



**Ministère de l'enseignement supérieur et de
la recherche scientifique**
**Université Mohamed Seddik Ben Yahia-
JIJEL**
Faculté des Sciences Exactes & Informatique
Département de Chimie

THÈSE

présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat en Sciences

Spécialité : Chimie

Option : Chimie Pharmaceutique

Par

Nafila BOUIDER

Conception et synthèse de nouveaux activateurs des canaux
potassiques dérivant de l'ouverture du cycle du diazoxide :
étude de l'effet vasodilatateur, de la stimulation de la synthèse
d'élastine et de l'effet inhibiteur sur la sécrétion de l'insuline

Soutenue le : 09/03/2016

Devant le jury :

Pr. Samir BENAYACHE	Université Mentouri- Constantine	Président
Pr. Smail KHELILI	Université M. Seddik Ben Yahia	Directeur de thèse
Pr. Bernard PIROTTE	Université de Liège	Co-directeur
Dr. Naima MERABET	Université M. Seddik Ben Yahia	Examinatrice
Pr. Gilles FAURY	Université Joseph Fourier-Grenoble	Invité

Laboratoire de pharmacologie et de phytochimie

Remerciements

*Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur **Smail KHELILI**, Professeur à l'Université de Jijel et directeur de laboratoire de Pharmacologie et de Phytochimie à la Faculté des sciences exactes et informatique de l'Université de Jijel. Je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance pour m'avoir dirigé dans la réalisation de ce travail, son écoute, son soutien et pour tout ce que j'ai appris de lui, depuis mes études de graduation jusqu'à ma thèse de doctorat.*

*Un grand merci à Monsieur **Bernard PIROTTE**, Professeur à la faculté de pharmacie de l'Université de Liège et directeur de laboratoire de chimie pharmaceutique, de m'avoir fait l'honneur de m'accueillir au sein de son laboratoire pendant une année pour la réalisation d'une grande partie de ce travail. Je le remercie pour tous les moyens qui ont été mis à ma disposition afin que je puisse avancer dans mon travail dans les meilleures conditions possibles ainsi pour son encadrement et ses conseils pendant mon séjour à Liège.*

*J'adresse mes remerciements à Monsieur **Samir BENAYACHE**, Professeur à l'Université Mentouri de Constantine d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.*

*Je tiens également à remercier Madame **Naïma MERABET-BOURAOUI**, Maître de conférences à l'Université de Jijel, pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail et l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de l'évaluer ainsi que pour ces conseils précieux.*

*Toute ma gratitude va à Monsieur **Gilles FAURY**, Professeur à l'Université Joseph Fourier de Grenoble, pour avoir accepté de participer à ce jury, et plus largement pour m'avoir accueilli successivement au sein de son laboratoire pour y effectuer des tests biologiques sur le modèle aortique de rats et sur les cellules musculaires lisses vasculaires ainsi que pour ses encouragements.*

Je voudrais également remercier Monsieur Philippe LEBRUN, Professeur à l'Université Libre de Bruxelles et directeur de laboratoire de Pharmacodynamie et de Thérapeutique pour avoir accepté de tester certaines de mes molécules sur le modèle pancréatique.

Je souhaite également remercier toutes les personnes qui ont vivement contribué aux différents projets présentés dans ce manuscrit en particulier Wassim et Zeinab du laboratoire Hypoxie (Grenoble) pour leur aide à la réalisation des cultures cellulaires et les mesures des taux d'élastine par ELISA, sans oublier aussi Yvettes Abrassart pour la réalisation des spectres infra-rouge et Stéphane Counerotte pour les analyses élémentaires.

Je remercie mes collègues Kamel et Nadjib pour toute leur aide et leur encouragement et mes étudiants qui sont maintenant des collègues Karima, Meriem, Zakaria et Taher.

*Enfin, je tiens à associer à ces remerciements ma famille pour m'avoir soutenue pendant toutes mes années d'étude et sans qui cette thèse n'aurait pas été accomplie. Je commence par **mes parents** pour lesquels le mot « merci » est insuffisant mais comme même je dis merci pour votre soutien permanent, vos sacrifices et d'avoir toujours cru en moi.*

*À mes adorables sœurs **Chahrazed** et **Asma**. A mon cher frère **Loukmane** et son épouse **Besma**.*

*Un grand merci à mon très cher mari **Abdou**, pour l'aide qu'il m'a apporté pendant les moments difficiles et son grand soutien moral pendant ces années de thèse.*

*Un grand bisou à mes petits bouts de chou que je les adore **Nadine** et **Moncef** sans oublier mes chers neveux **Yara**, **Yahia** et **Younes**.*

Table des matières

<i>Remerciements</i>	i
<i>Table des matières</i>	iii
<i>Liste des abréviations</i>	vi

Chapitre I : Introduction

I.1. Les canaux ioniques : Généralités	1
I.2. Les canaux potassiques	3
I.2.1. Les canaux potassiques voltage-dépendants.....	4
I.2.2. Les canaux potassiques à rectification entrante	5
I.2.3. Les canaux potassiques calcium dépendants	6
I.3. Les canaux potassiques sensibles à l'ATP (canaux K_{ATP})	7
I.3.1. Architecture moléculaire des canaux K_{ATP}	8
I.3.2. Physiologie des canaux K_{ATP} et pathologies associées.....	11
I.3.2.1. Canaux K_{ATP} pancréatiques.....	11
I.3.2.2. Canaux K_{ATP} du système nerveux central.....	13
I.3.2.3. Canaux K_{ATP} des cellules cardiaques.....	14
I.3.2.4. Canaux K_{ATP} des muscles lisses.....	14
I.3.2.5. Canaux K_{ATP} rénaux.....	15
I.3.2.6. Canaux K_{ATP} mitochondriaux	16
I.3.3. Pharmacologie des canaux K_{ATP}	16
I.3.3.1. Inhibiteurs des canaux K_{ATP}	17
I.3.3.2. Activateurs des canaux K_{ATP}	20
I.3.3.2.1. Les benzopyranes	22
I.3.3.2.2. Les cyanoguanidines	26
I.3.3.2.3. Les benzothiadiazines 1,1-dioxydes	27
I.4. Rôle des activateurs de canaux K_{ATP} sur la synthèse d'élastine	31
I.4.1. Structure des artères.....	31
I.4.1. Composition de la paroi artérielle	33
I.4.1.1. Les cellules endothéliales	33

I.4.1.2. Les cellules musculaires lisses vasculaires.....	33
I.4.1.3. Les fibroblastes.....	34
I.4.1.4. La matrice extracellulaire vasculaire	34
I.4.2. L'élastine.....	35
I.4.2.1. Rôles biologiques de l'élastine et des peptides d'élastine	36
I.4.2.1. Effet des activateurs de canaux K_{ATP} sur la synthèse d'élastine	37

Chapitre II : But du travail 39

Chapitre III : Stratégie de synthèse

III.1. Synthèse des composés de la Série I.....	43
III.2. Synthèse des composés de la Série II.....	51
III.3. Synthèse des composés de la série III.....	55

Chapitre IV : Résultats et discussion

IV.1. Présentation des modèles pharmacologiques.....	57
IV.1.1. Mesure de la contraction résiduelle de l'aorte de rat.....	59
IV.1.2. Mesure de la sécrétion d'élastine par les cellules musculaires lisses vasculaires en culture.....	60
IV.1.3. Mesure de la sécrétion statique d'insuline par les cellules β -pancréatiques...	62
IV.2. Détermination de la constante d'acidité.....	63
IV.3. Evaluation de l'effet myorelâchant sur l'aorte de rat.....	65
IV.4. Investigations complémentaires sur le tissu vasculaire.....	69
IV.4.1. Mesure de la contraction résiduelle de l'aorte de rat à 30 mM de KCl en l'absence et en présence de glibenclamide, et de 80 mM de KCl.	69
IV.4.2. Mesure de la contraction résiduelle de l'aorte de rat dépourvue d'endothélium.....	72
IV.5. Evaluation de l'effet sur la sécrétion statique de l'insuline par les cellules β -pancréatiques.....	73
IV.6. Résultats des mesures de la sécrétion d'élastine par les cellules musculaires lisses vasculaires en culture.....	74
IV.7. Evaluation pharmacologique <i>in vivo</i>	76

Chapitre V : Conclusion

Chapitre VI : matériels et méthodes 79

VI.1. Matériel.....	82
VI.2. Synthèse.....	84
VI.2.1. Molécules de la série I.....	81
VI.2.1.1. Synthèse des intermédiaires réactionnels.....	81
VI.2.1.2. Synthèse des molécules finales	88
VI.2.2. Molécules de la série II.....	92
VI.2.2.1. Synthèse des intermédiaires réactionnels.....	92
VI.2.2.2. Synthèse des molécules finales	96
VI.2.3. Molécules de la série III.....	103
VI.2.3.1. Synthèse des intermédiaires réactionnels.....	103
VI.2.3.2. Synthèse des molécules finales.....	105
VI.3. Détermination de la constante d'ionisation (pKa)	116
VI.4. Evaluation pharmacologique.....	117
VI.4.1. Modèle aortique.....	117
VI.4.1.1. Prélèvement de l'aorte thoracique de rat.....	117
VI.4.1.2. Montage des anneaux aortiques sur leurs supports.....	117
VI.4.1.3. Mesure de la contraction isométrique résiduelle d'aorte de rat.....	117
VI.4.2. Mesure de la sécrétion statique d'insuline.....	118
VI.4.2.1. Isolement des îlots pancréatiques.....	118
VI.4.2.2. Sécrétion statique d'insuline.....	118
VI.4.2.3. Dosage radioimmunologique de l'insuline.....	119
VI.4.3. Culture des cellules musculaires lisses aortiques.....	119
VI.4.4. Mesure du taux d'élastine extracellulaire par ELISA.....	120
VI.4.5. Evaluation pharmacologique <i>in vivo</i>	122
VII. Bibliographie	123
VIII. Annexe	141

Liste des abréviations

°C	: Température en degrés Celsius
δ	: Déplacement chimique
μg	: microgramme
μl	: microlitre
μM	: microMolaire
ABC	: ATP-Binding-Cassette
Ac	: Anticorps
ADP	: Adénosine DiPhosphate
ARNm	: Acide RiboNucléique messenger
ATP	: Adénosine TriPhosphate
BSA	: Bovine Serum Albumin
CCM	: Chromatographie sur Couches Minces
CE	: Cellules Endothéliales
CMLV	: Cellules Musculaires Lisses Vasculaires
CTP	: Cytosine TriPhosphate
d	: doublet
dd	: doublet dédoublé
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (milieu de culture cellulaire)
DMF	: DiMéthylFormamide
DMSO	: DiMéthylSulfOxide
DMSO-<i>d</i>₆	: DiMéthylSulfOxide deutérié
DTM	: Domaine TransMembranaire
EC₅₀	: Concentration évoquant 50% d'activité
ELISA	: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
g	: gramme
GLUT-2	: Glucose Transporter type 2
Gly	: Glycine
GTP	: Guanosine TriPhosphate

HRP	: Horseradish Peroxidase (peroxydase de raifort)
IR	: Infra-Rouge
K_A	: Canal potassique <i>delayed rectifier</i>
K_{ATP}	: Canal potassique sensible à l'ATP
K_{Ca}	: Canal potassique calcium-dépendant
KCOs	: <i>K⁺ Channel Openers</i> (Ouvreurs potassiques)
kDa	: kiloDalton
Kir	: K ⁺ inward rectifier (Canal K ⁺ rectifiant entrant)
Kv	: Canal potassique <i>transient outward</i>
m	: multiplet
MEC	: Matrice ExtraCellulaire
MgADP	: Complexe Mg ²⁺ Adénosine DiPhosphate
MHz	: MégaHertz
min	: minute
ml	: millilitre
mM	: milliMolaire
mmol	: millimole
mV	: milliVolt
NBF	: Nucléotide Binding Fold (site de fixation de nucléotide)
nM	: nanoMolaire
PBS	: Phosphate-Buffered Saline (solution saline tamponnée au phosphate)
Phe	: Phénylalanine
PHHI	: Persistent Hyperinsulinemic Hypoglycemia of Infancy (Hypoglycémie hyper insulinémique persistante du nouveau-né)
pKa	: Constante d'acidité
ppm	: Partie par million
RMN	: Résonance Magnétique Nucléaire
s	: Singulet
s.e.m.	: Standard error of the mean (erreur type)
SASV	: Sténose Aortique Supra-Vulvaire
SNar	: Substitution Nucléophile aromatique
STM	: Segment TransMembranaire
SUR	: SulfonylUrea Receptor (Récepteur des sulfonylurées)

SVF	: Sérum de Veau Fœtal
SWB	: Syndrome de Williams-Beuren
t	: Triplet
TE	: Tropoélastine
TMB	: 3,3',5,5'-TétraMéthylBenzidine.
TMS	: TétraMéthylSilane
Tyr	: Tyrosine
UTP	: Uridine DiPhosphate
UV	: UltraViolet
VDCC	: Canaux calciques voltage-dépendants
VIH	: Virus de l'Immunodéficience Humaine

Chapitre I

Introduction

I.1. Les canaux ioniques : Généralités

Toutes les cellules de l'organisme sont limitées par une membrane plasmique hydrophobe garantissant l'intégrité cellulaire et permettant la compartimentation, la régulation des échanges cellule/environnement, ou encore le contrôle des flux d'informations entre les cellules.

La membrane plasmique est principalement composée de lipides (phospholipides, glycolipides et cholestérol) organisés en deux feuilletts (bicouche lipidique) formant une barrière physique imperméable entre le milieu extracellulaire et le cytoplasme (Figure 1). Les autres composants essentiels de la membrane sont les protéines membranaires, assurant les fonctions de transport et de communication avec le milieu extracellulaire indispensables à la survie cellulaire.

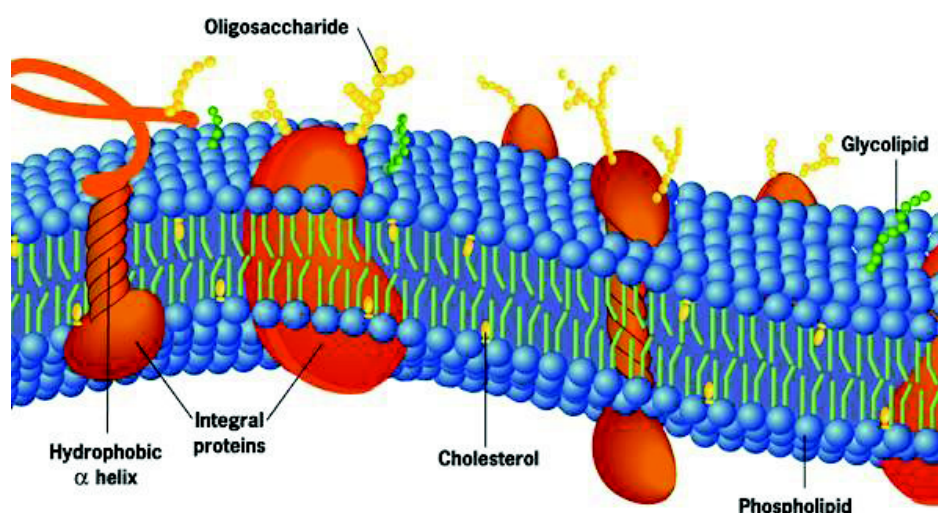


Figure 1 : Représentation schématique de la membrane plasmique [wordpress.com].

La nature lipidique de la membrane lui confère une relative imperméabilité vis-à-vis des molécules hydrosolubles. Le transport des ions et des molécules polaires telles que les sucres ou les acides aminés est donc assuré par des protéines transmembranaires spécialisées: les transporteurs et les canaux ioniques.

Les canaux ioniques sont des perméases qui forment des pores aqueux au travers la bicouche lipidique de la membrane plasmique. La présence ubiquitaire des canaux ioniques suggère leur importance dans l'intégrité du fonctionnement cellulaire. Ces canaux exploitent les gradients ioniques entre le coté cytosolique et le côté extracellulaire pour transférer les ions essentiels tels que Na^+ , K^+ , Ca^{2+} et Cl^- (flux allant jusqu'à 10^7 voir 10^8 ions par seconde) d'un coté à l'autre des membranes excitables et maintenir les processus cellulaires vitaux [Hodgkin, 1952].

Les canaux ioniques sont généralement classés selon le principal ion qu'ils transportent et le mécanisme par lequel ils sont ouverts ou fermés. Ils utilisent l'énergie de gradients de concentration (transport passif) ou de l'hydrolyse de l'ATP (transport actif) pour faire passer les ions d'un côté à l'autre de la membrane, leurs ouverture/fermeture étant régulées par différents facteurs suivant la nature des canaux considérés, à savoir la variation du potentiel membranaire, de la pression, ou encore la fixation d'un ligand.

La répartition ionique inégale entre le milieu intracellulaire et le milieu extracellulaire induit l'apparition d'un potentiel de membrane. Pour une cellule au repos, le potentiel membranaire (différence de potentiel entre la face interne et la face externe de la membrane) est compris entre -60 et -90 mV. La valeur de ce dernier est en grande partie fixée par le potentiel d'équilibre de l'ion K^+ . Les entrées et les sorties d'espèces chargées vont modifier la valeur du potentiel de membrane. La sortie de potassium va avoir pour effet l'hyperpolarisation de la membrane cellulaire (potentiel plus négatif) alors que l'entrée de sodium et/ou de calcium la dépolarise (potentiel plus positif).

Les canaux ioniques ont été durant des décennies et le seront toujours cibles attractives pour les manipulations pharmacologiques et le développement de nouveaux médicaments.

De très nombreuses études ont été centrées sur la modulation des canaux potassiques, canaux perméables aux ions potassium, qui sont présents de manière massive et variée

aussi bien dans les membranes plasmiques des cellules excitables que des cellules non-excitables, et qui sont extrêmement diversifiés tant au niveau de leurs conductances élémentaires que des mécanismes qui contrôlent leurs activités [Kazic et Gojkovic Bukarica, 1999].

I.2. Les canaux potassiques

Les canaux potassiques forment la classe la plus abondante des canaux ioniques. Au moins 16 types et beaucoup plus de sous-classes ont été décrits, et leurs fonctions physiologiques sont encore loin d'être complètement élucidées [Kazic et Gojkovic Bukarica 1999]. Cependant, quelques-unes sont bien connues telles que leur rôle fondamental dans les phénomènes électriques et mécaniques de base d'une large variété de tissus, à savoir : le contrôle de la contraction des muscles, la génération du rythme cardiaque, les signaux excitants dans les neurones et le contrôle de la sécrétion de l'insuline par les glandes endocrines [Hamilton, Weston. 1989 ; Escande *et al.*, 1988 ; Bernardi *et al* 1989].

Les progrès qu'a connus la pharmacologie des canaux potassiques sont dus à la découverte de plusieurs substances pharmacologiques spécifiques ayant des effets activateurs ou inhibiteurs sur ces canaux, et par l'introduction de nouvelles techniques électrophysiologiques (Voltage clamp, Patch clamp) et en particulier par les progrès de la biologie moléculaire [Wickenden, 2002].

Les canaux potassiques sont des entités moléculaires qui régulent la diffusion directionnelle et sélective de 10⁶ à 10⁸ ions potassium (K⁺) par seconde, du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire, ce qui correspond à un important gradient électrochimique d'ions potassiques de part et d'autre de la membrane plasmique [Parent *et al.*, 2002].

Des analyses cristallographiques ont bien montré que ces canaux sont pourvus d'une large cavité hydrophile d'un diamètre de 8 Å, qui se trouve au centre du canal potassique en contact avec le milieu cytoplasmique (Figure 2). La cavité interne se rétrécit considérablement au niveau du filtre de sélectivité formé par trois acides aminés Gly, Tyr, Phe, qui fait face au milieu extracellulaire. Ainsi, son rôle est d'assurer, uniquement, le passage virtuel des ions K⁺ à travers le canal avec une très grande sélectivité compatible avec le flux rapide des ions potassiques [Parent *et al.*, 2002].

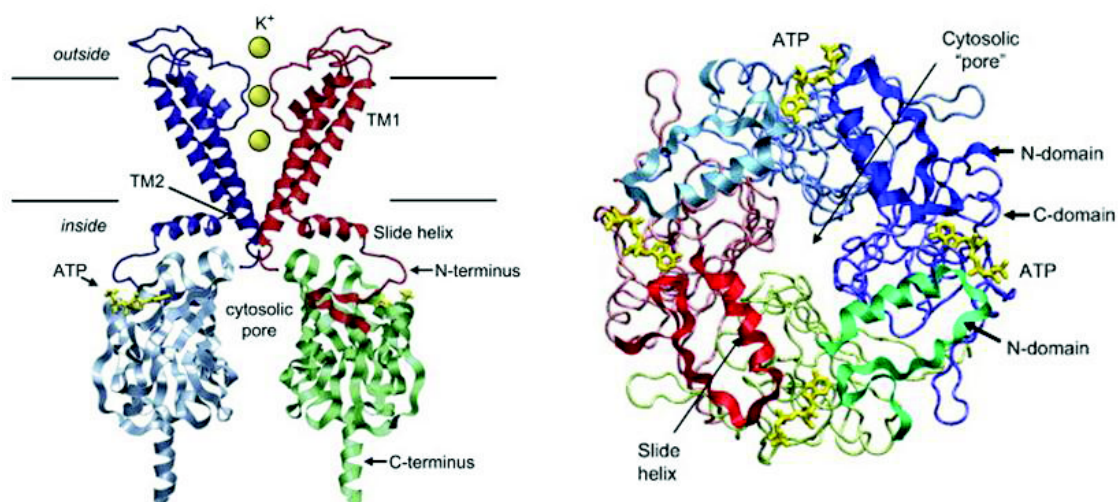


Figure 2: Structure tridimensionnelle d'un canal potassique [Haider, 2005 ; Proks et Ashcroft, 2009].

La classification la plus récente des canaux potassiques (1996) est basée sur le mécanisme principal d'activation de ces canaux. Quatre principales classes ont été identifiées : les canaux potassiques voltage-dépendants (Kv), les canaux potassiques calcium-dépendants (K_{Ca}), les canaux potassiques rectifiants entrants ou *inwardly rectifying potassium channels* (Kir), et les canaux potassiques ATP-dépendants (K_{ATP}).

I.2.1. Les canaux potassiques voltage-dépendants

Ce sont des tétramères à 6 segments transmembranaires avec un seul pore. Ils sont sensibles au potentiel membranaire (*voltage-gated*) grâce au segment 4, contenant des résidus avec des charges positives (lysine ou arginine) exigeant, pour l'activation du canal, des interactions électrostatiques avec les charges négatives des segments S2 et S3 (Figure 3).

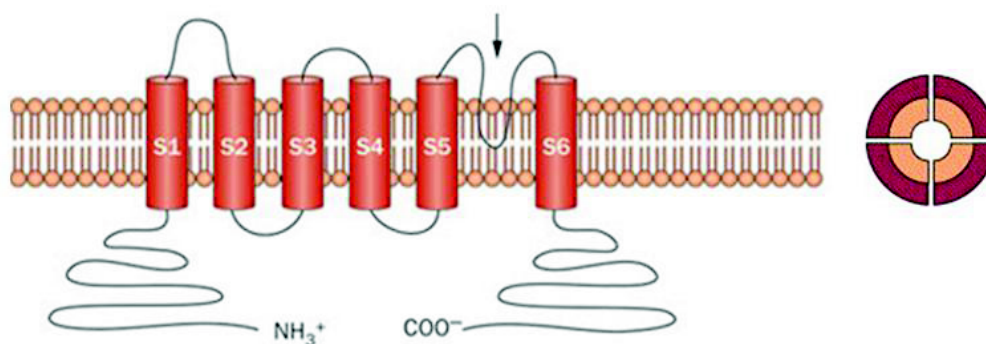


Figure 3 : Structure d'un canal potassique voltage-dépendant [Giudicessi et Ackerman, 2012 ; Xu *et al*, 2004].

Il existe plusieurs types de canaux potassiques potentiel-dépendants dont la distinction se fonde sur des différences de cinétiques d'ouverture /fermeture.

- Le canal potassique *delayed rectifier* (K_v) qui s'ouvre et qui reste ouvert un long moment après une dépolarisation membranaire. Ce type de canaux se trouve au niveau de nombreuses structures cellulaires telles que les cellules β pancréatiques, les cellules des muscles lisses, les cellules du myocarde et les neurones [Hille, 1992 ; Rudy, 1988].
- Le canal potassique *transient outward* (K_A) qui est activé par une dépolarisation membranaire consécutive à une hyperpolarisation. De telles structures sont présentes au niveau neuronal [Connor et Stevens, 1971], cardiaque [Hille, 1992], et au niveau des cellules β pancréatiques [Smith *et al.*, 1989].

I.2.2. Les canaux potassiques à rectification entrante

Les canaux Kir sont dits rectifiants entrants, c'est-à-dire qu'ils favorisent les flux d'ions entrants par rapport aux flux sortants. En d'autres termes, ils conduisent plus le courant quand la membrane est hyperpolarisée que quand elle est dépolarisée.

Les canaux Kir sont des tétramères de quatre sous-unités identiques (homomères) ou distinctes (hétéromères) qui ont chacune deux domaines transmembranaires TM liés par une boucle contenant la signature des canaux potassiques [Nichols et Lopatin, 1997 ; Doupnik *et al.*, 1995] (figure 4). Ces canaux remplissent deux principaux rôles physiologiques: ils stabilisent le potentiel membranaire de repos proche du potentiel d'équilibre du potassium, et ils assurent le transport d'ions K^+ à travers les membranes [Nichols et Lopatin, 1997 ; Doupnik *et al.*, 1995].

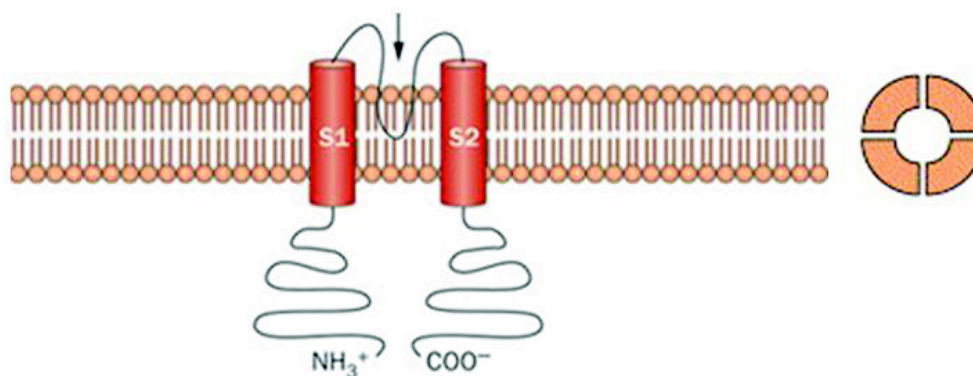


Figure 4 : Structure d'un canal potassique à rectification entrante [Giudicessi et Ackerman, 2012 ; Xu *et al.*, 2004].

La famille des canaux Kir humains comporte 17 membres répartis dans sept sous-familles, de Kir1.1 à Kir7.1 [Reimann et Ashcroft, 1999].

Le cas des canaux Kir6.x est unique dans la mesure où ils s'associent à une sous-unité régulatrice, le récepteur des sulphonylurées (SUR), pour former un canal octamérique de stoechiométrie 4:4 [Clement *et al*, 1997; Ashcroft et Gribble, 1998].

I.2.3. Les canaux potassiques calcium-dépendants

Les canaux potassiques calcium-dépendants (K_{Ca}) ont la particularité d'être activés soit par l'augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire, soit par la dépolarisation de la membrane. Tout comme les canaux K_v , ces canaux sont composés de 4 sous-unités qui comportent chacune 6 segments transmembranaires sauf pour les canaux de grande conductance qui comporteraient sept segments transmembranaires (Figure 5).

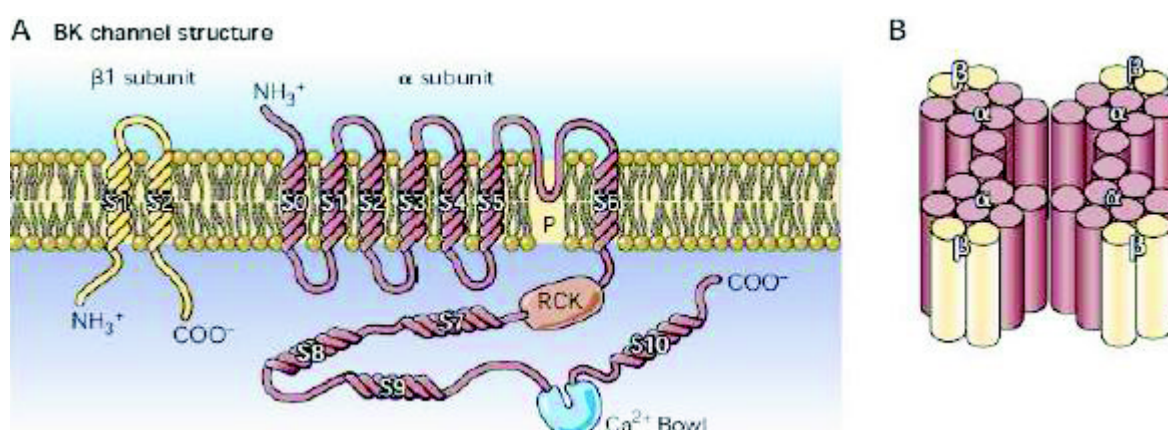


Figure 5 : Structure d'un canal potassique calcium dépendant BK [Ledoux *et al.*, 2006].

Ces canaux sont divisés en trois sous-groupes. La distinction se fonde sur les différences de conductance aux ions K^+ . Ainsi, il existe :

- les canaux à grande conductance (B_K) [Meech, 1978] ;
- les canaux à conductance moyenne (I_K) [Inoue, Okabe *et al.*, 1986] ;
- les canaux à faible conductance (S_K) [Cook et Quast, 1990].

I.3. Canaux potassiques sensibles à l'ATP

Les canaux potassiques régulés par le changement de concentrations intracellulaires d'ATP ($[ATP]_i$) ont été découverts et décrits pour la première fois dans le muscle cardiaque [Noma, 1980]. Ces canaux ont ensuite été identifiés dans de nombreuses autres cellules : les cellules B pancréatiques [Cook et Hales, 1984 ; Ashcroft et Gribble, 2000], les cellules musculaires lisses vasculaires [Standen, Quayle *et al.*, 1989], gastro-intestinales [Lebrun and Fontaine, 1990 ; Franck, Puschmann *et al.*, 1994; Hatakeyama, Wang *et al.*, 1995] ou utérines [Piper, Minshall *et al.*, 1990], les cellules musculaires striées [Allard and Lazdunski 1993], les neurones [Bernardi, Fosset *et al.* 1988] , les cellules de l'adénohypophyse [De Weille, Fosset *et al.* 1992], et l'hypothalamus [Evans, Mcrimmon *et al.*, 2004 ; Poci, Lam *et al.*, 2005].

Les canaux K_{ATP} assurent un couplage entre l'excitabilité et le métabolisme énergétique de la cellule et jouent un rôle crucial dans différentes fonctions cellulaires. Ils sont exprimés au niveau de la membrane plasmique ainsi que dans certaines organelles, notamment les mitochondries, dont ils régulent le potentiel.

