	0.56	0.32	0.86	0.23	0.41	0.13	0.71	0.33
breed	0.31	0.46	0.37	0.63	0.39	0.42	0.27	0.23	0.29
age category ²	0.41	0.44	0.44	0.26	0.59	0.67	0.26	0.42	0.37
sedation score	0.44	0.29	0.43	0.53	0.96	0.94	0.19	0.65	0.96
anxiety score	0.97	0.42	0.45	0.71	0.8	0.73	0.97	0.41	0.19

CMP=clomipramine; DCMP=desmethylclomipramine; AUC=area under the curve 0-24hr; C_{max}=maximal plasma concentration; T_{max}=time to reach maximal plasma concentration; Cl=clearance in L/h·kg; F= bioavailability; V_{ss}=volume of distribution at steady-state in L·kg; MR=metabolic ratio(AUC_{0-24h} DCMP/AUC_{0-24h} clomipramine), ¹ trouble = presence or absence of behavioral problem, ² age categories in years included <1.5, 1.5-6.9, and 7 and over.

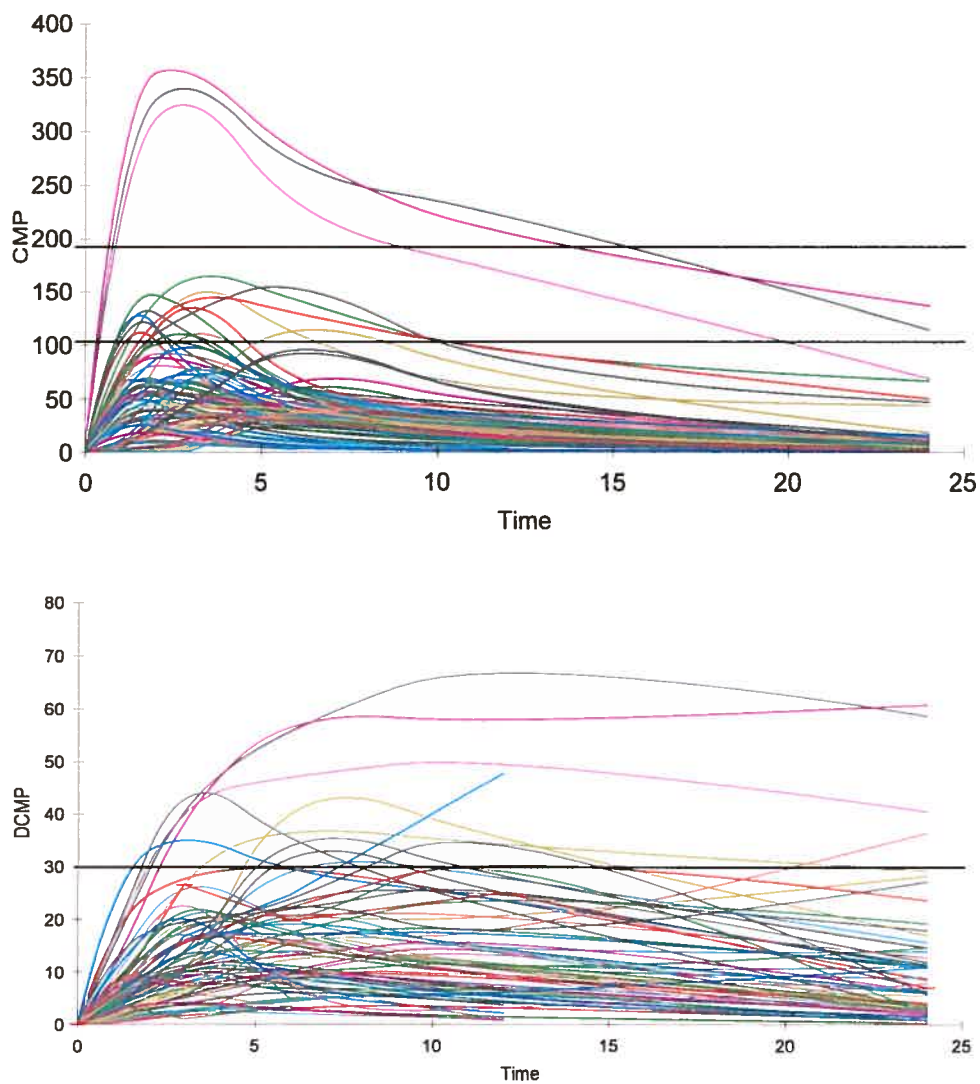


Fig. 1. Plasma concentrations versus time curves for clomipramine (CMP) and desmethylclomipramine (DCMP) after a single oral dose of approximately 0.5mg/kg of clomipramine in 76 cats. Horizontal lines represent estimated cut-off points between clomipramine and DCMP Cmax subpopulations.

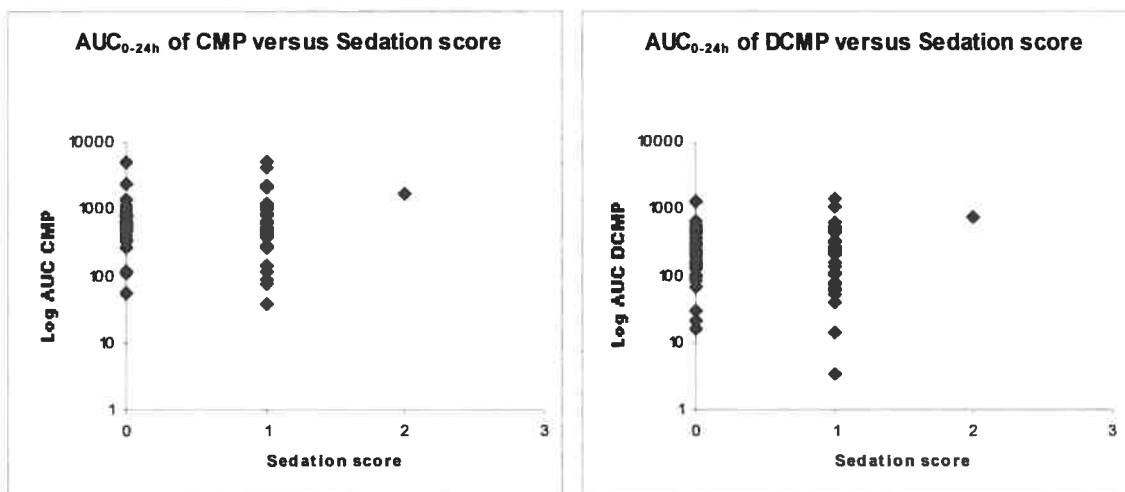


Fig. 2. Semilog dispersion graphs of the area under the curve (AUC_{0-24h}) of clomipramine (CMP) and desmethylclomipramine (DCMP) versus the sedation score observed in the first 24 hours after a single oral administration approximately 0.5mg/kg of clomipramine in 76 cats.

Article 3. (Projet 3)

Comparative oxidative metabolic profiles of clomipramine in cats, rats and dogs : a preliminary *in vitro* study.

Chantal Lainesse¹, DVM, Diane Frank², DVM, DACVB, Francis Beaudry¹, BSc, PChem, Michèle Y. Doucet¹ DVSc, DACVIM, DACVCP

¹Département de biomédecine vétérinaire and ²Département de sciences cliniques, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, St-Hyacinthe, QC, J2S 7C6, Canada.

Soumis le 31 janvier, 2007 à The Veterinary Journal.

Abstract

The objectives of this *in vitro* study were to describe CYP-dependent metabolism of clomipramine in canine and feline microsomes, compare metabolic profiles between cats, rats and dogs, and investigate a potential gender-related difference in metabolic activity between male and female cats. Pooled liver microsomes were incubated with clomipramine, where species and gender-specific reactions were initiated by the addition of a NADPH regenerating system and quenched with methanol at 0, 5, 15, 30, 45 and 60 minutes, and 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240 and 360 minutes respectively. LC-MS/MS was used to measure clomipramine and its metabolites. Results showed that cat microsomes biotransformed clomipramine slower and less efficiently than rat and dog microsomes. Gender differences in metabolic profiles suggested that male cat microsomes were less efficient demethylators and hydroxylators than female cat microsomes. As gender metabolic differences may carry clinical significance for this antidepressant, further studies are warranted.

Key words: cat; clomipramine; dog; metabolism; microsomes

1. Introduction

Cytochromes P450 (CYP) are heme-containing proteins found in many tissues, predominantly in the endoplasmic reticulum of the liver, which catalyze oxidation and reduction reactions of endogenous products, drugs and other foreign chemicals (Murray, 2000). Cytochrome activity requires NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form) as a cofactor and NADPH-cytochrome P450 reductase as a coenzyme (Murray, 2000). These enzymes use oxygen to transform endogenous and exogenous substrates into more polar products, which subsequently can be eliminated in urine. A microsome is a small vesicle that is derived from fragmented endoplasmic reticulum produced when tissues such as liver are homogenized and contain the cell's CYP (Murray, 2000).

Clomipramine, a tricyclic antidepressant, is a lipophilic compound that is mainly eliminated by oxidation catalyzed by the cytochrome P450 enzyme system in the liver in humans (Nielsen et al., 1996) and in rats (Krüger et al., 1986). The main route is N-demethylation to the active metabolite, desmethylclomipramine (DCMP) catalyzed by CYP3A4, CYP2C19, CYP2C9 and CYP1A2 (Krüger et al., 1986; Nielsen et al., 1996; Wu et al., 1998). Clomipramine and DCMP are mainly eliminated by hydroxylation in the 2 and 8 aromatic positions by CYP2D6 and the hydroxylated metabolites are rapidly glucuronidated and excreted in the urine (Faigle and Dieterle, 1973; Nielsen et al., 1994; Wu et al., 1998). DCMP may be further demethylated to didesmethylclomipramine (DiDCMP) (Nielsen et al., 1996).

Clomipramine is recommended for the treatment of several affective disorders in humans such as depression, anxiety and obsessive-compulsive disorders (DUAG, 1999; Broocks et al., 2003), in dogs such as separation anxiety, noise phobia and compulsive behaviors

(Seksel & Lindeman, 2001) and in cats such as urine marking, aggression, excessive vocalization and compulsive behaviors (Seksel & Lindeman, 1998; King et al, 2004, Lainesse et al, 2007, in press).

Interspecies differences are evident in the clinical response, incidence of side effects and pharmacokinetic parameters of clomipramine and DCMP between humans, dogs and cats (deCuyper et al, 1981; King et al, 2000a; Lainesse et al, 2006). Several studies have shown that women have a lower rate of hydroxylation of clomipramine and DCMP (Gex-Fabry et al., 1990; Mundo et al., 1999; Hildebrandt et al., 2003). In rodents, there are considerable sex and developmental differences in constitutive CYP expression and female rats have been shown to metabolize clomipramine faster than male rats (Kruger et al., 1986). No such sexual dimorphism was established in dogs in a pharmacokinetic study of clomipramine (King et al., 2000a). Recently, however, a pharmacokinetic study of 76 cats has revealed a significantly faster clearance of clomipramine in female cats compared to male cats (Lainesse et al, 2007, in press).

The objectives of the *in vitro* study were to qualitatively describe CYP-dependent metabolism of clomipramine in canine and feline liver microsomes, compare oxidative metabolic profiles of this antidepressant between cats, rats and dogs, and investigate a potential gender-related difference in metabolic activity between male and female cats.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals

Tris base (0.05 M) and dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Fisher-Scientific Canada (Ottawa, Ont.). HEPES (5.0 mM), KCl (0.15 M), sucrose (0.25 M), NaOH (1 N), HCl (1 N), sodium chloride (NaCl), sodium phosphate (Na₂HPO₄),

potassium phosphate (KHPO₄), bovine serum albumin (BSA), dextromethorphan, dextorphan, clomipramine and desmethylclomipramine (DCMP) were purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd (Oakville, Ont.). Methanol was obtained from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ). RC DC Protein Assay Reagent A and Reagent B were ordered from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). NADPH regenerating system solution A (26.1 mM NADP⁺, 66 mM glucose-6-phosphate, 66 mM magnesium chloride) and solution B (40 U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase in 5 mM sodium chloride) were obtained from Gentest-BD Biosciences (San Jose, CA).

2.2 Liver microsomes

Pooled male Sprague-Dawley rat (n = 111) and Beagle dog (n = 5) liver microsomes (20 mg/ml) were purchased from Gentest-BD Biosciences (San Jose, CA). Ten cats, ranging from two to 12 years old, were euthanized for population control reasons with 3 mL intravenous pentobarbital 540 mg/mL (Bimeda-MTC, Cambridge, On.). Livers were harvested and 1cm² pieces were flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until homogenization. All procedures followed ethical approval from the Canadian Council on Animal Care and the Comité d'éthique de l'utilisation des animaux of the Université de Montréal. Male and female cat liver microsomes were prepared from these frozen isolated livers by differential centrifugation as previously described (Cribb et al., 1996). Briefly, one gram of liver from either five male or female cats were pooled and homogenized in 4 volume of ice-cold 0.05 M Tris/ 0.15 M KCl buffer (pH 7.4) using a tissue homogenizer (Tearor™). The homogenate was centrifuged at 9000 x g for 20 minutes at 4 °C in a Beckman Coulter Allegra™ 25R Centrifuge. The resulting supernatant was further centrifuged at 105 000 x g for 60 minutes at 4 °C in a Beckman

L7-6S ultracentrifuge with a 70.1TI type pre-cooled rotor. The pellet was re-suspended in ice-cold 0.25 M sucrose/ 5.0 mM HEPES buffer (pH 7.4) and further homogenized using a hand-held manual glass homogenizer (Fisher-Scientific). Aliquots of 100 μ L were made of the pooled male and female feline microsomes respectively and kept at -80 $^{\circ}$ C for future use. Protein concentrations of the gender-specific microsomal fractions were determined with the Bio-Rad DC protein assay kit (Bio-Rad Laboratories) using the Lowry protocol (Lowry et al, 1951) and BSA as the standard.

2.3 Incubation conditions

Clomipramine and microsomes, at a protein concentration of 1 mg/mL, were suspended in phosphate buffer solution (0.1 M, pH 7.4) with the final incubation volume of 200 μ L. All samples were done in duplicate and pre-incubated for 5 minutes in a shaking water bath (VWRTM, oscillations at 40 rpm) at 37 $^{\circ}$ C, and each reaction was initiated by the addition of pre-warmed NRS (solution A and solution B). The substrate stock solutions were prepared with DMSO and represented less than 0.1 % of the total volume.

Appropriate negative controls (no microsomes, no cofactor and boiled microsomes) were conducted to eliminate non-specific biotransformation. Reactions were terminated by the addition of 3 v/v methanol. In the first assay, clomipramine, in a final concentration of 100 μ M, was added to rat, dog, male and female cat microsomes and the reactions were quenched after 0, 5, 15, 30, 45 and 60 minutes. In the second assay, metabolic reactions from a final concentration of 100 μ M of clomipramine combined with male or female cat microsomes were terminated at 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240 and 360 minutes of incubation. All microsomal-methanol mixtures were vortexed and then centrifuged for 5 minutes at

12 000 x g at room temperature in a IEC Microlite RF microcentrifuge (Thermo Electron Corporation) and frozen at -20 °C until analysis.

2.4 Quantitative and qualitative determination of clomipramine and its metabolites

The method used for the analysis of clomipramine and its metabolites was LC-MS/MS (liquid chromatography tandem mass spectrometry). Only clomipramine and DCMP were measured quantitatively due to the unavailability of most metabolite standards. Other metabolites were qualitatively assessed by measurement of peak areas (counts per second) obtained by the mass spectrometer operating in full scan MS.

Clomipramine and DCMP stock solutions were diluted in blank species-specific microsomal solution to obtain 100, 10, 1 and 0.5 µM standards. The HPLC system consisted of a Thermo Surveyor autosampler and a Thermo Surveyor MS pump (San Jose, CA). The LC-MS/MS system used was a Thermo LCQ Advantage (San Jose, CA). Data was acquired on a Dell Optiplex desktop computer (Round Rock, TX) equipped with operation system Windows XP professional. Data acquisition and analysis were performed using XCalibur 1.4 (San Jose, CA). Calibration curves were calculated from the equation $y = ax + b$, as determined by weighed (1/x) linear regression of the calibration line constructed from the peak-area of the analyte. Ten µL of the supernatant incubation mixture was injected into the LC-MS/MS system.

A gradient mobile phase was used with a Waters Symmetry C18 100 x 2.1 mm with particle size of 3.5 µm column. The initial mobile phase condition consisted of methanol and 0.1% formic acid in water at a ratio of 20:80, respectively. From 0 to 0.5 minute, the ratio was maintained at 20:80. From 0.5 to 12 minutes a linear gradient was applied and a ratio of 80:20 was maintained from 12 to 15 minutes. At 15.1 minutes, the mobile phase

composition was reverted to 20:80 and the column was allowed to equilibrate for 5 minutes for a total run of 20 minutes. The flow rate was fixed at 0.2 mL/min and clomipramine eluted at 10 minutes and DCMP at 11 minutes.