L'activité de ces canaux est proportionnelle au rapport $[ATP]/[ADP]$. Il est admis que l'accroissement de ce rapport, dû au métabolisme cellulaire du glucose, ferme le pore du canal alors que sa décroissance provoque son ouverture [Lu et Halvorsen., 1997 ; Liss et Roeper., 2001 ; Löffler-Walz *et al.*, 2002]. Les autres nucléotides triphosphates (CTP, GTP, UTP et ITP), bien que moins actifs, sont eux aussi capables d'inhiber le canal [Ashcroft et Ashcroft. 1990 ; Quayle, Nelson *et al.* 1997 ; Thuringer et Caverro. 1997].

Des études ont aussi démontré que l'augmentation de la concentration intracellulaire en MgADP (complexe entre Mg^{2+} et l'adénosine diphosphate) est le facteur principal induisant l'ouverture du canal, même en présence de concentrations bloquantes en ATP.

Le MgADP est donc l'ouvreur endogène du canal K_{ATP} [Nichols, Shyng *et al.*, 1996 ; Thuringer et Caverro., 1997]. L'ouverture du canal se traduit par une sortie d'ions K^+ hors de la cellule et une hyperpolarisation de la membrane cellulaire. La réponse physiologique associée à cette hyperpolarisation dépendra du tissu étudié.

I.3.1. Architecture moléculaire des canaux K_{ATP}

Les canaux K_{ATP} sont des complexes protéiques de 950 kDa environ [Clement *IV et al.*, 1997]. Ils adoptent une structure octamérique, composée de deux types de sous-unités : les sous-unités Kir (α) qui forment le pore du canal et les sous-unités β formant les récepteurs des sulfonyles SUR (sulfonyleurea receptor) qui sont les régulateurs de l'activité du canal (Figure 6) [Inagaki, Gonoï *et al.*, 1995].

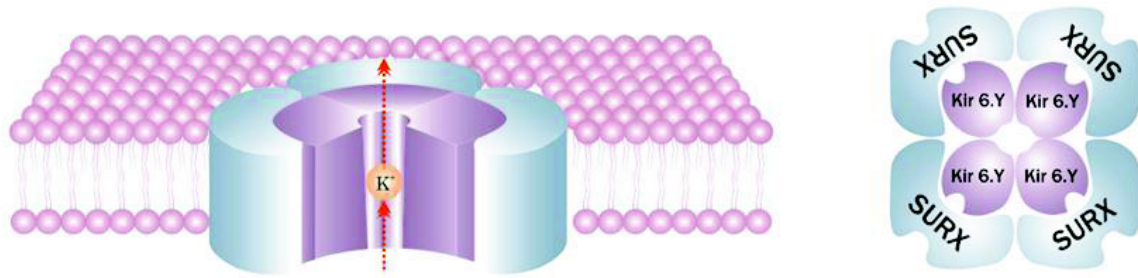


Figure 6 : Structure octamérique (SUR/Kir6.x) du canal K_{ATP} .

La sous-unité Kir est formée de deux segments transmembranaires (STM) en forme d'hélice α reliés par une boucle repliée dans la membrane ; les extrémités de la protéine sont intracellulaires. Ces canaux conduisent mieux le courant qui entre dans la cellule que celui qui en sort (Figure 7).

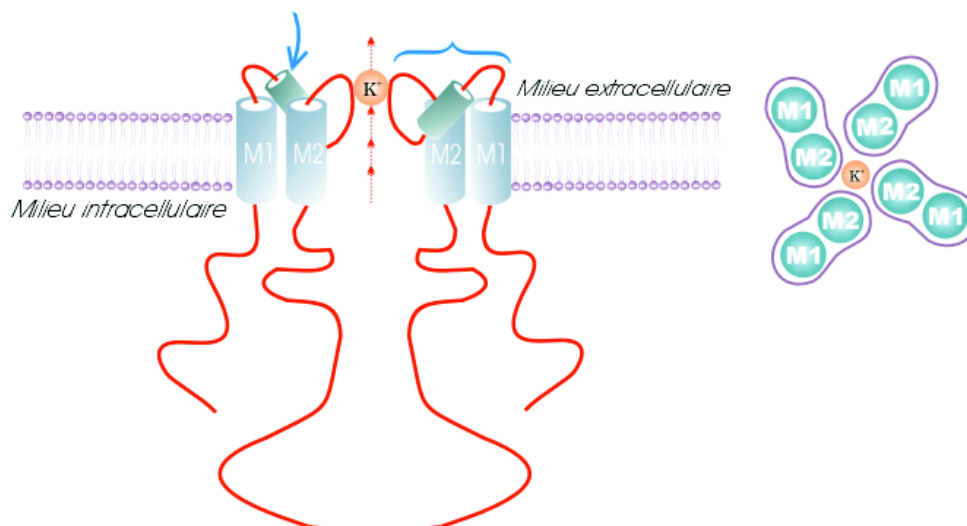


Figure 7 : Structure des isoformes du canal rectifiant entrant (Kir).

Le canal Kir comporte dans son pore la séquence d'acides aminés Gly-Tyr-Phe-Gly, qui est la signature des canaux potassiques leur conférant la sélectivité envers les ions K^+ [Doyle *et al.*, 1998 ; Minor *et al.* 1999; Giblin. *et al.*, 2002]. Les canaux Kir forment une grande superfamille composée de groupes Kir₁ à Kir₇, mais il paraît que seulement les membres du groupe Kir₆ (Kir_{6.1}, Kir_{6.2}) font partie des canaux K_{ATP}. Les acides aminés des Kir_{6.1} et Kir_{6.2} sont identiques à 71%. [Inagaki, Gonoï *et al.*, 1995].

La sous-unité SUR est une protéine formée d'environ 1580 acides aminés. Les quatre SURs du canal sont groupés symétriquement autour du pore formé par les Kirs agissant comme des sous-unités régulatrices [Inagaki *et al.*, 1996].

Des études sur les SUR ont permis de reconnaître que ces protéines sont des membres de la superfamille des protéines ABC (ATP-binding cassette protein), protéines liant l'ATP [Inagaki, Gonoï *et al.*, 1995 ; Inagaki, Inazawa *et al.*, 1995].

En général, les protéines ABC sont des transporteurs alimentés par l'ATP, mais elles peuvent aussi fonctionner comme des canaux ou réguler l'activité d'autres protéines. L'élément essentiel de ces protéines est un domaine composé de 6 segments transmembranaires (STM) suivi d'un site de fixation de nucléotide intracellulaire (nucleotide binding fold, NBF) (Figure 8).

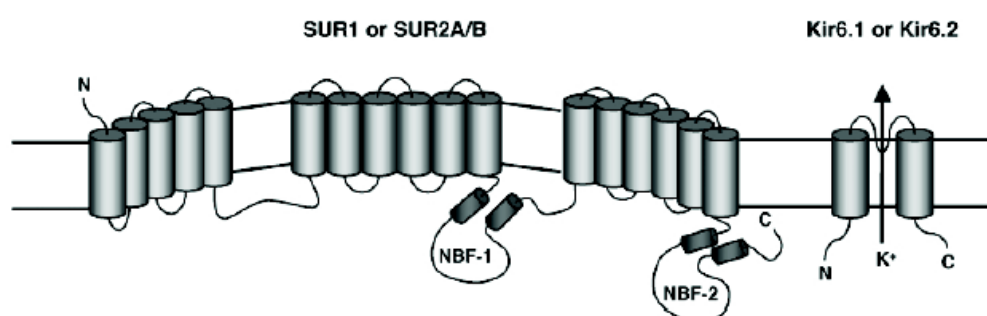


Figure 8 : Topologie membranaire des sous-unités SUR/Kir6.x du canal K_{ATP}.

Le récepteur sulfonylurée (SUR) est constitué de 17 segments transmembranaires (STM) qui sont regroupés en trois domaines. Le domaine initial (DTM0) contient l'extrémité amino-terminale extracellulaire et les STM 1 à 5. Ce domaine est une particularité du SUR absent dans les protéines ABC conventionnelles.

Les domaines DTM1 et DTM2 sont composés chacun de 6 STM suivis de leur site de fixation pour les nucléotides NBF₁ et NBF₂, ce qui correspond à la structure canonique des protéines ABC (Figure 8) [Mikhailov *et al.*, 2001 ; Giblin *et al.*, 2002 ; Hambrock *et al.*, 2004]. Les sites récepteurs des sulfonylurées et des activateurs se situent dans le dernier domaine transmembranaire et ils sont très proches l'un de l'autre [Uhde *et al.*, 1999].

Actuellement, deux types de SUR sont connus chez les mammifères : le SUR pancréatique (SUR1) qui est très sensible aux sulfonylurées et peu sensible aux activateurs (sauf le diazoxide) [Aguilar-Bryan *et al.*, 1995; Inagaki *et al.*, 1995] et le SUR des muscles (SUR2), dont l'épissage alternatif donne deux isoformes (SUR2A et SUR2B) qui ne diffèrent que dans les 40 derniers acides aminés [Inagaki *et al.*, 1996; Isomoto *et al.*, 1996]. SUR2A est le récepteur des myocytes cardiaques et squelettiques [Inagaki *et al.*, 1996], alors que SUR2B celui des muscles lisses [Isomoto *et al.*, 1996]. Selon le tissu considéré, les canaux K_{ATP} sont formés par combinaison des sous-unités Kir6.1 ou Kir6.2 et SUR1 ou SUR2, donnant des canaux de propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques distinctes.

Le tableau 1 montre la composition de ces canaux dans les différents tissus.

Tableau 1 : Assemblages des sous-unités formant les canaux K_{ATP} dans les différents tissus.

Sous-unité canalaire	Récepteur au sulfonylurée	Localisation tissulaire
Kir6.1/Kir6.2	SUR1	Neurones [Liss <i>et al.</i> , 1999]
Kir6.2	SUR1	Cellules β pancréatiques [Aguilar-Bryan <i>et al.</i> , 1995]
Kir6.2	SUR2A	Muscle cardiaque et squelettiques [Inagaki <i>et al.</i> , 1996]
Kir6.1	SUR2B	Muscles lisses vasculaires [Beech <i>et al.</i> , 1993]
Kir6.2	SUR2B	Muscles lisses non vasculaires [Isomoto <i>et al.</i> , 1996]
Kir6.1	SUR2	Mitochondries [Suzuki <i>et al.</i> , 1997]

I.3.2. Physiologie des canaux K_{ATP} et pathologies associées

Les canaux K_{ATP} jouent un rôle de senseur métabolique et couplent directement l'excitabilité membranaire au niveau énergétique de la cellule. Un niveau énergétique bas entraîne l'ouverture des canaux, et inversement, leur activation provoque une hyperpolarisation membranaire au repos, et un raccourcissement des potentiels d'action en cas d'activité. A l'inverse, leur inhibition provoque au repos une dépolarisation membranaire, et favorise la formation de potentiels d'action en cas d'activité.

I.3.2.1. Canaux K_{ATP} pancréatiques

Le rôle le mieux caractérisé des canaux K_{ATP} se situe au niveau des cellules β -pancréatiques, où les modifications de l'activité du canal, induites par le métabolisme, jouent un rôle essentiel dans la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (Figure 9).

Aux faibles concentrations de glucose, les canaux K_{ATP} sont ouverts et leur activité maintient le potentiel membranaire de repos à un niveau hyperpolarisé. L'élévation de la concentration sanguine du glucose augmente l'entrée de ce dernier à travers le GLUT-2 et sa métabolisation par les cellules β du pancréas. Ceci entraîne l'accroissement du rapport $[ATP]/[ADP]$, et provoque la fermeture des canaux K_{ATP} . L'inhibition de ces canaux conduit alors à une dépolarisation membranaire, et ainsi l'activation des canaux calciques voltage dépendants entraînant l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule. L'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} permet alors l'exocytose des vésicules de sécrétion et la libération d'insuline dans la circulation [During *et al.*, 1995 ; Lu et Halvorsen, 1997 ; Gribble *et al.*, 1998]. Par la suite, la présence d'insuline dans le milieu sanguin va induire une diminution du taux de glucose circulant. Un mécanisme inverse va aboutir à la réouverture des canaux K_{ATP} . Le potentiel membranaire retourne peu à peu vers sa valeur d'équilibre et la sécrétion d'insuline s'arrête.

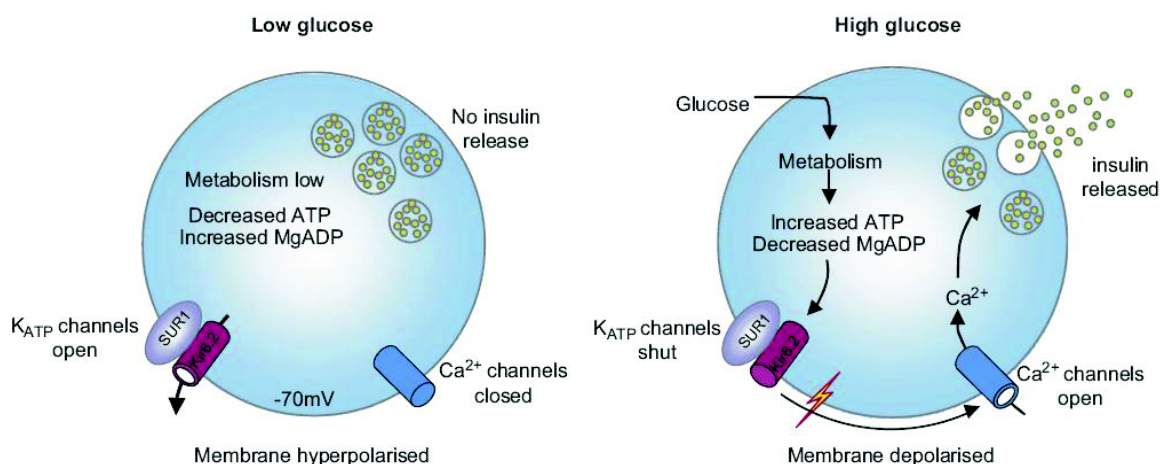


Figure 9 : Implication des canaux K_{ATP} *pancréatiques* dans la sécrétion d'insuline.

L'augmentation de la glycémie provoque l'entrée de glucose dans les cellules β pancréatiques où il est métabolisé. L'augmentation de la concentration intracellulaire en ATP qui en résulte ferme les canaux K_{ATP}, provoquant une dépolarisation membranaire activant des canaux calciques voltage-dépendants et entraînant l'entrée de calcium dans la cellule. Cette entrée de calcium induit l'exocytose des vésicules de sécrétion d'insuline.

Les canaux K_{ATP} β -pancréatiques (SUR1 + Kir6.2) jouent donc un rôle crucial dans la régulation de la sécrétion d'insuline et leur dysfonctionnement peut engendrer des désordres sévères. Des mutations des sous-unités SUR1 et Kir6.2 sont ainsi associées à l'hypoglycémie hyperinsulinémique persistante (PHHI), une pathologie caractérisée par une sécrétion excessive d'insuline et non régulée, ainsi qu'à certains diabètes de type II, caractérisés par l'absence de sécrétion d'insuline malgré une glycémie élevée [Gloyn *et al.*, 2006].

Dans certains cas, l'application de sulphonylurées permet de restaurer la densité de canaux à la membrane [Yan *et al.*, 2004], et l'application de diazoxide (ouvreurs pharmacologiques) d'augmenter la probabilité d'ouverture des canaux déficients [Dunne *et al.*, 2004].

I.3.2.2. Canaux K_{ATP} du système nerveux central

Dans le système nerveux central, les canaux K_{ATP} s'expriment dans différentes régions et notamment dans les neurones GABAergiques et les neurones dopaminergiques de la substance grise, dans l'hypothalamus, le cortex et l'hippocampe, mais leur rôle physiologique demeurent largement inconnu [Karschin *et al.*, 1998 ; Liss *et al.*, 1999 ; Liss et Roeper, 2001 ; Minami *et al.*, 2004].

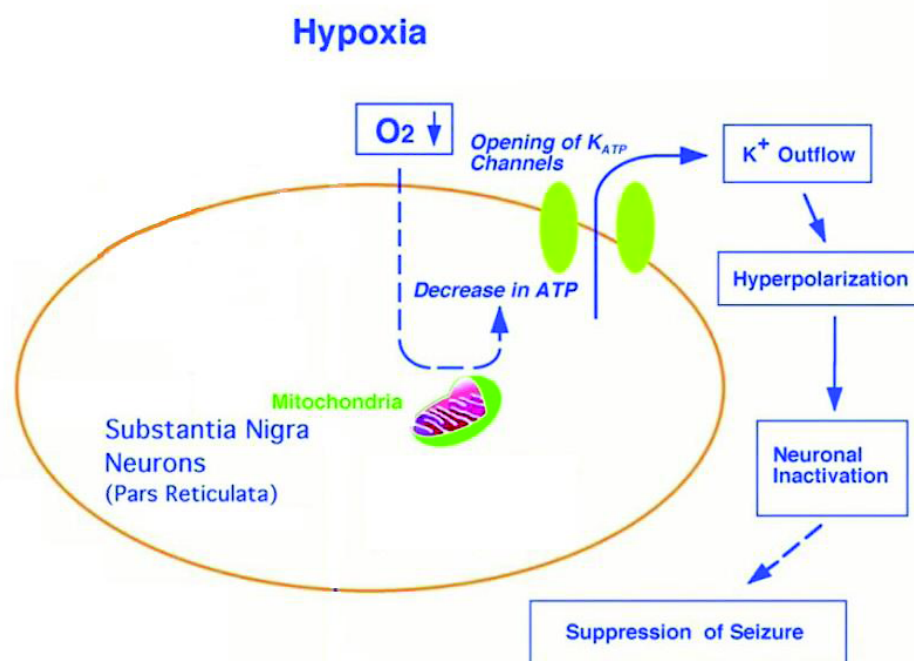


Figure 10 : Implication des canaux K_{ATP} dans l'activité des cellules nerveuses.

Les canaux K_{ATP} servent de senseurs de glucose au niveau des neurones de l'hypothalamus, rôle essentiel pour le maintien de l'homéostasie du glucose en régulant la sécrétion du glucagon [Miki *et al.*, 2001]. L'ouverture des canaux K_{ATP} de la matière grise protège contre la propagation d'une apoplexie généralisée après une brève hypoxie [Liss *et al.*, 1999 ; Yamada et Inagaki 2002] (Figure 10).

Certains auteurs ont démontré que les activateurs des canaux K_{ATP} exercent un effet neuroprotecteur marqué quand ils sont utilisés comme prétraitement à un épisode ischémique sévère ou une crise d'épilepsie. En effet, l'activation des canaux K_{ATP} neuronaux induit une hyperpolarisation qui inhibe la libération de glutamate et d'aspartate lors d'épisodes d'hypoxie couplés à la dépolarisation neuronale [Blondeau *et al.* 2000 ; Wickenden 2002 ; Kis *et al.*, 2004].

I.3.2.3. Canaux K_{ATP} des cellules cardiaques

L'implication des canaux K_{ATP} dans le fonctionnement de la cellule cardiaque apparaît pendant une ischémie cardiaque. Parmi les événements importants qui se produisent dans la cellule cardiaque ischémisée, il y a la diminution intracellulaire d'ATP. Cette diminution a pour effet d'ouvrir les canaux K_{ATP} et par là de raccourcir la durée du potentiel d'action conduisant à un phénomène de preconditionnement par lequel une première ischémie transitoire protège les cellules des dommages ischémiques induits par une seconde ischémie successive [Minami *et al.*, 2004 ; Terzic *et al.*, 2011] (Figure 11).

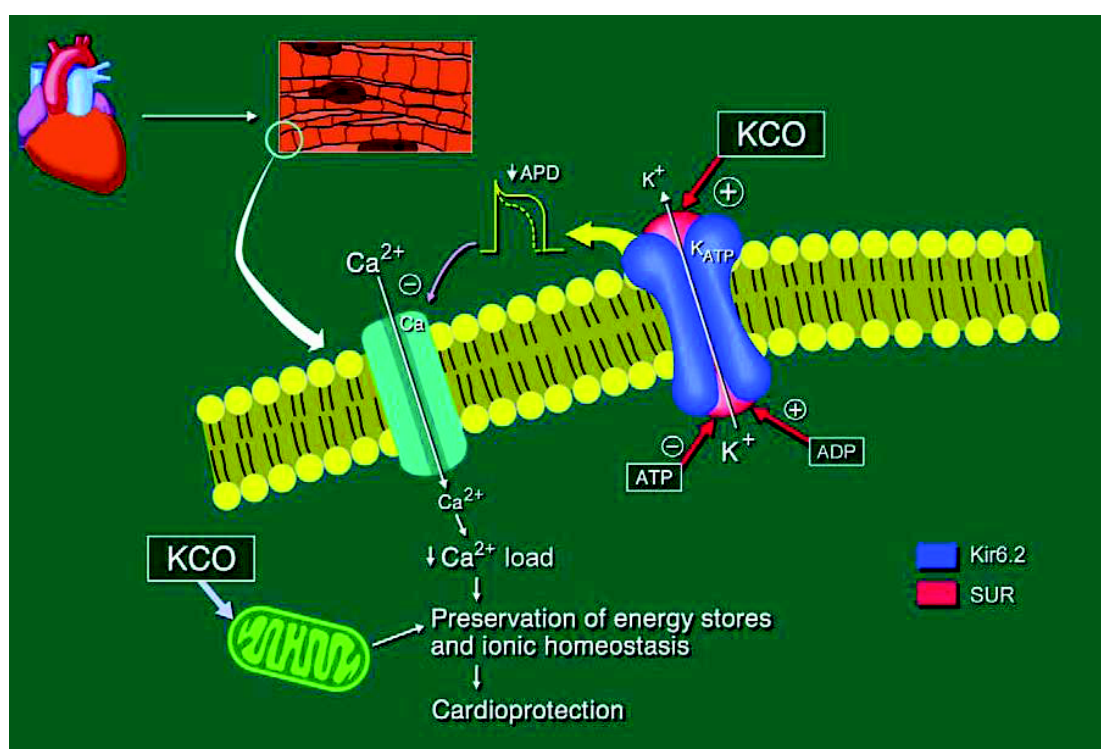


Figure 11 : Effet des activateurs de canaux K_{ATP} sur le myocarde.

L'activation des canaux K_{ATP} myocardiques diminue l'entrée de Ca^{2+} par le canal calcique voltage dépendant et réduit la durée du potentiel d'action (APD). Les KCO modulent aussi les canaux K_{ATP} mitochondriaux, ce qui prévient l'accumulation de Ca^{2+} et la production de radicaux libres [Jahangir et Terzic. 2005].

I.3.2.4. Canaux K_{ATP} des muscles lisses

Les canaux K_{ATP} semblent intervenir de manière importante dans le contrôle du tonus musculaire et dans le maintien de la contractilité, au niveau du tissu vasculaire et d'autres types de tissus musculaires lisses [Cook et Quast, 1990 ; Kolb, 1990 ; Brayden, 2002].

L'ouverture ou la fermeture de ce type de canaux conduit à une vasodilatation ou vasoconstriction respectivement.

L'activation des canaux potassiques sensibles à l'ATP au niveau de la fibre musculaire lisse prévient l'entrée de calcium dans la cellule et induit une relaxation musculaire (Figure 12) [Okada, Yanagisawa *et al.*, 1993 ; Quast, Guillon *et al.*, 1994]. Ainsi, l'activation des canaux K_{ATP} permet de contrôler la pression artérielle dans la majorité des cas d'hypertension [Jahangir et Terzic., 2005].

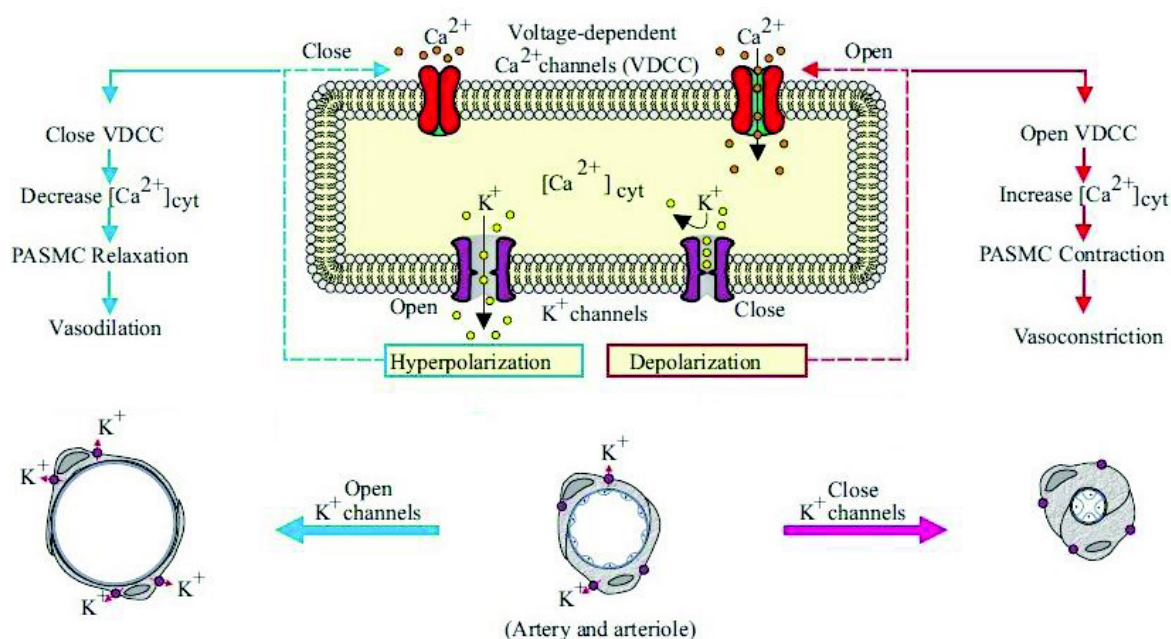


Figure 12 : Rôle des canaux K_{ATP} dans les cellules musculaires lisses.

I.3.2.5. Canaux K_{ATP} rénaux

Les canaux K_{ATP} sont présents au niveau de la membrane du tubule proximal rénale, dans l'appareil juxtaglomérulaire, la branche ascendante de l'anse de Henlé et au niveau du tube collecteur [Quast, 1996 ; McNicholas *et al.*, 1996 ; Giebisch, 2000]. Les canaux K_{ATP} rénaux, majoritairement ouverts dans les conditions physiologiques normales, jouent un rôle important dans la réabsorption d'électrolytes et de soluté, aussi bien que le recyclage des ions K^+ entrant dans la cellule à travers la pompe Na^+/K^+ -ATPase, où ils assurent un certain couplage entre l'activité du canal et celle de la pompe accumulant activement le potassium dans la cellule et transportant le sodium vers l'extérieur [Reeves et Shah, 1994 ; O'Connell *et al.*, 2005].

I.3.2.6. Canaux K_{ATP} mitochondriaux

Les canaux K_{ATP} mitochondriaux ont été initialement mis en évidence dans le foie et sont sensibles à l'inhibition par l'ATP et les sulphonylurées, ainsi qu'à l'activation par le diazoxide [Inoue *et al.*, 1991; Garlid *et al.*, 1996]. A ce titre, l'activation de ces canaux par les ouvreurs potassiques pourrait, en diminuant l'entrée d'ions Ca^{2+} dans l'organite, jouer un rôle protecteur en cas d'ischémie [Liu *et al.*, 1998].

En résumé, le canal K_{ATP} étant impliqué dans le couplage entre le métabolisme énergétique et le potentiel de membrane, joue un rôle important dans les conditions physiologiques et pathologiques. En étant un senseur métabolique il joue un rôle critique dans des situations de stress métabolique comme : l'hyperglycémie, l'hypoglycémie, l'ischémie et l'hypoxie, et plusieurs pathologies sont liées à la défaillance du canal K_{ATP} .

I.3.3. Pharmacologie des canaux K_{ATP}

Les canaux K_{ATP} constituent la plus abondante classe des canaux ioniques à avoir été étudiée. Leur fonction peut être modulée par de nombreuses molécules de structures chimiques variées qu'on peut séparer grossièrement en deux classes: les inhibiteurs de l'activité du canal (molécules de la famille des sulphonylurées principalement), et les activateurs ou ouvreurs potassiques (KCOs) (Figure 13).

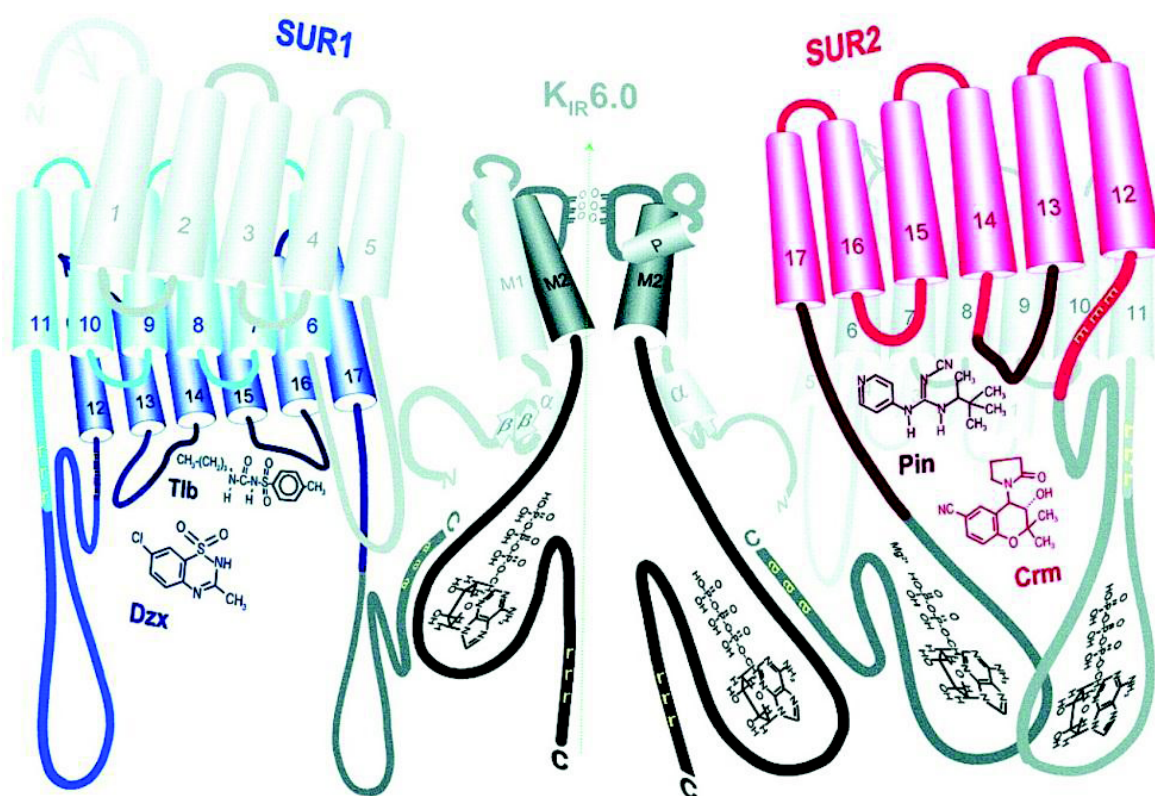


Figure 13 : Schéma récapitulatif montrant les déterminants et les interactions spécifiant une modulation différentielle des canaux (SURx/Kir6.0)₄ par des nucléotides, les KCOs et les sulfonyles [Babenko, 2000].

I.3.3.1. Inhibiteurs des Canaux K_{ATP}

Les inhibiteurs des canaux K_{ATP} peuvent être répartis en deux groupes: ceux qui interagissent avec le Kir6.2 et ceux qui interagissent avec le SUR1. Toutes ces molécules stimulent la sécrétion d'insuline et certaines sont utilisées dans le traitement du diabète de type II, telles que les sulfonyles dont les propriétés hypoglycémiantes sont connues depuis longtemps [Janbon *et al.*, 1942] : la prescription de glibenclamide permet ainsi de rétablir la glycémie des patients diabétiques (Figure 14).

Les imidazoles (phentolamine et cibenzoline) (Figure 15) se lient préférentiellement à Kir6.2 [Mukai *et al.*, 1998 ; Proks et Ashcroft, 1997], tandis que les sulfonyles (tolbutamide, gliclazide, glimepiride, glibenclamide) et les dérivés benzamido (meglitinide) se lient à SUR1 avec une forte affinité [Ashcroft et Gribble, 1999]

(Figure14). Selon leurs affinités préférentielles pour les canaux potassiques des différents organes, les sulfonylurées augmentent la durée du potentiel d'action cardiaque et pourraient augmenter les résistances vasculaires périphériques. Par leur haute affinité vis-à-vis des cellules β pancréatiques, ils stimulent la sécrétion de l'insuline [Babenko *et al.*, 1999 ; Ashfield *et al.*, 1999].

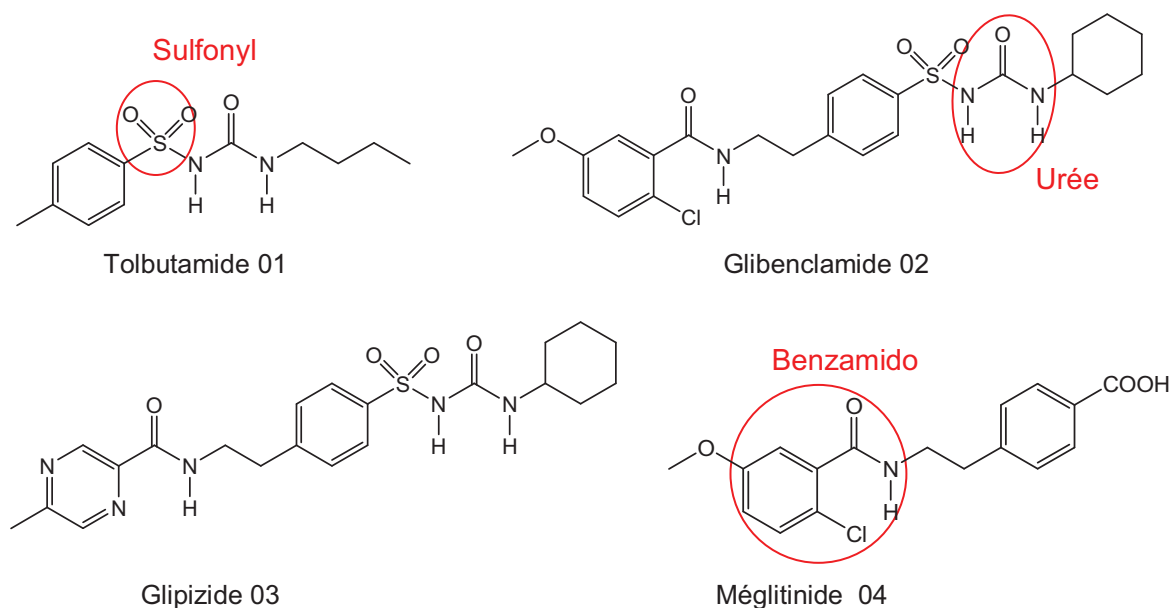


Figure 14 : Structure des principaux bloqueurs des canaux K_{ATP}

Les isoformes SUR présentent des sensibilités différentes aux inhibiteurs. De faibles concentrations de tolbutamide suffisent à bloquer les canaux K_{ATP} exprimant la sous-unité SUR1, mais pas ceux exprimant SUR2A ou SUR2B [Gribble *et al.*, 1998]. Au contraire le méglitinide bloque les trois types de canaux (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Concentrations semi-inhibitrices des inhibiteurs pour les canaux SUR1 + Kir6.2 et SUR2A + Kir6.2 (Gribble *et al.* 1998).

K_{ATP}	Tolbutamide	Glibenclamide	Méglitinide
SUR1/Kir6.2	5 μ M	4nM	0,3 μ M
SUR2A/Kir6.2	1,7 mM	27nM	0,5 μ M

Le site de liaison du glibenclamide sur les récepteurs aux sulfonyleurées se trouve au niveau de la face intracellulaire du domaine transmembranaire, et notamment sur les segments transmembranaires 14 et 15, ainsi que sur la boucle intracellulaire liant les deux segments transmembranaires 15 et 16 (Figure 13) [Mikhailov *et al.*, 2001 ; Stephan *et al.*, 2006]. Il a été suggéré que la boucle entre les hélices transmembranaires 15 et 16 soit le site de liaison du groupe sulfonyleurée et que la boucle intracellulaire entre les hélices 5 et 6 soit le site de liaison du groupe benzamide [Ashfield *et al.* 1999 ; Babenko *et al.* 1999 ; Mikhailov *et al.* 2001]. Par ailleurs, les hélices transmembranaires 14 à 16 pourraient être impliquées dans le processus de transduction couplant la liaison des sulfonyleurées à l'inhibition du canal, même si ce mécanisme moléculaire reste méconnu.

Enfin, on notera que les canaux K_{ATP} sont les cibles secondaires d'un certain nombre d'agents pharmacologiques, capables de les inhiber. Nous pouvons citer : le linogliride, la cibenzoline, la phentolamine, le U56234 et le U37883A. Toutefois, ces bloqueurs sont moins actifs et moins sélectifs que les sulfonyleurées. [Plant et Henquin, 1990 ; Proks et Ashcroft, 1997; Hopkins *et al.*, 1990; Ronner *et al.*, 1991] (Figure 15).

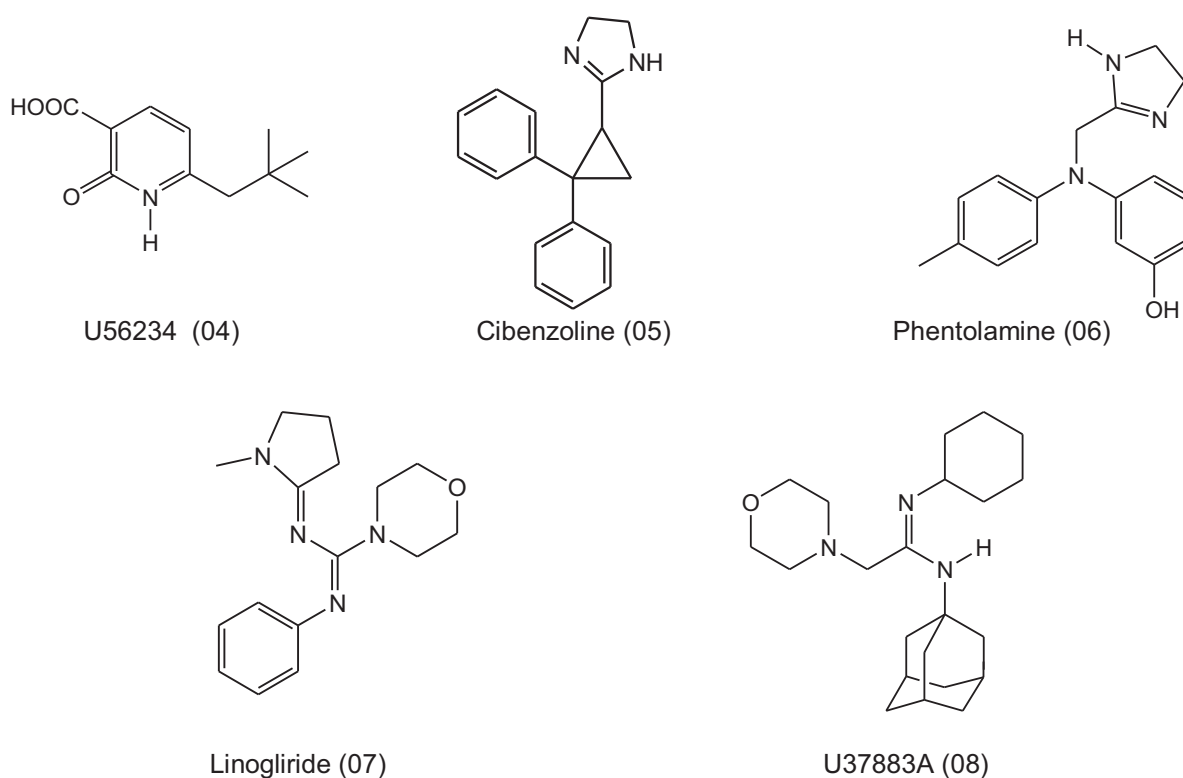


Figure 15 : Quelques bloqueurs de canaux K_{ATP} autres que les sulfonyleurées.

I.3.3.2. Activateurs des canaux K_{ATP}

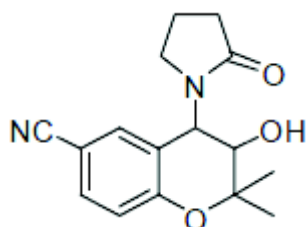
Le nombre d'agents possédant des propriétés activatrices des canaux potassiques ATP-dépendants (KCOs : K_{ATP} Channel openers) a fortement augmenté au cours de ces dernières années. Ces composés sont susceptibles de constituer de nouveaux agents thérapeutiques utiles dans le traitement de très multiples pathologies, touchant différents organes, en stimulant le flux des ions potassium à travers cette classe de canaux ioniques. Les KCOs exercent leur effet sur les cellules sécrétoires, les neurones, les muscles lisses vasculaires et non vasculaires et les muscles cardiaques et squelettiques par l'ouverture du canal K_{ATP} . L'augmentation de la sortie des ions $^{42}K^+$ ou de son traceur $^{86}Rb^+$ provoque une hyperpolarisation, la fermeture des canaux calciques voltage-dépendants et la réduction de l'activité électrique cellulaire. La diminution de la concentration cytosolique de Ca^{2+} qui en résulte, induit l'inhibition de sécrétion de l'insuline par les cellules β pancréatiques et la relaxation des muscles lisses vasculaires [Sebille *et al.*, 2004]. Ils entraînent aussi le relâchement des muscles lisses autres que vasculaires tels que les muscles bronchiques, dont seulement les dérivés du benzopyrane ont été profilés à la thérapie de l'asthme [Buchheit *et al.*, 2002 ; Sebille *et al.*, 2008].

D'autre part les KCOs pourraient jouer, par leur action sur les canaux K_{ATP} , un rôle primordial dans le traitement de l'ischémie de reperfusion du cœur, dont il a été démontré que le prétraitement par les KCOs (cromakalim et diazoxide) augmente le niveau d'expression des protéines impliquées dans l'apoptose [Fabiya *et al.*, 2003 ; Mannhold, 2004].

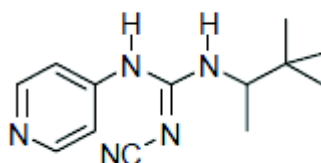
Les KCOs des canaux K_{ATP} forment un vaste groupe de composés assez disparates ne présentant pas de pharmacophore commun (Figure 16). Ces composés sont généralement classés en familles suivant leur structure chimique, parmi lesquelles on trouve notamment :

- Les benzopyranes et dihydropyranes analogues du cromakalim (**09**) et du levcromakalim ;
- Les benzothiadiazines représentés par le diazoxide (**11**) ;
- Les cyanoguanidines analogues du pinacidil (**10**) ;
- Les thioformamides analogues de l'aprikalim (**12**) ;
- Les dérivés de pyrimidines comme le minoxidil (**13**) , ou encore plus récemment les dihydropyridines (ZM-244085) ;
- Les dérivés de la nicotinamide comme le nicorandil (**15**) ;

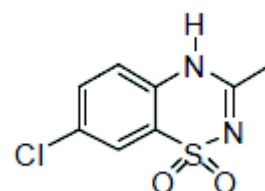
- Les cyclobutenediones (WAY-151616) ;
- Les carbinols tertiaires analogues de ZD-6169 (14) [Mannhold, 2004; Jahangir et Terzic, 2005].



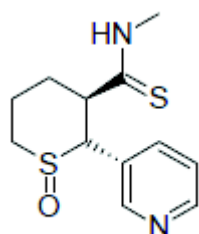
Cromakalim (09)
(Benzopyranes)



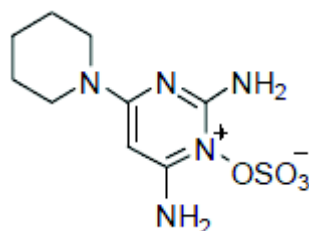
Pinacidil (10)
(Cyanoguanidines)



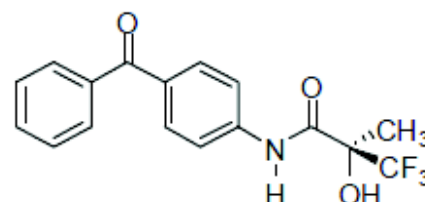
Diazoxide (11)
(Benzothiadiazines)



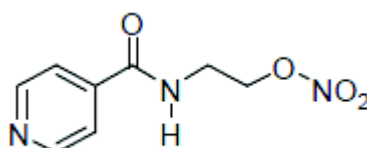
Aprikalim (12)
(Thioformamides)



Sulfate de minoxidil (13)
(Pyrimidines)



ZD 6169 (14)
(carbinols tertiaires)



Nicorandil (15)
(Pyridines)

Figure 16 : Principales familles des activateurs des canaux K_{ATP} représentées par leurs composés prototypes.

I.3.3.2.1. Les Benzopyranes

Le cromakalim est le prototype de cette famille d'ouvreurs des canaux K_{ATP} . Le cromakalim et ses dérivés constituent le groupe d'activateurs ayant fait l'objet de la plus large investigation pharmacochimique [Sebille *et al.*, 2004]. Le cromakalim a été largement étudié par le passé pour son action antihypertensive [Hamilton *et al.*, 1986]. Cette molécule est également connue pour être très faiblement active en tant qu'inhibiteur de la sécrétion d'insuline, par opposition à certains PCOs tel le diazoxide [Lebrun *et al.*, 1990]. Le cromakalim contient deux carbones chiraux avec un groupement OH (alcool) en position 3 et un groupement pyrrolidine en position 4 arrangés selon une configuration trans.

L'activité sur les canaux K_{ATP} réside, essentiellement, dans l'énantiomère 3*S*,4*R* (Levcromakalim **16**), duquel le groupement carbonyle de la séquence 4-pyrrolidinyl est considéré essentiel à l'activité biologique (Figure 17).

Plusieurs pharmacomodulations, autour du cromakalim, ont été effectuées afin, d'une part, d'augmenter l'activité vasorelaxante et d'autre part, de diminuer les effets secondaires liés à cette drogue. Les principaux sites sur lesquels les modifications ont été effectuées sont les suivantes :

- Substitution du carbone C-2 par différents groupes hydrocarbonés.
- Etude de l'influence de la stéréochimie des carbones C-3 et C-4. Le dérivé ayant un C4 de géométrie *R* (levcromackalim) est plus actif que le mélange racémique ou l'énantiomère *S* [Grover *et al.*, 1991].
- Modification du cycle substituant le carbone C-4. Par exemple, la fixation d'une cyanoguanidine en position 4 conduit à des agents cardioprotecteurs en modulant les canaux K_{ATP} des cellules cardiaques, le prototype de cette famille est le BMS-1804485 (**17**) [Grover *et al.*, 1995].
- Modification du groupement électroattracteur en position 6.
- Le cycle benzénique peut également être remplacé par une pyridine. Les résultats les plus intéressants seraient obtenus lorsque l'azote pyridinique se trouve en position 6.

- Le cycle pyrane lui-même peut être modifié. Il est possible de substituer l'atome d'oxygène par un atome de soufre [Smith, 1990], d'azote ou de carbone [Ashwood *et al.*, 1991].

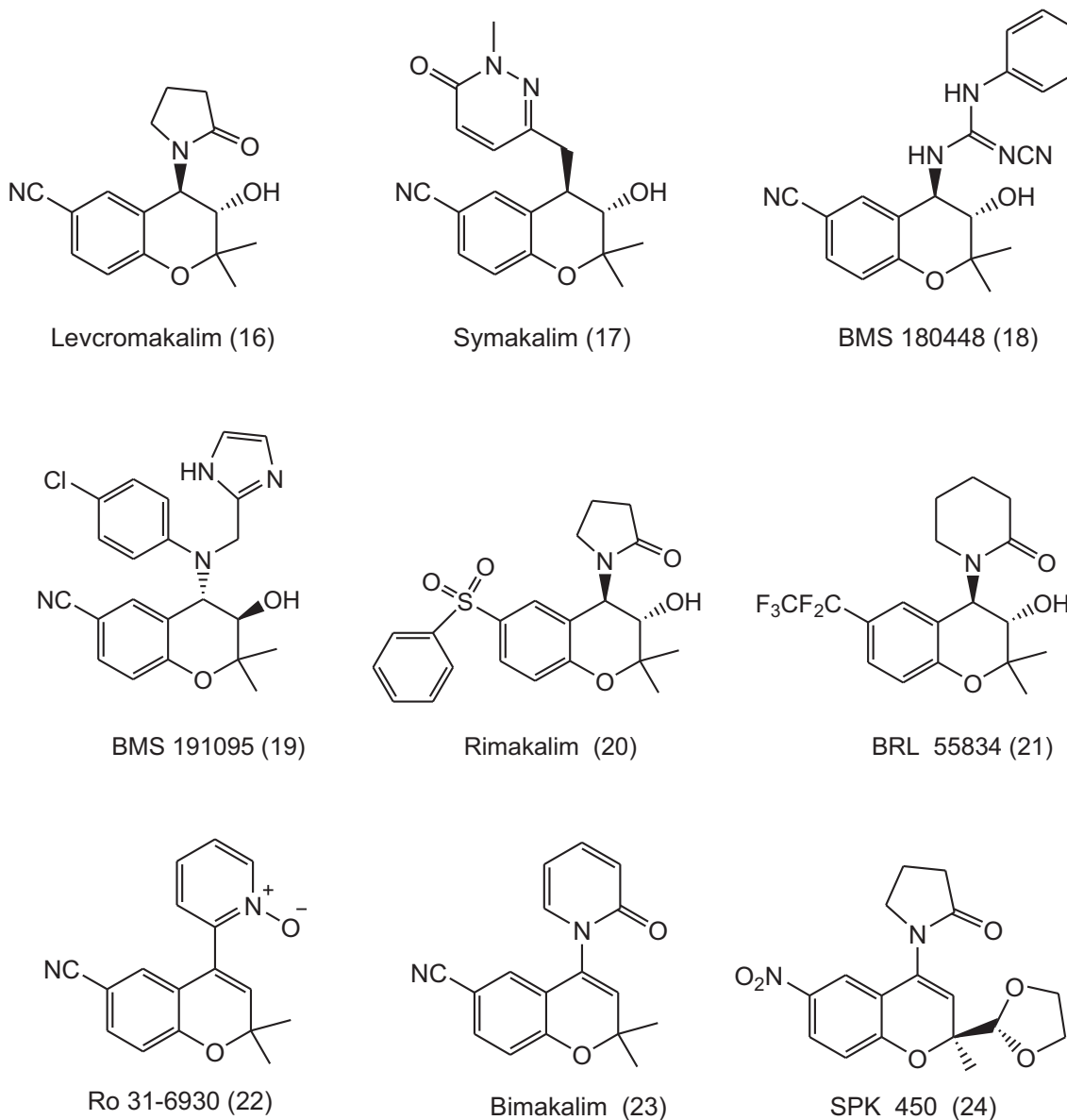


Figure 17 : Structures de quelques dérivés du cromakalim.

Des analogues portant un groupement arylsulfonylurée sur le carbone 4 (**25**), reliés structurellement au cromakalim et au BMS 1804485 ont exprimé un effet vasodilatateur modéré sur le muscle lisse vasculaire mais ne présentent aucun effet sur la sécrétion d'insuline. Par contre, leurs dérivés *N*-méthylés (**26**) se sont montrés plus actifs que leurs

molécules mères sur trois tissus différents à savoir, les muscles lisses vasculaires, le muscle utérin et les cellules β pancréatiques [Khelili *et al.*, 1999, 2006] (Figure18).

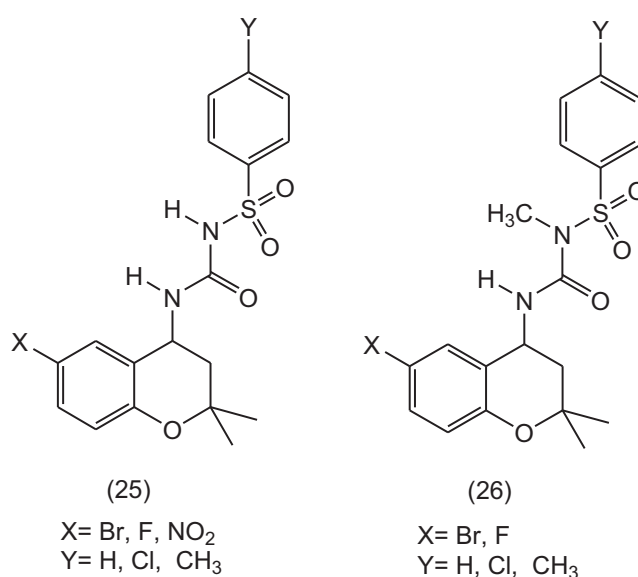


Figure 18 : Structure générale de benzopyranes portant un groupement arylsulfonylurée.

En plus de leur rôle dans la réduction de la pression sanguine par vasodilatation, les benzopyranes ont été étudiés en vue de les utiliser dans la thérapie de l'asthme. En effet certains benzopyranes comme le JTV 506 (**27**) (Figure 19) peuvent éviter l'hyperréactivité respiratoire provoquée expérimentalement à des faibles doses sans production d'effets secondaires cardiovasculaires comme le font ceux de la première génération (ex : levcromakalim). Une nouvelle génération de benzopyranes avec une sélectivité pour les voies respiratoires peut constituer une nouvelle classe de médicaments dans le traitement de l'asthme [Fozard *et Manley*, 2001].

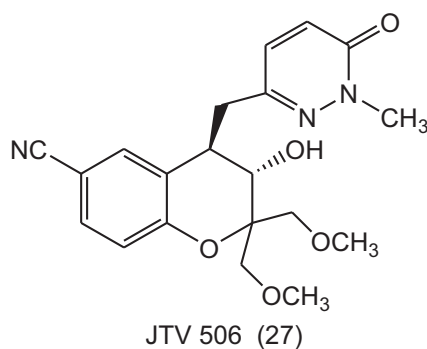


Figure 19 : Structure du JTV 506

Les travaux les plus récents visant à identifier de nouveaux PCOs sélectifs des cellules β pancréatiques ont permis la synthèse d'analogues du cromakalim (Figure 20). Certains se sont montrés plus actifs en tant qu'inhibiteurs de la sécrétion d'insuline et moins myorelâchants que les molécules de référence, le diazoxide et le cromakalim. Les molécules portant en C-4 un groupement de type phénylthiourée ou phénylurée substitué au niveau du cycle benzénique en *mé*ta ou en *para* par un groupement électro-attracteur tel qu'un groupement cyano- ou un atome de chlore se sont montrées très puissantes et sélectives des cellules β pancréatiques [Sebille, de Tullio *et al.*, 2008; Florence, Sebille *et al.*, 2009].

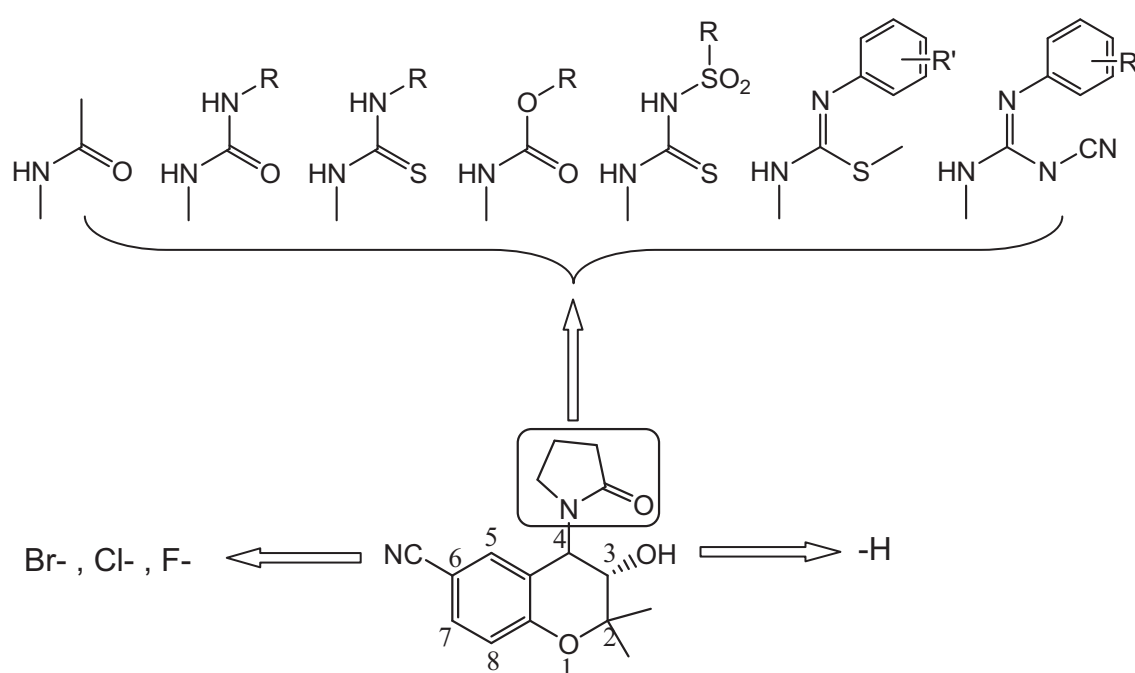


Figure 20 : Pharmacomodulations effectuées sur le noyau benzopyrane [Sebille 2005].

I.3.3.2.2. Les cyanoguanidines

Le prototype de ces ouvreurs, présentant des propriétés hypotensives, est le pinacidil (28, Figure 21) pour lequel l'activité réside dans le *R*-(-)-énantiomère. Ce composé, du fait de ses nombreux effets secondaires (tachycardie, palpitation,...) n'est utilisé en clinique qu'en association avec d'autres dérivés (β - bloquants ou diurétiques).

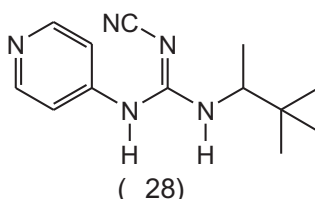


Figure 21 : Structure du pinacidil

Dans les cellules du muscle lisse, il a été montré qu'à des concentrations très basses, le pinacidil est capable d'activer les canaux K_{ATP} mais il reste moins actif que le cromakalim [Hamilton et Weston, 1989 ; Edwards et Weston, 1990]. A des concentrations plus au moins élevées, ce composé peut également activer les canaux K_{ATP} dans les cellules β pancréatiques [Lebrun *et al.*, 1988], et les cellules cardiaques [Fan *et al.*, 1990]. En plus du pinacidil, d'autres composés plus puissants ont été synthétisés, les principales pharmacomodulations apportées sur ce noyau sont les suivantes (Figure 22) :

- Remplacement du noyau pyridinique par un benzène porteur d'un groupement électroattracteur dans la même position de que l'azote (29) [Pirotte *et al.*, 1995].
- Modification de la position de l'azote aromatique par rapport à la fonction cyanoguanidine (30) [Edwards et Weston, 1990].
- Variation de la nature et de la longueur de la chaîne hydrocarbonée de la fonction cyanoguanidine (31) [Atwal *et al.*, 1992].

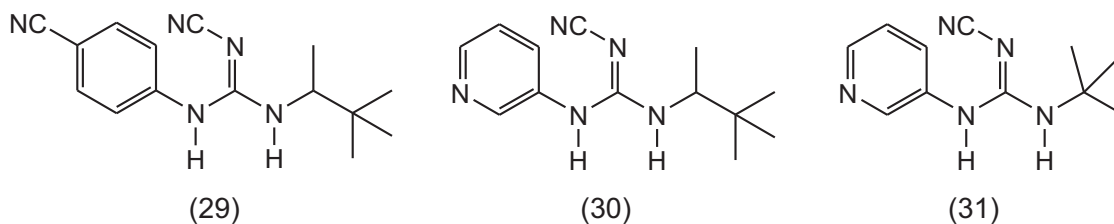


Figure 22 : Quelques exemples de dérivés du pinacidil.

I.3.3.2.3. Les Benzothiadiazines 1,1-dioxydes

Leur prototype est le diazoxide qui a une structure chimique semblable à celle des diurétiques thiazidiques avec des propriétés pharmacologiques différentes. Le diazoxide (HYPERSTAT[®]) a été longtemps et largement utilisé dans le traitement de l'urgence hypertensive. Son effet hypotensif apparaît rapidement après administration intraveineuse et peut persister de 4 à 12 heures. Par voie orale, le diazoxide (PROGLICEM[®], Gél 25 et 100 mg) est encore quelque fois prescrit dans le traitement de certaines hypoglycémies et les pathologies caractérisées par une hypersécrétion d'insuline (insulinome, nésioblastose du pancréas...). Son absorption après administration orale est bonne.

Ce produit diffère des autres KCOs par plusieurs aspects dont son site de fixation sur les protéines SUR, qui est localisé dans une région autre que celle des benzopyranes et des cyanoguanidines. C'est le seul activateur qui se lie avec la même affinité avec les SUR1 et les SUR2B en provoquant le relâchement des muscles lisses vasculaires, mais moins que le cromakalim, ce qui entraîne une hypotension, et exerçant un effet inhibiteur sur la sécrétion d'insuline, processus qui est attribué à l'ouverture des canaux K_{ATP} des cellules β -pancréatiques [Mannhold, 2004].

Les premières pharmacomodulations entreprises sur le diazoxide l'ont été avant la démonstration de son mécanisme d'action et avaient pour buts de chercher des effets potentiels aussi différents que l'activité antihypertensive [Raffa *et al.*, 1962 ; idem 1966 ; Monzani *et al.*, 1972 ; idem 1974 ; Topliss *et al.*, 1964].

En 1982, Henquin et Meissner ont conclu que l'inhibition de sécrétion de l'insuline par le diazoxide est due à une augmentation de la perméabilité aux ions K^+ par la membrane cellulaire. Quelques années après, d'autres travaux ont révélé que le diazoxide agit sur le même canal K_{ATP} qui est fermé par les sulfonyles [Trube *et al.*, 1986, Lebrun *et al.*, 1989].

Parmi les pharmacomodulations apportés sur le diazoxide comme activateur des canaux K_{ATP} nous pouvons citer (Figure 23) :

- Remplacement du noyau benzénique par un noyau pyridinique ;
- Variation de la ramification et de la longueur de la chaîne latérale 3-alkyle ;
- Alkylation des atomes d'azote en position 2 et 4 ;
- Saturation de la double liaison du cycle thiadiazidique ;
- Remplacement de l'atome d'azote en position 4 par un soufre.
- Remplacement du groupe sulfonyle par un carbonyle.