The mass spectrometer was interfaced with the HPLC system using a pneumatic assisted electrospray ion source. The sheath gas was set to 20 units and the ESI electrode was set at 4000 V. The capillary temperature was set at 300 °C, the capillary voltage to 6 V. The mass spectrometer was operating in full scan MS mode using one segment analysis (m/z 200-500). The quantification mass used was m/z 315 for clomipramine and 301 for DCMP.

The precision and accuracy of the clomipramine assay were 11.0 % and 99.5 % ($r = 0.9937$) respectively. The precision and accuracy of the DCMP assay were 2.7 % and 99.7 % ($r = 0.99746$) respectively. The limit of quantification was set at 0.1 μ M for both clomipramine and DCMP.

2.5 Descriptive and comparative data analysis

Pooled metabolic profiles were assessed and compared by describing the different metabolites detected for each species. Pathway ratios, calculated from the mean peak area of the metabolite formed at time t over peak area of clomipramine at time 0, were used to assess the relative importance of each metabolic pathway (demethylation, hydroxylation, N-oxidation) to the overall oxidative metabolism of clomipramine in each species and preliminary qualitative comparisons between species and between male and female cats were made. Desmethylclomipramine velocities (μ M/mg protein/min) were also calculated for interspecific comparisons. Statistical analysis was not possible due to the small sample size.

3. Results

None of the species-specific negative control samples yielded metabolites suggesting NADPH-dependent metabolic activity was required for biotransformation of clomipramine by rat, dog and cat microsomes. Desmethylclomipramine, hydroxyclopramine and N-oxide were common metabolites detected in all species. Didesmethylclomipramine was only detected in rat incubation mixtures.

Table 1 represents DCMP concentrations over time after biotransformation of 100 μM of clomipramine by male rat, dog and cat, and female cat hepatic microsomes respectively during the first metabolic assay. Feline metabolic activity was considerably less and took longer than the observed metabolic activity of rat and dog microsomes. In this study, mean DCMP velocity in rats ($1.59 \pm 0.45 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ protein) was greater than in dogs ($0.06 \pm 0.03 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ protein) and cats ($0.018 \pm 0.002 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ protein).

Qualitatively different metabolic profiles from the biotransformation of clomipramine between rat and dog microsomes were evident (Fig.1). Demethylation saturation was achieved over time by rat microsomes after 45 minutes of incubation, but not in dogs. Pathway ratios of mean peak areas after one hour of incubation, showed that DCMP was the most abundant metabolite formed by rats (0.69), whereas dogs predominantly biotransformed clomipramine into its hydroxylated form (0.45) (Fig.2). Very little metabolic formation was detected in male and female cat liver microsomes during this one-hour assay, which rendered interspecies comparisons difficult.

Differences in DCMP concentration versus time curves from the biotransformation of clomipramine by pooled male ($n = 5$) and female ($n = 5$) cat microsomes were shown in Figure 3. Feline gender-related differences in the relative amount of all metabolites formed were observed over time for up to six hours (Fig.4). Male cat liver microsomes

predominantly biotransformed clomipramine into DCMP, whereas N-oxide was the most abundant metabolite formed by female cat microsomes. Table 2 shows the differences in pathway ratios of DCMP, hydroxyclopramine and N-oxide measured over time between male and female cat liver microsomes. In general, pooled microsomes from five female cats showed pathway ratios that were consistently greater than pooled microsomes from five male cats for any given metabolite. Relative hydroxylation (hydroxylation/demethylation x 100) was superior in females (83%) than in males (71%). However, these differences could not be evaluated statistically due to pooling of the microsomes generating a sample size of only one for each sex.

4. Discussion

Clomipramine metabolism has been well documented in humans (Nielsen et al., 1996; Wu et al., 1998) and in rats (Krüger et al., 1986). To the authors' knowledge, this is the first *in vitro* study of clomipramine metabolism in dogs and cats. Human and rat *in vitro* studies have shown that clomipramine biotransformation is a reaction that is dependent on hepatic cytochromes (Nielsen et al., 1996; Krüger et al., 1986). In this study, it has also been demonstrated that Phase I NADPH-dependent reactions were necessary in order to form similar metabolites by rat, dog and cat liver microsomes, as negative control samples did not generate metabolic activity.

Desmethylclomipramine has been shown to be the main metabolite formed by liver microsomes followed by the hydroxylated forms of clomipramine and DCMP in humans (Gex-Fabry et al., 1990; Nielsen et al., 1996) and in rats (Krüger et al., 1986). In this study, similar findings were observed in the biotransformation of clomipramine by rat microsomes with DCMP being the dominant metabolite followed by

hydroxyclo mipramine, didesmethylclomipramine and N-oxide. In contrast with human and rat findings, DCMP was not the most abundant metabolite formed in dogs and very little was formed in cats in this study. The clinical relevance of active metabolites, especially DCMP, in dogs and cats has yet to be determined. *In vivo* human studies have demonstrated that therapeutic failure and antimuscarinic side effects are related to elevated plasma levels of DCMP and, for this reason, plasma concentrations of this metabolite are closely monitored in humans along with clomipramine plasma concentrations (Noguchi et al., 1993). The need for therapeutic drug monitoring of clomipramine has not been established in veterinary patients. Canine pharmacokinetic studies have demonstrated more rapid elimination of clomipramine and DCMP, compared to humans, rats and cats, and hence lower DCMP plasma concentrations (Hewson et al., 1998; King et al., 2000a). The most abundant metabolite produced by canine microsomes in this study was hydroxyclo mipramine in a 10:1 ratio with DCMP. Recently Nuñez and Perel (1995) have found that 8-hydroxyclo mipramine inhibits the uptake of serotonin and NE to the same extent as clomipramine and that 8-hydroxyclo mipramine and DCMP have about one-tenth the antimuscarinic potency of clomipramine and DCMP respectively. It is therefore possible that low plasma concentrations of DCMP, coupled with high hydroxyclo mipramine concentrations in dogs contribute to the therapeutic efficacy and low rate of side effects observed in canine patients. In humans, it is speculated that impaired hydroxylation capacity catalyzed by CYP2D6 would result in a dramatic increase of DCMP concentration (up to 10-fold or more), accompanied by a modest increase in the concentration of clomipramine (Gex-Fabry et al., 1990). Hydroxylation deficiency, rather than demethylation, might thus be the target parameter in detection of patients at risk of

showing DCMP concentrations in the toxic range when administered recommended dose of clomipramine in humans as well as in dogs.

Over the years, interspecies differences in substrate metabolism have been established in several studies where the cat, in general, has consistently demonstrated a significantly lower hepatic enzyme capacity than other species (Hietanen and Vainio, 1973; Chauret et al., 1997; Court and Greenblatt, 1997). Based on results of a feline pharmacokinetic study showing a mean *in vivo* metabolic ratio, calculated as DCMP AUC_{0-30h}/ clomipramine AUC_{0-30h}, of 0.64 in cats (Lainesse et al., 2006) compared to a calculated mean metabolic ratio of 0.3 based on data from a recent canine pharmacokinetic study (King et al., 2000a), it was hypothesized that cats may have a greater demethylation ability or lesser hydroxylation and/or glucuronidation capacity than dogs and humans (Lainesse et al., 2006). Preliminary results from this *in vitro* study show that hydroxylation in cats appears to be much less than in dogs, relative to the demethylation capacity of each species. Extrapolation of these *in vitro* findings, however, must be made with caution. The observation of poor feline metabolic activity may have been caused by sub-optimal microsomal preparation and/or incubation conditions for cat microsomes, although identical metabolic conditions were needed for all species to facilitate interspecies comparisons. Therefore while weaker metabolic activity of the feline microsomes was demonstrated in this study compared to rats and dogs, further metabolic studies using optimal species-specific incubation conditions are required to support these interspecific differences.

In addition to CYP, hepatic microsomes also contain a second class of monooxygenases called the flavin-containing monooxygenases (FMO) (Wrighton et al., 1993). N-oxide forms of clomipramine were detected in rats in this study as in others (Krüger et al., 1986),

as well as in cats and dogs. The clinical significance of such findings is unknown as the importance of this particular metabolite with regards to clinical effects has not been determined in any species.

Longer incubation times allowed the detection of trends in metabolite formation in cats and gender-related comparisons in the biotransformation of clomipramine. Human gender differences in the antiobsessional response to clomipramine suggest a possible relationship between clomipramine metabolism, gender and clinical efficacy of the drug (Gex-Fabry et al., 1990; Mundo et al., 1999). The influence of gender on drug biotransformation is best studied with gender-specific microsomal pools by eliminating interindividual variability (Brandon et al., 2003), as was done in this study. After several hours of incubation, it was possible to map out the gender-specific oxidative metabolic profiles as more metabolic activity was evident. This preliminary *in vitro* study showed that female cat liver microsomes were more efficient overall at metabolizing the same clomipramine dose over time than male cat microsomes as suggested by a recent *in vivo* pharmacokinetic study of clomipramine in 76 cats (Lainesse et al., 2007, in press). This current *in vitro* study supports a tendency for more efficient demethylation and hydroxylation by female cat microsomes, further supporting a faster female clomipramine clearance as previously suggested. However, the lack of hydroxyDCMP data and Phase II glucuronidation in this study limits extrapolation to *in vivo* clinical situations.

5. Conclusion

In vitro cytochrome-dependent clomipramine biotransformation was confirmed in rat, dog and cat microsomes. Species and gender-specific differences in metabolic activities were observed in cats. These findings support the need for further testing of gender-

related feline metabolic differences of clomipramine biotransformation at optimal incubation conditions taking into account linearity with time and microsomal concentration, in order to investigate enzyme kinetic differences between sexes in a large sample size for statistical significant comparisons, as gender metabolic differences may carry clinical significance for this tricyclic antidepressant.

Table 1. Desmethylclomipramine concentrations (μM) produced by incubation of rat, dog, male and female cat liver microsomes with 100 μM clomipramine over time.

Time (min)	Rat	Dog	Male cat	Female cat
0	0	0	0	0
5	8.04	0.77	N/D	N/D
15	32.66	1.29	N/D	N/D
30	54.71	2.14	N/D	0.54
45	61.32	2.82	0.86	0.99
60	58.60	3.48	0.96	1.06

μM = micromolar, N/D = not detected

Table 2. Comparative pathway ratios (metabolite peak area at time t / clomipramine peak area at time 0) of desmethylclomipramine (DCMP), hydroxycloipramine and N-oxide at 1, 2, 4 and 6 hour incubation periods in male and female cat liver microsomes.

Time (min)	DCMP		Hydroxycloipramine		N-oxide	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female
60	0.007	0.005	N/D	0.008	0.007	0.010
120	0.013	0.012	0.010	0.018	0.014	0.023
240	0.025	0.028	0.019	0.024	0.025	0.037
360	0.035	0.041	0.025	0.034	0.031	0.043

N/D = not detected

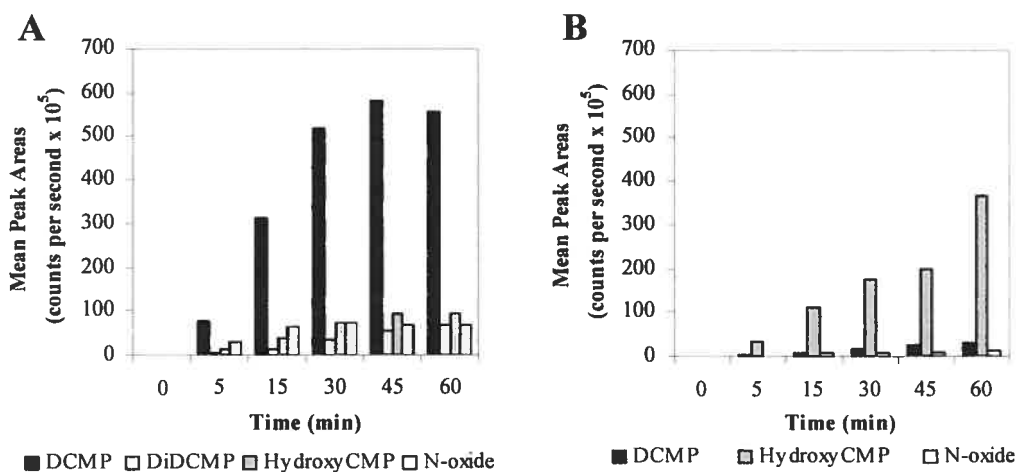


Fig. 1. Individual metabolic profiles of metabolite peak areas versus time from the biotransformation of 100 μ M of clomipramine by pooled male rat (A) and dog (B) microsomes. DCMP= desmethylclomipramine; DiDCMP=didesmethylclomipramine; HydroxyCMP=hydroxycloipramine.

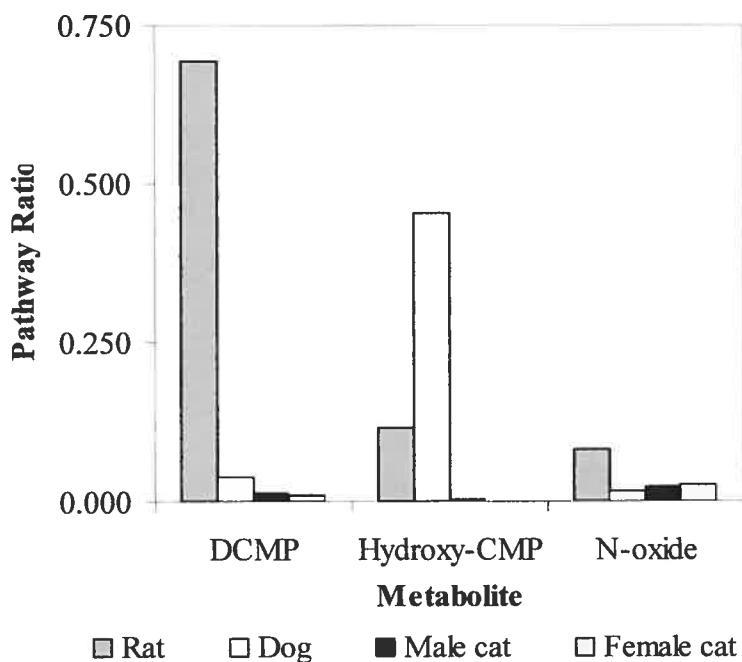


Fig.2. Pathway ratio (peak area of metabolite at 1hour incubation over peak area of clomipramine at time 0) of desmethylclomipramine (DCMP), hydroxycloipramine (Hydroxy-CMP) and N-oxide from the biotransformation of 100 μ M of clomipramine by pooled male rat, dog and cat, and female cat microsomes.

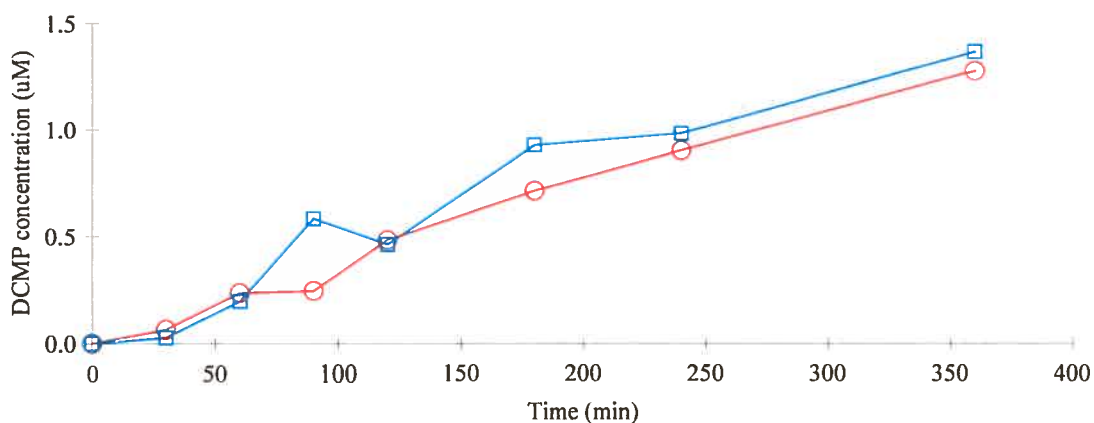


Fig. 3. Desmethylclomipramine (DCMP) concentrations versus time curves after incubation of 100 μ M of clomipramine with pooled male (○) and female (□) cat microsomes.