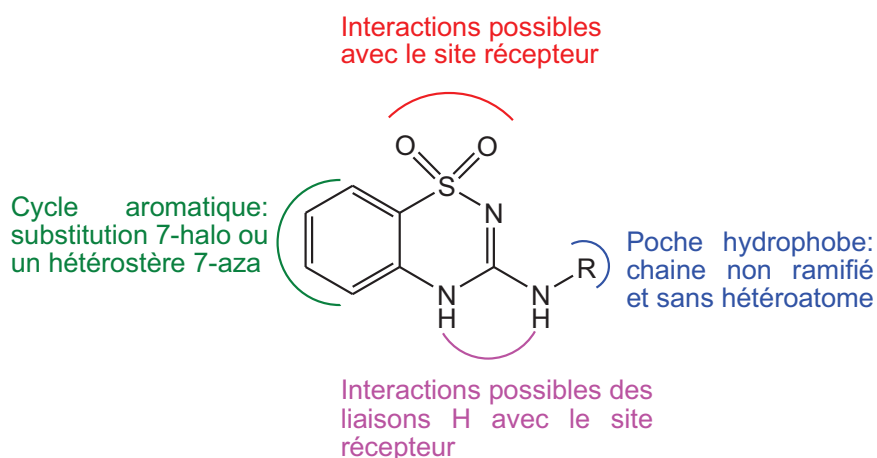


Figure 23 : Structure générale des dérivés arylthiadiazines [D'après Mannhold, 2004].

Des travaux, visant à découvrir de nouveaux agents pharmacologique, ont abouti à la synthèse de 3-alkylamino-4*H*-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxydes, tel que le BPZD 44 (**32**) et le BPZD 73 (**33**) (Figure 24) [Pirrotte *et al.*, 1993 ; de Tullio *et al.*, 1996 ; Khelili *et al.*, 1999 ; Pirrotte *et al.*, 2000].

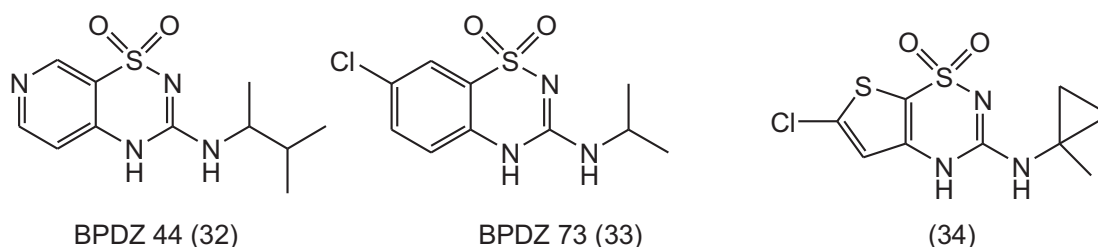


Figure 24 : Arylthiadiazines puissantes et sélectifs des canaux K_{ATP} pancréatiques.

Ces nouvelles structures résultent en fait d'une association d'éléments structuraux appartenant à la fois au diazoxide et au pinacidil. On retrouve dans ce type de dérivés, un noyau arylthiadiazine dioxyde comme dans le diazoxide et un groupement arylalkylguanidine semblable à celui du pinacidil. A l'opposé du diazoxide qui ne montrait pas de sélectivité tissulaire, et du pinacidil qui a une forte affinité pour les muscles lisses, des pyridothiadiazines tels que le BPDZ 44 (**32**) ont montré une très nette sélectivité pour les cellules β pancréatiques (Figure 24).

Des analogues plus puissants et sélectifs des cellules β pancréatiques ont été conçus et synthétisés en remplaçant le noyau pyridinique par un noyau thiophène [Nielsen *et al.*, 2002] (Figure 24). Le NN414 (**34**) est au moins 1000 fois plus puissant que le diazoxide dans l'inhibition de la libération d'insuline [Nielsen *et al.*, 2002], il a été développé pour traiter le diabète de type II jusqu'en phase II clinique où il a dû être abandonné pour des raisons d'hépto-toxicité.

La variation de la position de l'atome d'azote du noyau pyridinique des pyridothiadiazines a donné des composés avec une sélectivité tissulaire opposée : par exemple BPDZ-79 (**35**) et BPDZ-83 (**36**) sont plus sélectifs des cellules musculaires lisses vasculaires versus les cellules β du pancréas [Pirotte *et al.*, 2000] (Figure 25). Le BPDZ-79 (**35**) diffère structurellement de BPDZ-44 (**32**) par la position de l'atome d'azote du noyau pyridinique, illustrant comment de simples variations structurales peuvent affecter la sélectivité tissulaire.

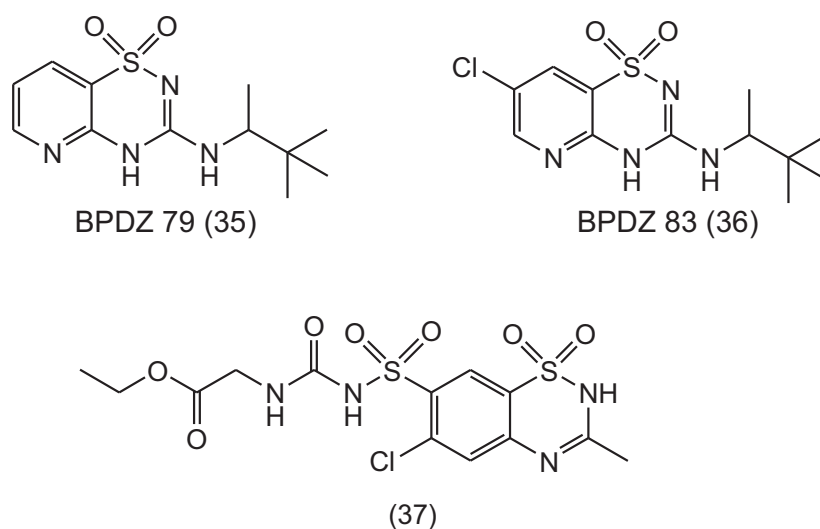


Figure 25 : Quelques arylthiadiazines présentant des propriétés vasodilatatrices.

Des composés hybrides associant le noyau benzothiadiazine (pharmacophore « activateur du canal potassique ») avec un groupe benzènesulfonylurée (pharmacophore « bloqueur du canal potassique ») (composé **(37)**, Figure 25), ont été conçus et synthétisés par Khelili *et al.* Le composé **(37)** présente des propriétés vasodilatatrices intéressantes de l'aorte de rat mais est dénué d'effet sur le pancréas [Khelili *et al.*, 1995 ; Faury *et al.*, 2003].

I.4. Rôle des activateurs de canaux K_{ATP} sur la synthèse d'élastine

Les vaisseaux permettent au système vasculaire d'être plus qu'une simple voie de circulation du sang dans l'organisme. Les fibres élastiques présentes dans la paroi de ces vaisseaux rendent ceux-ci élastiques et permettent le lissage de la pression et du flux sanguins très discontinus délivrés par le cœur. Cette fonction est impérative pour permettre une hémodynamique correcte.

Les fibres élastiques sont constituées d'élastine et de microfibrilles riches en fibrillines qui procurent aux artères leurs propriétés élastiques et qui sont aussi des signaux pouvant se fixer à des récepteurs membranaires relativement spécifiques. Cette double fonction mécanique et de signalisation met les fibres élastiques à la croisée des processus de développement et de vieillissement prenant place dans les vaisseaux sanguins.

Une altération de la fonction des gènes de l'élastine ou des fibrillines conduit à des pathologies génétiques lourdes affectant le système cardiovasculaire, comme la sténose aortique supra-avalvulaire, ou le syndrome de Williams-Beuren, dans lesquels le déficit de production d'élastine induit des sténoses aortiques, ou le syndrome de Marfan, au cours duquel le déficit de production de fibrilline-1 provoque au contraire l'apparition d'anévrismes aortiques. Des modèles de souris génétiquement modifiées de ces maladies ont permis de mieux comprendre la pathogenèse de ces syndromes. En particulier, il a été montré que les rôles fonctionnels et morphogénétiques de l'élastine et de la fibrilline-1 peuvent s'additionner et donc être complémentaires par certains aspects, alors qu'ils peuvent s'opposer dans d'autres situations. Aussi, il est maintenant avéré que des modifications précoces de la disponibilité en élastine ou fibrilline-1 peuvent altérer la fonction de signalisation normale de ces protéines et conduire à long terme à des modifications de la physiologie vasculaire et des processus de vieillissement [Fhayli *et al.*, 2012].

I.4.1. Structure des artères

Les grandes artères élastiques possèdent trois couches ou tuniques concentriques, de l'intérieur vers l'extérieur du vaisseau : l'intima, le média et l'adventice (Figure 26).

1. **L'intima** est formée successivement d'une monocouche de cellules endothéliales, d'une fine couche de tissu conjonctif appelée lame basale, de la couche sous-endothéliale et de la limitante élastique interne.

Cette dernière est une lame élastique qui sépare l'intima de la tunique sous-jacente, la média [Pezet *et al.*, 2008].

2. **La média** se compose d'une succession d'unités lamellaires concentriques et est considérée comme l'unité structurale et fonctionnelle de la paroi vasculaire. Cette architecture multilamellaire n'existe que dans les artères élastiques. Chaque unité lamellaire est constituée d'une couche de cellules musculaires lisses vasculaire et d'une lame élastique adjacente. Les lames élastiques sont constituées des fibres élastiques (microfibrilles 10% et élastine 90%) qui procurent aux tissus extensibles (essentiellement la peau, les poumons et les artères) leur propriété d'élasticité. Des fibres de collagène et des microfibrilles dispersées entre les cellules musculaires lisses sont aussi présentes [Pezet *et al.*, 2008 ; Uitto, 1979].

3. **L'adventice** est séparé de la média par la limitante élastique externe (la lame élastique de la paroi la plus externe). Elle se compose d'une matrice extracellulaire (MEC) riche en collagène produite par une population hétérogène de fibroblastes. Elle contient aussi quelques fibres élastiques épaisses. L'adventice des grosses artères contient un système capillaire, dit « vasa vasorum », qui apporte les nutriments et l'oxygène aux cellules les plus éloignées de la lumière vasculaire [Bonnet, 2010 ; Michel *et al.*, 2007 ; Tedgui et Lévy, 1997].

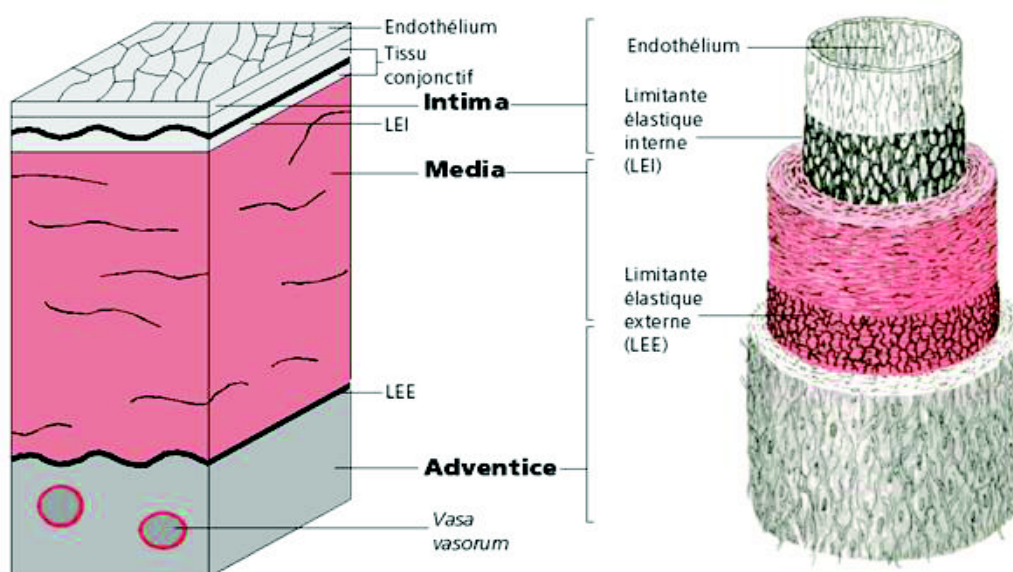


Figure 26 : Structure de la paroi artérielle [Kahle *et al.*, 1990].

I.4.1. Composition de la paroi artérielle

La paroi vasculaire contient trois types principaux de cellules : les cellules endothéliales (CE), les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) et les fibroblastes, en plus d'une matrice extracellulaire (MEC).

I.4.1.1. Les cellules endothéliales

Les CE, constitutives de l'endothélium, forment une monocouche cellulaire semi-perméable qui tapisse la totalité du système circulatoire (environ 1×10^{13} cellules) et qui assure l'échange moléculaire entre le sang et les tissus. Elles constituent presque 1,5% de la masse totale du corps (environ 1 kg) et sont orientées/polarisées dans la direction du débit sanguin [Sumpio *et al.*, 2002 ; Girard et Springer, 1995]. *In vivo* les CE adhèrent à la surface du vaisseau par l'intermédiaire de récepteurs d'adhésion, les intégrines. Celles-ci assurent aussi une partie de la signalisation entre les CE et la MEC [Carleson *et al.*, 2008 ; Fitridge et Thompson, 2007]. Pendant longtemps, l'endothélium vasculaire a été considéré comme étant simplement une barrière entre le sang et les tissus. Depuis, de nombreuses études ont montré qu'un endothélium sain est capable de répondre à des stimuli mécaniques (force de cisaillement) et chimiques (hormones, prostaglandines,...) [Rennier et Ji, 2013 ; Triggle *et al.*, 2012 ; Deanfield *et al.*, 2007 ; Vanhoutte et Rimele, 1982].

L'endothélium module la vasomotricité et le débit de perfusion en synthétisant et en libérant des facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs qui diffusent vers les CMLV sous-jacentes. Dans les conditions physiologiques, c'est l'équilibre entre les effets des substances endothéliales vasodilatatrices et vasoconstrictrices qui maintient l'état contractile basal des CMLV [Triggle *et al.*, 2012].

I.4.1.2. Les cellules musculaires lisses vasculaires

Les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) sont embryologiquement issues du mésoderme. Elles sont généralement fusiformes et uninuclées (contrairement aux cellules musculaires squelettiques qui sont plurinuclées) et ont un diamètre de 2 à 5 μm pour une longueur qui varie de 20-60 μm . Elles sont arrangées de façon concentrique sous forme de feuillets séparées par des lames élastiques et des fibres de collagènes [Matsumoto et Nagayama, 2012].

L'état « contractile » est caractérisé par la présence des myofilaments contractiles (actine et myosine) dans les CMLVs, procurant aux vaisseaux sanguins leur motricité, avec une capacité réduite de synthétiser les protéines et un taux de prolifération faible [Matsumoto et Nagayama, 2012 ; Gomez et Owens, 2012 ; Van Eys *et al.*, 2007 ; Rudijanto, 2007].

Les CMLVs sont les principaux éléments contractiles des parois des vaisseaux sanguins. Cet effet contractile est lié directement à l'augmentation de la concentration intracellulaire du calcium ($[Ca^{2+}]_i$) de ces cellules. Celle-ci peut être initiée suite à une stimulation électrique (potentiel membranaire) ou chimique (angiotensine II, noradrénaline,...). La relaxation de la CMLV résulte de la diminution de la concentration de $[Ca^{2+}]_i$, soit par l'expulsion du calcium à l'extérieur de la cellule, soit par son recaptage dans le réticulum sarcoplasmique. Grâce à leur contraction ou leur relaxation, les CMLVs jouent un rôle majeur dans la régulation du débit sanguin local et de la pression artérielle moyenne [Wynne *et al.*, 2009 ; Collin et Levy, 2008 ; Rudijanto, 2007].

I.4.1.3. Les fibroblastes

Le fibroblaste est le type cellulaire le plus abondant dans l'adventice vasculaire. Les fibroblastes jouent un rôle central dans le contrôle de la fonction vasculaire. Ils stimulent la production, l'organisation et la dégradation des éléments de la MEC. Les fibroblastes sécrètent également un mélange complexe de facteurs de croissance, des cytokines et des chimiokines. En outre, les fibroblastes communiquent avec les cellules neuronales qui possèdent leurs terminaisons dans l'adventice, les cellules d'origine hématopoïétiques (cellules dendritiques, les macrophages, les lymphocytes T), les CMLV et les CE [Stenmark *et al.*, 2012 ; Sorrell et Caplan, 2009]. L'action des fibroblastes favorise aussi la réparation vasculaire. En réponse à une blessure, les fibroblastes se transforment en myofibroblastes, ce qui leur permet d'accroître leurs capacités contractiles, par l'expression d' α -actine, et la production des protéines de la matrice extracellulaire telle que les collagènes [Martinez-Lemus, 2012 ; Forte *et al.*, 2010].

I.4.1.4. La matrice extracellulaire vasculaire

Les matériaux extracellulaires sont des constituants majeurs de la paroi vasculaire, désignés sous le nom de stroma ou matrice extracellulaire (MEC). Dans les artères élastiques, la MEC constitue plus de la moitié du poids total du vaisseau.

Elle est formée essentiellement par l'élastine et les collagènes. D'autres composants comme la fibronectine, les microfibrilles, les protéoglycanes et les glycoprotéines sont aussi présents. La MEC confère aux parois vasculaires une structure de soutien indispensable à leur intégrité et à leurs propriétés fonctionnelles, notamment l'élasticité apportée par les fibres élastiques et la rigidité apportée par les collagènes. Elle est aussi impliquée dans la régulation de processus de signalisation cellulaire et dans les contacts entre cellules (molécules d'adhérence et systèmes de jonction cellule-cellule). Ces macromolécules extracellulaires sont synthétisées par les trois types des cellules vasculaires (CE, CMLV, fibroblastes) au cours du développement et de la croissance. À l'âge adulte, la synthèse et le renouvellement de certaines macromolécules (élastine, collagène,...) de la MEC est plus lente, voire inexistante, alors que la synthèse d'autres macromolécules de cette matrice augmente (fibronectine, laminine) [Briones *et al.*, 2010 ; Jacob, 2006 ; Varani *et al.*, 2006 ; Kelleher *et al.*, 2004].

I.4.2. L'élastine

L'élastine est un polymère totalement insoluble, hydrophobe et durable, avec une demi-vie estimée à environ 74 ans [Petersen *et al.*, 2002]. L'élastine est le constituant majeur (90%) des fibres élastiques. Son rôle principal est de procurer les propriétés élastiques et la résilience essentielle pour le bon fonctionnement des tissus qui sont soumis à des étirements répétitifs et/ou des stress, notamment l'**aorte**, les **poumons** et la **peau** (Figure 27) [Kielty *et al.*, 2006, 2002a,b ; Rosenbloom *et al.*, 1993]. L'élastine constitue, en poids sec, 30 à 57% de l'aorte, 50% des ligaments élastiques, 3-7% du poumon, 4% de tendons et 2-5% de la peau [Vrhovski et Weiss, 1998]. L'élastine est apparue assez tardivement au cours de l'évolution. Absente chez les invertébrés, elle est présente chez tous les vertébrés, à l'exception des cyclostomes primitifs, vertébrés aquatiques, tels que la lamproie et la myxine [Faury, 2001]. L'élastine est synthétisée sous forme d'un précurseur, la tropoélastine (TE) d'environ 70 kDa, qui va s'assembler pour donner naissance au biopolymère extrêmement insoluble et durable qu'est l'élastine. [Mithieux et Weiss, 2005 ; Tamburro *et al.*, 2005].

Les domaines hydrophiles de la TE sont riches en alanine et en lysine et sont considérés comme des cibles pour la liaison avec les composantes des microfibrilles et les enzymes de réticulation (LOX et LOXL) au cours de l'élastogénèse.

A l'inverse, les domaines hydrophobes sont riches en glycine, valine et proline, sont présents en motif répétitifs et sont à l'origine des propriétés élastiques de l'élastine [Kielty *et al.*, 2002c ; Csiszar, 2001 ; Bellingham *et al.*, 2001 ; Debelle et Tamburro, 1999 ; Vrhovski et Weiss, 1998 ; Rosenbloom *et al.*, 1993].

Trois maladies humaines sont liées à des mutations ou délétions dans le gène de la TE:

- Le syndrome de Williams-Beuren (SWB), caractérisée par des anomalies endocrines (hypercalcémie, métabolisme anormal du glucose), neurologiques, musculo-squelettiques, un retard mental et des anomalies cardiovasculaires.
- la sténose aortique supra-valvulaire (SASV), qui est un rétrécissement de l'aorte au dessus des valves aortiques.
- le cutis laxa, caractérisée par une laxité et inélasticité de la peau [Bayés *et al.*, 2003 ; Tassabehji *et al.*, 1998 ; Olson *et al.*, 1995].

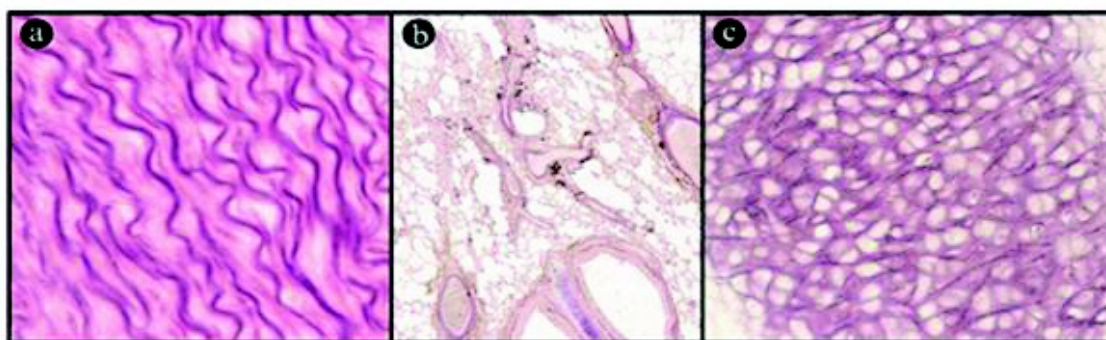


Figure 27 : Structure de l'élastine.

a) aorte, b) poumon, c) cartilage de l'oreille [Kielty, 2006].

I.4.2.1. Rôles biologiques de l'élastine et des peptides d'élastine

Au cours du vieillissement ou dans certaines situations pathologiques, les fibres élastiques sont clivées par des protéases, ce qui libère des peptides d'élastine. L'élastine et les peptides d'élastine ont diverses activités biologiques [Duca *et al.*, 2004 ; Fulop *et al.*, 2001, 1981 ; Faury, 1998]. Outre leur fonction d'élasticité, l'élastine joue un rôle dans la morphogenèse des artères en contrôlant la prolifération des CMLV. En effet, les souris génétiquement invalidées pour le gène d'élastine meurent d'occlusion des artères deux jours après la naissance [Li *et al.*, 1998].

Les peptides d'élastine déclenchent une cascade d'effets biologiques sur plusieurs types cellulaires (CMLV, CE, fibroblastes, leucocytes, monocytes...) après fixation sur un récepteur de haute affinité [Duca *et al.*, 2004 ; Mochizuki *et al.*, 2002 ; Faury, 1998 ; Tajima *et al.*, 1997 ; Wachi *et al.*, 1995 ; Senior *et al.*, 1984] :

- Ils modulent le chimiotactisme des monocytes, des fibroblastes et des CE [Indik *et al.*, 1990 ; Long *et al.*, 1989 ; Senior *et al.*, 1984] ;
- Ils favorisent la formation de fibres d'actine [Patel *et al.*, 2006] ;
- Ils régulent la prolifération et la migration des CMLV [Spofford et Chilian, 2001 ; Wachi *et al.*, 1995 ; Ooyama *et al.*, 1987];
- Ils induisent l'augmentation de la concentration de calcium dans les CE et les leucocytes. L'augmentation du calcium intracellulaire active la production de monoxyde d'azote (NO), qui diffuse vers les CMLV et provoque ainsi une vasorelaxation dépendante de l'âge [Faury *et al.*, 1994, 1995, 1997, 1998a,b ; Varga *et al.*, 1989].

I.4.2.1. Effet des activateurs de canaux K_{ATP} sur la synthèse d'élastine

Comme nous l'avons déjà cité au début du chapitre, les canaux K_{ATP} , inhibés par l'ATP intracellulaire et activé par l'ADP, constituent des cibles pour les médicaments qui agissent soit comme des ouvreurs (minoxidil, nicorandil, diazoxide,...) soit comme des bloqueurs (glibenclamide) de ces canaux. Les ouvreurs des canaux potassiques (PCOs) entraînent l'hyperpolarisation des CMLV, Ce qui induit la fermeture des canaux calciques voltage-dépendants et donc une réduction du taux de calcium intracellulaire et par la suite une vasodilatation [Standen, 2003 ; Nelson et Brayden, 1993].

Outre leur fonction vasodilatatrice, les activateurs des canaux potassiques ont fait l'objet de plusieurs études concernant la synthèse d'élastine. Il a été montré que le traitement chronique de 2 mois sur des rats de différents âges (2, 12 et 24 mois) par le nicorandil (**14**) à faible dose (0.1 mg/kg/jour) provoque une augmentation de la proportion d'élastine et du nombre des lames élastiques de l'aorte [Raveaud *et al.*, 2009]. De son côté, le minoxidil (**12**) révèle un effet positif sur l'expression de l'élastine *in vivo* [Tsoporis *et al.*, 1998] et *in vitro* [Tajima *et al.*, 1995 ; Hayashi *et al.*, 1994].

Hayashi *et al.* (1994) ont montré que le traitement *in vitro* des CMLVs par le minoxidil augmente l'expression d'élastine d'une façon dose-dépendante et temps-dépendante. L'expression est maximale avec une dose de 1 mM pour 48 h de traitement. Chez le rat spontanément hypertendu, le traitement chronique par le minoxidil (120 mg/l dans l'eau de boisson pendant 10 semaines) augmente le contenu en élastine dans l'aorte abdominale, l'artère mésentérique et les artères rénales. Cette augmentation pourrait être due à la diminution significative de l'activité des élastases tissulaires provoquée par le minoxidil [Tsoporis *et al.*, 1998].

Chapitre II

But du travail

Comme nous venons de le voir dans le chapitre précédent, les canaux sensibles à l'ATP jouent un rôle essentiel dans plusieurs processus physiologiques dont la modulation pourrait ouvrir une voie à des applications pharmacologiques et médicales très intéressantes.

L'intérêt croissant porté ces dernières années à l'étude et au développement de modulateurs des canaux K_{ATP} , plus spécifiquement d'activateurs de ces canaux (PCOs), est une preuve supplémentaire de l'importance prise par ces entités transmembranaires en pharmacologie et en thérapeutique. Les indications, avérées ou potentielles, des activateurs sont nombreuses. Nous pouvons entre autres signaler le traitement de l'hypertension artérielle, la cardioprotection, le traitement de l'incontinence urinaire et de l'asthme.

Les activateurs des canaux K_{ATP} constituent une famille de composés chimiquement divers qui appartiennent à de nombreuses classes structurales, que nous avons déjà cités dans le chapitre précédent.

Le cromakalim, le prototype des benzopyranes, présente un effet vasodilatateur puissant des muscles vasculaires lisses, mais une faible inhibition de la sécrétion d'insuline, contrairement au diazoxide, une benzothiadiazine, qui est actif sur les cellules sécrétrices d'insuline (inhibiteur) et les cellules musculaires lisses vasculaires (vasodilatateur).

L'optimisation de l'hétérocycle diazoxide a fourni des composés comme le BPDZ 44 et le BPDZ 73, qui ont montré une très nette sélectivité pour les cellules β -pancréatique, [de Tullio *et al.*, 2003] au contraire du diazoxide qui n'a montré qu'une très faible sélectivité tissulaire.

Parmi les diverses pharmacomodulations menées autour du diazoxide comme activateur des canaux K_{ATP} nous pouvons citer :

- Remplacement du noyau benzénique par un noyau pyridinique ou un thiophène conduisant à des pyridothiadiazines [Pirrotte *et al.*, 1993] ou des thiénothiadiazines [Nielsen *et al.*, 2002] ;
- Remplacement de la chaîne alkyle en position 3 par une chaîne alkylaminée comme le BPDZ 73 ;
- Remplacement du groupe sulfonyle (SO_2) par son isostère, le groupe carbonyle ($C=O$), conduisant à des quinazolinones [Mogensen *et al.*, 2002] ;
- Introduction de fonction sulfonylurée en différentes positions [Khelili *et al.*, 1995, 2003] ;

Jusqu'à présent, la modification de la structure du noyau benzothiadiazine par ouverture de cycle n'a jamais été tentée pour aboutir à une nouvelle classe d'activateurs des canaux K_{ATP} (PCOs).

Dans cette optique, ce travail tente de développer de nouveaux PCOs simplifiés avec des propriétés pharmacologiques améliorées. Pour cela, nous avons entrepris la synthèse de certains composés résultant à la fois de l'ouverture du cycle 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxyde et l'introduction de fragments urée ou thiourée.

Nous avons tout d'abord synthétisé des analogues ouverts du cycle thiadiazinique en gardant le même squelette de ce dernier, avec fixation d'un groupe (thio)urée (Série I) (figure 28). Par la suite, le NH a été remplacé par un atome d'oxygène, tandis que le groupe SO_2 a été remplacé par son isostère non classique $C=O$. Ces modifications structurales ont conduit à trois nouvelles séries d'analogues à cycle ouvert de diazoxide et des 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazines 1,1-dioxydes (séries I, II et III), comme c'est illustré dans la figure 28.

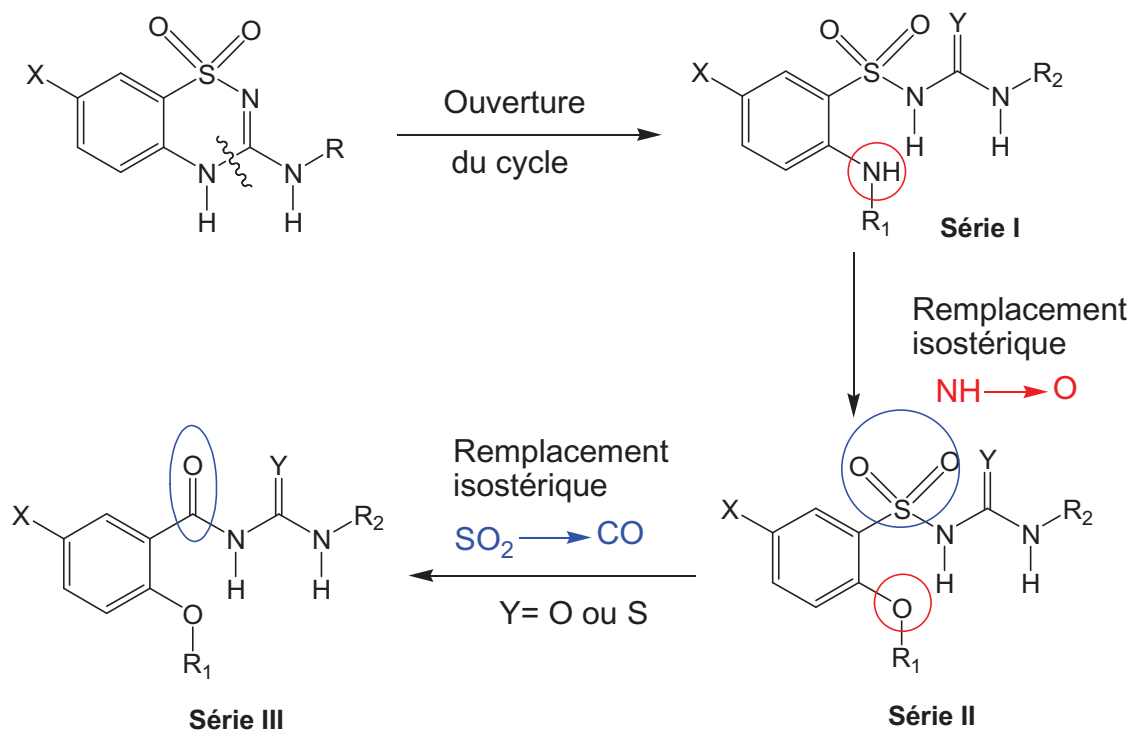


Figure 28 : Simplification des 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides conduisant à de nouvelles séries de composés (**I**, **II** et **III**).