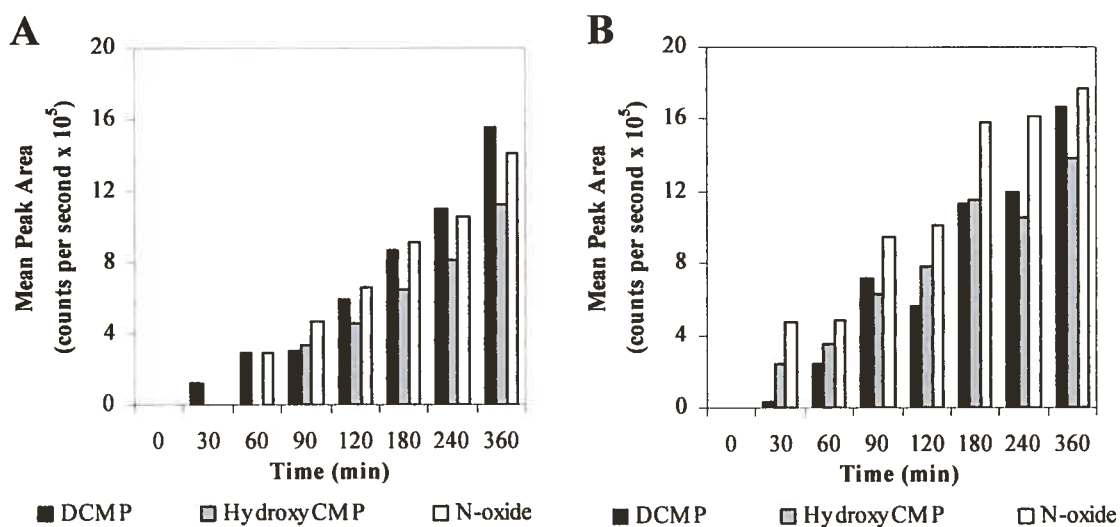


Fig. 4. Individual metabolic profiles of metabolite peak area versus time from the biotransformation of 100 μ M of clomipramine by pooled male (A) and female (B) cat microsomes. DCMP = desmethylclomipramine; Hydroxy-CMP = hydroxyclopmipramine.

Discussion

La clomipramine est fréquemment utilisée en combinaison avec des thérapies comportementales et des modifications environnementales comme traitement pharmacologique pour les troubles causés par l'anxiété chez les chats, comme le marquage urinaire. Bien que plusieurs études félines aient démontré l'efficacité clinique de la clomipramine chez les chats avec troubles de comportement, une grande variabilité interindividuelle de succès thérapeutique et d'incidence d'effets secondaires adverses dans la population de chats est observée suite à son administration orale. L'imprévisibilité des effets bénéfiques et le délai d'action de cet antidépresseur tricyclique (ADT) contribuent grandement à l'incertitude de l'efficacité clinique du traitement et à la frustration du vétérinaire et du propriétaire pour la gestion pharmacologique des problèmes comportementaux chez les chats.

De par sa nature et métabolisme particulier, le chat est rarement utilisé comme modèle animal dans les études nécessitant des extrapolations à des conditions humaines. De plus, les difficultés associées à l'échantillonnage de sang chez les chats ont rendu cette espèce non favorable à des études de pharmacocinétique classique où 12 à 15 prises de sang en 24 heures sont nécessaires. Ainsi, la posologie d'un médicament pour les chats est souvent extrapolée à partir de données obtenues d'études de pharmacocinétique pour les chiens, les humains ou les rats, ou à partir d'études cliniques félines utilisant la dose plutôt que la C_p pour la détermination de la posologie efficace du xénobiotique. Cependant, ces approches peuvent engendrer des recommandations inefficaces ou même toxiques, d'où l'importance d'entreprendre des études de pharmacocinétique spécifiquement pour les chats.

Il est également important de prendre en considération les différences de capacité métabolique entre les espèces, par des études de métabolisme *in vitro*, puisque ces variations peuvent donner des indices quant aux origines des différences interspécifiques des effets cliniques d'un médicament. Une extrapolation à partir de techniques microsomales aux conditions de métabolisme *in vivo* nécessite par contre, que l'organe principal de biotransformation soit le foie et que le métabolisme de phase I soit le mécanisme principal d'élimination (Lau et al., 2002; Brandon et al., 2003). Ainsi, quoique cette dépendance cytochromique ait été documentée pour la biotransformation de la clomipramine chez les humains et les rats (Krüger et al., 1986; Nielsen et al., 1996), il a été nécessaire de vérifier s'il existait une telle dépendance chez les chats pour cet ADT pour permettre des comparaisons interspécifiques.

Ce programme doctoral avait donc pour but d'investiguer les causes de la variabilité d'effet clinique suite à l'administration du Clomicalm® chez les chats. En commençant par une étude de pharmacocinétique classique de la clomipramine chez un nombre limité de chats, qui a mis en évidence une grande variabilité interindividuelle des paramètres de pharmacocinétique, une deuxième étude a été exécutée pour déterminer les covariables pouvant expliquer cette variabilité interindividuelle dans le cadre d'une étude de pharmacocinétique de population. Ces études ont permis d'établir des comparaisons interspécifiques dans la disposition de la clomipramine et de son métabolite, la DCMP, entre les humains, les chiens et les chats. Finalement, une troisième étude de métabolisme *in vitro* a permis une investigation préliminaire de la biotransformation de la clomipramine par les microsomes félins et un aperçu des différences dans les profils métaboliques entre les chiens, rats et chats ainsi qu'entre les chats mâles et femelles.

Le plan de la discussion de cette thèse doctorale est une synthèse des résultats obtenus dans les trois études débutant par des **comparaisons interspécifiques** de disposition de la clomipramine entre les humains, chiens, chats et rats, en offrant des explications possibles quant aux différences d'effets cliniques observés entre les espèces, mettant ainsi en évidence l'imprudence de faire des extrapolations d'une espèce à l'autre pour ce médicament. La discussion se poursuit par une élaboration des causes potentiellement responsables de la grande **variabilité interindividuelle** des paramètres de pharmacocinétique de la clomipramine détectée entre les chats, pouvant en partie, expliquer la variabilité de l'effet clinique observée avec l'utilisation du Clomicalm® chez cette espèce. Finalement, la **corrélation entre la concentration plasmatique de la clomipramine et le niveau de sédation** est brièvement examinée quant à son implication dans la variabilité de la réponse clinique observée chez les chats.

Pharmacocinétique comparative de la clomipramine

En général, les études de cette thèse ont permis de déterminer que les estimés des paramètres de pharmacocinétique de la clomipramine chez les chats se situent entre les données rapportées dans la littérature pour les humains et les chiens. Ainsi, la clairance féline de la clomipramine est plus lente que la clairance canine mais semblable à celle de l'humain, tandis que le volume de distribution à l'équilibre chez le chat est semblable à celui du chien mais plus petit que celui de l'humain (Evans et al., 1980; Hewson et al., 1998a; King et al., 2000a; Gex-Fabry et al., 2000; Lainesse et al., 2006). Par conséquent, le temps de demi-vie moyen de la clomipramine chez le chat (12 h) est 2.4 fois plus long, mais 1.7 fois plus court que les temps de demi-vie chez le chien (5 h) et l'humain (20 h) respectivement (Evans et al., 1980; Hewson et al., 1998; King et al., 2000a; Gex-Fabry et

al., 2000; Lainesse et al., 2006). Des différences semblables sont rapportées dans la littérature pour la disposition du diazépam et de la buspirone entre les espèces (Boothe, 2001; Simpson & Papich, 2003; Mealey et al., 2004).

En ce qui concerne la biodisponibilité de la clomipramine, celle-ci est supérieure chez le chat comparativement à celle rapportée pour les humains et les chiens (Evans et al., 1980; Gex-Fabry et al., 2000; King et al., 2000a; King et al., 2000b; Lainesse et al., 2006). La biodisponibilité étant le ratio des ASC entre l'administration orale et intraveineuse, elle met en évidence les différents facteurs influençant l'absorption par le tractus gastrointestinal et l'ampleur de l'effet de premier passage. Une plus grande biodisponibilité féline semble donc être le reflet d'une plus grande absorption de la clomipramine et/ou d'un effet de premier passage moins important chez le chat, comparativement à l'humain et au chien. Des facteurs ayant possiblement favorisé une plus grande absorption de la clomipramine chez les chats dans les deux études de pharmacocinétique incluent une plus petite aire de surface du comprimé dû au fractionnement du Clomicalm® en quart ou en moitié et la présence de nourriture lors de l'administration orale. Les différences de pH, surface d'absorption, perméabilité et débit sanguin du tractus gastrointestinal ainsi que la quantité et les fonctions relatives des transporteurs et des enzymes métaboliques intestinaux entre les chats, chiens et humains peuvent également avoir contribué à cette variation d'absorption entre ces espèces. Une investigation de l'impact de ces facteurs sur l'absorption de la clomipramine chez le chat et une caractérisation des différences entre les espèces permettraient de quantifier l'influence de l'absorption sur la variation interspécifique de la biodisponibilité de la clomipramine.

Le facteur le plus important influençant l'effet de premier passage d'un xénobiotique est la capacité intrinsèque des enzymes hépatiques à métaboliser le médicament. En normalisant la clairance totale de la clomipramine par un facteur proportionnellement relié à la taille de l'individu, soit le débit cardiaque, il est donc possible de comparer le potentiel d'extraction du médicament par le foie entre les espèces (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004a). Cet ajustement physiologique a démontré une faible capacité d'extraction hépatique de la clomipramine chez le chat dans les études de cette thèse, entraînant telle qu'anticipée, la conclusion d'un effet de premier passage inférieur comparativement à l'homme et au chien. De plus, les deux études de pharmacocinétique de la clomipramine ont démontré que le temps nécessaire pour atteindre la concentration maximale de la DCMP est plus long chez le chat que chez l'humain et le chien, reflétant ainsi une vitesse d'absorption plus lente et/ou une déméthylation de la clomipramine moins efficace et plus lente chez les chats que chez les humains et les chiens, tout comme il a été observé dans l'étude de métabolisme *in vitro*. Tous ces résultats sont compatibles avec une meilleure biodisponibilité de la clomipramine chez le chat. Il est également possible que la différence interspécifique des paramètres de pharmacocinétique de la clomipramine ait été causée, en partie, par la variation dans l'étendue de la liaison aux protéines plasmatiques de la clomipramine entre les espèces, surtout en ce qui concerne la clairance et le volume de distribution. Quoiqu'une forte liaison ait été documentée chez l'humain et le chien (Evans et al., 1980; King et al., 2000a), l'étendue de la liaison protéinique de la clomipramine chez les chats n'a pas été déterminée lors des études de cette thèse.

Métabolisme comparatif de la clomipramine

L'étude de métabolisme *in vitro* a démontré que la biotransformation de la clomipramine chez les chats et les chiens est dépendante des cytochromes hépatiques. Cette étude a également identifié les mêmes métabolites formés par les microsomes de rats, chiens et chats. Toutefois, une capacité métabolique de phase I plus lente et moins efficace des microsomes félines comparativement à celle des microsomes de rats et de chiens a été observée. Cette faible activité microsomale a antérieurement été documentée pour plusieurs substrats comme la dextrométhorphane et le S-méphénytoïne, dans d'autres études de métabolisme comparative *in vitro* impliquant des microsomes de chats (Hietanen & Vainio, 1973; Chauret et al., 1997; Kamali et al., 1999; VanBeusekom et al., 2006). Dans l'étude de métabolisme, les microsomes de chats ont pris six heures à métaboliser 10.5% de la clomipramine, tandis que les microsomes de rats et de chiens ont pris 5 et 15 minutes respectivement pour le même pourcentage de biotransformation. De plus, les différences qualitatives des profils métaboliques de la clomipramine entre les espèces ont démontré que la déméthylation par les microsomes de rats et de chats était 6 et 1.5 fois plus efficace que l'hydroxylation respectivement, tandis que l'hydroxylation par les microsomes canins était 10 fois plus efficace que la déméthylation. Ainsi, quoique le chat ait démontré un métabolisme microsomal inférieur, sa capacité de déméthylation relative à sa capacité d'hydroxylation était supérieure, contrairement à ce qui a été observé chez le chien. Ces résultats *in vitro* sont en accord avec les résultats *in vivo* des deux études de pharmacocinétique démontrant que le ratio métabolique (RM) moyen (ASC DCMP/ASC clomipramine) des chats était plus élevé que celui des chiens.

Depuis la découverte de l'affinité de la DCMP aux récepteurs anticholinergiques et noradrénergiques plutôt que sérotoninergiques, par l'équipe de Benfield en 1980, l'importance de la contribution de ce métabolite à l'incidence des effets secondaires adverses a été le focus du suivi clinique des Cp et des études de pharmacocinétique et de métabolisme chez les humains. Supposant que la DCMP est le métabolite responsable de l'incidence des effets secondaires chez les patients canins et félins, ces résultats expliqueraient pourquoi les chats semblent cliniquement plus sensibles aux effets du Clomicalm® que les chiens. Le peu de DCMP formé par les microsomes félins dans cette troisième étude de la clomipramine chez les chats par contre, met en question l'importance clinique de ce métabolite chez cette espèce. En effet, un faible métabolisme de la clomipramine chez le chat peut se traduire en une élimination lente du xénobiotique, résultant en une concentration élevée du principe actif au site d'action, ainsi qu'aux récepteurs antimuscariniques, antihistaminiques et adrénérgiques. Il est donc possible que la clomipramine, et non la DCMP, soit responsable de tous les effets cliniques (thérapeutiques et adverses) chez le patient félin. Des études à doses multiples par contre, sont nécessaires pour évaluer la présence d'une accumulation de la DCMP, pouvant contribuer à l'effet clinique après une administration chronique du xénobiotique chez les chats. De plus, la contribution clinique et les différences interspécifiques des paramètres de pharmacocinétique de la DCMP (Cl et Vss) chez le chat et le chien pourraient être évaluées après une administration intraveineuse de ce métabolite chez ces espèces. Contrairement aux humains et selon les résultats de l'étude de métabolisme *in vitro*, la DCMP n'est pas le métabolite le plus abondant chez les chiens. En effet, les microsomes canins ont formé l'hydroxyclopmipramine dans un ratio des aires de pic de 10:1 avec la DCMP après une heure d'incubation. Chez les humains, il est suggéré qu'une diminution

de la capacité d'hydroxylation engendrerait une augmentation des Cp de la DCMP (jusqu'à 10 fois ou plus), et de la clomipramine (Gex-Fabry et al, 1990). Il semblerait ainsi qu'une déficience d'hydroxylation, au lieu de déméthylation, serait un paramètre plus adéquat pour la détection de patients à risques de démontrer des Cp de clomipramine et de DCMP dans les limites toxiques, quand des doses habituelles de cet ADT sont administrées aux patients canins et humains. En considérant que le CYP responsable de l'hydroxylation de la clomipramine (CYP2D6) chez l'humain est caractérisé par un polymorphisme génétique important et une activité enzymatique saturable (Bertilsson et al., 2002; Vandael et al., 2004), il est surprenant que le suivi des Cp d'hydroxyclopidramine et d'hydroxyDCMP n'est pas pratique courante en médecine humaine. Compte tenu du peu d'effets secondaires causés par l'hydroxyclopidramine et sa capacité d'inhiber le recaptage de la sérotonine équivalente à la clomipramine (Nuñez & Perel, 1995), il est possible que la formation prédominante d'hydroxyclopidramine chez les chiens contribue à la grande efficacité clinique et la faible incidence d'effets secondaires adverses chez les patients canins et expliquerait pourquoi le suivi des Cp du principe actif et de ces métabolites chez le chien est considéré inutile. Cependant, il est intéressant de noter que le CYP2D15 canin (orthologue du CYP2D6 humain) a démontré un polymorphisme génétique important dans l'hydroxylation de l'anti-inflammatoire non stéroïdien, le celecoxib, où 50% des chiens de race Beagle de l'étude (n = 242) ont été identifiés comme métaboliseurs lents (Paulson et al., 1999). Ainsi, il est possible qu'un tel polymorphisme génétique influence le métabolisme de la clomipramine chez les chiens augmentant de façon significative la Cp de DCMP chez les hydroxylateurs lents et par conséquent, l'incidence d'effets secondaires chez le chien.

La présence de métabolites N-oxyde dans les solutions microsomales de rats, a également été détectée de façon qualitativement significative dans les solutions microsomales canines et félines de l'étude métabolique. Plus particulièrement, les microsomes de chattes ont métabolisé la clomipramine par N-oxydation plus efficacement que par déméthylation et plus rapidement et efficacement que les microsomes de chats mâles. Le N-oxyde était relativement moins important chez les rats et chiens. Malheureusement, l'influence de ce métabolite sur le succès thérapeutique et l'incidence d'effets secondaires est inconnue autant chez les humains que chez les animaux. L'administration intraveineuse du N-oxyde et la détermination de ses affinités face aux récepteurs sérotoninergiques, adrénergiques, muscariniques et histaminiques pourraient élucider sa contribution clinique chez ces espèces.

La détection du DiDCMP et de l'hydroxyDCMP dans les échantillons aurait aidé à caractériser davantage le processus de déméthylation et d'hydroxylation de la DCMP chez les chats. L'absence de ces métabolites dans les solutions peut indiquer soit une limite de la méthode analytique (séparation des ions avec pics superposés, faible sensibilité), une capacité microsomale intrinsèque de déméthylation et d'hydroxylation plus faible pour la DCMP que pour la clomipramine et/ou une trop petite quantité de DCMP formée pour permettre une biotransformation successive de ce métabolite par les microsomes de chats. En effet, une caractérisation qualitative des métabolites hydroxylés de la DCMP n'a été possible qu'après l'addition directe de ce métabolite à la solution microsomale pré-incubation dans une étude de rats (Krüger et al., 1986). Bien qu'il soit intéressant de caractériser le métabolisme de la DCMP chez le chat, ces métabolites sont probablement sans importance clinique pour cette espèce puisqu'il est anticipé que ceux-ci soient formés en trop petite quantité.

L'utilisation des microsomes a exclu la participation des enzymes UGT et les transporteurs intestinaux, hépatiques et biliaires dans la biotransformation de la clomipramine. Une représentation complète du métabolisme de la clomipramine par investigation dans la capacité de glucuronidation des métabolites hydroxylés de la clomipramine et de la DCMP chez le chat pourrait révéler une faible activité de l'UGT, enzyme de phase II, telle que documentée pour l'acétaminophène (Court & Greenblatt, 1997a, b), pouvant également contribuer au RM plus élevé chez le chat que le chien, observé en situation *in vivo*. Des études comparatives de métabolisme *in vivo* quantifiant les différents métabolites glucuronidés et le recouvrement de la clomipramine dans l'urine des différentes espèces aideraient à clarifier les différences interspécifiques de cette avenue métabolique pour la clomipramine et la DCMP.

Variabilité interindividuelle du niveau de sédation et des paramètres de pharmacocinétique de la clomipramine chez les chats

L'étude de pharmacocinétique classique de la clomipramine a démontré une variabilité importante dans l'intensité de la manifestation clinique de sédation après une administration intraveineuse et orale chez les chats. La deuxième étude de pharmacocinétique a également démontré une variabilité interindividuelle significative du niveau de sédation dans une grande population mixte de chats normaux et anxieux après une seule administration orale de 0.31 à 0.62 mg/kg de la formulation commerciale de clomipramine en comprimés (Clomicalm®). Cette variabilité, bien qu'observée après une seule dose de clomipramine, est en accord avec la variabilité de l'incidence et l'intensité des effets secondaires adverses observés dans les sept études cliniques de la clomipramine chez les chats démontrant divers troubles de comportement (Dehasse, 1997; Seksel &

Lindeman, 1998; Litster, 2000; King et al., 2004; Landsberg & Wilson, 2005; Hart et al., 2005; Mertens et al., 2006).

Les deux études de pharmacocinétique de ce programme doctoral ont également démontré une grande variabilité interindividuelle des profils concentrations-temps (CT) et par conséquent, des paramètres de pharmacocinétique de la clomipramine après l'administration orale de la clomipramine, tandis que la variabilité interindividuelle des profils CT et des paramètres de la DCMP a été observée après les voies d'administration orale et intraveineuse. La variabilité des paramètres de pharmacocinétique de la clomipramine entre les chats après l'administration i.v. était dans les limites acceptables de variation causée par les erreurs expérimentales et analytiques, soit de < 20%. Cette variabilité après une administration orale reflète celle reconnue chez les humains mais est supérieure à la variabilité interindividuelle observée chez les chiens pour les valeurs estimées de l'ASC du principe actif et de son métabolite (Hewson et al., 1998a; Gex-Fabry et al., 2000; King et al., 2000a, b). Suite à ces résultats, il semblerait que l'**absorption** et le **métabolisme** soient principalement responsables de la variabilité des paramètres de pharmacocinétique estimés et possiblement de la variabilité du niveau de la sédation observée entre les chats dans ces deux études.

Absorption

La présence d'un double pic durant la phase d'absorption des profils CT des chats durant les deux études de pharmacocinétique est considérée comme un facteur important responsable, en partie, des différences de disposition de la clomipramine entre les chats. Les raisons expliquant la présence d'une telle absorption biphasique sont nombreuses, cependant, la cause la plus plausible est l'effet de repas. Il est possible que les deux

cuillères à thé de nourriture en conserve, données à chaque chat suite à l'administration orale de la clomipramine pour éviter les vomissements, aient ralenti la vidange gastrique par le déclenchement du processus de digestion. Cette hypothèse a des conséquences cliniques puisque l'administration de la clomipramine avec ou sans nourriture pourrait influencer l'étendue et la vitesse d'absorption et par conséquent l'exposition interne (ASC) du principe actif et/ou de son métabolite, et possiblement causer une variabilité quant à l'effet thérapeutique et l'incidence d'effets secondaires. En effet, l'étude canine de pharmacocinétique de King et coll. (2000a) a démontré une augmentation significative de 25% de l'ASC de la clomipramine lorsque celle-ci était administrée avec un repas, sans toutefois remarquer de différence entre les ASC de la DCMP après les administrations avec ou sans repas. Ces auteurs concluent par contre, que cette augmentation ne devrait pas avoir de conséquences cliniques puisque cette variation d'ASC, causée par la nourriture, était plus petite que la variabilité interindividuelle des ASC observée pour l'ensemble des chiens (King et al., 2000a). De plus, ils suggèrent qu'une réduction de l'effet de premier passage due à l'augmentation postprandiale du débit sanguin au foie expliquerait l'absence d'une augmentation des ASC de la DCMP en parallèle avec l'augmentation de l'ASC de la clomipramine suite au repas (King et al., 2000a). Une étude de pharmacocinétique évaluant l'effet de repas sur l'ASC de la clomipramine et de la DCMP chez les chats serait utile pour caractériser l'influence de la nourriture sur la disposition de cet ADT dans le but d'établir les recommandations appropriées lors de la prescription de ce xénobiotique aux patients félins. De plus, une étude évaluant l'efficacité clinique après l'administration de la clomipramine avec ou sans nourriture est nécessaire pour appuyer les hypothèses émises par King et coll. (2000a) chez les chiens et par cette thèse chez les chats.

D'autres facteurs pouvant être responsables de l'absorption biphasique observée incluent le complexe moteur migrant du système gastrointestinal, phénomène observé pour la ranitidine chez l'humain (Yin et al., 2003) et l'alprazolam chez le rat (Wang et al., 1999), une absorption secondaire distale de l'ADT et un effet anticholinergique de la clomipramine sur le tractus gastrointestinal. L'absence du double pic après l'administration i.v., par contre, rend le recyclage entérohépatique peu plausible.

Hewson et coll. (1998a) ont suggéré que l'anxiété généralisée d'un des chiens de leur étude de pharmacocinétique de la clomipramine aurait physiologiquement ralenti la vidange gastrique et la vitesse d'absorption de l'ADT et par conséquent, généré les plus hautes valeurs estimées de l'ASC et l'ASCM du principe actif et de son métabolite des six chiens utilisés dans leur étude, et ce même après 28 jours d'administration de clomipramine. Il est intéressant de noter que la seule chatte (E) de la première étude de pharmacocinétique considérée comme anxieuse avait une biodisponibilité de 138% indiquant une absorption ralentie et prolongée (phénomène de « flip-flop »), une clairance de la clomipramine plus lente et par conséquent des valeurs estimées de l'ASC et de l'ASCM de la clomipramine et de la DCMP les plus élevées du groupe. Cette chatte a également démontré un niveau de sédation plus prononcé et une léthargie prolongée plusieurs jours suivant l'étude à dose unique. Ainsi, il est possible que l'anxiété soit responsable d'absorption variable et erratique, et possiblement de la variabilité d'effets cliniques observée entre les chats de la population. Il est également possible par contre, qu'une différence de métabolisme soit responsable de la variabilité clinique indépendamment de l'anxiété, vu la différence des valeurs estimées de la clairance de la clomipramine entre les six chats. Ainsi, la participation de chats normaux autant

qu'anxieux dans la deuxième étude de pharmacocinétique était essentielle pour vérifier ces hypothèses. Toutefois, aucune corrélation n'a été établie entre le score d'anxiété des 76 chats et les paramètres du principe actif et de son métabolite, y compris la biodisponibilité et la clairance de la clomipramine, suggérant qu'il n'y avait aucune différence dans la disposition de la clomipramine entre les chats anxieux et les chats normaux.

L'utilisation du tableau dose/poids dans l'étude de pharmacocinétique d'une population de 76 chats a permis une posologie de clomipramine qui représentait l'utilisation clinique de cet ADT en visant une dose de 0.25 à 0.50 mg/kg telle que recommandée par King et coll. (2004). Cependant, le fractionnement des comprimés de 5 mg de Clomicalm® en quart et en moitié pour accommoder les différents poids des patients félins, a généré une étendue de doses avec une différence d'un facteur de 2, c'est-à-dire de 0.31 à 0.62 mg/kg. Il est donc possible que la variabilité interindividuelle des paramètres de pharmacocinétique détectée par cette étude ait simplement été causée par une différence de dose administrée ou par la difficulté de couper le comprimé en quart de façon précise. Le fait qu'une corrélation entre la dose et l'ASC₀₋₂₄ de la clomipramine ait été observée, quoique faible, indique la possibilité d'une implication de la dose comme facteur de variation clinique. Ceci pourrait expliquer la grande variabilité de l'efficacité clinique observée dans les cinq études antérieurement publiées utilisant une étendue semblable de doses. Ainsi, les vétérinaires prescrivant le Clomicalm® de 5 mg avec l'intention d'utiliser une telle étendue de dose et de couper le comprimé en quart doivent être informés de la possibilité d'engendrer une variabilité des C_p pouvant être responsable, en partie, d'une imprévisibilité de l'effet thérapeutique et de l'incidence d'effets secondaires adverses. Il serait difficile par contre, d'éviter l'utilisation d'une étendue de doses avec

l'administration du comprimé, même si le fabricant fournissait des comprimés de 1.25 et 2.5 mg de Clomicalm® sécables en deux ou en quatre, puisqu'il serait quand même impossible d'accommoder tous les poids de chats.

Un autre aspect important à considérer est le fait que plusieurs propriétaires ont de la difficulté à administrer un comprimé à leur chat, d'où l'utilisation grandissante de formulations liquides disponibles pour plusieurs médicaments y compris la clomipramine. Malheureusement, ces formulations ne sont pas encore standardisées et risquent également de causer des absorptions erratiques. L'équipe de Mertens (2006) ayant tout dernièrement utilisé une dose exacte de clomipramine de 0.5 mg/kg en liquide formulé sur mesure pour les chats de leur étude, ne fait pas mention des écarts-types et des coefficients de variation calculés pouvant indiquer s'il y avait présence de variabilité interindividuelle dans la réponse clinique pour le traitement de l'alopecie psychogénique. Ainsi, il n'est pas possible de savoir si la standardisation de doses pouvait potentiellement diminuer la variabilité clinique entre les chats. En effet, il se pourrait que ces auteurs n'aient pas détecté de différence significative entre les groupes clomipramine et placebo justement à cause de la présence d'une grande variabilité interindividuelle d'effet thérapeutique de la clomipramine pour l'alopecie psychogénique.

L'effet repas et l'étendue de doses administrées oralement sont donc d'importants facteurs identifiés par les deux études de pharmacocinétique de cette thèse, qui sembleraient influencer la variabilité de l'absorption de la clomipramine entre les chats, et par conséquent, pourraient causer une variabilité dans la réponse clinique et incidence d'effets secondaires adverses observés. La seule façon d'éviter ces influences sur la disposition de cet ADT serait d'administrer la clomipramine par voie i.v. Cependant, cette suggestion n'est ni pratique, ni économique. Il s'agirait plutôt de déterminer l'influence du

repas et d'utiliser un produit standardisé (liquide ou solide), spécialement conçu pour les chats plutôt que d'utiliser un produit destiné aux chiens. Bien qu'une administration transdermale d'une dose fixe de la clomipramine semble être la solution idéale pour éviter ces facteurs, l'étude transdermale de l'amitryptiline et de la buspirone (Mealey et al., 2004) démontre l'importance d'entreprendre, **avant** son utilisation clinique, des études de pharmacocinétique féline, afin d'élaborer une posologie adéquate pour cette voie d'administration chez les chats.

Métabolisme

La possibilité d'une variabilité dans la capacité métabolique de la clomipramine entre les chats a été soupçonnée suite à la grande variabilité des profils CT de la DCMP observée autant après l'administration i.v. qu'orale, lors de l'étude de pharmacocinétique classique de cette thèse. Quoique la deuxième étude de pharmacocinétique n'ait démontré aucune association significative entre les covariables physiologiques (âge, catégorie d'âge, poids, race) ou comportementales (score d'anxiété, présence ou absence de trouble de comportement) et les valeurs estimées moyennes des paramètres de pharmacocinétique de la clomipramine et de la DCMP de cette population féline, une clairance totale plus rapide et un RM significativement plus élevé chez les chattes ont été observés. Ces résultats suggèrent la possibilité d'une déméthylation et/ou d'une hydroxylation de la clomipramine plus efficace chez les femelles que chez les mâles comme il a été antérieurement rapporté chez les rats (Krüger et al., 1986), mais contrairement à ce qui a été observé chez les humains (Gex-Fabry et al., 1990; Mundo et al., 1999; Hildebrandt et al., 2003). Il est intéressant de noter que tous les chats de l'étude étaient stérilisés entre l'âge de six mois et

un an, suggérant la possibilité d'une détermination *in utero* et/ou périnatale de la capacité métabolique des enzymes chez les chats.

Existe-t-il donc une différence entre les sexes dans le métabolisme de la clomipramine chez les chats qui pourrait expliquer, en partie, la grande variabilité interindividuelle des paramètres de pharmacocinétique observée dans la population féline étudiée? L'étude *in vitro* de Chauret et coll., en 1997, n'a détecté aucune différence de capacité métabolique des microsomes entre les sexes chez les humains, chats, chiens et chevaux pour une série de substrats. Cependant, tout récemment, une étude microsomale féline a démontré des différences significatives de capacité métabolique de divers CYP entre les sexes pour plusieurs substrats (Van Beusekom et al., 2006). Ainsi, les orthologues félins CYP1A, CYP2B et CYP2D avaient une capacité enzymatique supérieure chez les chats, tandis que les orthologues CYP2C et CYP2E étaient plus efficaces chez les chattes (Van Beusekom et al., 2006). Il n'y avait aucune différence statistiquement significative de capacité enzymatique du CYP3A entre les sexes (Van Beusekom et al., 2006). L'étude de métabolisme *in vitro* de la clomipramine chez les chats de cette thèse a également démontré une différence qualitative de biotransformation de la clomipramine entre les microsomes de chats mâles et femelles. En se basant sur les principaux CYP responsables de déméthylation (CYP3A4, CYP2C19) et d'hydroxylation (CYP2D6) de la clomipramine chez les humains, et selon l'étude de Van Beusekom et coll. (2006), la déméthylation de la clomipramine devrait être supérieure chez les chattes, tandis que l'hydroxylation de cet ADT devrait être supérieure chez les chats. En fait, les concentrations plus élevées de DCMP et d'hydroxyclopmipramine détectées dans les solutions microsomales de chattes suggèrent que celles-ci ont eu une tendance à déméthyliser et hydroxyler le principe actif plus efficacement avec le temps que les chats.

Considérant que la spécificité des substrats des CYP félins n'a jamais été évaluée et que plusieurs inhibiteurs spécifiques pour certains CYP humains n'ont pu inhiber les isoformes correspondantes félines (Chauret et al., 1997; Van Beusekom et al., 2006), il est possible que les avenues métaboliques de la clomipramine soient catalysées par des isoenzymes différents chez le chat comparativement à ce qui est rapporté chez le rat et l'humain. Les résultats de la troisième étude étant préliminaires, des études de cinétique enzymatique et moléculaires sont nécessaires pour confirmer la présence d'un dimorphisme sexuel dans la biotransformation de la clomipramine, et les CYP responsables du métabolisme de cet ADT chez les chats respectivement.

Le métabolisme de phase I n'est qu'une facette du métabolisme du xénobiotique et toutes extrapolations à des situations *in vivo* doivent être faites avec prudence. D'autres études félines de métabolisme comparant les sexes et incluant l'activité microsomale de phase II, avec des échantillons plus grands et l'utilisation de différentes doses de clomipramine à des conditions d'incubation optimales (linéaires avec le temps et la concentration protéinique) sont requises pour supporter ces résultats et permettre une investigation des différences de cinétique enzymatique entre les sexes.

Corrélation entre la concentration plasmatique et le niveau de sédation

Bien que cela ne fasse pas partie des principaux objectifs de cette thèse, des données préliminaires récoltées lors des deux études de pharmacocinétique de la clomipramine chez les chats n'ont démontré aucune corrélation entre le niveau de sédation et les C_p , et l'exposition interne (ASC_{0-24h}) de la clomipramine et de la DCMP. Ce manque de corrélation peut être expliqué par quatre raisons fondamentales, dont le choix

du biomarqueur (score de sédation), la dose unique, la linéarité de la pharmacocinétique de la clomipramine et la complexité pharmacodynamique de cet ADT.