Cette stratégie a été inspirée à partir des travaux antérieurs consistant en l'ouverture du cycle pyrane de cromakalim, un dihydrobenzopyrane, et l'introduction d'un groupe urée et de groupes sulfonyle, qui a fourni de nouvelles molécules plus simples avec un effet vasodilatateur substantiel [Khelili *et al.*, 2008] (Figure 29).

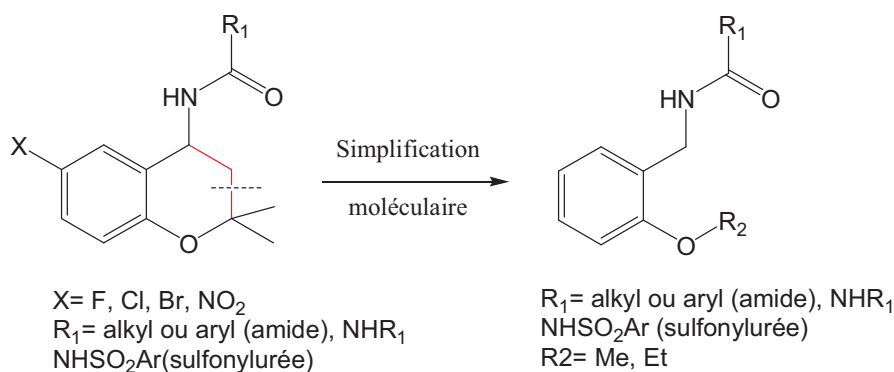


Figure 29: Simplification moléculaire des dihydrobenzopyranes [Khelili *et al.*, 2008].

Les nouveaux composés conçus ont été étudiés en tant qu'activateurs potentiels du canal K_{ATP} en évaluant leur activité vasodilatatrice sur le tissu musculaire lisse vasculaire de rat (anneaux aortiques). Nous avons également examiné certaines de nos molécules les plus prometteuses sur le tissu pancréatique de rat comme inhibiteurs putatifs de la sécrétion de l'insuline, et sur les cellules musculaires lisses vasculaires comme stimulateurs potentiels de la production de l'élastine.

Rappelons que l'élastine est la principale protéine de la matrice extracellulaire composant les fibres élastiques, qui confère de l'élasticité aux tissus extensibles (comme la peau, les poumons et les artères). Le gène de l'élastine n'est exprimé qu'au cours de la vie fœtale et l'enfance, donc l'élastine n'est pas renouvelée régulièrement au cours de l'âge adulte et au cours du vieillissement, conduisant à un raidissement progressif des artères et à un dysfonctionnement cardio-vasculaire ultérieur.

Dans le vieillissement normal et les syndromes liés à un déficit génétique de l'élastine, les patients peuvent bénéficier d'une régulation à la hausse du gène de la protéine, ce qui augmenterait le déficit de la teneur en élastine des artères et améliore la fonction artérielle.

Il a été démontré que le minoxidil, un activateur de canaux K_{ATP} , augmente l'expression du gène de l'élastine, *in vitro*, dans des fibroblastes de la peau et des cellules musculaires lisses vasculaires [Hayashi *et al.*, 1994 ; Tajima *et al.*, 1995] et *in vivo* chez le rat, ce qui conduit à une augmentation de la teneur artérielle en élastine [Tsoporis *et al.*, 1998]. Plus récemment, il a été démontré que le minoxidil, le diazoxide, et le pinacidil (PCOs) augmentent les ARNm codant pour les protéines et les enzymes impliquées dans la formation de fibres élastiques, tandis que le glibenclamide a eu un effet contraire [Slove *et al.*, 2013].

Pour ces raisons, il nous paraît judicieux d'investiguer l'effet stimulateur potentiel sur la synthèse d'élastine dans les cellules musculaires lisses vasculaires par application de nos molécules nouvellement synthétisées et qui ont montré une certaine activité sur les canaux K_{ATP} du muscle lisse vasculaire.

Chapitre III

Stratégie de synthèse

Rappelons que l'objectif de ce travail est d'élaborer des analogues simplifiés des 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides résultant de l'ouverture du cycle thiadiazinique et la substitution de quelques groupements par leurs bioisostères.

Au cours de ce chapitre, nous allons décrire les différentes méthodes de synthèse que nous avons appliquées pour préparer nos molécules cibles.

III.1. Synthèse des composés de la série I

Les molécules de la première série résultent de l'ouverture directe des 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides au niveau de la liaison C-N du cycle thiadiazine (Figure 30).

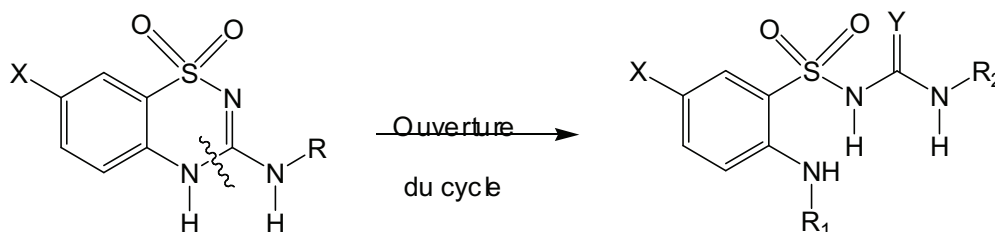
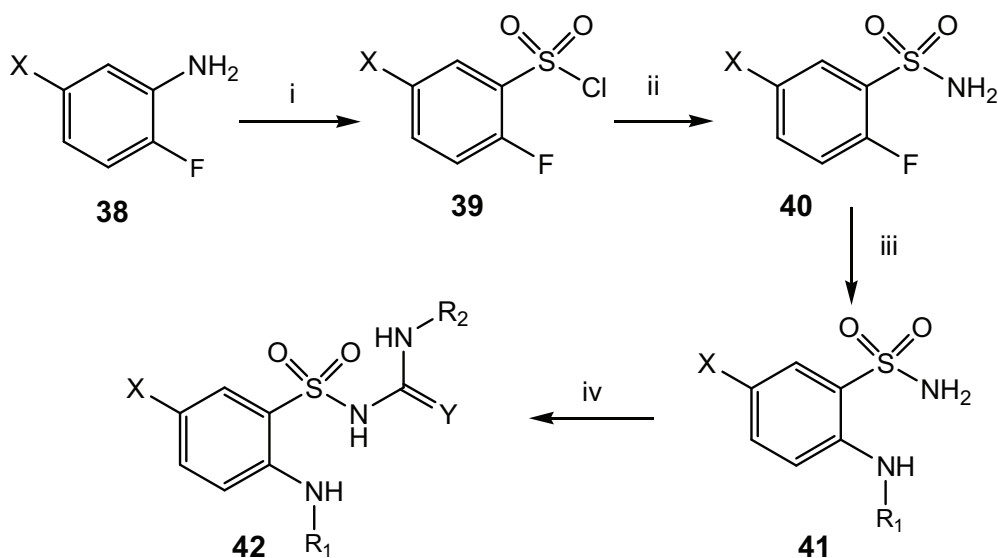


Figure 30 : pharmacomodulations effectuées pour obtenir les molécules de la série I.

La voie de synthèse des molécules de cette série est présentée dans la figure 31 :



Réactifs : i : a) NaNO₂, HCl ; b) SO₂, acide acétique, CuCl₂ ; ii : NH₄OH, dioxane ;
iii : R₁NH₂, dioxane ; iv : NaOH, R₂NCO ou R₂NCS, acétone.

Figure 31 : voie de synthèse des molécules de la série I.

La 2-fluoro-5-halogénoaniline (**38**) est diazotée selon le mécanisme représenté dans la figure 32.

Dans un milieu acide contenant des ions nitrite (NO₂⁻), les amines primaires ont la capacité d'être diazotées par l'ion nitronium, qui est spontanément formé dans le milieu acide. Pratiquement, les amines primaires aliphatiques donnent de très réactifs et inutiles carbocations (sauf pour un usage très spécifique). Dans des conditions similaires, les amines aliphatiques secondaires donnent des nitrosamines et les amines tertiaires ne réagissent pas.

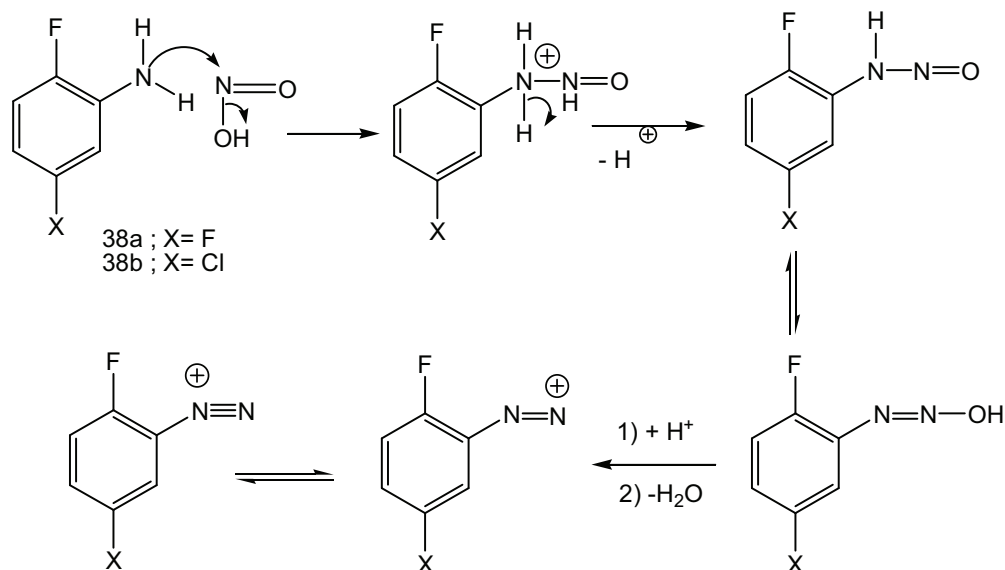


Figure 32 : Mécanisme de diazotation des 2-fluoro-5-halogénoanilines 38(a,b).

En ce qui concerne les amines aromatiques primaires (anilines), le sel de diazonium peut être stabilisé en raison de phénomène de résonance des électrons π du cycle aromatique (Figure 33). Ces sels doivent être formés et manipulés à une température inférieure à 5°C, car ils réagissent violemment à des températures plus élevées pour former des phénols, avec le risque d'explosion.

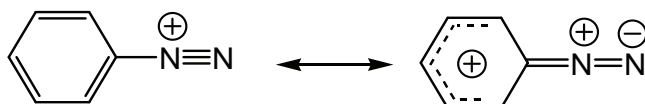


Figure 33: Stabilisation de l'ion diazonium par les électrons π aromatiques.

Les Sels de diazonium subissent plusieurs substitutions avec libération d'azote moléculaire. En effet, l'azote est un bon groupe partant, en raison de la stabilité de la molécule résultante. La réaction spécifique utilisée pour notre synthèse est une variante de la réaction Sandmeyer, décrit par Meerwein *et al.* en 1957 (Figure 34) [Meerwein, Dittmar *et al.* 1957].

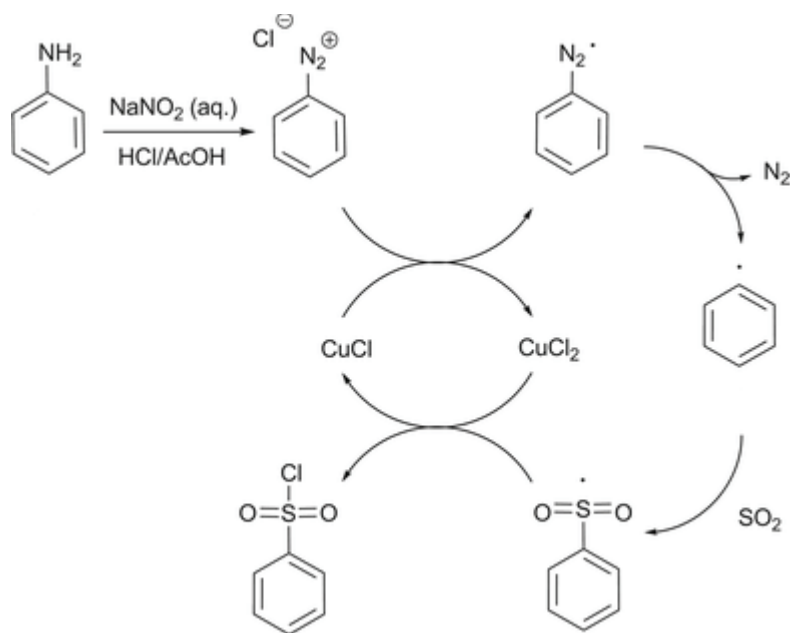


Figure 34: Synthèse du chlorure de sulfonyle proposée par Meerwein *et al.*

Dans une réaction typique de Sandmeyer, le sel de diazonium se décompose en présence des halogénures de cuivre (I) (tels que le chlorure de cuivre (I)) pour former l'halogénure d'aryle souhaité. La réaction implique un mécanisme radicalaire catalysé par le cuivre (I). Meerwein, quand il a fait barboter l'anhydride sulfureux dans un mélange de chlorure de sel de diazonium / cuivre, a obtenu un chlorure de sulfonyle à la place de l'halogénure d'aryle attendu (Figure 34). Cette réaction conduisant au chlorure de sulfonyle est facilement réalisée, mais est encore mal étudiée et son mécanisme exact reste inconnu.

Ainsi, nous avons utilisé la synthèse de Meerwein pour synthétiser les chlorures de sulfonyle désirés après diazotation. Les composés résultants sont ensuite versés dans une solution ammoniacale, donnant ainsi les sulfonamides désirés (Figure 31).

Pratiquement, **38** (a, b) a été mis en suspension dans un mélange acide chlorhydrique-acide acétique. La solution formée doit être maintenue à une température inférieure à 5°C avant d'ajouter le nitrite de sodium, afin d'éviter une réaction violente de sels de diazonium formés. Ces derniers réagissent violemment à des températures plus élevées. Le mélange contenant le sel de diazonium a été ajouté à une solution d'acide acétique saturé par l'anhydride sulfureux en présence de Cu_2Cl_2 . A la fin de la réaction, le chlorure de sulfonyle formé est séparé et versé dans une solution d'ammoniaque refroidie pour former les sulfonamides désirées.

Les 2-alkylamino 5-halogénobenzènesulfonamides **41** ont été obtenus par substitution nucléophile de l'atome de fluorure en ortho par rapport au groupe sulfonamide des composés **40** (a,b) par une amine appropriée.

En effet, plusieurs types de substitutions nucléophiles peuvent être rencontrés. La substitution nucléophile monomoléculaire ou $\text{S}_{\text{N}}1$ qui suit un mécanisme en deux étapes et la substitution nucléophile bimoléculaire ou $\text{S}_{\text{N}}2$, une réaction en une seule étape sans espèces intermédiaires (Figure 35).

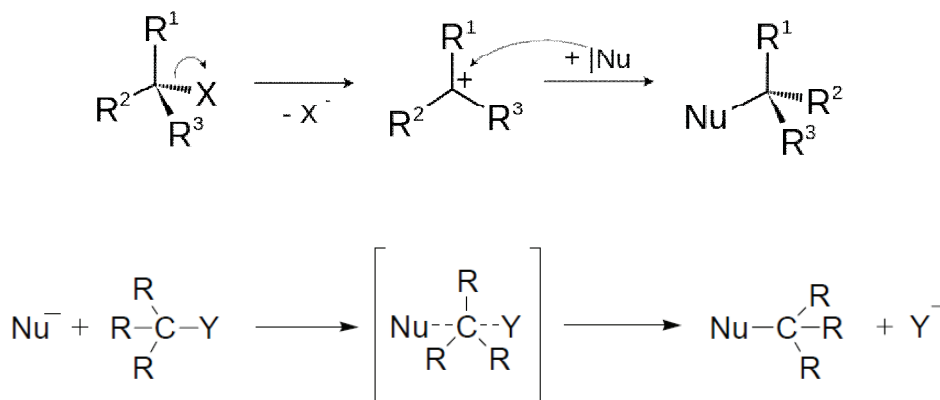


Figure 35: Mécanisme $\text{S}_{\text{N}}1$, $\text{S}_{\text{N}}2$.

Lorsque l'espèce nucléophile réagit avec un atome de carbone d'un cycle aromatique, qui est notre cas, nous parlons d'une substitution nucléophile aromatique et un mécanisme d'addition-élimination se pose. Bien que ce mécanisme montre une certaine ressemblance formelle avec une $\text{S}_{\text{N}}2$, la voie représentée à la figure 36 est différente, car l'attaque par le Nu ne peut pas avoir lieu à partir de l'arrière du carbone portant le groupe partant, mais doit se produire à partir du côté, en raison de la configuration spatiale du

noyau aromatique. L'étape cinétique limitante est l'addition du nucléophile sur le cycle donnant un intermédiaire transitoire, qui peut être isolé dans certains cas (Complexe Meisenheimer).

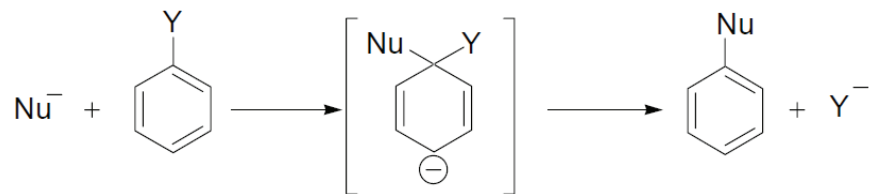
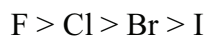
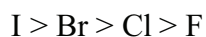


Figure 36 : Mécanisme S_NAr.

La cinétique de cette substitution dépend de plusieurs paramètres, à savoir la nature du groupe partant et du solvant. En ce qui concerne la nature du groupe partant, les atomes d'halogène sont le plus largement utilisés comme dans nos intermédiaires **40a**, **b**. La réactivité observée pour une S_NAr où les halogènes sont comme groupes partants est la suivante:



Cet ordre de classement de réactivité est opposé par rapport à la S_N2 classique, qui est:



Plusieurs stratégies peuvent être envisagées pour la synthèse du groupe sulfonylurée, à partir d'un sulfonamide. Les réactifs généralement utilisés dans ces méthodes sont l'acide isocyanique, les isocyanates, les esters isocyaniques ou des substances qui se décomposent en ces derniers dans les conditions de synthèse. Les urées, nitrouées, uréthanes et le chlorure de carbamyle peuvent servir de source d'acide isocyanique. Leurs analogues N-alkylés et N-arylés ainsi que certains dérivés d'acides ou des bromoamides, ont été employés comme source d'isocyanates d'alkyles ou aryles.

Pour arriver à nos molécules finales qui comportent un groupe sulfonylurée ou sulfonylthiourée nous avons choisi la condensation des isocyanates ou des isothiocyanates avec les sulfonamides déjà préparés (Figure 37).

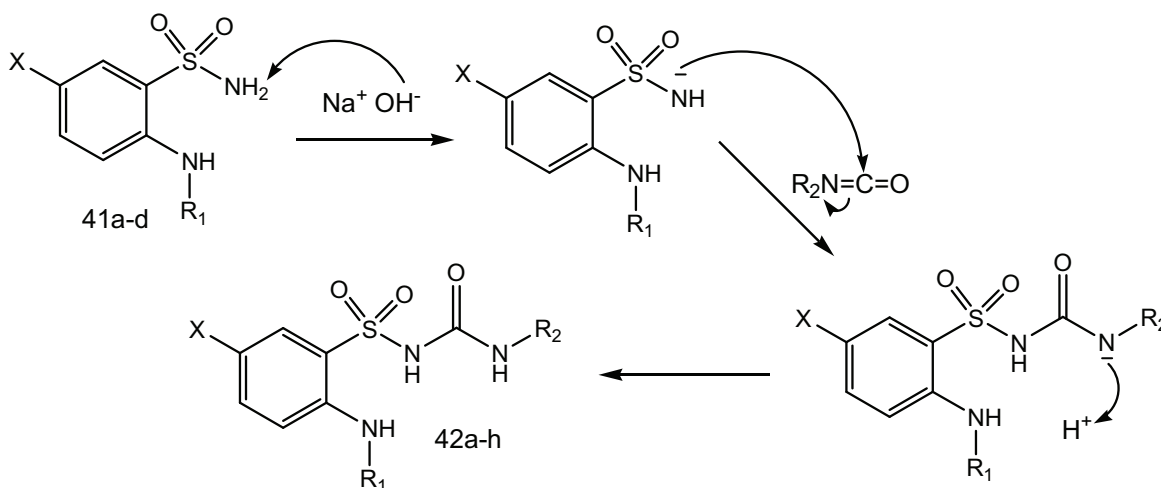


Figure 37: Mécanisme de formation du groupe sulfonyl(thio)urée

Cette réaction peut se faire dans des conditions variées, avec des isocyanates aliphatiques ou aromatiques. Les sels alcalins de sulfonamides réagissent avec les isocyanates dans différents solvants tels que le nitrobenzène, l'acétone ou l'éthanol, alors que les sulfonamides se condensent dans des solutions éthanoliques d'hydroxyde de sodium ou en absence de solvants. Dans ce dernier cas, l'addition de triéthylamine accélère la réaction et conduit à de bons rendements [Haak, 1945 ; Geigy 1942].

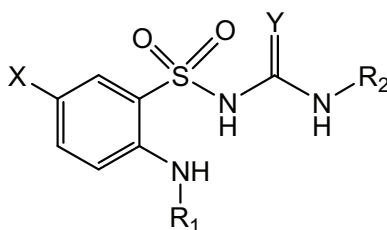
L'interaction des isocyanates avec les amines, se fait si facilement que l'usage d'amines tertiaires comme catalyseurs, n'est pas nécessaire. Il apparaît que dans ce cas, l'un des réactifs, l'amine, qui est une base, jouerait le rôle d'autocatalyseur.

Avec les sulfonamides qui ont un caractère essentiellement acide, par contre, l'effet catalytique d'amines tertiaires est très significatif [Roth and Degering, 1945].

La condensation des isocyanates avec les sulfonamides est une simple addition facilitée par la grande réactivité des isocyanates, cependant la toxicité élevée de ces derniers constitue un handicap lors de leur utilisation industrielle, surtout lorsqu'il s'agit de composés relativement volatils. Néanmoins, à l'échelle de laboratoire les isocyanates ne constituent aucun risque si on les manipule sous hotte aspirante.

Les produits finaux synthétisés sont repris dans le tableau suivant :

Tableau 2 : Molécule synthétisées appartenant à la série I



Composés	X	Y	R ₁	R ₂
42a	Cl	O	CH ₃	C ₂ H ₅
42b	Cl	O	CH ₃	CH(CH ₃) ₂
42c	Cl	O	CH ₃	C ₆ H ₁₁
42d	Cl	O	CH ₃	C ₅ H ₁₁
42e	Cl	O	CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅
42f	Cl	S	CH ₃	C ₂ H ₅
42g	Cl	S	CH ₃	CH(CH ₃) ₂
42h	F	S	CH ₃	CH(CH ₃) ₂

III.2. Synthèse des composés de la Série II

Après ouverture de l'hétérocycle benzothiadiazine dans la première série de molécules, nous allons remplacer le NH par un atome d'oxygène pour obtenir les molécules de la série II (Figure 38).

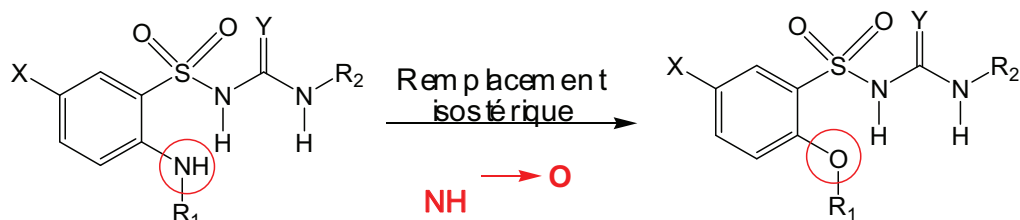
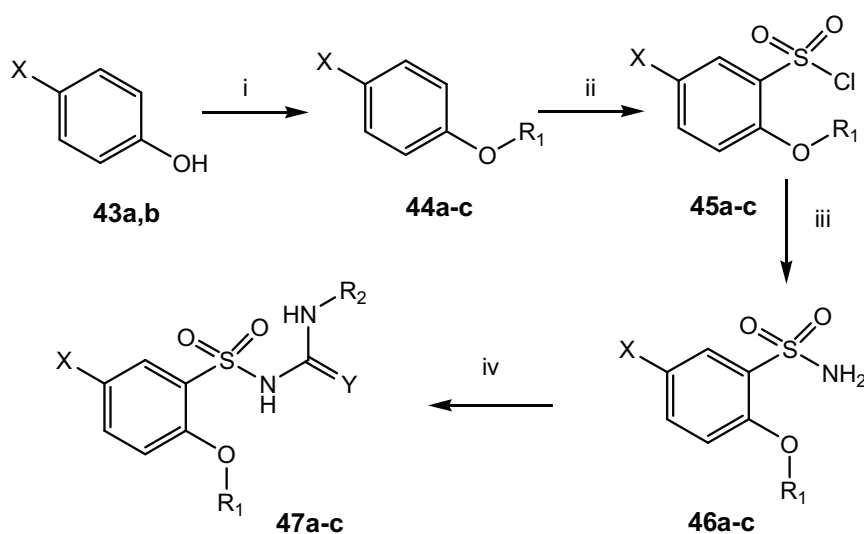


Figure 38 : pharmacomodulations effectuées pour obtenir les molécules de la série II.

La voie de synthèse de sulfonylurées et sulfonylthiourées (II) est décrite dans la figure 39. Ces composés ont été obtenus à partir des para-halogénophénols appropriés en quatre étapes successives.



Réactifs : i) K_2CO_3 , R_1X , acetone ; ii) $HClO_3S$; iii) NH_4OH , dioxane ; iv) NaH , R_2NCO ou R_2NCS , DMF.

Figure 39 : Voie de synthèse des composés de la série II

Le para-halogénophénol 43(a, b) a été alkylé en utilisant un halogénure d'alkyle approprié en présence de carbonate de potassium pour fournir les 1-halogéno-4-alkoxybenzènes.

Pour obtenir les intermédiaires sulfonamides à partir des alkylphényl éthers déjà préparés, nous avons fixé le groupement sulfonyle par une chlorosulfonation en utilisant l'acide chlorosulfonique. Les chlorures de sulfonyle obtenus sont ensuite transformés en leurs sulfonamides par réaction avec l'hydroxyde d'ammonium.

L'acide chlorosulfonique est un bon réactif pour la conversion des composés organiques en leurs chlorures de sulfonyle. Ces derniers possèdent une importance considérable, car ils sont des intermédiaires de synthèse utiles dans la préparation de plusieurs dérivés sulfonyles. Les chlorures de sulfonyle s'hydrolysent facilement quand des traces d'humidité sont présentes, puisque cela se traduit par formation de chlorure d'hydrogène qui catalyse la décomposition hydrolytique.

Les chlorures de sulfonyle sont généralement caractérisés par leur condensation avec les amines ou l'hydroxyde d'ammonium pour former les sulfonamides correspondants qui sont des solides cristallins stables avec des points de fusion relativement élevés.

La réaction de chlorosulfonation suit un mécanisme de substitution électrophile aromatique, l'acide chlorosulfonique est un acide très fort et s'auto-protone pour donner l'électrophile comme le montre la figure 40.

Dans les éthers d'alkyle et d'aryle, l'orientation préférée de sulfonation est en position *para* par rapport au groupe donneur d'électrons alkoxy. Dans les intermédiaires **44a-c**, cette position est bloquée par un halogène, donc la sulfonation peut se produire en *ortho* par rapport au groupe alkoxy (Figure 40).

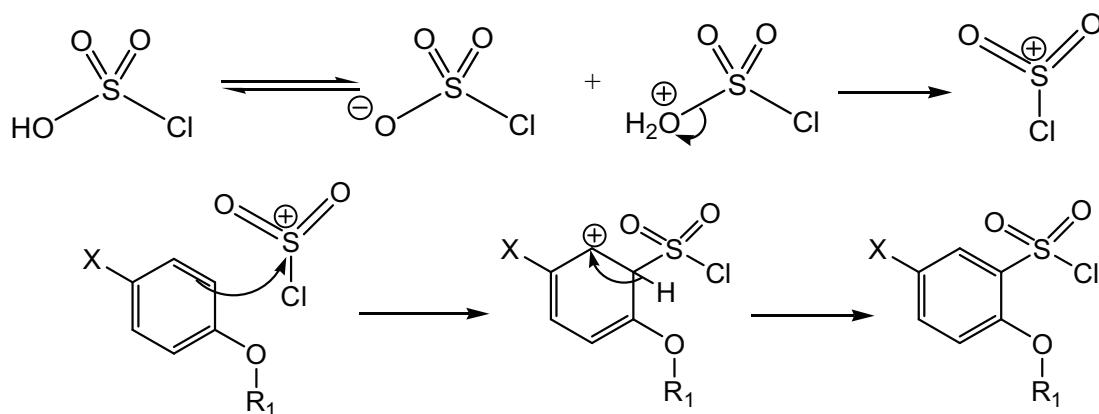


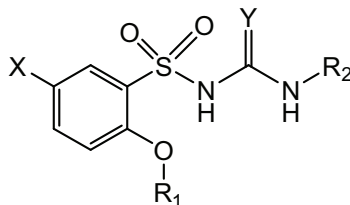
Figure 40 : Mécanisme réactionnel de la chlorosulfonation des intermédiaires 44a-c

Pratiquement, on procède de la manière suivante : les 1-halogéno-4-alkoxybenzènes (44a-c) ont été dissous dans du chloroforme pur. La solution obtenue doit être refroidie avant de rajouter l'acide chlorosulfonique car il se décompose violemment par la chaleur. Une fois la solution refroidie, l'acide chlorosulfonique est additionné goutte à goutte puis le milieu réactionnel est porté à température ambiante. Le chlorure de sulfonyl obtenu à la fin de la réaction est transformé en sulfonamide par réaction avec l'hydroxyde d'ammonium.

Les molécules finales **47a-o** ont été synthétisées par addition nucléophile du groupe sulfonamide des composés **46 a-c** sur l'isocyanate ou l'isothiocyanate approprié (Figure 39).

Les produits finaux synthétisés sont repris dans le tableau suivant :

Tableau 3 : Molécules synthétisées appartenant à la série II.



Composés	X	Y	R ₁	R ₂
47a	Cl	O	CH ₃	CH(CH ₃) ₂
47b	Cl	O	CH ₃	C ₆ H ₁₁
47c	Cl	O	CH ₃	C ₆ H ₅
47d	Cl	O	CH ₃	<i>p</i> -F-C ₆ H ₄
47e	Cl	S	CH ₃	C ₂ H ₅
47f	Cl	S	CH ₃	CH(CH ₃) ₂
47g	Cl	S	CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅
47h	F	O	CH ₃	CH(CH ₃) ₂
47i	F	S	CH ₃	CH(CH ₃) ₂
47j	Cl	O	CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃) ₂
47k	Cl	O	CH ₂ CH ₃	C ₆ H ₁₁
47l	Cl	O	CH ₂ CH ₃	C ₆ H ₅
47m	Cl	S	CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃) ₂
47n	Cl	S	CH ₂ CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅
47o	Cl	S	CH ₂ CH ₃	<i>p</i> -F-C ₆ H ₄

III.3. Synthèse des composés de la série III

Dans cette série de dérivés ouverts de l'hétérocycle benzothiadiazine 1,1-dioxyde, nous avons remplacé le groupement sulfonyle par son isostère non classique, le groupe carbonyle (Figure 41).