Score de sédation

Le choix du score de sédation était basé sur le fait que la sédation entraîne souvent un arrêt prématuré du traitement de clomipramine par les propriétaires dès les premières administrations et par conséquent, un échec thérapeutique chez nombreux chats démontrant des troubles de comportement. Dans le cas d'une corrélation établie entre la Cp ou paramètres de pharmacocinétique de la clomipramine et/ou de son métabolite et le score de sédation, ce dernier aurait pu être utilisé comme biomarqueur précoce pouvant détecter les chats les plus sensibles aux effets nocifs de l'ADT et susceptibles de succomber à un échec thérapeutique dès le début du traitement. Or, il est possible que le score de sédation n'ait pas été un marqueur pharmacodynamique approprié pour détecter une corrélation concentration plasmatique-effet ou suffisamment détaillé pour détecter des différences subtiles entre les chats dans ces études. Une corrélation entre la concentration cérébrale de la clomipramine et le niveau de sédation, aurait peut-être été plus appropriée. Cependant, une technique de microdialyse permettant de mesurer les concentrations du principe actif et de son métabolite au site d'action aurait été trop invasive pour cette étude clinique.

Dose unique

Il n'est pas surprenant qu'une corrélation directe entre le RM et l'intensité de la sédation n'ait pas été établie dans les deux études de pharmacocinétique, puisque d'après l'étude de métabolisme *in vitro*, la contribution clinique de la DCMP n'est peut être pas

significative chez le chat, surtout après une seule administration de clomipramine. De plus, il est anticipé que la concentration cérébrale de la DCMP est encore plus basse que la C_p de ce métabolite de par sa nature hydrophilique. En effet, une étude *in vivo* a démontré que le RM du cerveau était de 59% plus bas que le RM au niveau sérique chez 20 rats mâles après plusieurs administrations de clomipramine (Weigmann et al., 2000).

Bien qu'aucune corrélation entre le niveau de sédation, les paramètres de pharmacocinétique et le sexe des chats n'a pu être établie après une seule administration de clomipramine dans les études de pharmacocinétique de cette thèse, il serait intéressant d'évaluer la relation PC/PD entre les sexes après une administration chronique de la clomipramine pour le traitement, entre autres, du marquage urinaire. En supposant que la clomipramine est l'entité chimique principalement responsable des effets cliniques (thérapeutiques et secondaires) chez le chat, l'hypothèse de recherche serait que la chatte réponde moins bien à la clomipramine que le chat pour la même dose en mg par kg administrée, puisque celle-ci métabolise la clomipramine plus efficacement, éliminant ainsi l'ADT plus rapidement et par conséquent, a des C_p inférieures pour atteindre le site d'action. Cependant, si la DCMP contribue de façon significative aux effets secondaires adverses chez les chats après une administration chronique de la clomipramine à cause d'une accumulation du métabolite, la chatte serait plus susceptible aux toxicités de la clomipramine que le chat. Ainsi, une étude à administration chronique de clomipramine chez les chats est donc nécessaire pour évaluer la contribution du principe actif en relation avec le métabolite chez cette espèce, puisqu'une accumulation de la DCMP pourrait engendrer des conséquences cliniques.

Linéarité de la pharmacocinétique de la clomipramine

Ceci dit, l'évaluation d'une corrélation concentration plasmatique-effet suppose la présence d'une cinétique linéaire du médicament dans le corps. Or, certaines études ont démontré une cinétique non linéaire de la clomipramine chez les chiens et humains après l'administration chronique de cet ADT, possiblement causée par une saturation des enzymes responsables de l'hydroxylation du principe actif et de son métabolite (Kuss & Jungkunz, 1986; Gex-Fabry et al., 1990; Hewson et al., 1998a). Une corrélation positive détectée entre la dose en mg par kg et l'ASC, et le Tmax moyen de la clomipramine était trop faible pour démontrer une tendance de cinétique linéaire pour la clomipramine chez les chats. De plus, l'étude de métabolisme n'a détecté aucune évidence de saturation des enzymes de déméthylation ni d'hydroxylation chez les chiens et les chats après une et six heures d'incubation respectivement, quoiqu'une saturation de déméthylation ait été détectée chez les rats après une heure. Des études félines *in vivo* ou *in vitro* à doses multiples de plus grande étendue (facteur de 10) sont donc requises pour caractériser de façon adéquate la linéarité de la pharmacocinétique de ce xénobiotique chez les chats.

Complexité pharmacodynamique de la clomipramine

Une corrélation entre les Cp ou les paramètres de pharmacocinétique de la clomipramine et les effets thérapeutiques chez les humains est controversée, entre autres à cause de la complexité pharmacodynamique de cet ADT (Charlier et al., 2000; Gex-Fabry et al., 2000). Bien que le temps pour atteindre des Cp à l'équilibre de la clomipramine et de la DCMP soit de 5 et 15 jours respectivement, une étude de 99 personnes dépressives a démontré que 31 jours étaient nécessaires pour qu'une réponse clinique satisfaisante se manifeste dans 50% des cas (Gex-Fabry et al., 1999). Comparativement, selon le temps de

demi-vie de la clomipramine calculé chez les chats (12 heures), l'atteinte de l'équilibre des Cp de la clomipramine prendrait seulement 3 jours (Lainesse et al., 2006). Cependant, les études cliniques félines ont démontré que 1 à 3 semaines étaient nécessaires pour atteindre un équilibre pharmacodynamique (effet thérapeutique) pour la majorité des chats répondeurs (Dehasse, 1997; Seksel & Lindeman, 1998; Litster, 2000; King et al, 2004; Landsberg & Wilson, 2005; Hart et al., 2005; Mertens et al., 2006). Ainsi, la présence d'une hystérèse suggère la possibilité d'une chaîne de réactions engendrées par la présence de messagers secondaires et des mécanismes d'autorégulation tentant de maintenir une homéostasie monoaminergique dans le cerveau, rendant difficile la possibilité de détecter une corrélation significative entre la Cp et l'effet thérapeutique chez les chats.

En médecine humaine, des doses différentes sont prescrites selon la maladie affective et le suivi des Cp est nécessaire pour assurer un succès thérapeutique et minimiser les toxicités chez les patients humains (DUAG, 1999; Gex-Fabry et al., 1999; Gram et al., 1999; Gex-Fabry et al., 2000). Il est donc possible que la variabilité clinique du succès thérapeutique de la clomipramine observée cliniquement entre les chats soit causée par l'administration de la même dose de clomipramine pour tous les types de trouble de comportement nécessitant plutôt des doses différentes. La détermination de biomarqueurs appropriés représentant l'importance pharmacodynamique du médicament de façon objective et fiable est importante pour évaluer son efficacité clinique en rapport avec la Cp mesurée pour chaque trouble de comportement. Sommes-nous par contre, convaincus que le processus pathopsychologique causant les troubles affectifs chez les humains est le même que celui qui cause de l'anxiété chez l'animal?

Chaque étude de ce programme doctoral a apporté un détail pertinent aidant à élucider la variabilité imprévisible de la réponse thérapeutique et de l'incidence des effets secondaires spécifiques à l'administration de clomipramine chez les chats. L'exploration d'une seule facette à la fois par contre, a engendré des résultats qui ont provoqué la formulation d'une série de questions et d'hypothèses. L'échantillonnage d'un compartiment « effet » approprié et l'identification de tous les métabolites participant à l'activité clinique (thérapeutique et adverse) auraient pu aider à répondre davantage à certaines questions. Cependant, les différents récepteurs sérotoninergiques et la présence de messagers secondaires des protéines G engendrant des délais d'action auraient également été difficiles à mesurer. De plus, la diversité des neurorécepteurs et récepteurs extracérébraux affectés par la clomipramine crée des variabilités exponentielles. Idéalement, la quantification de la clomipramine dans le cerveau après plusieurs administrations aurait permis une corrélation concentration-effet, cependant la présence du médicament à proximité des récepteurs ne veut pas nécessairement conclure que la totalité ou même la majorité des molécules sont actives. Ainsi une investigation pharmacodynamique est également nécessaire, quoique complexe, pour caractériser la variabilité clinique observée entre les chats surtout après une administration chronique de la clomipramine. Il était clair dès le début du programme doctoral qu'une extrapolation interspécifique n'était pas judicieuse et qu'une investigation de la pharmacocinétique et du métabolisme de la clomipramine chez les chats n'était qu'un début du déchiffrement de l'énigme neuropharmacologique relié à ce médicament.

Conclusions

Les études effectuées lors de ce programme de doctorat ont permis d'élucider quelques pistes d'explication et de formuler des hypothèses pouvant mener à une meilleure compréhension de la problématique entourant l'utilisation de la clomipramine chez les chats.

Des comparaisons interspécifiques ont démontré une plus grande biodisponibilité et un ratio métabolique supérieur, ainsi qu'une clairance plus lente de la clomipramine chez les chats versus les chiens. Ces différences expliquent, en partie, la plus grande incidence d'effets secondaires adverses cliniquement observés chez certains chats comparativement aux chiens. De plus, les différences qualitatives de métabolites détectés dans les profils métaboliques de la clomipramine entre le chien et le chat pourraient aussi contribuer à cette variabilité interspécifique. D'après ces résultats préliminaires, il est possible de proposer que la C_p de la DCMP ne soit pas un paramètre approprié à mesurer dans le suivi clinique des patients canins et félins après l'administration de la clomipramine, comme il est recommandé pour les patients humains. Puisque l'activité de biotransformation féline était faible, il semblerait que la clomipramine soit le seul contributeur aux effets thérapeutique et secondaires chez cette espèce. Ainsi, les études de cette thèse attestent l'importance d'éviter d'établir des extrapolations d'une espèce à l'autre pour ce xénobiotique.

Les études de pharmacocinétique de la clomipramine chez les chats ont démontré une grande variabilité interindividuelle des valeurs estimées des paramètres de pharmacocinétique de la clomipramine et de la DCMP. Les principaux facteurs à l'origine de ces variabilités interindividuelles sont les différences d'absorption et de métabolisme

observées dans les trois études. L'administration du comprimé avec ou sans repas ainsi que l'utilisation clinique d'une étendue de doses, variant par un facteur de 2 dû au fractionnement du comprimé de Clomicalm® 5 mg en quart et en moitié, sont d'importantes sources de variabilité qui doivent être prises en considération par le vétérinaire prescrivant cet ADT à ses patients félins.

Considérant la tendance des microsomes de chattes à métaboliser la clomipramine plus rapidement et plus efficacement que les microsomes de chats mâles, il est possible cliniquement que les chats mâles soient exposés à la clomipramine plus longtemps et par conséquent, aient une meilleure efficacité clinique que les femelles, pour la même dose de Clomicalm® administrée. Les études de ce programme doctoral suggèrent qu'il est possible que la femelle nécessite une dose plus élevée de Clomicalm® que le mâle afin d'assurer un succès thérapeutique, tandis que le mâle aurait besoin d'une dose plus faible pour minimiser l'incidence des effets secondaires. Il serait également possible de diminuer la fréquence d'administration de la clomipramine chez les mâles, cependant un plus grand intervalle entre les doses (> 24 heures) pourrait causer de trop grandes fluctuations des Cp et par conséquent, entraîner une rechute du trouble de comportement (épisodes de marquage) entre les administrations. De plus, il est important de considérer les différents types de troubles de comportement affligeant majoritairement les chats versus les chattes, ceux-ci pouvant nécessiter des doses différentes pour assurer un effet thérapeutique adéquat.

La grande variabilité interindividuelle des paramètres de pharmacocinétique de la clomipramine chez les chats étant multifactorielle et l'élimination de tous les facteurs

influençant cette variabilité n'étant pas possible, la détermination d'une étendue de Cp de la clomipramine efficace pour chaque trouble de comportement félin permettrait un suivi des Cp de cet ADT, un ajustement individualisé des posologies indépendamment des facteurs influençant l'absorption et le métabolisme, et une vérification, si nécessaire, de la cause de l'échec thérapeutique (non observance de la prescription versus patient non répondeur). Ce suivi des Cp permettrait une amélioration de l'utilisation clinique de la clomipramine chez les chats et aiderait à diminuer la frustration qui émane d'une thérapie à tâtons. Il est possible, par contre qu'une étendue de Cp de la clomipramine universellement acceptable ne puisse être déterminée due à la grande variabilité interindividuelle des Cp de la clomipramine observée dans les études de cette thèse. Plusieurs études félines sont envisageables pour investiguer les questions suscitées par ce programme doctoral.

Sources documentaires

al-Banna, M.K., Kelman, A.W. & Whiting, B. 1990. Experimental design and efficient parameter estimation in population pharmacokinetics. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, **18**(4), 347-360.

Abdel-Salam, O.M., Nofal, S.M. & El-Shenawy, S.M. 2003. Evaluation of the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of different antidepressants in the rat. *Pharmacological Research*, **48** (2), 157-165.

Achar, E., Achar, R.A., Paiva, T.B., Campos, A.H. & Schor, N. 2003. Amitriptyline eliminates calculi through urinary tract smooth muscle relaxation. *Kidney International*, **64** (4), 1356-1364.

Albarellos, G.A., Bonafino, R.R., Kreil, V.E., Ambros, L.A., Montoya, L. & Hallu, R.E. 2003. A non-surgical jugular catheterization technique for multiple blood sampling in cats. *Laboratory Animals*, **37**, 188-192.

Alfonso, J., Pollevick, G.D., van der Hart, M.G., Flügge, G., Fuchs, E. & Frasch, A.C.C. 2004. Identification of genes regulated by chronic psychosocial stress and antidepressant treatment in the hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, **19**, 659-666.

Ansari, M., Kazemipour, M. & Talebnia, J. 2004. The development and validation of a dissolution method for clomipramine solid dosage forms. *Dissolution Technologies*. August 2004, 16-24.

Bach-Rojecky, L. 2003. Analgesic effect of caffeine and clomipramine: A possible interaction between adenosine and serotonin systems. *Acta Pharmacologica*, **53**, 33-39.

Balant-Gorgia, A.E., Balant, L.P., Genet, Ch., Dayer, P., Aeschlimann, J.M. & Garrone, H. 1986. Importance of oxidative polymorphism and levopromazine treatment on the

- steady-state blood concentrations of clomipramine and its major metabolites. *European Journal of Pharmacology*, **31**, 449-455.
- Beal, M.W. & Hughes, D.** 2000. Vascular access: Theory and techniques in the small animal emergency patient. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, **15**(2), 101-109.
- Beaver, B.V.** 1989. Housesoiling by cats: A retrospective study of 120 cases. *Journal of the American Animal Hospital Association*, **25**, 631-637.
- Beaver, B.V.** 2003. Feline Communicative Behavior. In *Feline Behavior. A Guide for Veterinarians*. 2nd edn. pp 1- 41, 120-121. W.B. Saunders.
- Benfield, D.P., Harris, C.M. & Luscombe, D.K.** 1980. Some pharmacological aspects of desmethylclomipramine. *Postgraduate Medical Journal*, **56**(suppl. 1), 13-18.
- Bergman, L., Hart, B.L., Bain, M. & Cliff, K.** 2002. Evaluation of urine marking by cats as a model for understanding veterinary diagnostic and treatment approaches and client attitudes. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **221** (9), 1282-1286.
- Bertilsson, L., Dahl, M-L. & Tybring, G.** 1997. Pharmacogenetics of antidepressants: clinical aspects. *Acta Psychiatry Scandinavia*, **96** (suppl. 391), 14-21.
- Bertilsson, L., Dahl, M.L., Dalén, P. & Ai-Shurbaji, A.** 2002. Molecular genetics of CYP2D6: Clinical relevance with focus on psychotropic drugs. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **53**, 111-122.
- Bertrand, M., Jackson, P. & Walther, B.** 2000. Rapid assessment of drug metabolism in the drug discovery process. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **11**(suppl.2), S61-S72.
- Böhning, D., Schlattmann, P. & Lindsay, B.** 1992. Computer-assisted analysis of

- mixtures (C.A.MAN): statistical algorithms. *Biometrics*, **48**(1), 283-303.
- Bolo**, N.R., Hodé, Y., Nédeléc, J.F., Lainé, E., Wagner, G. & Macher, J.P. 2000. Brain pharmacokinetics and tissue distribution *in vivo* of fluvoxamine and fluoxetine by fluorine magnetic resonance spectroscopy. *Neuropsychopharmacology*, **23**, 428-438.
- Bonate**, P.L. 2005. Recommended reading in population pharmacokinetic pharmacodynamics. *American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*, **7** (2 - Article 37), E363-E373
- Boothe**, D.M. 2001. *Small Animal Clinical Pharmacology and Therapeutics*. Chapitres 1-2 et 25. Eds Maddison, J., Page, S. and Church, D. W.B. Saunders. Philadelphia, Pennsylvania, pp 3-40, 457-472.
- Borchelt**, P.L. 1991. Cat elimination behavior problems. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, **21** (2), 257-264.
- Borchelt**, P.L. & Voith, V.L. 1987. Aggressive behavior in cats. *Compendium Small Animal*, **9** (1), 49-57.
- Boscarino**, B.T. & Parfitt, D.B. 2002. Chronic oral administration of clomipramine decreases sexual behavior in the male Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). *Physiology and Behavior*, **75** (3), 361-366.
- Brandon**, E.F.A., Raap, C.D., Meijerman, I., Beijnen, J.H. & Schellens, J.H.M. 2003. An update on *in vitro* test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **189**, 233-246.
- Broocks**, A., Meyer, T., Opitz, M., Bartmann, U., Hillmer-Vogel, U., George, A., Pekrun, G., Wedekind, D., Rütger, E. & Bandelow, B. 2003. 5-HT_{1A} responsivity in patients with panic disorder before and after treatment with aerobic exercise, clomipramine or placebo. *European Neuropsychopharmacology*, **13**, 153-164.

- Brøsen, K.** 2004. Some aspects of genetic polymorphism in the biotransformation of antidepressants. *Therapie*, **59** (1), 5-12.
- Buffington, C.A., Chew, D.J., Kendall, M.S., Scrivani, P.V., Thompson, S.B., Blaisdell, J.L. & Woodworth, B.E.** 1997. Clinical evaluation of cats with nonobstructive urinary tract diseases. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **210**(1), 46-50.
- Burchell, B.** 2003. Genetic variation of human UDP-glucuronosyltransferase. Implications in disease and drug glucuronidation. *American Journal of Pharmacogenomics*, **3** (1), 37-52.
- Campbell, P.N., Smith, A.D. & Peters, T. J.** 2005. Structure and function of enzymes. In *Biochemistry Illustrated: Biochemistry and Molecular Biology in the Post-Genomic Era*. 5th Ed. Chapter 3, Churchill Livingstone, pp 55-74.
- Carvajal, G.P., Garcia, D., Sanchez, S.A., Velasco, M.A., Rueda, D. & Lucena, M.I.** 2002. Hepatotoxicity associated with the new antidepressants. *Journal of Clinical Psychiatry*, **63** (2), 135-137.
- Center, S.A., Elston, T.H., Rowland, P.H., Rosen, D.K., Reitz, B.L., Brunt, J.E., Rodan, I., House, J., Bank, S., Lynch, L.R., Dring, L.A. & Levy, J.K.** 1996. Fulminant hepatic failure associated with oral administration of diazepam in 11 cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **209** (3), 618-625.
- Chapman, B.L.** 1991. Feline aggression. Classification, diagnosis and treatment. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, **21** (2), 315-327.
- Charlier, C., Pinto, E., Anseau, M. & Plomteux, G.** 2000. Relationship between clinical effects, serum drug concentration, and concurrent drug interactions in depressed patients treated with citalopram, fluoxetine, clomipramine, paroxetine or

- venlafaxine. *Human Psychopharmacology*, **15**, 453-459.
- Chauret, N., Gauthier, A., Martin, J. & Nicoll-Griffith, D.A.** 1997. *In vitro* comparison of cytochrome P450-mediated metabolic activities in human, dog, cat and horse. *Drug Metabolism and Disposition*, **25** (10), 1130-1136.
- Chesney, C.J.** 1976. The response to prostagen treatment of some diseases of cats. *Journal of Small Animal Practice*, **17**, 35-44.
- Cheu, J.W. & Siegel, A.** 1998. GABA receptor mediated suppression of defensive rage behavior elicited from the medial hypothalamus of the cat : role of the lateral hypothalamus. *Brain Research*, **783**(2), 293-304.
- Chew, D.J., Buffington, C.A., Kendall, M.S., DiBartola, S.P. & Woodworth, B.E.** 1998. Amitriptyline treatment for severe recurrent idiopathic cystitis in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **213** (9), 1282-1286.
- Chiu, S.H.L. & Huskey, S.E.W.** 1998. 1996 Aspet N-glucuronidation of xenobiotics symposium. Species differences in N-glucuronidation. *Drug Metabolism and Disposition*, **26** (9), 838-847.
- Ciribassi, J., Luescher, A., Pasloske, K.S., Robertson-Plouch, C., Zimmerman, A. & Kaloostian-Whittymore, L.** 2003. Comparative bioavailability of fluoxetine after transdermal and oral administration to healthy cats. *American Journal of Veterinary Research*, **64**(8), 994-998.
- Cochrane, S.M., Parent, J.M., Allen, D.G., Black, W.D., Valliant, A.E. & Lumsden, J.H.** 1989. A method for chronic intravenous catheterization in the cat. *Canadian Veterinary Journal*, **30**, 432-433.
- Cooper, L.L.** 1997. Feline inappropriate elimination. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, **27** (3), 569-599.

- Cooper, L.L. & Hart, B.L.** 1992. Comparison of diazepam with progestin for effectiveness in suppression of urine spraying behavior in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **200** (6), 797-801.
- Consoli, D., Fedotova, J., Micale, V., Saprnov, N.S. & Drago, F.** 2005. Stressors affect the response of male and female rats to clomipramine in a model of behavioral despair (forced swim test). *European Journal of Pharmacology*, **520** (1-3), 100-107.
- Correia, M.A.** 2004. Drug Biotransformation. Chapitre 4, dans *Basic and Clinical Pharmacology*, 9th edition, Eds. Katzung, B.G., Bernstein, J., Ransom, J., Foltin, J. & Holton, B. Lange Medical Books/McGraw-Hill, pp 51-63.
- Cotler, S., Guftafson, J.H. & Colburn, W.A.** 1984. Pharmacokinetics of diazepam and nordiazepam in the cat. *Journal of Pharmacological Sciences*, **73** (3), 348-351.
- Couture, L., Elie, R. & Lavoie, P.A.** 2001. Effects of antidepressants on ATP-dependant calcium uptake by neuronal endoplasmic reticulum. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, **79** (11), 946-952.
- Court, M.H. & Greenblatt, D.J.** 1997a. Biochemical basis for deficient paracetamol glucuronidation in cats: an interspecies comparison of enzyme constraint in liver microsomes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **49**, 446-449.
- Court, M.H. & Greenblatt, D.J.** 1997b. Molecular basis for deficient acetaminophen glucuronidation in cats. An interspecies comparison of enzyme kinetics in liver microsomes. *Biochemical Pharmacology*, **52**, 1041-1047.
- Court, M.H. and Greenblatt, D.J.** 2000. Molecular genetic basis for deficient acetaminophen glucuronidation by cats: UGT1A6 is a pseudogene, and evidence for reduced diversity of expressed hepatic UGT1A isoforms. *Pharmacogenetics*, **10** (4), 335-369.

- Cribb, A.E., Nuss, C.E., Alberts, D.W., Lamphere, D.B., Grant, D.M., Grossman, S.J. & Spielberg, S.P.** 1996. Covalent binding of sulfamethoxazole reactive metabolites to human and rat liver subcellular fractions assessed by immunochemical detection. *Chemical Research in Toxicology*, **9**, 500-507.
- Cribb, A.E.** 2003. Metabolism: the cytochrome P450 in the dog. In *Proceedings of the Thirteenth Biennial Symposium of the American Academy of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, ed. Ted Whitem. June, pp 30-34.
- Crowell-Davis, S.L., Barry, K. & Wolfe, R.** 1997. Social behavior and aggressive problems of cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, **27** (3), 549-567.
- Crowell-Davis, S.L., Seibert, L.M., Sung, W., Parthasarathy, V. & Curtis, T.M.** 2003. Use of clomipramine, alprazolam, and behavior modification for treatment of storm phobia in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **222**(6), 744-748.
- Daley, E., Wilkie, D., Loesch, A., Hargreaves, I.P., Kendall, D.A., Pilkington, G.J. & Bates, T.E.** 2005. Chlorimipramine: A novel anticancer agent with a mitochondrial target. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **328**, 623-632.
- deCarvalho, S.C., Marcourakis, T., Artes, R. & Gorenstein, C.** 2002. Memory performance in panic disorder patients after chronic use of clomipramine. *Journal of Psychopharmacology*, **16** (3), 220-226.
- deCuyper, H.J., van Praag, H.M., Mulder-Hajonides, W.R., Westernberg, H.G. & de Zeuw, R.A.** 1981. Pharmacokinetics of clomipramine in depressive patients. *Psychiatry Research*, **4**, 147-156.
- Dehasse, J.** 1997. Feline urine spraying. *Applied Animal Behaviour Science*, **52**, 365-

- 371.
- Divoll, M., Greenblatt, D.J., Ochs, H.R. & Shader, R.I.** 1983. Absolute bioavailability of oral and intramuscular diazepam: effects of age and sex. *Anesthesia & Analgesia*, **62**, 1-8.
- DUAG – Danish University Antidepressant Group.** 1999. Clomipramine dose-effect study in patients with depression: Clinical end-points and pharmacokinetics. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **66**, 152-165.
- Dyer, D.C.** 1996. Principles of Drug Absorption, Disposition, and Action. Dans *Pharmacology*. Chapter 1. Eds. Ahrens, F.A. Williams and Wilkins A. Waverly Company, pp 1-19.
- El-Demerdash, E. & Mohamadin, A.M.** 2004. Does oxidative stress contribute in tricyclic antidepressants-induced cardiotoxicity. *Toxicology Letters*, **152**, 159-166.
- Ette, E.I., Howie, C.A., Kelman, A.W. & Whiting, B.** 1995a. Experimental design and efficient parameter estimation in preclinical pharmacokinetic studies. *Pharmacology Research*, **12(5)**, 729-737.
- Ette, E.I., Kelman, A.W., Howie, C.A. & Whiting, B.** 1995b. Analysis of animal pharmacokinetic data: performance of the one point per animal design. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, **23(6)**, 551-566.
- Evans, L.E.J., Bett, J.H.N., Cox, J.R., Dubois, J.P & Van Hees, T.** 1980. The bioavailability of oral and parenteral clomipramine (anafranil). In *Progress in Neuro-Psychopharmacology*. Vol 4, 293-302. Pergamon Press Ltd. Great Britain.
- Faigle, J.W. & Dieterle, W.** 1973. The metabolism and pharmacokinetics of clomipramine (Anafranil). *Journal of Internal Medical Research*, **1**, 281-290.
- Faravelli, C., Ballerini, A., Ambonetti, A., Braodhurst, A.D. & Das, M.** 1984. Plasma

- levels and clinical response during treatment with clomipramine. *Journal of Affective Disorders*, **6**, 95-107.
- Fernandez-Guasti**, A., Ulloa, R.E. & Nicolini, H. 2003. Age differences in the sensitivity to clomipramine in an animal model of obsessive-compulsive disorder. *Psychopharmacology*, **166**(3), 195- 201.
- Fersht**, A. 1985. Enzyme Mechanisms. In *Enzyme Structure and Mechanism*, 2nd Ed., New York, W.H. Freeman & Company. Chapter 5, pp105-123.
- Figgitt**, D.P. & McClellan, K.J. 2000. Fluvoxamine. An updated review of its use in the management of adults with anxiety disorders. *Drugs*, **60**(4), 925-954.
- Folk**, G.E. & Mora, F. 2003. Serotonin and the last great bioassay. *Journal of Biological Sciences*, **3** (10), 951-960.
- Frank**, D. & Dehasse, J. 2003. Differential diagnosis and management of human-directed aggression in cats. *The Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, **33**, 269-286.
- Galeotti**, N., Bartolini, A. & ghelardini, C. 2002. Role of Gi proteins in the antidepressant-like effect of amitriptyline and clomipramine. *Neuropsychopharmacology*, **27** (4), 554-564.
- Gauthier**, E. 2001. The best way to choose a pharmacologic treatment for behavioral problems. In *Proceedings of the Third International Congress on Veterinary Behavioural Medicine*, Vancouver, B.C., pp 197-199.
- Gerber**, H.A. & Sulman, F.G. 1964. The effects of methylloestrenalone on oestrus, pseudopregnancy, vacrancy, satyriasis and squirting in dogs and cats. *The Veterinary Record* **76**, 1089-1092.
- Gerlowski**, L.E. & Jain, R.K. 1983. Physiologically based pharmacokinetic modeling:

- principles and applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **72**(10), 1103-1027.
- Gex-Fabry, M., Balant-Gorgia, A.E., Balant, L.P. & Garrone, G.** 1990. Clomipramine metabolism. Model based analysis of variability factors from drug monitoring data. *Clinical Pharmacokinetics*, **19**(3), 241-255.
- Gex-Fabry, M., Balant-Gorgia, A.E. & Balant, L.P.** 1999. Clomipramine concentration as a predictor of delayed response: a naturalistic study. *European Journal of Clinical Pharmacology*, **54**(12), 895-902.
- Gex-Fabry, M., Haffen, E., Paintaud, G., Bizouard, P., Sechter, D., Bechtel, P. & Balant, L.P.** 2000. Population pharmacokinetics of clomipramine, desmethylclomipramine, and hydroxylated metabolites in patients with depression receiving chronic treatment: Model evaluation. *Therapeutic Drug Monitoring*, **22**(6), 701-711.
- Ghelardini, C., Galeotti, N. & Bartolini, A.** 2001. Amitriptyline and clomipramine activate Gi-protein signaling pathway in the induction of analgesia. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacology*, **365** (1), 1-7.
- Gibbon, K.J., Cyborski, J.M., Viviano, K.R. & Trepanier, L.A.** 2003. Evaluation of adverse effects of EMLA (lidocaine/prilocaine) cream for the placement of jugular catheters in healthy cats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **26**, 439-441.
- Glatt, H. & Meinel, W.** 2004. Pharmacogenetics of soluble sulfotransferases (SULTs). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacology*, **369**, 55-68.
- Grasmäder, K., Verwohlt, P.L., Rietschel, M., Dragicevic, A., Müller, M., Hiemke, C., Freymann, N., Zobel, A., Maier, W. and Rao, M.L.** 2004. Impact of polymorphisms of cytochrome-P450 isoenzymes 2C9, 2C19 and 2D6 on plasma concentrations and clinical effects of antidepressants in naturalistic clinical setting. *European journal of*

- Clinical Pharmacology, **60**, 329-336.
- Greenblatt, D.J., Harmatz, J.S., Friedman, H., Locniskar, A. & Shader, R.I.** 1989. A large-sample study of diazepam pharmacokinetics. *The Drug Monitoring*, **11** (6), 652-657.
- Grindlinger, H.M & Ramsay, E.** 1991. Compulsive feather picking in birds. *Arch General Psychiatry*, **48**(9), 857.
- Gulikers, K.P. & Panciera, D.L.** 2003. Evaluation of the effects of clomipramine on canine thyroid function tests. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **17** (1), 44-49.
- Haduch, A., Wojcikowski, J. & Daniel, W.A.** 2006. The effect of tricyclic antidepressants, selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) and newer antidepressant drugs on the activity and level of rat CYP3A. *European Neuropsychopharmacology*, **16**, 178-186.
- Hart, B.L.** 1980. Objectionable urine spraying and urine marking in cats: evaluation of progestin treatment in gonadectomized males and females. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **177** (6), 529-533.
- Hart, B.L.** 1996. Behavioral and pharmacological approaches to problem urination in cats. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, **26** (3), 651-658.
- Hart, B.L., Cliff, K.D., Tynes, V.V. & Bergman, L.** 2005. Control of urine marking by use of long-term treatment with fluoxetine or clomipramine in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **226** (3), 378-382.
- Hart, B.L. & Cooper, L.** 1984. Factors relating to urine spraying and fighting in prepubertally gonadectomized cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **184** (10), 1255-1258.