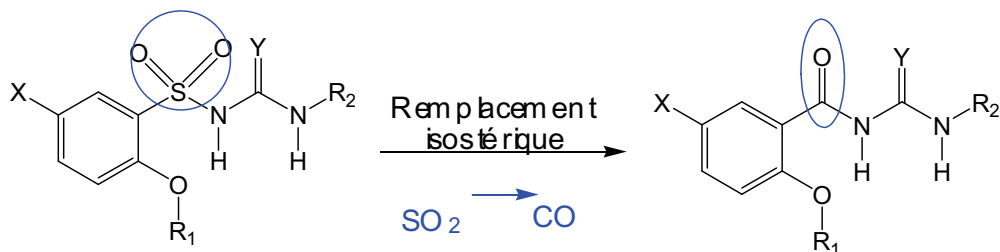
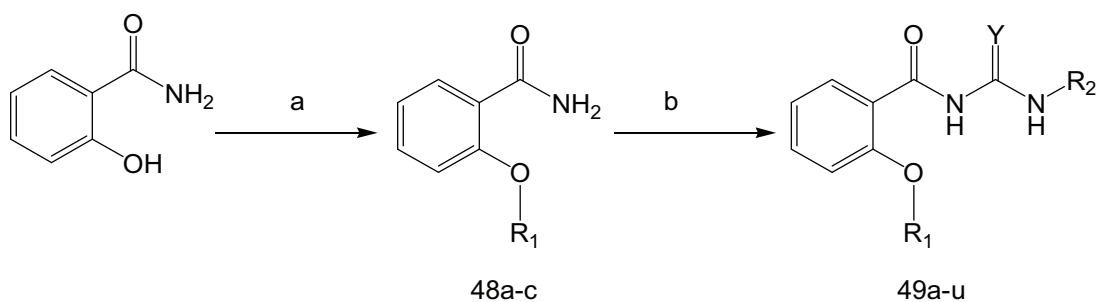


Figure 41 : pharmacomodulation effectuée pour obtenir les molécules de la série III.

La voie synthétique utilisée pour préparer ces carbonylurées ou carbonylthiourées comporte deux étapes (Figure 42).

En partant de 2-hydroxybenzamide, nous avons préparé les 2-alkoxybenzamides **48a-c** par réaction avec un halogénure d'alkyle approprié en présence d'une base. Les 2-alkoxybenzamides synthétisés ont été récupérés avec des bons rendements qui varient entre 90 et 95%.

La deuxième étape consiste à fixer une urée ou thiourée sur le groupe amide pour accéder au carbonylurées ou carbonylthiourées finaux **49a-u**.



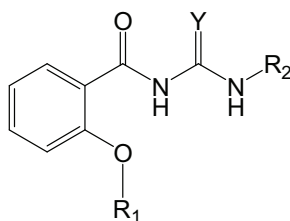
Réactifs : a) NaOH, R₁X, EtOH ; b) NaH, R₂NCO ou R₂NCS, DMF.

Figure 42 : Synthèse des composés 48a-x.

Pour cela nous avons fait réagir les intermédiaires **48a-c** avec différents isocyanates et isothiocyanates, après un traitement par l'hydrure de sodium.

Les produits finaux synthétisés sont repris dans le tableau 4 :

Tableau 4 : Molécules synthétisées appartenant à la série III.



Composés	Y	R ₁	R ₂
49a	O	CH ₃	C ₂ H ₅
49b	O	CH ₃	CH(CH ₃) ₂
49c	O	CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃
49d	O	CH ₃	C ₆ H ₁₁
49e	O	CH ₃	C ₆ H ₅
49f	O	CH ₂ CH ₂ CH ₃	C ₆ H ₁₁
49g	O	CH ₂ CH ₂ CH ₃	C ₆ H ₅
49h	O	CH ₂ C ₆ H ₅	C ₂ H ₅
49i	O	CH ₂ C ₆ H ₅	CH(CH ₃) ₂
49j	O	CH ₂ C ₆ H ₅	C ₅ H ₁₁
49k	O	CH ₂ C ₆ H ₅	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃
49l	O	CH ₂ C ₆ H ₅	C ₆ H ₁₁
49m	O	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₅
49n	S	CH ₃	C ₂ H ₅
49o	S	CH ₃	CH(CH ₃) ₂
49p	S	CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃
49q	S	CH ₃	C ₆ H ₅
49r	S	CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅
49s	S	CH ₂ CH ₂ CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅
49t	S	CH ₂ CH ₂ CH ₃	C ₆ H ₅
49u	S	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₅

Chapitre IV

Résultats et discussion

IV.1. Présentation des modèles pharmacologiques

Comme nous l'avons déjà cité, le but de ce travail est de développer de nouveaux activateurs des canaux K_{ATP} , analogues ouverts de la famille des benzothiadiazines 1,1-dioxydes.

En premier lieu, nous avons testé tous nos composés synthétisés sur des segments d'aorte de rats en mesurant la contraction isométrique résiduelle dans le but d'évaluer leur capacité à relâcher les fibres musculaires.

Au niveau du muscle lisse, l'activation du canal K_{ATP} se traduit par une hyperpolarisation de la membrane plasmique engendrant une diminution du flux entrant de calcium au travers des canaux calciques voltage-dépendants, ce qui conduit au relâchement de la fibre musculaire.

Les composés qui ont montré une certaine activité au niveau aortique ont aussi été expérimentés sur les cellules β -pancréatiques, afin d'évaluer l'impact de ces molécules choisies sur la sécrétion d'insuline. Comme nous avons vu précédemment, l'activation des canaux K_{ATP} des cellules β -pancréatiques permet une fuite des ions potassium hors de la cellule, l'hyperpolarisation qui en résulte conduit à la diminution de l'activité sécrétoire.

L'activité de nos molécules sur les deux modèles, aortique et pancréatique, a été comparée à celle de deux activateurs des canaux K_{ATP} de référence, de la famille des benzothiadiazine1,1-dioxydes : le diazoxide (Figure 16) qui est actif au niveau vasculaire et pancréatique et le BPDZ 73 (Figure 24), relativement sélectif des canaux K_{ATP} des cellules β -pancréatiques comme le montre le tableau 5.

Tableau 5 : Effets des composés de référence sur l'activité contractile de l'aorte et sur la sécrétion de d'insuline.

Composés	Sécrétion résiduelle d'insuline (%)		Activité myorelâchante
	50 μ M	10 μ M	EC ₅₀ (μ M)
Diazoxide	28,8 \pm 2,4 (21) ^a	70,0 \pm 3,6 (22) ^a	22,4 \pm 2,1 (11)
BPDZ 73	5,7 \pm 0,5 (35)	4,9 \pm 0,4 (32) ^b	36,6 \pm 2,2 (6) ^b

a et *b* : résultats publiés.

a [Pirrotte *et al.*, 2000], *b* [de Tullio *et al.*, 2003].

Dans le premier chapitre nous avons montré qu'en plus de leur fonction vasodilatatrice, les activateurs des canaux K_{ATP} jouent un rôle important dans la synthèse de l'élastine par les CMLVs. Le minoxidil par exemple, un activateur de canaux K_{ATP} , augmente l'expression du gène de l'élastine, *in vitro*, dans des fibroblastes de la peau et des cellules musculaires lisses vasculaires [Hayashi *et al.*, 1994 ; Tajima *et al.*, 1995] et *in vivo* chez le rat, ce qui conduit à une augmentation de la teneur artérielle en élastine [Tsoporis *et al.*, 1998].

Nous avons donc décidé d'évaluer la capacité des nouvelles molécules à stimuler la production de l'élastine par les CMLVs en appliquant certains de nos produits qui ont montré des résultats prometteurs dans les tests de pharmacologie vasculaire.

IV.1.1. Mesure de la contraction résiduelle de l'aorte de rat

Les expériences sur l'aorte de rat ont été réalisées au sein du laboratoire d'Hypoxie : Physiopathologie Cardiovasculaire et Respiratoire (HP2) de l'Université de Grenoble Alpes, France.

Pratiquement, les expériences se déroulent comme suit : après dissection du rat et récupération de l'aorte thoracique, cette dernière est coupée en morceaux de 2 à 3 mm de long, qui sont placés sur deux crochets : l'un est fixe, l'autre est relié à une jauge de

contrainte (Figure 43). La contraction est induite par une solution de KCl de concentration 30 mM. Certaines expériences sont réalisées en présence de glibenclamide, un bloqueur des canaux K_{ATP} , à la concentration de 10 μ M.

Les résultats obtenus sont exprimés sous forme d' EC_{50} (en μ M) pour chaque produit. Cette valeur correspond à la concentration en produit qui inhibe 50% de la contraction induite par la solution de KCl 30 mM. Une valeur faible d' EC_{50} signifie que le produit associé est actif.

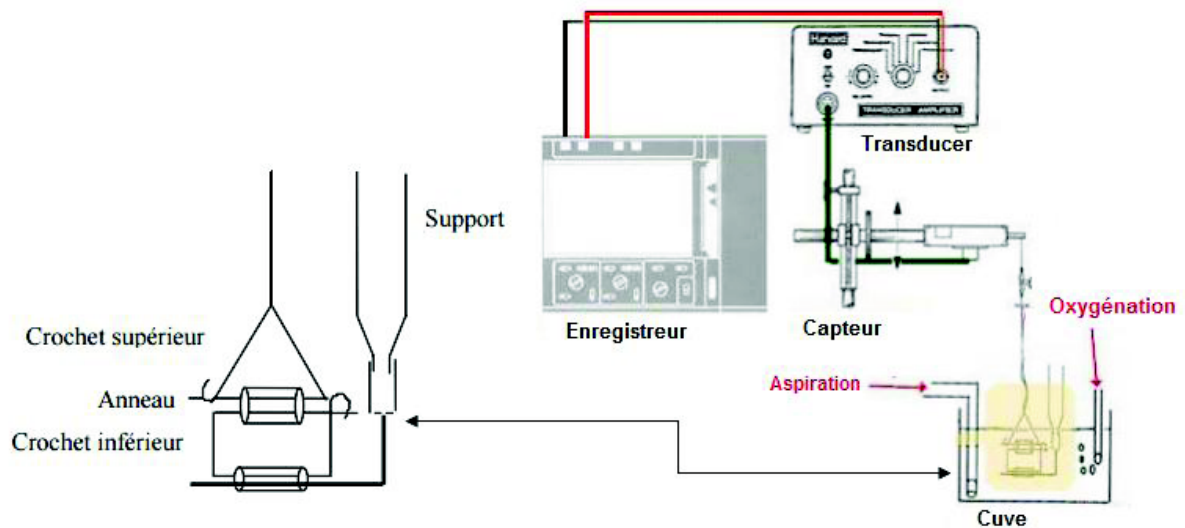


Figure 43 : Schéma représentant le montage de mesure de la contraction de l'aorte.

IV.1.2. Mesure de la sécrétion d'élastine par les cellules musculaires lisses vasculaires en culture

Les cultures des cellules musculaires lisses vasculaires et les mesures du contenu d'élastine extracellulaire ont été réalisées au sein du laboratoire d'Hypoxie : Physiopathologie Cardiovasculaire et Respiratoire (HP2) de l'Université de Grenoble Alpes, France.

IV.1.2.1. Culture cellulaire

Nous avons tout d'abord préparé des cellules de muscle lisse aortique en culture à partir de l'aorte de rats âgés de 6 mois. L'aorte thoracique a été enlevée et débarrassée du

tissu adipeux adhérent. La culture des cellules a été effectuée selon un protocole qui a été adapté à partir d'une méthode précédemment publiée [Golovina, Blaustein, 2006].

Les cellules (CMLV) ont été isolées à partir de l'aorte par digestion enzymatique avec de la collagénase de type 2 (1 mg / ml) et l'élastase (0,5 mg / ml) pendant 40 min à 37 °C. Après centrifugation de la suspension, les cellules ont été recueillies et placées dans du milieu de culture (DMEM) contenant 20% de sérum de veau fœtal (SVF), 1% (v / v) de pénicilline / solution de streptomycine et 1% de solution d'acides aminés non essentiels (NEAA), et maintenu dans l'air humidifié à 5% CO₂ à 37 ° C. Après confluence, les cellules ont été isolées par trypsination.

IV.1.2.2. Quantification de l'élastine extracellulaire

Le protocole établi pour cette étude est basé sur la technique ELISA. Des cultures en confluence de CMLV ont été cultivées dans 1% de SVF-DMEM frais. Les composés à tester solubilisés dans le DMSO ont été appliqués à des différentes concentrations, 0 (DMSO seul en solution), 10, 20, 50 et 100 µM. Le minoxidil a été utilisé comme contrôle positif de la stimulation de l'expression d'élastine, antérieurement montré pour induire une forte augmentation de l'élastine extracellulaire [Giro *et al.*, 1984].

L'effet du diazoxide, utilisé comme référence dans les expériences de pharmacologie vasculaire, a été également évalué.

Après 48h, l'élastine extracellulaire a été quantifiée en mesurant l'absorbance des puits à 450 nm.

IV.1.2.3. Principe de la technique ELISA

La méthode immuno-enzymatique **ELISA** (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*, c'est-à-dire dosage immuno-enzymatique sur support solide) est un examen de laboratoire principalement utilisé en immunologie pour détecter la présence d'un anticorps ou d'un antigène dans un échantillon.

Ce test entre dans le cadre plus général des **EIA** (*enzyme immunoassays*), dans lequel le dosage est couplé à une réaction catalysée par une enzyme qui libère un composant coloré suivi par une spectroscopie (UV-visible par exemple), par opposition aux **RIA** (*radio immunoassays*) dans lesquels l'anticorps est marqué par un radioélément et dont le dosage mesure un nombre de désintégrations par seconde (activité radio-active).

L'ELISA est une technique biochimique utilisant un ou deux anticorps. L'un de ceux-ci est spécifique de l'antigène, tandis que l'autre réagit aux complexes immuns (antigène-anticorps) et est couplé à une enzyme. Cet anticorps secondaire, responsable du nom de la technique, peut aussi causer l'émission d'un signal par un substrat chromogène ou fluorogène (Figure 44).

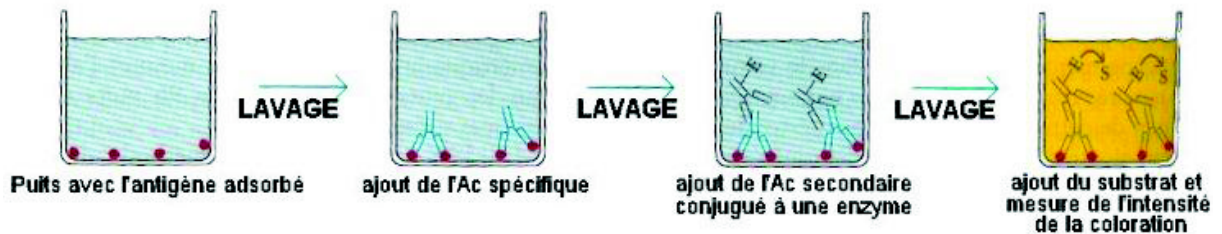


Figure 44: Les différentes étapes d'une ELISA indirecte.

L'ELISA a trouvé des applications dans plusieurs domaines, pour des essais quantitatifs et qualitatifs.

- **Essais quantitatifs** : On utilise l'ELISA directe pour le dosage de protéines variées. Quelques exemples tirés d'applications en pharmacologie médicale : hormones thyroïdiennes, concentration en médicaments...
- **Essais qualitatifs** : L'application la plus connue du grand public est le dépistage en première ligne du VIH.

IV.1.3. Mesure de la sécrétion statique d'insuline par les cellules β -pancréatiques

Les tests pharmacologiques sur les îlots pancréatiques de rat ont été réalisés au sein du laboratoire de pharmacodynamie et de thérapeutique de l'Université Libre de Bruxelles, Belgique.

L'expérience est réalisée sur îlots de Langerhans isolés de rat, placés en incubation dans un milieu contenant une concentration insulinothrique de glucose (16.7 mmol/l), en présence du composé à tester à une concentration donnée. En parallèle, des expériences témoins (en l'absence de produit ou en présence de diazoxide et avec un milieu contenant simplement le glucose) sont réalisées.

Après incubation, l'insuline excrétée dans le milieu extracellulaire est dosée par mesures radioimmunologiques.

Pour cela, on prélève une fraction du liquide d'incubation (contenant l'insuline froide à quantifier) auquel on ajoute de l'insuline marquée radioactivement, du sérum anti-insulinique de cobaye et, 72 heures plus tard, du charbon-dextran.

Au cours de la réaction, l'insuline froide ainsi qu'une partie de l'insuline chaude vont se lier au sérum anti-insulinique. L'excès d'insuline radioactive va, quant à elle, se fixer au charbon-dextran. Par centrifugation, on isole le charbon.

En mesurant la radioactivité émise par ce dernier, il est possible de déduire la quantité de marqueur radioactif qui s'y est fixée. Puisque les quantités de sérum anti-insulinique et d'insuline chaude sont connues, et en se référant à des courbes standards, il est possible de quantifier l'insuline excrétée par les cellules dans le milieu [Florence 2010].

Les résultats obtenus par cette expérience sont exprimés sous forme de pourcentage de la sécrétion résiduelle d'insuline. Une valeur proche de 100 % indique que le produit n'a aucune activité. Les pourcentages ont été mesurés pour des concentrations en drogue de 50 et 10 μM .

IV.2. Détermination de la constante d'acidité

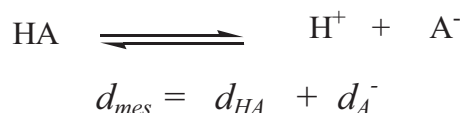
Les molécules synthétisées au cours de ce travail possèdent des protons échangeables sur les atomes d'azote. Nous avons entrepris de déterminer la constante d'acidité (pKa) pour quelques exemples de ces molécules. La connaissance du pKa nous permettra de prévoir la forme prédominante à pH physiologique (pH=7,4).

Généralement l'ionisation des molécules actives peut influencer sur le profil d'activité pharmacologique et peut même perturber les interactions entre le produit et son site de fixation.

Parmi les méthodes connues pour déterminer les pKa, nous pouvons citer la titrimétrie en retour et la spectrométrie UV. Dans cette partie nous allons présenter un rappel théorique de la deuxième technique (spectrométrie UV) que nous avons utilisée pour déterminer les pKa de certains de nos produits.

La connaissance du rapport des densités optiques des différentes espèces d'un acide en solution (HA et A⁻) à un pH connu permet de calculer le pKa [Albert et serjeant, 1971].

Pour une molécule ionisable, la densité optique mesurée (d_{mes}) à une longueur d'onde donnée est égale à la somme de la densité optique de la forme chargée (d_{A^-}) et celle de la forme neutre (d_{HA}) à cette même longueur d'onde.



La relation entre la densité optique et la concentration d'une substance X en solution est établie par la loi de Beer-Lambert.

$$d_x = [X] \cdot l \cdot \varepsilon$$

où : [X] : concentration de l'espèce X ;

l : trajet optique ;

ε : coefficient d'extinction ;

La formule simplifiée permettant de calculer le pH d'un acide faible en solution, relie cette valeur du pH au pKa de l'acide en solution.

$$pH = pKa - \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

A partir de la formule permettant de calculer le pH d'un acide faible en solution, nous pouvons déduire celle du pKa en fonction des densités optiques.

$$pKa = pH + \log \frac{d_i - d_{mes}}{d_{mes} - d_n}$$

Avec d_{mes} : densité optique mesurée à une longueur d'onde donnée et un pH donné ;

d_i : densité optique de la forme ionisée ;

d_n : densité optique de la forme neutre.

Il faut noter que les densités optiques des formes ionisées et neutres, à une longueur d'onde choisie, soient suffisamment différentes l'une de l'autre.

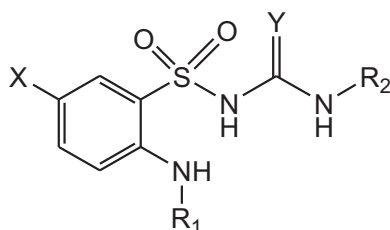
L'avantage de la spectrophotométrie UV par rapport aux autres méthodes comme la titrimétrie est la possibilité de travailler avec des solutions plus diluées. Le seuil de détection de cette technique est de l'ordre de 10^{-5} M alors que celui des méthodes titrimétriques est de l'ordre de 10^{-3} M [Somers, 2001].

IV.3. Evaluation de l'effet myorelâchant sur l'aorte de rat.

On rappelle que trois séries d'analogues ouverts des 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides ont été synthétisés. Dans la série I contenant les composés **42a-h**, nous avons simplifié la structure de ces molécules en ouvrant le cycle benzothiadiazinique et dans la deuxième nous avons remplacé le groupe NH par un oxygène (composés **47a-o**). Les composés (**49a-u**) de la série III ont été obtenus en remplaçant le groupement sulfonyle par l'un de ces isostères non classiques, le groupe carbonyle.

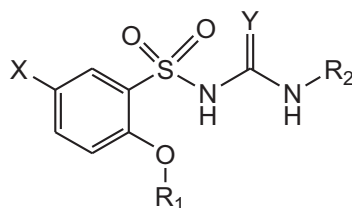
Afin d'évaluer l'activité vasorelaxante, toutes les molécules synthétisées appartenant aux trois séries ont été testées *in vitro* sur le modèle aortique décrits précédemment. Les résultats reportés dans les tableaux 6, 7 et 8 indiquent l'effet des composés **42a-h**, **47a-o** et **49a-u** sur les anneaux d'aorte de rat précontractés avec une solution de KCl 30 mM. Ces résultats sont exprimés sous forme d'EC₅₀ et ont été comparé à ceux des molécules de référence déjà cités, le diazoxide et le BPDZ73.

Tableau 6 : Effet des composés 42a-h (série I) sur l'activité contractile des anneaux de l'aorte de rat précontractés par 30mM de KCl.



Composés	X	R ₁	R ₂	Y	Activité vasorelaxante EC ₅₀ (μM)
42a	Cl	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	O	>300 (6)
42b	Cl	CH ₃	C ₆ H ₁₁	O	>300 (6)
42c	Cl	CH ₃	C ₆ H ₅	O	>300 (6)
42d	Cl	CH ₃	<i>p</i> -F-C ₆ H ₄	O	>300 (6)
42^e	Cl	CH ₃	C ₂ H ₅	S	>300 (6)
42f	Cl	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	S	>300 (6)
42g	Cl	CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅	S	>300 (6)
42h	F	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	O	>300 (6)
Diazoxide	-	-	-	-	21.6 ± 3.0 (9)

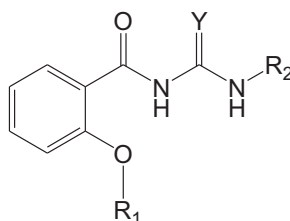
Tableau 7 : Effet des composés 47a-o (série II) sur l'activité contractile des anneaux de l'aorte de rat précontractés par 30mM de KCl.



Composés	X	R ₁	R ₂	Y	Activité vasorelaxante EC ₅₀ (μM)
47a	Cl	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	O	>300 (6)
47b	Cl	CH ₃	C ₆ H ₁₁	O	>300 (6)
47c	Cl	CH ₃	C ₆ H ₅	O	>300 (6)
47d	Cl	CH ₃	<i>p</i> -F-C ₆ H ₄	O	>300 (6)
47 ^e	Cl	CH ₃	C ₂ H ₅	S	>300 (6)
47f	Cl	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	S	>300 (6)
47g	Cl	CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅	S	>300 (6)
47h	F	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	O	>300 (6)
47i	F	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	S	>300 (6)
47j	Cl	CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃) ₂	O	>300 (6)
47k	Cl	CH ₂ CH ₃	C ₆ H ₁₁	O	>300 (6)
47l	Cl	CH ₂ CH ₃	C ₆ H ₅	O	>300 (6)
47m	Cl	CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃) ₂	S	>300 (6)
47n	Cl	CH ₂ CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅	S	>300 (6)
47o	Cl	CH ₂ CH ₃	<i>p</i> -F-C ₆ H ₄	S	>300 (6)
Diazoxide	-	-	-	-	21.6 ± 3.0 (9)
BPDZ73	-	-	-	-	36.6 ± 2.2 (6)

Comme le montre les deux tableaux 6 et 7, aucun des nouveaux produits I et II n'a montré un effet myorelâchant marqué sur l'aorte de rat (EC₅₀ >300μM), tandis que la majorité des composés de la série III (carboxy(thio)urées) ont montré un effet vasorelaxant substantiel comme l'indique le tableau 8. Certains de ces composés actifs présentent un effet similaire ou même plus puissant que celui du diazoxide. Le dérivé 49k par exemple, le composé le plus actif, présente une EC₅₀ = 12.2 μM contre 21.6 μM pour le diazoxide.

Tableau 8 : Effet des composés 49a-u (série III) sur l'activité contractile des anneaux de l'aorte de rat précontractés par 30mM de KCl.



Composés	R ₁	R ₂	Y	Activité* vasorelaxante EC ₅₀ (μM)
49a	CH ₃	C ₂ H ₅	O	>100 (5)
49b	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	O	91.4 ± 24.1 (4)
49c	CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	O	31.8 ± 1.4 (5)
49d	CH ₃	C ₆ H ₁₁	O	35.9 ± 1.4 (6)
49e	CH ₃	C ₆ H ₅	O	26.7 ± 5.9 (4)
49f	CH ₂ CH ₂ CH ₃	C ₆ H ₁₁	O	58.2 ± 11.2 (6)
49g	CH ₂ CH ₂ CH ₃	C ₆ H ₅	O	59.6 ± 1.9 (5)
49h	CH ₂ C ₆ H ₅	C ₂ H ₅	O	16.7 ± 2.2 (3)
49i	CH ₂ C ₆ H ₅	CH(CH ₃) ₂	O	26.8 ± 3.5 (3)
49j	CH ₂ C ₆ H ₅	C ₅ H ₁₁	O	17.3 ± 0.5 (5)
49k	CH ₂ C ₆ H ₅	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	O	12.2 ± 1.8 (6)
49l	CH ₂ C ₆ H ₅	C ₆ H ₁₁	O	33.8 ± 6.1 (5)
49m	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₅	O	21.1 ± 2.7 (6)
49n	CH ₃	C ₂ H ₅	S	15.2 ± 2.3 (5)
49o	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	S	18.6 ± 2.3 (6)
49p	CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	S	36.6 ± 2.1 (5)
49q	CH ₃	C ₆ H ₅	S	34.5 ± 3.8 (9)
49r	CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅	S	47.2 ± 12.0 (3)
49s	CH ₂ CH ₂ CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅	S	71.1 ± 4.7 (5)
49t	CH ₂ CH ₂ CH ₃	C ₆ H ₅	S	16.5 ± 2.0 (6)
49u	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₅	S	>100 (5)
Diazoxide	-	-	-	21.6 ± 3.0 (9)
BPDZ73	-	-	-	36,6 ± 2,2 (6) ^b

*Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± s.e.m. n se réfère au nombre de mesures effectuées

L'observation des résultats obtenus avec les composés carbonylurées **49h - m**, où le groupe R₁ est une chaîne benzyle, montre que ces molécules possèdent un effet myorelâchant supérieur à celui du diazoxide ou intermédiaire entre celui de ce dernier et le BPDZ 73, ceci indique que le groupement benzyle est préférable pour cette activité.

Les analogues carbonylthiourées ont montré une activité similaire à leurs urées correspondantes et certains d'entre eux ont atteint ou légèrement dépassé l'activité du diazoxide (composés **49n**, **49o**, **49t**).

L'inactivité des composés des deux séries **I** et **II** (**42a-h** et **47a-o** respectivement) pourrait être due à leur caractère acide, comme le montre les valeurs calculées de leurs pKa situées entre 4,5 et 5,8 (tableau 9). A pH physiologique (7,4), l'atome d'azote situé entre les deux groupes sulfonyle et carbonyle (thiocarbonyle) des molécules de la série **I** et **II** est partiellement ionisé tandis que l'azote correspondant des analogues de la série **III** est probablement non ionisé à cette valeur de pH. Cette caractéristique indique que la présence d'un groupement NH non ionisé lié à la fonction C=O pourrait être essentielle pour l'activité biologique (ou au contraire une charge négative sur l'azote est défavorable).

Nous signalons que les valeurs de pKa des composés de la série **III** ne pouvaient pas être déterminées car tous les spectres UV enregistrés aux différentes valeurs de pH ont été identiques.

Tableau 9 : Valeurs des pKa de quelques composés de la série I et II.

Composés	X	R ₁	R ₂	Y	pKa
42a	Cl	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	O	5,25
47a	Cl	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	O	5,65
47b	Cl	CH ₃	C ₆ H ₁₁	O	5,46
47c	Cl	CH ₃	C ₆ H ₅	O	4,50
47f	Cl	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	S	5,74
47h	F	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	O	5,52

IV.4. Investigations complémentaires sur le tissu vasculaire

Un effet relâchant des anneaux aortiques n'est cependant pas forcément le reflet d'une activation des canaux K_{ATP} exercée par la drogue. Afin de vérifier si l'effet vasorelaxant enregistré par nos molécules actives résulte de leur capacité à activer les canaux K_{ATP} , des expériences pharmacologiques complémentaires ont été effectuées.

IV.4.1. Mesure de l'effet myorelâchant des composés sur l'aorte de rat précontracté par 30 mM de KCl en l'absence et en présence de glibenclamide et précontracté par 80 mM de KCl.

Dans cette partie nous allons étudier le pouvoir myorelaxant des produits **49h**, **49k**, **49n**, **49o**, et **49t**, ayant montré une activité supérieure à celle du diazoxide, dans des conditions expérimentales différentes de celle utilisées précédemment.

L'étude a porté premièrement sur des anneaux aortiques précontractés par une solution de KCl 30 mM en présence de 10 μ M de glibenclamide, un bloqueur spécifique des canaux K_{ATP} appartenant à la classe des sulfonylurées hypoglycémiantes. Si la drogue agit comme un activateur de canaux K_{ATP} , nous devrions observer une perte d'activité en présence de glibenclamide [Lebrun *et al.*, 1990]. Si ce n'est pas le cas, cela indique que la drogue agit par un autre mécanisme.

L'analyse des résultats présentés dans le tableau 10 indique que la présence de 10 μ M de glibenclamide dans le bain a provoqué une augmentation notable de la valeur de l' EC_{50} pour la majorité des composés sélectionnés. Ceci signifie la diminution de l'effet myorelâchant et nous permet de suggérer l'implication des canaux K_{ATP} dans l'activité vasodilatatrice de ces molécules. Il faut noter que les augmentations des valeurs de l' EC_{50} de ces molécules induites par le glibenclamide (environ 2 fois) sont inférieures à celle enregistrée avec le diazoxide (environ 8 fois). Cette remarque suggère que ces dérivés agissent, au moins en partie, au niveau des canaux potassiques sensibles à l'ATP.

Tableau 10 : Effet des composés sélectionnés et du diazoxide sur l'activité contractile de l'aorte de rat précontractée par 30mM de KCl en l'absence et en présence de 10 µM de glibenclamide ou de 80 mM de KCl.

Composés	KCl 30 mM	KCl 30 mM+ Glib. 10 µM	KCl 80 mM
	EC ₅₀ (µM) ^a	EC ₅₀ (µM) ^a	EC ₅₀ (µM) ^a
49h	16.7 ± 2.2 (3)	38.0 ± 3.6* (6)	36.6 ± 3.8 ^S (6)
49k	12.2 ± 1.8 (6)	20.2 ± 2.3* (7)	45.6 ± 6.6** (5)
49n	15.2 ± 2.3 (5)	28.2 ± 6.0 (5)	57.1 ± 4.6 ^S (5)
49o	18.6 ± 2.3 (6)	28.1 ± 4.3 (4)	38.1 ± 2.8** (4)
49t	16.5 ± 2.0 (6)	64.9 ± 14.7** (3)	121.0 ± 10.9 ^S (6)
Diazoxide	19.5 ± 2.7 (6) ^b	163.4 ± 41.2 (6) ^b	> 300 (6) ^b

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± s.e.m. n se réfère au nombre de mesures effectuées
 P < 0.05 est considéré significatif. * p < 0.05 ; ** p < 0.01 ; ^S p < 0.001.

^a EC₅₀ : concentration nécessaire pour induire 50% de relaxation de la contraction initiale induite par 30 ou 80 mM de KCl. Glib: glibenclamide.

^b Résultats publiés [pirotte *et al.*, 2000]. Les résultats statistiques ont été performés en comparant les EC₅₀ en présence de glibenclamide ou de KCl 80 mM par rapport à celles à KCl 30 mM.

Deuxièmement, des segments aortiques ont été exposés à une solution riche en KCl (80 mM), une méthode classique utilisée pour différencier les activateurs des canaux potassiques des bloqueurs calciques. Dans ces conditions, la concentration en KCl est tellement forte que même une ouverture totale des canaux K_{ATP} par un activateur de ces canaux ne peut s'opposer à la dépolarisation de la membrane cellulaire et ne peut inhiber l'entrée du calcium. Dès lors, l'effet vasodilatateur d'un pur activateur de canaux K⁺ doit théoriquement être supprimé, ou au moins réduit de manière significative. Par contre, l'activité d'une drogue qui agit directement en bloquant les canaux calciques reste inchangée dans une solution de KCl 80 mM [pirotte *et al.*, 2000].

Les résultats pharmacologiques présentés dans le tableau 10, indiquent que lorsque la contraction est induite par une solution riche en potassium (KCl 80 mM), l'effet myorelâchant des cinq substances sélectionnées est significativement moins marqué par rapport à celui enregistré à 30 mM de KCl. Nous constatons aussi la forte diminution de l'activité myorelâchante du diazoxide dans ces conditions.

Ces constatations sont illustrées par les courbes dose-réponse des deux composés les plus actifs (**49k**, **49n**) dans les trois conditions expérimentales réalisées où le déplacement vers la droite des courbes concentration-réponse en présence de glibenclamide et à 80 mM est constaté par rapport à celles enregistrées à 30 mM de KCl (Figure 45).

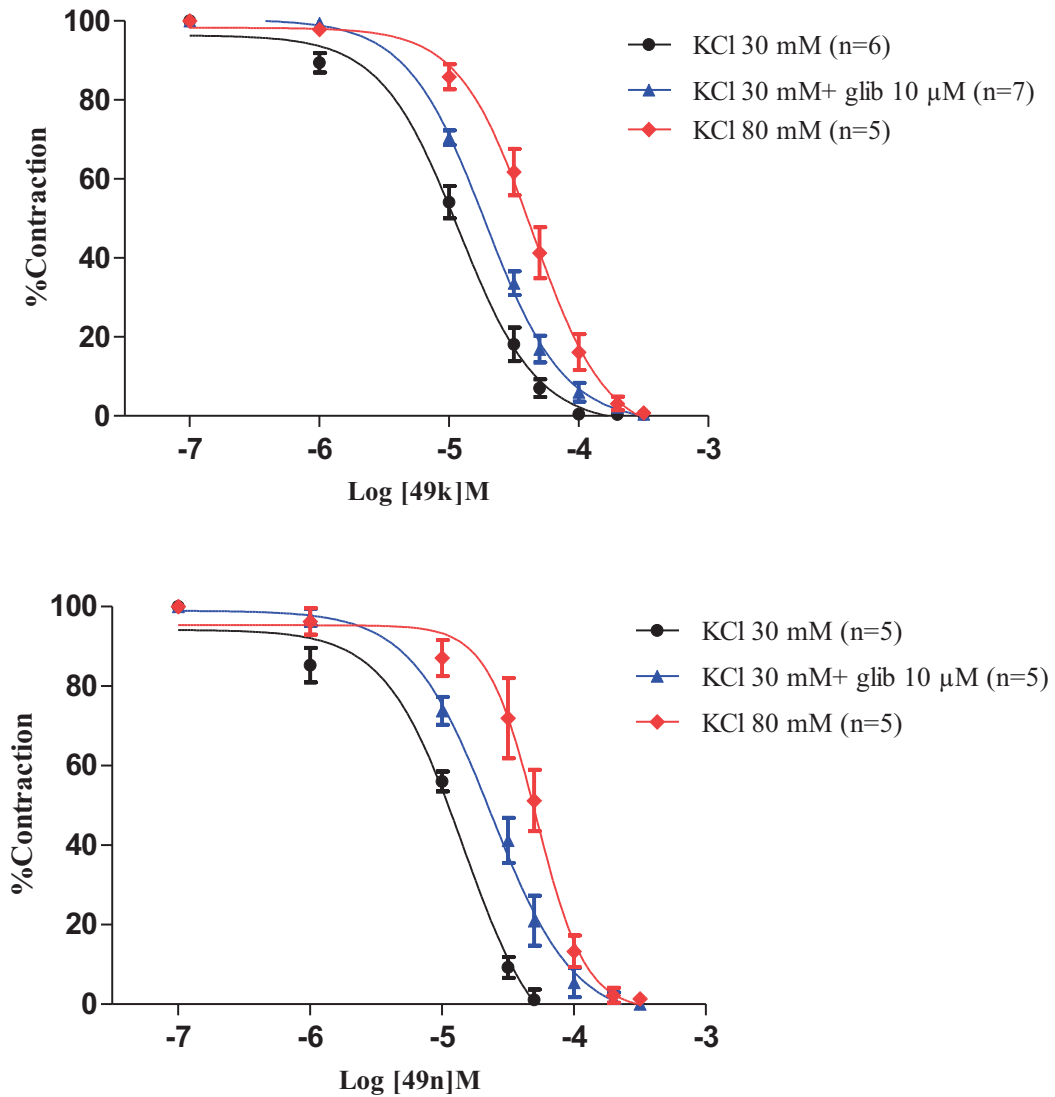


Figure 45 : Courbes Concentration-réponse des composés 49k et 49n sur l'activité contractile de l'aorte de rat précontractée par 30 mM de KCl en l'absence et en présence de 10 μM de glibenclamide et par 80 mM de KCl.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm s.e.m., n se réfère au nombre de mesures effectuées.

En conclusion, Ces différents résultats suggèrent que les dérivés **49h**, **49k**, **49n**, **49o** et **49t** se comportent, du moins en partie, comme activateurs des canaux potassiques ATP-dépendants du muscle lisse vasculaire.

IV.4.2. Mesure de la contraction résiduelle de l'aorte de rat dépourvue d'endothélium

L'**endothélium** vasculaire est la couche la plus interne des vaisseaux sanguins, celle en contact avec le sang. Parmi les diverses fonctions de l'endothélium, on peut souligner le contrôle du tonus vasculaire. Ce tonus est régulé par de nombreux facteurs vasoconstricteurs ou vasodilatateurs endothéliaux. Le monoxyde d'azote (NO), par exemple, est parmi les principaux facteurs vasorelaxants et que l'endothélium peut générer à partir de l'acide aminé L-arginine provoquant une vasodilatation.

Dans toutes les expériences précédentes, les segments de l'aorte ont été utilisés telle qu'ils sont, c'est -à-dire avec leur endothélium. Pour vérifier si l'activité de nos composés dépendrait ou non de la présence de l'endothélium, nous avons effectué des mesures de l'activité myorelâchante sur des anneaux de l'aorte dépourvus d'endothélium. Cette dénudation a été effectuée à l'aide de la face rugueuse d'une pince en raclant doucement la lumière du vaisseau. Lorsque la contraction induite par 30mM de KCl s'est stabilisée, de l'acétylcholine (10 μ M) est ajoutée au bain afin de vérifier la disparition de l'endothélium enlevé mécaniquement. Dans le cas où l'endothélium a réellement été enlevé lors de l'isolement du muscle, l'acétylcholine n'a aucun effet, et ne provoque pas la relaxation des segments d'aortes.

Comme le montre le tableau 11, la plupart des composés actifs (**49h**, **49k**, **49n**, **49o**, **49t**) sur les anneaux d'aorte ont maintenu le même profil vasorelaxant en présence ou en l'absence d'endothélium, ce qui confirme que le mécanisme et le site d'action de ces composés sont indépendants de l'endothélium.

Tableau 11 : Effet des composés sélectionnés sur l'activité contractile de l'aorte de rat précontractée par 30 mM de KCl avec endothélium et sans endothélium.

Composés	annaux aortiques avec endothélium	annaux aortiques sans endothélium
	EC ₅₀ (μM) ^a	EC ₅₀ (μM) ^a
49h	16.7 ± 2.2 (3)	17.2 ± 2.6 (6)
49k	12.2 ± 1.8 (6)	15.3 ± 1.7 (5)
49n	15.2 ± 2.3 (5)	17.4 ± 1.9 (4)
49o	18.6 ± 2.3 (6)	15.7 ± 1.2 (5)
49t	16.5 ± 2.0 (6)	12.0 ± 0.5 (5)

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± s.e.m. n se réfère au nombre de mesures effectuées

^a EC₅₀ : concentration nécessaire pour induire 50% de relaxation de la contraction initiale induite par 30 mM de KCl.

IV.5. Evaluation de l'effet sur la sécrétion statique de l'insuline par les cellules β pancréatiques

Plusieurs de nos dérivés appartenant à la série **III** ont été trouvés actifs sur la fibre musculaire lisse, et se sont montrés être au moins partiellement des activateurs des canaux K_{ATP} du muscle lisse vasculaire. Les molécules les plus prometteuses de cette série ont été prioritairement examinées sur des ilots pancréatiques de rats afin d'évaluer leur capacité à inhiber la libération de l'insuline induite par le glucose, recherchant chez eux une éventuelle sélectivité tissulaire.

L'activité biologique des composés testés (**49h**, **49k**, **49n**, **49o**, **49t**) sur le tissu pancréatique, ainsi que celle des drogues de référence, est reprise dans le tableau **12**.

Tableau 12: Effets des composés 49h, 49k, 49n, 49o, 49t, du diazoxide et du BPDZ73 sur la sécrétion statique de l'insuline par les ilots pancréatiques de rats.

Composés	R ₁	R ₂	Y	Sécrétion résiduelle d'insuline (%)	
				50 µM	10 µM
49h	CH ₂ C ₆ H ₅	C ₂ H ₅	O	113.3 ± 5.8 (24)	110.2 ± 5.3 (23)
49k	CH ₂ C ₆ H ₅	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	O	21.4 ± 1.9 (22)	90.1 ± 5.1 (23)
49n	CH ₃	C ₂ H ₅	S	99.6 ± 4.8 (24)	94.1 ± 6.3 (22)
49o	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	S	104.7 ± 5.4 (24)	90.9 ± 3.6 (23)
49t	CH ₂ CH ₂ CH ₃	C ₆ H ₅	S	44.9 ± 2.1 (23)	83.8 ± 3.5 (23)
Diazoxide	-	-	-	28.8 ± 2.4 (21) ^a	70.0 ± 3.6 (22) ^a
BPDZ73	-	-	-	5.7 ± 0.5 (35) ^b	4.1 ± 0.4 (32) ^b

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± s.e.m. n se réfère au nombre de mesures effectuées.

^a résultats publiés [Pirotte *et al.*, 2000]

^b résultats publiés [de Tullio *et al.*, 2003].

Comme l'indique le tableau 12, tous les composés sont soit inactifs soit peu actifs sur la sécrétion d'insuline, à la concentration de 10 µM, proche de l'EC₅₀ de la majorité de ces composés dans le tissu vasculaire. Par contre à 50 µM les deux composés **49t** et **49k** présentaient un important effet inhibiteur de la sécrétion de l'insuline où les pourcentages de la sécrétion résiduelle d'insuline sont 44,9% et 21,4%, respectivement. Ces résultats suggèrent une relative sélectivité tissulaire de certains de ces composés, exception faite des composés **49t** et **49k**, pour le muscle vasculaire lisse.

IV.6. Résultats des mesures de la sécrétion d'élastine par les cellules musculaires lisses vasculaires en culture

Certains de nos composés les plus vasoactifs ont été testés sur un autre modèle biologique, qui est la production d'élastine par les cellules musculaires lisses vasculaires en culture. Les composés **49k**, **49n** et **49o** en solution dans le DMSO ont été appliquées aux cellules à différentes concentrations: 0 (DMSO seul en solution ajouté aux cellules), 10, 20, 50 et 100 µM (Figure 46).

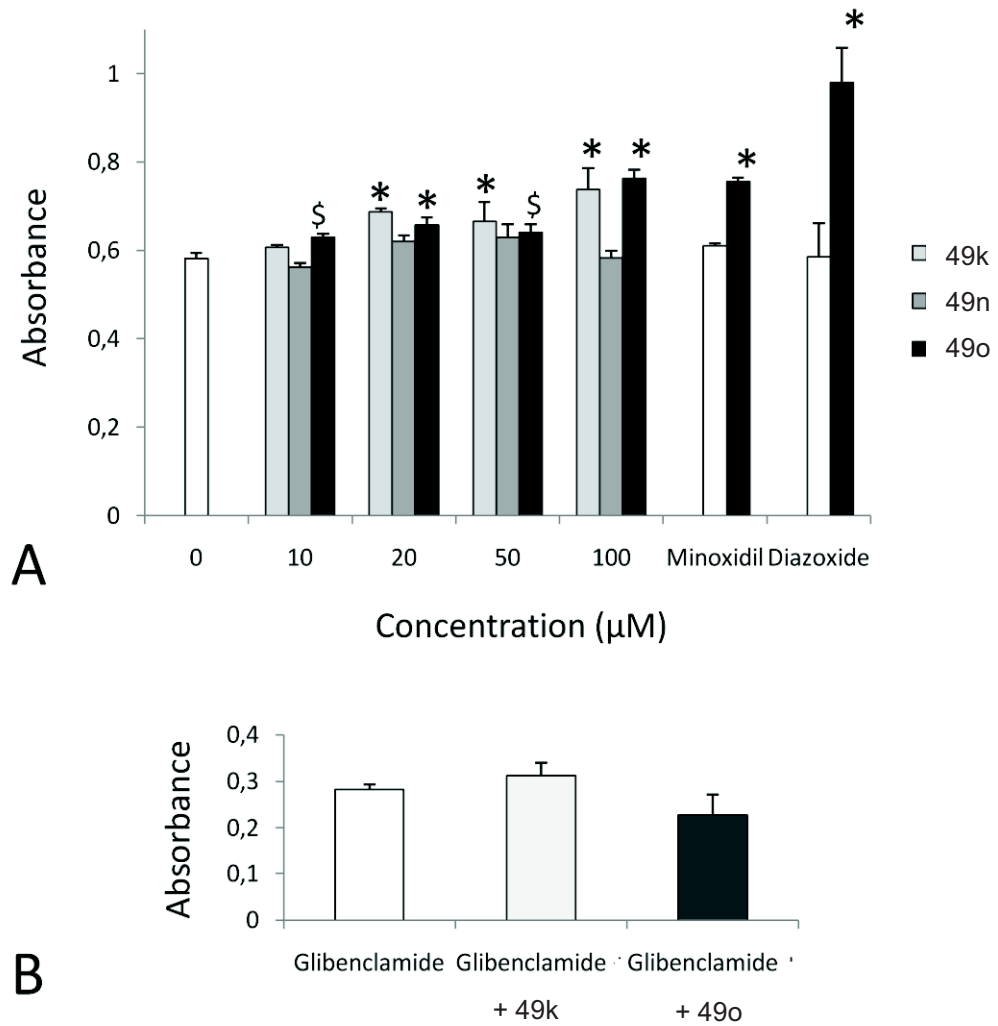


Figure 46: Effet des molécules testées sur la production d'élastine par les cellules du muscle vasculaire lisse.

A : élévation de l'absorbance en fonction des différentes concentrations des molécules **49k**, **49n** et **49o** comparée à celle du DMSO seul, 1 mM minoxidil ou 50 µM diazoxide. Pour l'effet du minoxidil, le contrôle a été changé parce que cette molécule a été solubilisé dans l'eau à la concentration utilisée: barre blanche = contrôle (pas de DMSO).

B: présence de 10 µM de glibenclamide pendant toute l'expérience. L'absorbance représente la quantité d'élastine extracellulaire (n = 3-4 dans chaque groupe de molécules à tester, n=6-9 dans chaque groupe de contrôle positif ou négatif). La différence significative avec le témoin correspondant: * $P \leq 0.05$, ^{\$} $P \leq 0.07$.

D'après la figure 46(A), bien que le composé 49n n'a eu aucun effet sur la production de l'élastine par rapport à l'effet de DMSO seul, un effet concentration-dépendant a été observé avec les composés 49k et 49o où la production d'élastine par les cellules musculaires lisses vasculaires a été augmentée de façon significative à des concentrations aussi faibles que 20 μ M ($P \leq 0,05$).

À la concentration de 100 μ M des composés 49k ou 49o, la production d'élastine a été augmenté d'environ 30% par rapport au témoin DMSO, tandis que le minoxidil induit le même effet mais à une concentration de 1 mM.

Le diazoxide, utilisé comme référence dans les tests de pharmacologie vasculaire, a été également testé sur la production d'élastine par les CMLVs. En comparant le résultat obtenu par rapport aux conditions expérimentales de contrôle (DMSO seul), une activation significative de la production d'élastine a été observée à une concentration de 50 μ M de diazoxide ($P \leq 0,05$) où l'augmentation de l'élastine extracellulaire atteint environ 67%. Dans une autre expérience, le composé 49h s'est montré inactif et incapable de stimuler la production d'élastine à des concentrations de 10 et 20 μ M (les données ne sont pas présentées sur le graphe).

Les expériences avec les deux composés 49k et 49o, qui ont montré un effet intéressant, ont été reproduites en présence de 10 μ M de glibenclamide, un bloqueur spécifique des canaux potassiques ATP-dépendants, dans le milieu.

Le résultat obtenu (Figure 46 B) montre que l'effet stimulant de 49k et 49o sur la production d'élastine a été totalement aboli par 10 μ M de glibenclamide, cette constatation nous permet de présumer l'implication des canaux K_{ATP} dans la production d'élastine.

IV.7. Evaluation pharmacologique *in vivo*

Comme nous l'avons déjà montré, les composés 49h, 49k, 49n, 49o et 49t ont été testés *in vitro* sur des ilots pancréatiques et se sont montrés plus au moins inactifs sauf pour les deux composés 49t et 49k qui ont été capables d'inhiber la sécrétion d'insuline à une concentration de 50 μ M. Nous avons voulu examiner ces molécules *in vivo* en mesurant la concentration de glucose sanguin chez le rat après leur administration orale.

Ces expériences ont été réalisées au laboratoire de phytochimie et de pharmacologie de l'université de Jijel.

Les cinq composés sélectionnés ont été administrés par voie orale chez les rats à une dose de 50 mg/kg ainsi que deux composés de référence, le diazoxide connu par son effet hyperglycémiant et le glibenclamide, un agent hypoglycémiant. Le prélèvement du sang a été effectué juste avant l'administration et après 1, 2, 3 et 4 heures.

Les variations du taux de glucose sanguin en fonction du temps chez les rats administrés par voie orale au temps zéro avec les composés sélectionnés (50 mg/kg), le diazoxide (50 mg/kg) ou le glibenclamide (0,25 mg/kg) sont représentées par la figure 47.

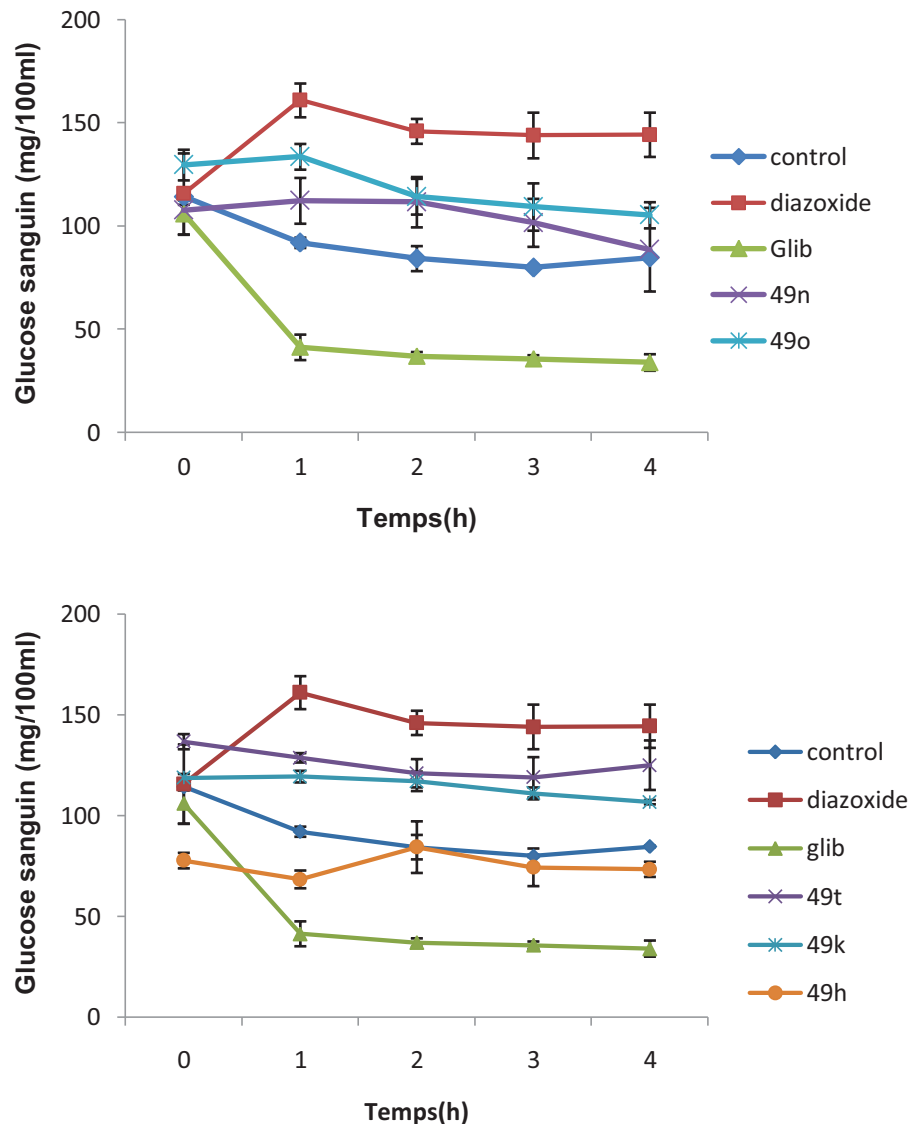


Figure 47 : Variations du taux de glucose sanguin en fonction du temps chez les rats traités par voie orale au temps zéro avec les composés 49 (n, o, t, k, h) (50 mg / kg), le diazoxide (50 mg / kg) ou le glibenclamide (0,25 mg / kg).

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm s.e.m de trois rats (n=3).

D'après la figure 47, l'effet hyperglycémiant du diazoxide a été observé *in vivo* chez le rat par la mesure de glycémie au cours du temps, conformément à ce qu'on a observé *in vitro*. L'inhibition de la sécrétion d'insuline par certaines substances *in vitro* devrait induire une hyperglycémie *in vivo*. L'effet hypoglycémiant du glibenclamide, un sulfamide hypoglycémiant oral, a été aussi bien marqué et soutenu dans le temps. A l'opposé, nos molécules sélectionnées pour cette étude, n'ont montré aucun effet significatif sur la concentration de glucose sanguin, même pour les deux composés **49k** et **49t** qui ont été capables d'inhiber la sécrétion d'insuline *in vitro* à la concentration de 50 μ M. Cette constatation pourrait être expliquée par une mauvaise biodisponibilité des deux composés ou d'un métabolisme rapide *in vivo* après une administration orale.

V. Conclusion

Partant des 3-alkyl amino-4*H*-1,2,4 benzothiadiazines 1,1-dioxydes, activateurs de canaux K_{ATP} , nous nous sommes attachés à la préparation et à l'évaluation pharmacologique d'analogues ouverts originaux de ces molécules.

Pour ce faire, nous avons réalisé différentes pharmacomodulations autour de l'hétérocycle benzothiadiazine 1,1-dioxyde, qui ont conduit à trois séries de molécules à structure simplifiée.

Toutes les molécules synthétisées (produits finis et intermédiaires) ont été caractérisées par leurs points de fusion, leur analyse élémentaire et leurs spectres 1H RMN et IR.

Nous avons tout d'abord synthétisé des analogues ouverts du cycle thiadiazinique en gardant le même squelette que ce dernier, avec fixation de groupes (thio)urées (Série I). Par la suite, le NH a été remplacé par un atome d'oxygène, tandis que le groupe SO_2 a été remplacé par son isostère non classique C=O. Ces modifications structurales ont conduit à trois nouvelles séries d'analogues à cycle ouvert de diazoxide et des 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazines 1,1-dioxides (séries I, II et III).

Les composés finaux synthétisés ont été testés *in vitro* sur trois modèles pharmacologiques afin d'en évaluer leur activité : sur les aortes de rat en mesurant l'effet myorelâchant d'anneaux aortiques précontractés par une solution de KCl 30 mM et sur les cellules β -pancréatiques de rat en mesurant l'effet inhibiteur de la sécrétion d'insuline des

îlots pancréatiques incubés en présence de 16.7 mM de glucose. Le troisième modèle est l'évaluation de la production de l'élastine par les cellules musculaires lisses vasculaires de l'aorte de rat en culture. L'activité de nos molécules dans les deux premiers modèles a été comparée à celle de deux activateurs des canaux K_{ATP} de référence que sont le diazoxide et le BPDZ 73 et à celle du minoxidil pour l'évaluation de la production d'élastine.

Aucune des nouvelles sulfonylurées ou thiourées des deux séries **I** et **II** n'a montré un effet myorelâchant marqué sur l'aorte de rat. Un tel effet pourrait être attribué à leur ionisation au pH physiologique, à cause de leur caractère acide lié à la fonction sulfonylurée.

A l'opposé, la majorité des composés de la série **III** (carboxy(thio)urées) ont montré un effet vasorelaxant substantiel, certains de ces composés actifs présentent un effet similaire ou même plus puissant que le produit de référence, le diazoxide. Le produit le plus actif était le **49k** avec une EC_{50} de 12,2 μ M.

L'activité vasodilatatrice des cinq molécules les plus actives (**49h**, **49k**, **49n**, **49o** et **49t**) a été diminuée en présence de 10 μ M de glibenclamide et a été réduit sur les anneaux aortiques précontractés par 80 mM de KCl. Ces données suggèrent une implication potentielle, au moins en partie, des canaux K_{ATP} .

La préservation de l'activité vasodilatatrice dans les anneaux aortiques de rats dépourvus d'endothélium a indiqué que le site d'action des molécules est situé sur les cellules musculaires lisses vasculaires et non sur les cellules endothéliales.

Les composés sélectionnés (**49h**, **49k**, **49n**, **49o** et **49t**), à 50 μ M n'ont pas montré un effet inhibiteur marqué sur la sécrétion d'insuline à partir de cellules β -pancréatiques (sauf **49k** et **49t**) et sur la glycémie, ce qui suggère une sélectivité tissulaire relative de certains de ces composés pour le muscle lisse vasculaire.

Certaines de nos molécules vasorelaxantes les plus puissantes (**49k** et **49o**) ont présenté également une stimulation importante de la production d'élastine, le composant principal de la paroi artérielle responsable de son élasticité. Cet effet a également été aboli par glibenclamide (10 μ M), ce qui indique une implication présumée des canaux K_{ATP} dans la production d'élastine.

Grâce à leur capacité d'augmenter la production d'élastine, les molécules telles que **49k** et **49o** pourraient représenter une classe de drogues vasorelaxantes et qui pourraient améliorer

l'élasticité et l'hémodynamique artérielle. En outre, des tests *in vivo* doivent être performés pour vérifier cette hypothèse.

Il serait également intéressant de ré-évaluer l'activité des molécules des deux séries **I** et **II** après méthylation du groupe NH lié au groupe SO₂ responsable de leur ionisation.

Chapitre VI

Matériel et Méthodes

VI.1. Matériel

Les points de fusion des produits ont été mesurés sur un appareil Stuart[®] SMP 3 et n'ont pas été corrigés.

Les spectres infrarouges ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Perkin-Elmer FT-IR 4000. Les produits ont été mis sous forme de pastilles en dispersion dans le KBr.

Les analyses élémentaires des composés (C, N, H, S) ont été effectuées avec un appareil Carlo-Erba[®] EA 1108.

Les spectres RMN ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker[®] Avance 500 (500 MHz). Les composés sont mis en solution dans le DMSO deutéré et les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au TMS. Les abréviations s, d, t, dd, m, b signifient respectivement singulet, doublet, triplet, doublet de doublet, multiplet, broad (large).

Les spectres UV ont été enregistrés sur un appareil de marque Hitachi U 3010 spectrophotometer. Les échantillons sont placés dans des cuvettes dont le trajet optique vaut 1 cm.

L'avancement des réactions a été suivi par chromatographie sur couche mince (CCM). Les plaques employées sont des plaques Merck en aluminium recouvertes d'une couche de gel de silice 60 F₂₅₄. Les plaques ont été examinées aux rayons ultraviolets à 254 ou 366 nm.

Les différents composés synthétisés ont été séchés dans une étuve ventilée à 30 °C, sans précautions particulières.

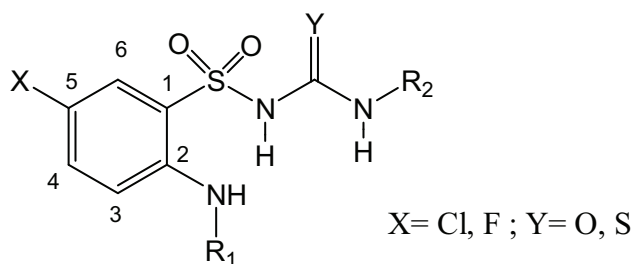
Les rats utilisés pour les expériences biologiques sont des rats Wistar femelles, dont le poids se situe entre 200 et 250 g.

Les mesures de la contraction résiduelle des anneaux d'aorte de rat ont été réalisées à l'aide d'un appareillage composé de huit cuves à organes isolés. La tension des anneaux d'aorte a été visualisée au cours du temps grâce au logiciel d'acquisition Lab Chart 7. La détermination des valeurs d'EC₅₀ a été effectuée en utilisant le logiciel GraphPad prisme.