- Hart, B.L., Eckstein, R.A., Powell, K.L. & Dodman, N.H.** 1993. Effectiveness of buspirone on urine spraying and inappropriate urination in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **203** (2), 254-258.
- Härtter, S., Arand, M., Oesch, F. & Hiemke, C.** 1995. Non-competitive inhibition of clomipramine N-demethylation by fluvoxamine. *Psychopharmacology*, **117**, 149-153.
- Hashimoto, H., Nishimoto, M., Ozaki, T., Ohara, K. & Nakashima, M.** 1990. Comparison of the cardiac electrophysiologic effects of amitriptyline and clomipramine in the dog after myocardial infarction. *Archives in International Pharmacodynamic Therapy*, **304**, 181-195.
- Hassanain, M., Bhatt, S. & Siegel, A.** 2003. Differential modulation of feline defensive rage behavior in the medial hypothalamus by 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors. *Brain Research*, **981**(1-2), 201-209.
- Hemeryck, A. & Belpaire, F.M.** 2002. Selective serotonin reuptake inhibitors and cytochrome P-450 mediated drug-drug interactions: an update. *Current Drug Metabolism*, **3**, 13-37.
- Hernandez, A., Xamena, N., Gutiérrez, S., Velazquez, A., Creus, A., Surrallés, J., Galofré, P. & Marcos, R.** Basal and induced micronucleus frequencies in human lymphocytes with different GST and NAT2 genetic backgrounds. *Mutation Research*, **606**, 12-20.
- Herrera, D., Mayet, L., Galindo, M.C. & Jung, H.** 2000. Pharmacokinetics of a sustained-release dosage form of clomipramine. *Journal of Clinical Pharmacology*, **40**, 1488-1493.
- Hetts, S.** 1991. Psychologic well-being: Conceptual issues, behavioral measures, and implications for dogs. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal*

- Practice, **21** (2), 369-385.
- Hewson, C.J., Conlon, P.D., Luescher, U.A. & Ball, R.O.** 1998a. The pharmacokinetics of clomipramine in dogs: parameter estimates following a single oral dose and 28 consecutive daily oral dose of clomipramine. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **21**(3), 214-222.
- Hewson, C.J., Luescher, U.A., Parent, J.M., Conlon, P.D. & Ball, R.O.** 1998b. Efficacy of clomipramine in the treatment of canine compulsive disorder. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **213** (12), 1760-1766.
- Hietanen, E. & Vainio, H.** 1973. Interspecies variation in small intestine and hepatic drug hydroxylation and glucuronidation. *Acta Pharmacologica and Toxicologica*, **33**, 57-64.
- Hildebrandt M.G., Steyerberg E.W., Passchier J., Kragh-Soerensen, P. & Danish University Antidepressant Group.** 2003. Are gender differences important for the clinical effects of antidepressants? *American Journal of Psychology*, **160** (9), 1643-1650.
- Holmes, D.T., Long, P. & Frohlich, J.** 2005. Dysbetalipoproteinemia and clomipramine. *American Journal of Psychiatry*, **162**(7), 1384-1385.
- Houpt, K.A.** 1997. Sexual behavior problems in dogs and cats. *The Veterinary clinics of North America: small Animal Practice*, **27** (3), 601-615.
- Jacobs, B.L.** 1991. Serotonin and behavior: emphasis on motor control. *Journal of Clinical Psychiatry*, **52** (12), 17-23.
- Jones, H.M. & Houston, J.B.** 2004. Substrate depletion approach for determining in vitro metabolic clearance: time dependencies in hepatocyte and microsomal incubations. *Drug Metabolism and Disposition*, **32**, 973-982.

- Juarbe-Diaz, S.V.** 2000. Animal behavior case of the month. Congo African Grey parrot examined because of feather picking and self-injurious behavior. *Journal of the American Medical Association*, **216**(10), 1562-1564.
- Kakuma, Y. & Bradshaw, J.W.S.** 2001. Effects of a feline facial pheromone analogue on stress in shelter cats. In *Proceedings of the Third International Congress on Veterinary Behavioural Medicine, Vancouver, B.C.* pp 218-219.
- Kamali, F., Ball, D.E., McLaughlin, W.S. & Seymour, R.A.** 1999. Phenytoin metabolism to 5-(4-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin (HPPH) in man, cat and rat *in vitro* and *in vivo*, and susceptibility to phenytoin-induced gingival overgrowth. *Journal of Periodontal Research*, **34**, 145-153.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H. & Jessell, T.M.** 2000. Neurotransmitters. Dans *Principles of Neural Science*. 4ième Ed. Chapitre 15, McGraw-Hill Companies, pp 280.
- Kelly, M.W. & Myers, C.W.** 1990. Clomipramine: a tricyclic antidepressant effective in obsessive-compulsive disorder. *DICP*, **24** (7-8), 739-744.
- Khalil, W.F., Saitoh, T., Shimoda, M. & Kokue, E.** 2001. In vitro cytochrome P450-mediated hepatic activities for five substrates in specific pathogen free chickens. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **24**, 343-348.
- King, J.N., Maurer, M.P., Hotz, R.P. & Fisch, R.D.** 2000a. Pharmacokinetics of clomipramine in dogs following single-dose intravenous and oral administration. *American Journal of Veterinary Research*, **61**(1), 74-79.
- King, J.N., Maurer, M.P., Altmann, B.O. & Strehlau, G.A.** 2000b. Pharmacokinetics of clomipramine in dogs following single-dose and repeated-dose oral administration. *American Journal of Veterinary Research*, **61**(1), 80-85.
- King, J.N., Simpson, B.S., Overall, K.L., Appleby, D., Pageat, P., Ross, C., Chaurand,**

- J.P., Heath, S., Beata, C., Weiss, A.B., Muller, G., Paris, T., Bataille, B.G., Parker, J., Petit, S. & Wren, J. 2000c. Treatment of separation anxiety in dogs with clomipramine: results from a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, multicenter trial. *Applied Animal in Behavioral Sciences*, **67** (4), 255-275.
- King, J.N., Steffan, J., Heath, S.E., Simpson, B.S., Crowell-Davis, S.L., Harrington, L.J.M., Weiss, A.B & Seewald, W.** 2004. Determination of the dosage of clomipramine for the treatment of urine spraying in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **225**(6), 881-887.
- King, R., Bonfiglio, R., Fernandez-Metzler, C., Miller-Stein, C. & Olah, T.** 2000. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *Journal of American Society of Mass Spectrometry*, **11**, 942-950.
- Klotz, U., Antonin, K.H. & Bieck, P.R.** 1976. Pharmacokinetics and plasma binding of diazepam in man, dog, rabbit, guinea, pig and rat. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **199** (1), 67-73.
- Knol, B.W. & Egberink-Alink, S.T.** 1989. Treatment of problem behavior in dogs and cats by castration and progestagen administration: a review. *Veterinary Quarterly*, **11** (2), 102-107.
- Kobayashi, T., Washiyama, K. & Ikeda, K.** 2003. Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels by fluoxetine (Prozac). *British journal of Pharmacology*, **138**, 1119-1128.
- Kobayashi, T., Washiyama, K. & Ikeda, K.** 2004. Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels by various antidepressant drugs. *Neuropsychopharmacology*, **29**, 1841-1851.

- Koella, W.P., Glatt, A., Klebs, K. & Durst, T.** 1979. Epileptic phenomena induced in the cat by the antidepressants maprotiline, imipramine, clomipramine, and amitriptyline. *Biology and Psychiatry*, **14** (3), 485-497.
- Kraijer, M., Fink-Gremmels, J. & Nickel, R.F.** 2003. The short-term clinical efficacy of amitriptyline in the management of idiopathic feline lower urinary tract disease: a controlled clinical study. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, **5** (3), 191-196.
- Krüger, A., Holzl, G., Kuss, H.J. & Schefold, L.** 1986. Comparison of the metabolism of the three antidepressants amitriptyline, imipramine and chlorimipramine in vitro in rat liver microsomes. *Psychopharmacology*, **88**, 505-513.
- Kruger, J.M., Conway, T.S., Kaneene, J.B., Perry, R.L., Hagenlocker, E., Golombek, A. & Stuhler, J.** 2003. Randomized controlled trial of the efficacy of short-term amitriptyline administration for treatment of acute, nonobstructive, idiopathic lower urinary tract disease in cats. *Journal of the American Medical Association*, **222** (6), 749-758.
- Kuss, H.J. & Jungkunz, G.** 1986. Nonlinear pharmacokinetics of clomipramine after infusion and oral administration in patients. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry*, **10**, 739-748.
- Lainesse, C., Boysen, S. & Doucet, M.** A simple, one-step jugular catheterisation method for multiple blood sampling in cats. *The Veterinary Record*, sous impression.
- Lainesse, C., Frank, D., Meucci V., Intorre L., Soldani, G. & Doucet, M.** 2006. Pharmacokinetics of clomipramine and desmethylclomipramine after single-dose intravenous and oral administrations in cats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **29**, 271-278.
- Landsberg, G.M.** 1991. Feline scratching and destruction and the effects of declawing.

- The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, **21** (2), 265-279.
- Landsberg, G.M.** 2001. Effects of clomipramine on cats presented for urine marking. In Proceedings of the Third International Congress on Veterinary Behavioural Medicine. Eds Overall, K.L., Mills, D.S., Heath, S.E and Horwitz, D. pp 186-189. Vancouver, British Columbia.
- Landsberg, G.M & Wilson, A.L.** 2005. Effects of clomipramine on cats presented for urine marking. Journal of the American Animal Hospital Association, **41**, 3-11.
- Lash, L.H.** 1994. Role of renal metabolism in risk to toxic chemicals. Environmental Health Perspectives, **102** (suppl. 11), 75-79.
- Lau, Y.Y., Krishna, G., Yumibe, N.P., Grotz, D.E., Sapidou, E., Norton, L., Chu, I., Chen, C., Soares, A.D. & Lin, C-C.** 2002. The use of in vitro metabolic stability for rapid selection of compounds in early discovery based on their expected hepatic extraction ratios. Pharmaceutical Research, **19** (11), 1606-1610.
- Lin, Z., Lou, Y. & Squires, J.E.** 2004. Molecular cloning and functional analysis of porcine *SULT1A1* gene and its variantL a single mutation *SULT1A1* causes a significant decrease in sulfation activity. Mammalian Genome, **15** (3), 218-226.
- Litster, A.** 2000. Use of clomipramine for treatment of behavioral disorders in 14 cats – Efficacy and side effects. Australian Veterinary Practitioner, **30**(2), 50-54.
- Liu, X., Emery, C.J., Laude, E., Herget, J., Gill, G., Cope, G. & Barer, G.R.** 2002. Adverse pulmonary vascular effects of high dose tricyclic antidepressants: acute and chronic animal studies. European Respiratory Journal, **20**, 344-352.
- Luescher, A.U., McKeown, D.B. & Halip, J.** 1991. Stereotypic or obsessive-compulsive disorders in dogs and cats. The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, **21** (2), 401-413.

- Luescher, A.U.** 2003. Diagnosis and management of compulsive disorders in dogs and cats. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, **33**, 253-267.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J.** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**, 265-275.
- Maes, M.** 2001. The immunoregulatory effects of antidepressants. *Human Psychopharmacology*, **16** (1), 95-103.
- Mahmood, I., Peters, D.K. & Mason, W.D.** 1994. The pharmacokinetics and absolute bioavailability of selegiline in the dog. *Biopharmacology and Drug Disposition*, **15** (8), 653-664.
- Marder, A.R.** 1991. Psychotropic drugs and behavioral therapy. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, **21** (2), 329-342.
- Martin G.J.W. & Rand J.S.** 1999. Evaluation of a polyurethane jugular catheter in cats placed using the modified Seldinger technique. *Australian Veterinary Journal* **77**(4), 250-254.
- Martin-Jiménez, T. & Riviere, J.E.** 1998. Population pharmacokinetics in veterinary medicine: Potential use for therapeutic monitoring and prediction of tissue residues. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **21**, 167-189.
- Maugras, M. and Reichart, E.** 1979. The hepatic cytochrome level in the cat (*Felis catus*): normal value and variations in relation to some biological parameters. *Comprehensive Biochemical Physiology B* **64** (1), 125-7.
- McCracken, J.T. & Hanna, G.L.** 2005. Elevated thyroid indices in children and adolescents with obsessive-compulsive disorder: Effects of clomipramine treatment. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology*, **15** (4), 581-588.
- McTavish, D. & Benfield, P.** 1990. Clomipramine, an overview of its pharmacological

- properties and a review of its therapeutic use in obsessive compulsive disorder and panic disorder. *Drugs*, **39** (1), 136-153.
- Mealey, K.L., Peck, K.E., Bennett, B.S., Sellon, R.K., Swinney, G.R., Melzer, K., Gokhale, S.A. & Krone, T.M.** 2004. Systemic absorption of amitriptyline and buspirone after oral and transdermal administration to healthy cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **18**, 43-46.
- Mertens, P.A., Torres, S. & Jessen, C.** 2006. The effects of clomipramine hydrochloride in cats with psychogenic alopecia : a prospective study. *Journal of the American Animal Hospital Association*, **42**, 336-343.
- Milgram, N.W., Ivy, G.O., Murphy, M.P., Head, E., Wu, P.H., Ruehl, W.W., Yu, P.H., Durden, D.A., Davis, B.A. & Boulton, A.A.** 1995. Effects of chronic oral administration of L-deprenyl in the dog. *Pharmacology and Biochemistry Behavior*, **51** (2-3), 421-428.
- Mills, D.S.** 1997. Using learning theory in animal behavior therapy practice. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, **27** (3), 617-635.
- Moon-Fanelli, A.A & Dodman, N.H.** 1998. Description and development of compulsive tail chasing in terriers and response to clomipramine treatment. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **212** (8), 1252-1257.
- Mulder, R.T., Watkins, W.G.A., Joyce, P.R. & Luty, S.E.** 2003. Age may affect response to antidepressant with serotonergic and noradrenergic actions. *Journal of Affective Disorders*, **76**, 143-149.
- Mundo, E., Pirola, R., Bellodi, L., Smeralsi, E. & Bareggi, S.** 2002. Are gender differences in antiobsessional response related to different clomipramine metabolism. *Journal of clinical Psychopharmacology*, **22** (3), 341-342.

- Murray, R.K.** 2000. Chapter 61: Metabolism of Xenobiotics. In Harper's Biochemistry (25th edition). Eds Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A. & Rodwell, V.W. Appleton & Lange, Stamford, Connecticut. pp 780-786.
- Nedelman, J.R.** 2005. On some 'Disadvantages' of the population approach. American Association of Pharmaceutical Scientists Journal, 7 (2-Article 38), E374-E82.
- Neilson, J.C.** 2003. Feline house soiling: elimination and marking behaviors. The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, 33, 287-301.
- Nieuwstraten, C., Labiris, N.R., Holbrook, A.** 2006. Systematic overview of drug interactions with antidepressant medications. Canadian Journal of Psychiatry, 51(5), 300-316.
- Nicholl, R.A.** 2004. Introduction to the Pharmacology of the CNS Drugs. Chapter 21. In Basic and Clinical Pharmacology, 9th edition, Eds. Katzung, B.G., Bernstein, J., Ransom, J., Foltin, J. & Holton, B. Lange Medical Books/McGraw-Hill, pp 336-350.
- Nielsen, K.K., Brøsen, K., Gram, L.F. & the Danish University Antidepressant Group.** 1992. Steady-state plasma levels of clomipramine and its metabolites: impact of the sparteine/debrisoquine oxidation polymorphism. European Journal of Clinical Pharmacology, 43, 405-411.
- Nielsen, K.K., Flinois, J.P., Beaune, P. & Brosen, K.** 1996. The biotransformation of clomipramine *in vitro*, Identification of the cytochrome P450s responsible for the separate metabolic pathways. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 277 (3), 1659-1664.
- Nichimura, Y., Kitoh, A., Yoshida, Y. & Tanaka, T.** 2005. Clomipramine-induced hypersensitivity syndrome with unusual clinical features. Journal of the American Academy of Dermatology, 53 (5, suppl. 1), S231-S233.

- Noguchi, T., Shimoda, K. & Takahashi, S.** 1993. Clinical significance of plasma levels of clomipramine, its hydroxylated and demethylated metabolites : prediction of clinical outcome in mood disorders using discriminant analysis of therapeutic drug monitoring. *Journal of Affective Disorders*, **29**(4), 267-279.
- Nuñez, R. & Perel, J.M.** 1995. Comparative neurotransmitter reuptake and anticholinergic potencies of the 8-hydroxymetabolites of clomipramine. *Psychopharmacology Bulletin*, **31** (2), 217-221.
- Odendaal, J.S.J.** 1997. A diagnostic classification of behavior in dogs and cats. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, **27** (3), 427-443.
- Oesterheld, J. & Kallepalli, B.R.** 1997. Grapefruit juice and clomipramine: Shifting metabolic ratios. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, **17**(1), 62-63.
- Ogata, N. & Takeuchi, Y.** 2000. Clinical trial of a feline pheromone analogue for feline urine marking. *Journal of Veterinary Medical Science*, **63** (2), 157-161.
- Ohmiya, Y. & Mehendale, H.M.** 1984. Species differences in pulmonary N-oxidation of chlorpromazine and imipramine. *Pharmacology*, **28**, 298-295.
- Olm, D.D. & Houpt, K.A.** 1988. Feline house-soiling problems. *Applied Animal Behaviour Science*, **20**, 335-345.
- Overall, K.L.** 1994. Use of clomipramine to treat ritualistic stereotypic motor behavior in three dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **205** (12), 1733-1741.
- Overall, K.L.** 1997. Pharmacologic treatments for behavior problems. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, **27** (3), 637-664.
- Overall, K.L.** 2001. Pharmacological treatment in behavioural medicine: The importance of neurochemistry, molecular biology and mechanistic hypotheses. *The*

- Veterinary Journal, **162**, 9-23.
- Overall, K.L. & Dunham, A.E.** 2002. Clinical features and outcome in dogs and cats with obsessive-compulsive disorder: 126 cases. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **221**(10), 1445-1452.
- Pacher, P. & Kecskemeti, V.** 2004. Cardiovascular side effects of new antidepressants and antipsychotics: new drugs, old concerns. *Current Pharmaceutical Design*, **10**, 2463-2475.
- Pacher, P., Ungvari, Z., Nanasi, P.P., Furst, S. & Kecskemeti, V.** 1999. Speculations on difference between tricyclic and selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants on their cardiac effects. Is there any? *Current Medical Chemistry*, **6** (6), 469-480.
- Pageat, P. & Gauthier, E.** 2003. Current research in canine and feline pheromones. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, **33**, 187-211.
- Palego, L., Marazziti, D., Biondi, L., Giannaccini, G., Sarno, N., Armani, A., Bassi, A., Battistini, G., Lucacchini, A., Cassano, G.B. & Dell'Osso, L.** 2000. Simultaneous plasma level analysis of clomipramine, n-desmethylclomipramine and fluvoxamine by reverse-phase liquid chromatography. *Therapeutic Drug Monitoring*, **22**, 190-196.
- Pariante, C.M. & Miller, A.H.** 2001. Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biological Psychiatry*, **49**, 391-404.
- Pasloske, K.** 2003. New therapeutic horizons: fluoxetine pharmacology and safety in dogs and cats and its role in behavior modification. *Proceedings of the Thirteenth Biennial Symposium of the American Academy of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, ed. Ted Whitem. June, pp 70-73.
- Patronek, G.J., Glickman, L.T., Beck, A.M., McCabe, G.P. & Ecker, C.** 1996. Risk

- factors for relinquishment of cats to an animal shelter. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **209** (3), 582-588.
- Paulson, S.K., Engel, L., Reitz, B., Bolten, S., Burton, E.G., Maziasz, T.J., Yan, B. & Schoenhard, G.L.** 1999. Evidence for polymorphism in the canine metabolism of the cyclooxygenase 2 inhibitor, celecoxib. *Drug Metabolism and Disposition*, **27**(10), 1133-1142.
- Pfeiffer, E., Guy, N. & Cribb, A.** 1999. Clomipramine-induced urinary retention in a cat. *Canadian Veterinary Journal*, **40**, 265-267.
- Podberscek, A.L., Hsu, Y. & Serpell, J.A.** 1999. Evaluation of clomipramine as an adjunct to behavioural therapy in the treatment of separation-related problems in dogs. *Veterinary Record*, **145**, 365-369.
- Pollock, B.G., Perel, J.M., Kupfer, D.J., Bowler, K.A. & Miewald, J.M.** 1993. Early response patterns associated with successful clomipramine treatment. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, **13**(6), 442-447.
- Poolsup, N., Li Wan Po, A., Knight, T.L.** 2000. Pharmacogenetics and psychopharmacotherapy, **25** (3), 197-220.
- Potter, W.Z.** 1996. Adrenoceptors and serotonin receptor function: Relevance to antidepressant mechanisms of action. *Journal of Clinical Psychiatry*, **57** (suppl 4), 4-8.
- Potter, W.Z. & Hollister, L.E.** 2004. Antidepressant agents. Chapter 30. In *Basic and Clinical Pharmacology*, 9th edition, Eds. Katzung, B.G., Bernstein, J., Ransom, J., Foltin, J. & Holton, B. Lange Medical Books/McGraw-Hill, pp 482-496.
- Pouchelon, J-L., Martel, E., Champeroux, P., Richard, S. & King, J.** 2000. Effects of clomipramine hydrochloride on heart rate and rhythm in healthy dogs. *American Journal of Veterinary Research*, **61** (8), 960-964.

- Price, N. & Stevens, L.** 1989. *Fundamentals of enzymology*. 2nd Ed. Oxford University Press, Oxford, England, pp 1-13, 365-447.
- Pryor, P.A., Hart B.L., Cliff, K.D. & Bain M.J.** (2001). Effects of a selective serotonin reuptake inhibitor on urine spraying behavior in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **219**(11), 1557-1561.
- Quitkin, F.M., Rabkin, J.G., Ross, D.R. & Stewart, J.W.** 1984. Identification of true drug response to antidepressants. *Archives of General Psychiatry*, **41**, 782-786.
- Reich, M.R. Ohad, D.G., Overall, K.L. & Dunham, A.E.** 2000. Electrocardiographic assessment of antianxiety medication in dogs and correlation with serum drug concentration. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **216** (10), 1571-1575.
- Reisner, I.R.** 1991. The pathophysiologic basis of behavior problems. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, **21** (2), 207-223.
- Reisner, I.R., Houpt, K.A., Erb, H.N. & Quimby, F.W.** 1994. Friendliness to humans and defensive aggression in cats: the influence of handling and paternity. *Physiology & Behavior*, **55** (6), 1119-1124.
- Riviere, J.E.** 1999. *Comparative Pharmacokinetics. Principles, Techniques and Applications*. Chapitres 1 à 10 et 14. Ed. Riviere, J.E. Iowa State Press, Ames, Iowa, pp 3-189, 259-282.
- Riviere, J.E. & Martin-Jiménez** 1999. Population pharmacokinetic models and Bayesian forecasting applied to clinical pharmacokinetics. In *Comparative Pharmacokinetics. Principles, Techniques and Applications*. Blackwell Publishing Company, Iowa State Press. Pp 259-282.
- Rosenbaum, S.E., Carter, A.A. & Dudley, M.N.** 1995. *Population pharmacokinetics:*

- Fundamentals, Methods and Applications. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **21**(9), 1115-1141.
- Rowland, M. & Tozer, T.N.** 1995. *Clinical Pharmacokinetics. Concepts and Applications, Third Edition.* Chapitres 1 à 4, 8 à 12, 19 et 21. Lippincott Williams & Wilkins. Eds Balado, D., Klass, F., & Stead, L. Philadelphia, Pennsylvania, pp 1-52, 109-203, 313-339, 367-393.
- Roy, A. & Ette, E.I.** 2005. A pragmatic approach to the design of population pharmacokinetics studies. *American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*, **7** (2), E408-E420.
- Rueter, L.E., Fornal, C.A., Jacobs, B.L.** 1997. A critical review of 5-HT brain microdialysis and behavior. *Reviews in the Neurosciences*, **8**, 117-137.
- Sakr, A. & Andheria, M.** 2001. A comparative multidose pharmacokinetic study of buspirone extended-release tablets with a reference immediate-release product. *Journal of Clinical Pharmacology*, **41**(8), 886-894.
- Sallee, F.R., Pollock, B., Perel, J.M., Ryan, N.D. & Stiler, R.L.** 1989. Intravenous pulse loading of clomipramine in adolescents with depression. *Psychopharmacology Bulletin*, **25**, 114-118.
- Samer, C.F., Piguet, V., Dayer, P. & Desmeules, J.A.** 2005. Polymorphisme génétique et interactions médicamenteuses : leur importance dans le traitement de la douleur. *Canadian Journal of Anesthesia*, **52** (8), 806-821.
- Sauter, C.** 1989. Cystostatic activity of commonly used tricyclic antidepressants. *Oncology*, **46**, 155-157.
- Sawyer, L.S., Moon-Fanelli, A.A. & Dodman, N.H.** 1999. Psychogenic alopecia in cats: 11 cases (1993-1996). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **214**

(1), 71-74.

Schildkraut, J.J., Schanberg, S.M., Breese, G.R. & Kopin, I.J. 1967. Norepinephrine metabolism and drugs used in the affective disorders: a possible mechanism of action. *American Journal of Psychiatry*, **124** (5), 600-608.

Schwartz, S. 1994. Carbamazepine in the control of aggressive behavior in cats. *Journal of the American Animal Hospital Association*, **30**, 515-519.

Schwartz, S. 1999. Use of cyproheptadine to control urine spraying and masturbation in a cat. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **214** (3), 369-371.

Schwartz, S. 2002. Separation anxiety syndrome in cats: 136 cases (1991-2000). *Journal of the American Medical Association*, **220** (7), 1028-1033.

Schwartz, S. 2003. Separation anxiety syndrome in dogs and cats. *Journal of the American Medical Association*, **222** (11), 1526-1532.

Seksel, K. 2002. Behavior-modifying drugs. In *Small Animal Clinical Pharmacology*, Eds Maddison, J.E., Page, S.W. & Church, D., W.B. Saunders, Chapter 23, pp 489-513.

Seksel, K. & Lindeman, M.J. 1998. Use of clomipramine in the treatment of anxiety-related and obsessive-compulsive disorders in cats. *Australian Veterinary Journal*, **76**(5), 317-321.

Seksel, K. & Lindeman, M.J. 2001. Use of clomipramine in the treatment of obsessive-compulsive disorder, separation anxiety and noise phobia in dogs: a preliminary, clinical study. *Australian Veterinary Journal*, **79** (4), 252-256.

Shah, R.R. 2005. Pharmacogenetics in drug regulation: promise, potential and pitfalls. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, **360**, 1617-1638.

Shargel, L. & Yu, A.B.C. 1999. *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*, 4th

- Ed. Chapters 2-5, 9-13, Ed. Mehalik, C.L., Appleton & Lange and McGraw-Hill, pp 29-128, 223-398.
- Sheiner, L.B. & Beal, S.L.** 1980. Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetic parameter. I. Michaelis-Menten Model: Routine clinical pharmacokinetic data. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, **8**(6), 553-571.
- Sheiner, L.B. & Beal, S.L.** 1981. Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetic parameter. II. Biexponential model and experimental pharmacokinetic data. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, **9** (5), 635-651.
- Sheiner, L.B. & Beal, S.L.** 1983. Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetic parameter. III. Monoexponential model: Routine clinical pharmacokinetic data. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, **11** (3), 303-319.
- Sheiner, L.B., Rosenberg, B. & Marathe, V.V.** 1977. Estimation of population characteristics of pharmacokinetic parameters from routine clinical data. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, **5**(5), 445-479.
- Shimoda, K., Nogushi, T., Ozeki, Y., Morita, S., Shibasaki, M., Someya, T. & Takahashi, S.** 1995. Metabolism of clomipramine in a Japanese psychiatric population: Hydroxylation, desmethylation and glucuronidation. *Neuropsychopharmacology*, **12**(4), 323-333.
- Siegal, A., Schubert, K.L. & Shaikh, M.B.** 1997. Neurotransmitters regulating defensive rage behavior in the cat. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, **21**(6), 733-742.
- Simpson, B.S. & Papich, M.G.** 2003. Pharmacologic management in veterinary behavioral medicine. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal*

- Practice, **33**(2), 365-404.
- Sommi, R.W., Crismon, M.L. & Bowden, C.L.** 1987. Fluoxetine: a serotonin-specific, second-generation antidepressant. *Pharmacotherapy*, **7** (1), 1-15.
- Stage, K.B., Kragh-Sorensen, P.B. & Danish University Antidepressant Group.** 2002. Age-related adverse drug reactions to clomipramine. *Acta Psychiatry Scandinavia*, **105** (1), 55-59.
- Sugimoto, Y, Inoue, K. & Yamada, J.** 2003. The tricyclic antidepressant clomipramine increases plasma glucose levels in mice. *Journal of Pharmacological Science*, **93** (1), 74-79.
- Tibbitts, J.** 2003. Issues related to the use of canines in toxicologic pathology –Issues with pharmacokinetics and metabolism. *Toxicologic Pathology*, **31** (suppl.), 17-24.
- Thomson, A.B.** 1979. Limitations of the Eadie-Hoffstee plot to estimate kinetic parameters of intestinal transport in the presence of an unstirred water layer. *Journal of Membrane Biology*, **47**(1), 39-57.
- Toutain, P.L & Bousquet-Mélou, A.** 2004a. Plasma clearance. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **27**(6), 415-425.
- Toutain, P.L. & Bousquet-Mélou, A.** 2004b. Plasma terminal half-life. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **27**, 427-439.
- Toutain, P.L. & Bousquet-Mélou, A.** 2004c. Volumes of distribution. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **27**, 441-453.
- Trepanier, L.A.** 2003. Cytochrome P450 in dogs: families and pharmacogenetics. In *Proceedings of the Thirteenth Biennial Symposium of the American Academy of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, ed. Ted Whittam. Charlotte, North Carolina, June, pp 35-39.

- Trepanier, L.A., Ray, K., Winand, N.J., Spielberg, S.P. and Cribb, A.E.** 1997. Cytosolic arylamine N-acetyltransferase (NAT) deficiency in the dog and other canids due to the absence of NAT genes. *Biochemical Pharmacology*, **54** (1), 73-80.
- Tynes, V.V., Hart, B.L., Pryor, P.A., Bain, M.J. & Messam, L.L.** 2003. Evaluation of the role of lower urinary tract disease in cats with urine-marking behavior. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **223** (4), 457-461.
- Van Beusekom, C.D., Schipper, L. & Fink-Gremmels, J.** 2006. Hepatic cytochrome P450-mediated metabolism of new fluorescent substrates in cats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **29**(suppl 1), 115-116.
- Vandel, P., Haffen, E., Nezelof, S., Broly, F., Kantelip, J.P. & Sechter, D.** 2004. Clomipramine, fluoxetine and CYP2D6 metabolic capacity in depressed patients. *Human Psychopharmacology Clinical Experiments*, **19**, 293-298.
- Vandel, B., Vandel, S., Journet, J.M., Allers, G. & Volmat, R.** 1982. Relationship between the plasma concentration of clomipramine and desmethylclomipramine in depressive patients and the clinical response. *European Journal of Clinical Pharmacology*, **22**, 15-20.
- Villeneuve, A., Berlan, M., Paris, H., Tran, M.A., Lafontan, M., Montastruc, J.L. & Montastruc, P.** 1986. Effect of clomipramine treatment on dog platelet alpha 2-adrenergic receptivity. *Journal of Pharmacology*, **17**(4), 644-650.
- Virga, V.** 2003. Behavioral dermatology. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, **33**, 231-251.
- Vozeh, S., Steimer, J-L., Rowland, M., Morselli, P., Mentré, F., Balant, L.P. & Aarons, L.** 1996. The use of population pharmacokinetics in drug development. *Clinical Pharmacokinetics*, **30** (2), 81-93.

- Waisglass, S.E., Landsberg, G.M., Yager, J.A. & Hall, J.A.** 2006. Underlying medical conditions in cats with presumptive psychogenic alopecia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **228**(11), 1705-1709.
- Wang, Y., Roy, A., Sun, L. & Lau, C.E.** 1999. A double peak phenomenon in the pharmacokinetics of alprazolam after oral administration. *Drug Metabolism and Disposition*, **27**(8), 855-859.
- Weigmann, H., Härtter, S., Bagli, M. & Hiemke, C.** 2000. Steady-state concentrations of clomipramine and its major metabolite desmethylclomipramine in rat brain and serum after oral administration of clomipramine. *European Neuropsychopharmacology*, **10**(5), 401-405.
- White, K.J., Walline, C.C. & Barker, E.L.** 2005. Serotonin transporters: implications for antidepressant drug development. *American Association of Pharmaceutical Science*, **7**(2), E421-E433.
- White, M.M., Neilson, J.C., Hart, B.L. & Cliff, K.D.** 1999. Effects of clomipramine hydrochloride on dominance-related aggression in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **215**(9), 1288-1291.
- Wilson, S. & Argyropoulos, S.** 2005. Antidepressants and sleep. A qualitative review of the literature. *Drugs*, **65** (7), 927-947.
- Wrighton, S.A., Vandenbranden, M., Stevens, J.C., Shipley, L.A., Ring, B.J., Rettie, A.E. & Cashman, J.R.** 1993. In vitro methods for assessing human hepatic drug metabolism: their use in drug development. *Drug Metabolism Reviews*, **25** (4), 453-484.
- Wu, Z-L., Huang, S-L., Ou-Yang, D-S., Xu, Z-H., Xie, H-G. & Zhou, H-H.** 1998. Clomipramine N-demethylation metabolism in human liver microsomes. *Zhongguo*

- Yao Li Xue Bao, **19** (5), 433-436.
- Yamada, J. & Sugimoto, Y.** 2002. Differential effects of the 5-HT₂ receptor antagonist on the anti-immobility effects of noradrenaline and serotonin reuptake inhibitors in the forced swimming test. *Brain Research*, **958**, 161-165.
- Yamada, M., Yamada, M. & Higushi, T.** 2005. Antidepressant-elicited changes in gene expression. Remodeling of neuronal circuits as a new hypothesis for drug efficacy. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, **29**, 999-1009.
- Yin, O.Q.P, Tomlinson, B., Chow, A.H.L. & Chow, M.S.S.** 2003. A modified two-portion absorption model to describe double-peak absorption profiles of ranitidine. *Clinical Pharmacokinetics*, **42**(2), 179-192.
- Ying, G., Karlsson, H., DePierre, J.W. & Nassberger, L.** 2002. Tricyclic antidepressants prevent the differentiation of monocytes into macrophage-like cells in vitro. *Cell Biology and Toxicology*, **18**(6), 425-437.
- Yokono, A., Morita, S., Someya, T., Hirokane, G., Okawa, M. & Shimoda, K.** 2001. The effect of CYP2C19 and CYP2D6 genotypes on the metabolism of clomipramine in Japanese psychiatric patients. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, **21**(6), 549-555.
- Yokota, S., Ishikura, Y. & Ono, H.** 1987. Cardiovascular effects of paroxetine, a newly developed antidepressant, in anesthetized dogs in comparison with those of imipramine, amitriptyline and clomipramine. *Japanese Journal of Pharmacology*, **45**, 335-342.