Les mesures de la sécrétion statique d'insuline ont été réalisées avec une station de pipetage automatique de type : « Micromédic Systems Inc, Modèle 24006, USA ». Le comptage de la radioactivité lors des dosages radioimmunologiques a été réalisé avec un compteur gamma 1270 Rackgamma II Gammacounter, LKB Wallac, Finland. Les échantillons ont été centrifugés avec un appareil de type « Cryofuge 6/4, Heraeus Christ, Allemagne » [Florence 2010].

VI.2. Synthèse

VI.2.1. Molécules de la Série I



VI.2.1.1. Synthèse des intermédiaires réactionnels

Mode opératoire générale pour la synthèse de 40 a, b

D'une part, on sature 60 ml d'acide acétique glacial en SO_2 pendant une heure (solution A), d'autre part, 10 g de 5-chloro-2-fluoroaniline sont dissous dans 60 ml d'acide acétique glacial et 30 ml d'acide chlorhydrique concentré (solution B). Cette solution est refroidie jusqu'à atteindre une température voisine de 0 à 5°C, puis 5 g de nitrite sodique dissous dans 10 ml d'eau sont ajoutés goutte à goutte à la solution B pour former le sel de diazonium. La température doit être maintenue proche de 0°C. 3g de CuCl_2 sont dissous dans 10 ml d'eau, la solution formée est ajoutée à la solution A et agitée pendant 2 minutes. Un précipité de Cu_2Cl_2 apparaît. La solution de diazonium est ensuite ajoutée prudemment et sous agitation à cette suspension. Après 15 minutes d'agitation le milieu réactionnel est versé dans un mélange eau /éther (200/200). La phase étherée est décantée, lavée à l'eau puis évaporée sous pression réduite. Après évaporation, le résidu obtenu est repris par 25 ml de dioxane, la solution formée est ajoutée goutte à goutte à un mélange de 50 ml d'ammoniaque et 15 ml d'eau sur bain de glace. A la fin de la réaction le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite et traité au charbon. Après filtration, le filtrat est concentré sous pression réduite, le résidu est solubilisé dans le méthanol et le produit est précipité par ajout de deux volumes d'eau, puis recueilli par filtration, lavé à l'eau et séché.

5-chloro-2-fluorobenzènesulfonamide (40a)

Rendement	: 67%
Point de fusion	: 135-136°C
IR (cm ⁻¹)	
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 7.51(m, 3H, CH _{arom}), 7.56 (s, 2H, SO ₂ NH ₂)
δ (ppm)	
Analyse élémentaire (%)	: C ₆ H ₅ ClFNO ₂ S

	C	H	N	S
Calculés	34,38	2,40	6,68	15,29
Trouvés	34,22	2,41	6,74	15,27

2,5-difluorobenzènesulfonamide (40b)

Rendement	: 61%
Point de fusion	: 139°C
IR (cm ⁻¹)	: 3339 (N-H) ; 1334,1160 (SO ₂).
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 7.51(m, 3H, CH _{arom}), 7.56 (s, 2H, SO ₂ NH ₂)
δ (ppm)	
Analyse élémentaire (%)	: C ₆ H ₅ F ₂ NO ₂ S

	C	H	N	S
Calculés	37,30	2,61	7,25	16,60
Trouvés	36,82	2,28	6,95	16,24

Mode opératoire générale pour la synthèse de (41a-d)

5g (0,022 mol) de (40 a, b) dans 40 ml de dioxane, 7,5ml de méthylamine en solution alcoolique sont placés dans un autoclave scellé qui est mis à l'étuve à 120°C pendant 48 h. A la fin de la réaction, le mélange réactionnel est évaporé sous pression réduite puis le résidu est repris par un mélange eau/méthanol. Le précipité formé est filtré, le filtrat est agité sur de la glace et filtré une deuxième fois. Le produit obtenu est traité au charbon, lavé à l'eau est séché.

5-chloro-2-méthylaminobenzènesulfonamide (41a)

Rendement	: 64%
Point de fusion	: 149-150°C
IR (cm ⁻¹)	: 3431, 3339 (N-H) ; 1325,1149 (SO ₂).
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 2.81 (d, 3H, CH ₃ NH), 5.93 (s, 1H, CH ₃ NH), 6.75 (d, 1H, 3-H), 7.41 (d, 1H, 4-H), 7.44 (s, 2H, SONH ₂), 7.56 (d, 1H, 6-H).
Analyse élémentaire (%)	: C ₇ H ₉ ClN ₂ O ₂ S

	C	H	N	S
Calculés	38,10	4,11	12,69	14,53
Trouvés	38,08	4,16	13,07	14,56

5-fluoro-2-méthylaminobenzènesulfonamide (41b)

Rendement	: 60,5 %
Point de fusion	: 130-131°C
IR (cm ⁻¹)	: 3369 (N-H) ; 1319,1152 (SO ₂).
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 2.81 (d, 3H, CH ₃ NH), 5.70 (s, 1H, CH ₃ NH), 6.73 (dd, J=8,1; 4,1, 1H, 3-H), 7.28 (m, 1H, 4-H), 7.36 (m, 1H, 6-H), 7.40 (s, 2H, SONH ₂).
Analyse élémentaire (%)	: C ₇ H ₉ FN ₂ O ₂ S

	C	H	N	S
Calculés	41,17	4,44	13,72	15,70
Trouvés	41,20	4,53	14,18	15,41

5-chloro-2-éthylaminobenzènesulfonamide (41c)

Ce dérivé est obtenu en suivant les conditions expérimentales décrites à partir de 5-chloro-2-fluorobenzènesulfonamide (40a) et de 1,5 éq d'éthylamine (solution 2M dans le méthanol).

Rendement	: 64,4 %
Point de fusion	: 126 -127°C
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 1.20 (t, 3H, CH ₃ CH ₂), 3.20 (m, 2H, CH ₃ CH ₂), 5.83 (t,

δ (ppm)	1H, NHCH ₂), 6.70 (d, 1H, 3- <u>H</u>), 7.39 (dd, 1H, 4- <u>H</u>), 7.53 (d, 1H, 6- <u>H</u>), 7.56 (s, 2H, SON <u>H</u> ₂).
Analyse élémentaire (%)	: C ₈ H ₁₁ ClN ₂ O ₂ S

	C	H	N	S
Calculés	40,94	4,72	11,94	13,66
Trouvés	40,97	4,89	11,79	13,45

2-éthylamino-5-fluorobenzènesulfonamide (41d)

Ce dérivé est obtenu en suivant les conditions expérimentales décrites à partir de 2,5-difluorobenzènesulfonamide (40b) et de 1,5 éq d'éthylamine (solution 2M dans le méthanol).

Rendement	: 60 %
Point de fusion	: 149.5 -150°C
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 1.20 (t, 3H, CH ₃ CH ₂), 3.18 (m, 2H, CH ₃ CH ₂), 5.62 (t, 1H, NHCH ₂), 6.77 (d, 1H, 3- <u>H</u>), 7.27 (dd, 1H, 4- <u>H</u>), 7.38 (d, 1H, 6- <u>H</u>), 7.47 (s, 2H, SON <u>H</u> ₂).
δ (ppm)	
Analyse élémentaire (%)	: C ₈ H ₁₁ FN ₂ O ₂ S

	C	H	N	S
Calculés	44,02	5,08	12,84	14,69
Trouvés	43,93	5,18	12,85	14,64

VI.2.1.2. Synthèse des molécules finales

Les dérivés urées

Méthode générale de synthèse

500 mg de sulfonamide approprié (voir intermédiaires **41 a-d**) sont dissous dans 30 ml d'acétone, 1 éq de soude (solution à 10%) est ajouté. Le mélange est agité pendant 10 min et évaporé à sec sous pression réduite. Le solide obtenu est dissous dans l'acétone est légèrement chauffé, 2 éq de l'isocyanate approprié sont ajoutés. A la fin de la réaction (suivie par CCM), le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite, le résidu est repris par 50 ml de soude à 2%. Cette solution est extraite trois fois par l'éther diéthylique. La phase aqueuse est amenée à pH 7 par de l'acide chlorhydrique 2N. Le produit qui précipite est filtré, lavé à l'eau et séché. Le produit est recristallisé dans le méthanol.

N-éthyl-N'-(5-chloro-2-méthylaminobenzènesulfonyl)urée (42a)

Rendement	: 63%
Point de fusion	: 147.8 °C
IR (cm ⁻¹)	: 3410, 3337 (N-H) ; 1684 (C=O) ; 1336,1150 (SO ₂)
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 0.94 (t, 3H, CH ₃ CH ₂), 2.82 (s, 1H, CH ₃ NH), 2.96 (m, 2H, CH ₃ CH ₂), 6.11(s, 1H, CH ₃ NH), 6.65 (t, 1H, NHCH ₂), 6.78 (d, 1H, J=8.8 Hz; 3-H), 7.46 (d, 1H, J= 9.1 Hz; 4-H), 7.60 (s, 1H, 6-H), 10.65 (s, 1H, SO ₂ NHCO).
Analyse élémentaire (%)	: C ₁₀ H ₁₄ ClN ₃ O ₃ S

	C	H	N	S
Calculés	41,17	4,84	14,40	10,99
Trouvés	41,29	4.96	15,06	10,85

N-isopropyl-N'-(5-chloro-2-méthylaminobenzènesulfonyl)urée (42b)

Rendement : 36 %

Point de fusion :°C

IR (cm⁻¹) : 3407, 3391 (N-H) ; 1687 (C=O) ; 1340,1152 (SO₂).

RMN ¹H(DMSO-d₆, 500 MHz) : 1.00 (t, 3H, (CH₃)₂CH), 2.82 (s, 1H, CH₃NH), 3.57 (m, 2H, (CH₃)₂CH), 6.13 (s, 1H, CH₃NH), 6.49 (d, 1H, J= 7,6 Hz ; NHCH), 6.78 (d, 1H, J= 9.1 Hz ; 3-H), 7.45 (dd, 1H, J= 9, 2.4 Hz ; 4-H), 7.60 (d, 1H, J= 2.5; 6-H), 10.45 (s, 1H, SO₂NHCO).

Analyse élémentaire (%) : C₁₁H₁₆ClN₃O₃S

	C	H	N	S
Calculés	43,21	5,27	13,74	10,48
Trouvés	43,34	5,30	13,65	10,20

N-cyclohexyl-N'-(5-chloro-2-méthylaminobenzènesulfonyl)urée (42c)

Rendement : 61.7 %

Point de fusion : 139-140°C

IR (cm⁻¹) : 3429, 3363 (N-H) ; 1674 (C=O) ; 1340,1155 (SO₂).

RMN ¹H(DMSO-d₆, 500 MHz) : 1.10-1.70 (m, 10H, CH₂ cyclohexyle), 2.82 (s, 1H, CH₃NH), 3.28 (b, 1H, NHCH), 6.14 (s, 1H, CH₃NH), 6.50 (d, J= 7.6 Hz, 1H, NHCH), 6.77 (d, J= 8.8 Hz, 1H, 3-H), 7.45 (d, J= 9.0 Hz 1H, 4-H), 7.58 (s, 1H, 6-H), 10.42 (s, 1H, SO₂NHCO).

Analyse élémentaire (%) : C₁₄H₂₀ClN₃O₃S

	C	H	N	S
Calculés	48,62	5,83	12,15	9,27
Trouvés	48,66	5,87	12,01	8,62

N-pentyl-*N'*-(5-chloro-2-méthylaminobenzènesulfonyl)urée (42d)

Rendement	: 46.6 %
Point de fusion	: 114.5-115°C
IR (cm ⁻¹)	: 3426, 3376 (N-H) ; 1675 (C=O) ; 1339,1154 (SO ₂).
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 0,81 (t, 3H, <u>CH</u> ₃ (CH ₂) ₄), 1.11 (m, 2H, CH ₃ CH ₂ <u>CH</u> ₂ (CH ₂) ₂), 1.21 (m, 2H, CH ₃ CH ₂ <u>CH</u> ₂ (CH ₂) ₃), 1.31 (m, 2H, CH ₃ (CH ₂) ₂ <u>CH</u> ₂ CH ₂), 2.82 (s, 3H, NH <u>CH</u> ₃), 2.92 (q, 2H, CH ₃ (CH ₂) ₃ <u>CH</u> ₂), 6.10 (s, 1H, NH <u>CH</u> ₃), 6.63 (t, 1H, NHCH ₂), 6.78 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H, 3- <u>H</u>), 7.45 (dd <i>J</i> = 9, 2.4 Hz, 1H, 4- <u>H</u>), 7.60 (d, <i>J</i> = 2.5Hz, 1H, 6- <u>H</u>), 10.72 (s, 1H, SO ₂ NHCO).
Analyse élémentaire (%)	: C ₁₃ H ₂₀ ClN ₃ O ₃ S

	C	H	N	S
Calculés	46,77	6,04	12,59	9,61
Trouvés				

N-benzyl-*N'*-(5-chloro-2-méthylaminobenzènesulfonyl)urée (42e)

Rendement	: 46 %
Point de fusion	: 136 -136.5°C
IR (cm ⁻¹)	: 3429, 3363 (N-H) ; 1674 (C=O) ; 1340,1155 (SO ₂)
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 2.82 (s, 3H, NH <u>CH</u> ₃), 4.15 (d, 2H, NHCH <u>2</u>), 6.11 (s, 1H, NH <u>CH</u> ₃), 6.80 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H, 3- <u>H</u>), 7.14 (d, <i>J</i> = 7.1 Hz 2H, 2',6'-H), 7.21 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz, 1H, 4'- <u>H</u>), 7.23 (t, 1H, NHCH ₂), 7.27 (t, 2H, 3',5'- <u>H</u>), 7.47 (dd, <i>J</i> = 8.8, 2.5Hz 1H, 4- <u>H</u>), 7.62 (d <i>J</i> = 2.5Hz, 1H, 6-H), 10.84 (s, 1H, SO ₂ NHCO).
Analyse élémentaire (%)	: C ₁₅ H ₁₆ ClN ₃ O ₃ S

	C	H	N	S
Calculés	50,92	4,56	11,88	9,06
Trouvés				

Les dérivés thiourées

Ces dérivés sont obtenus selon le protocole expérimental décrit pour les composés précédents à partir des sulfonamides déjà préparés (**41 a-d**) et d'isothiocyanates appropriés.

***N*-éthyl-*N'*-(5-chloro-2-méthylaminobenzènesulfonyl)thiourée (**42f**)**

Rendement	: 30 %
Point de fusion	: 157-158.5°C
IR (cm ⁻¹)	: 3412, 3338 (N-H) ; 1122 (C=S) ; 1337,1149 (SO ₂)
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 0.97 (t, 3H, CH ₃ CH ₂), 2.83 (s, 1H, CH ₃ NH), 3.43 (m, 2H, CH ₃ CH ₂), 6.14 (bs, 1H, CH ₃ NH), 6.50 (d, 1H, NHCH), 6.80 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz 1H, 3-H), 7.48 (dd, <i>J</i> = 9.0, 2.0 Hz 1H, 4-H), 7.72 (d, <i>J</i> = 2.2 Hz 1H, 6-H), 8.51(t, 1H, NH ₂ C ₂ H ₅), 11.50 (bs, 1H, SO ₂ NHCS).
δ (ppm)	
Analyse élémentaire (%)	: C ₁₀ H ₁₄ ClN ₃ O ₂ S ₂

	C	H	N	S
Calculés	39,02	4.58	13.65	20.83
Trouvés	38.74	4.61	14.00	20.82

***N*-isopropyl-*N'*-(5-chloro-2-méthylaminobenzènesulfonyl)thiourée (**42g**)**

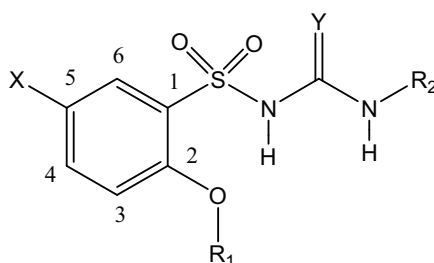
Rendement	: 51 %
Point de fusion	: 168-168.7°C
IR (cm ⁻¹)	: 3435, 3313 (N-H) ; 1116 (C=S) ; 1340,1153 (SO ₂).
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 1.09 (d, <i>J</i> = 6.3 Hz, 6H, (CH ₃) ₂ CH), 2.83 (s, 1H, CH ₃ NH), 4.21 (m, 1H, (CH ₃) ₂ CH), 6.13 (bs, 1H, CH ₃ NH), 6.81 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H, 3-H), 7.49 (dd, <i>J</i> = 9.1, 2.5Hz, 1H, 4-H), 7.64 (d, <i>J</i> = 2.5 Hz 1H, 6-H), 8.18 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz 1H, NHCH), 11.37 (bs, 1H, SO ₂ NHCS).
δ (ppm)	
Analyse élémentaire (%)	: C ₁₁ H ₁₆ ClN ₃ O ₂ S ₂

	C	H	N	S
Calculés	41,05	5,01	13,06	19,93
Trouvés				

***N*-isopropyl-*N'*-(5-fluoro-2-méthylaminobenzènesulfonyl)thiourée (42h)**

Rendement	: 63,8 %
Point de fusion	: 158-159 °C
IR (cm ⁻¹)	: 3437, 3316 (N-H) ; 1123 (C=S) ; 1340,1152 (SO ₂).
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 1.00 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz, 6H, (CH ₃) ₂ CH), 2.82 (s, 1H, CH ₃ NH), 3.58 (m, 1H, (CH ₃) ₂ CH), 5.92 (bs, 1H, CH ₃ NH), 6.45 (d, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H, NHCH), 6.77 (dd, <i>J</i> = 9.1, 4.4 Hz, 1H, 3-H), 7.36 (td, <i>J</i> = 8.5x (2), 2.8 Hz, 1H, 4-H), 7.42 (dd, <i>J</i> = 8.8, 2.8 Hz, 1H, 6-H), 10.45 (bs, 1H, SO ₂ NHCS).
δ (ppm)	
Analyse élémentaire (%)	: C ₁₁ H ₁₆ FN ₃ O ₂ S ₂

	C	H	N	S
Calculés	43,26	5,28	13,76	20,99
Trouvés	43,17	5,13	13,40	20,59

VI.2.2.Molécules de la série II

X= Cl, F ; Y= O, S

VI.2.2.1. Synthèse des intermédiaires réactionnels**Méthode générale de synthèse de (44a-d)**

10 g (0,078 mol) de 4-chlorophénol, 1,5 éq (0,117 mol) de carbonate de potassium et 1,5 éq (0,117 mol) d'iodo méthane sont chauffés à reflux dans 60 ml d'acétone pendant 3h. L'acétone est évaporé sous pression réduite et le résidu obtenu est extrait par l'éther diéthylique (3 x 50 ml). Les phases organiques sont réunies et séchée sur sulfate de magnésium anhydre puis l'éther est évaporé. Le produit obtenu est une huile jaune.

1-chloro-4-méthoxybenzène (44a)

Rendement : 79 %

RMN ¹H(DMSO-d₆, 500 MHz): 3,73 (s, 3H, OCH₃), 6,96 (d, 2H, 3,5-H), 7,33 (d, 2H, 2,6-H).**1-fluoro-4-méthoxybenzène (44b)**

Ce dérivé est obtenu en suivant les conditions expérimentales décrites pour le composé (44a) à partir de 10g de 4-fluorophénol (0,089mol) et d'iodométhane (0,113 mol, 1,5 éq). Le résidu obtenu (huile jaune) est purifié par chromatographie sur colonne (10% acétate d'éthyle/ hexane).

Rendement : 58 %

RMN ¹H(DMSO-d₆, 500 MHz) : 3.73 (s, 3H, OCH₃), 6.75 (d, 2H, 3,5-H), 6.86 (d, 2H, 2,6-H).**1-chloro-4-éthoxybenzène (44c)**

Ce dérivé est obtenu en suivant les conditions expérimentales décrites pour le composé (43a) à partir de 10 g de 4-chlorophénol (0,077mol) et d'iodoéthane (0,096 mol, 1,5 éq). Le produit obtenu est une huile incolore.

Rendement : 89 %

RMN ¹H(DMSO-d₆, 500 MHz): 1.32 (t, 3H, OCH₂CH₃), 4.00 (q, 2H, OCH₂CH₃), 6.95 (d, 2H, 3,5-H), 7.30 (d, 2H, 2,6-H).**1-éthoxy-4-fluorobenzène (44d)**

Ce dérivé est obtenu en suivant les conditions expérimentales décrites pour le 1-chloro-4-méthoxybenzène (44a) à partir de 10 g de 4-fluorophénol (0,089mol) et d'iodoéthane (0,111 mol).

Rendement : 77 %**RMN ¹H(DMSO-d₆, 500 MHz):****Méthode générale de synthèse de 46a-d**

Dans un tricol de 250 ml, muni d'un système d'agitation magnétique, d'un thermomètre, d'une garde à chlorure de calcium et d'une ampoule à réactif, sont introduits (0,06 mol) de 1-chloro-4-méthoxybenzène (44a-d) en solution dans 50 ml de chloroforme pur. La solution est refroidie à 0°C, puis est additionnée goutte à goutte de 15 ml (0,225 mole) d'acide chlorosulfonique. Une fois l'addition terminée, le milieu réactionnel est porté à température ambiante, puis laissé en contact 2h. Il est ensuite versé sur de la glace pilée, le

mélange obtenu est épuisé au chloroforme. Les extraits organiques sont séchés sur sulfate de sodium puis concentrés sous pression réduite jusqu'à cristallisation. Le chlorure de sulfonyle obtenu est dissous dans 60 ml du dioxane et est ajouté goutte à goutte à 100 ml de NH_4OH concentré. Le mélange réactionnel est évaporé sous pression réduite, le solide obtenu est lavé à l'eau, récolté par filtration et séché.

5-chloro-2-méthoxybenzènesulfonamide (46a)

Rendement	: 45 %
Point de fusion	152-153°C
IR (cm^{-1})	: 3323, 3259 (N-H) ; 1329, 1166 (SO_2)
RMN ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz)	: 3.90 (s, 3H, OCH_3), 7.24 (s, 2H, SO_2NH_2), 7.25 (d, $J=6.9$ Hz, 1H, 3- <u>H</u>), 7.63 (d, $J=7.0$, 1H, 4- <u>H</u>), 7.67 (s, 1H, 6- <u>H</u>).
Analyse élémentaire (%)	: $\text{C}_7\text{H}_8\text{ClNO}_3\text{S}$

	C	H	N	S
Calculés	37,93	3,64	6,32	14,46
Trouvés	38,02	3,64	6,36	14,31

5-fluoro-2-méthoxybenzènesulfonamide (46b)

Ce dérivé est obtenu en suivant les conditions expérimentales décrites à partir de 6,5 g de 1-fluoro-4-méthoxybenzène (**44b**) (0,06 mol).

Rendement	: 39 %
Point de fusion	:174-175°C
IR (cm^{-1})	: 3323, 3259 (N-H) ; 1329, 1166 (SO_2)
RMN ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz)	: 3.89 (s, 3H, OCH_3), 7.22 (s, 2H, SO_2NH_2), 7.24 (dd, 1H, 3- <u>H</u>), 7.43-7.50 (m, 2H, 4,6- <u>H</u>).
Analyse élémentaire (%)	: $\text{C}_7\text{H}_8\text{FNO}_3\text{S}$

	C	H	N	S
Calculés	40,97	3,93	6,83	15,62
Trouvés	41,01	3,92	7,18	15,60

5-chloro-2-éthoxybenzènesulfonamide (46c)

Ce dérivé est obtenu en suivant les conditions expérimentales décrites à partir de 11g de 1-chloro-4-éthoxybenzène (**44c**) (0,07 mol).

Rendement	: 47 %
Point de fusion	: 156-157°C
IR (cm ⁻¹)	: 3367, 3269 (N-H) ; 1321, 1163 (SO ₂)
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 1.36 (t, 3H, OCH ₂ CH ₃), 4.21 (q, 2H, OCH ₂ CH ₃), 7.11 (s, 2H, SO ₂ NH ₂), 7.25 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H, 3-H), 7.61 (dd, <i>J</i> = 8.8, 2.8 Hz, 1H, 4-H), 7.67 (d, <i>J</i> = 2.8 Hz, 1H, 6-H).
Analyse élémentaire (%)	: C ₈ H ₁₀ ClNO ₃ S ; 235,69

	C	H	N	S
Calculés	40,77	4,28	5,94	13,60
Trouvés	40,97	4,35	6,08	13,74

2-éthoxy-5-fluorobenzènesulfonamide (46d)

Ce dérivé est obtenu en suivant les conditions expérimentales décrites à partir de 11g de 1-éthoxy-4-fluorobenzène (**44d**) (0,078 mole).

Rendement	: 49 %
Point de fusion	: 142°C
IR (cm ⁻¹)	: 3361, 3263 (N-H) ; 1325, 1162 (SO ₂)
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 1.36 (t, 3H, OCH ₂ CH ₃), 4.19 (q, 2H, OCH ₂ CH ₃), 7.09 (s, 2H, SO ₂ NH ₂), 7.24 (dd, 1H, 3-H), 7.41 (dd, 1H, 4-H), 7.49 (dd, 1H, 6-H).
Analyse élémentaire (%)	: C ₈ H ₁₀ FNO ₃ S ; 219,24

	C	H	N	S
Calculés	43,83	4,60	6,39	14,62
Trouvés	43,10	4,82	6,74	14,49

VI.2.2.2.Synthèse des molécules finales

Les dérivés urées

Mode opératoire général de synthèse

A une solution de 500 mg du sulfonamide approprié (voir intermédiaires réactionnels) dans un minimum de DMF refroidie à 0°C, est ajouté 0,1g de NaH. Le mélange est agité pendant 15 minutes puis 1,5 éq d'un isocyanate approprié sont ajoutés. La solution ainsi formée est agitée à température ambiante pendant 2 heures puis versée dans 20 ml d'eau et filtrée. Le filtrat est acidifié avec une solution d'HCl. Le précipité formé est filtré, lavé à l'eau et séché.

N-isopropyl-N'-(5-chloro-2-méthoxybenzènesulfonyl)urée (47a)

Rendement	: 76 %
Point de fusion	: 198-199°C
IR (cm ⁻¹)	: 3338 (N-H) ; 1666 (C=O) ; 1340, 1161 (SO ₂)
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 0,98 (t, 6H, CH(CH ₃) ₂), 3,55 (st, 1H, CH(CH ₃) ₂), 3,90(s, 3H, OCH ₃), 6,22 (d, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H, NHCH), 7,28 (d, 1H, 3-H), 7.71 (m, 2H, 4, 6-H), 10,25 (s, 1H, SO ₂ NHCO).
δ (ppm)	
Analyse élémentaire (%)	: C ₁₁ H ₁₅ ClN ₂ O ₄ S ; 306,77

	C	H	N	S
Calculés	43,07	4,93	9,13	10,45
Trouvés	43,11	4,95	9,30	10,42

N-pentyl-N'-(5-chloro-2-méthoxybenzènesulfonyl)urée (47b)

Rendement	: 70 %
Point de fusion	: 147-148°C
IR (cm ⁻¹)	: 3326 (N-H) ; 1657 (C=O) ; 1351,1160 (SO ₂).
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 0,81 (t, 3H, CH ₃ (CH ₂) ₄), 1.11 (m, 2H, CH ₃ CH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₂), 1.21 (m, 2H, CH ₃ CH ₂ (CH ₂) ₃), 1.30 (m, 2H, CH ₃ (CH ₂) ₂ CH ₂ CH ₂), 2.92 (q, 2H, CH ₃ (CH ₂) ₃ CH ₂), 3.90(s, 3H, OCH ₃), 6.37 (t, 1H, NHCH ₂), 7.28 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H, 3-H), 7.69 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz 1H, 4-H), 7.71 (s, 1H, 6-H), 10.44 (s, 1H, SO ₂ NHCO).
δ (ppm)	
Analyse élémentaire (%)	: C ₁₃ H ₁₉ ClN ₂ O ₄ S ; 334,85

	C	H	N	S
Calculés	46,63	5,72	8,37	9,58
Trouvés	46,60	5,73	8,59	9,64

N-phényl-N'-(5-chloro-2-méthoxybenzènesulfonyl)urée (47c)

Rendement	: 43 %
Point de fusion	: 176-177°C
IR (cm ⁻¹)	: 3344 (N-H) ; 1687 (C=O) ; 1353, 1164 (SO ₂)
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 3.92 (s, 3H, OCH ₃), 7.02 (t, 1H, 4'-H), 7.25 (d, 2H, 3', 5'-H), 7.28 (d, 1H, 3-H), 7.31(d, 2H, 2',6'-H), 7.72 (dd, 1H, 4-H), 7.77(d, 1H, 6-H), 8.71 (s, 1H, NH ₂ C ₆ H ₅), 10.40 (s, 1H, SO ₂ NHCO).
Analyse élémentaire (%)	: C ₁₄ H ₁₃ ClN ₂ O ₄ S ; 340,78

	C	H	N	S
Calculés	49,34	3,85	8,22	9,41
Trouvés	49,32	4,08	8,19	9,01

N-(4-fluorophényl)-N'-(5-chloro-2-méthoxybenzènesulfonyl)urée (47d)

Rendement	: 30 %
Point de fusion	: 270 °C
IR (cm ⁻¹)	: 3334 (N-H) ; 1638 (C=O) ; 1315, 1153 (SO ₂)
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 3,92 (s, 3H, OCH ₃), 7.02 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz x (2), 2H, 3', 5'-H), 7.29 (d, <i>J</i> = 9 Hz, 1H, 3-H), 7.34(m, 2H, 2',6'-H), 7.72 (dd, <i>J</i> = 9, 2.7 Hz, 1H, 4-H), 7.77(d, <i>J</i> = 2.5 Hz, 1H, 6-H), 7.95 (s, 1H, NH ₂ C ₆ H ₄ F), 10.10 (s, 1H, SO ₂ NHCO).
Analyse élémentaire (%)	: C ₁₄ H ₁₂ ClFN ₂ O ₄ S ; 358,78

	C	H	N	S
Calculés	46,87	3,37	7,81	8,94
Trouvés	47,15	3,42	8,01	8,84

N-isopropyl-N'-(5-fluoro-2-méthoxybenzènesulfonyl)urée (47h)

Rendement	: 85,7 %
Point de fusion	: 193,5-194°C
IR (cm ⁻¹)	: 3338 (N-H) ; 1664 (C=O) ; 1340,1156 (SO ₂).
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 3.10 (d, 6H, (CH ₃) ₂ CH), 3.55 (m, 1H, (CH ₃) ₂ CH), 3.90 (s, 3H, OCH ₃), 6.20 (d, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H, NHCH ₂ CH ₃), 7.28 (d, 1H, 3-H), 7.51 (dd, 1H, 4-H), 7.53 (d, 1H, 6-H), 10.20 (s, 1H, SO ₂ NHCO).
Analyse élémentaire (%)	: C ₁₁ H ₁₅ FN ₂ O ₄ S ; 290,31

	C	H	N	S
Calculés	45,51	5,21	9,65	11,04
Trouvés	45,50	5,17	9,82	11,16

N-isopropyl-N'-(5-chloro-2-éthoxybenzènesulfonyl)urée (47j)

Rendement	: 49 %
Point de fusion	: 173-174°C
IR (cm ⁻¹)	: 3346 (N-H) ; 1670 (C=O) ; 1337,1163(SO ₂)
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 0.99 (d, 6H, (CH ₃) ₃ CH), 1.34 (t, 3H, CH ₃ CH ₂ O), 3.55(m, 1H, (CH ₃) ₃ CH), 4.21 (q, 2H, CH ₃ CH ₂ O), 6.25 (d, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H, NHCH), 7.27 (d, <i>J</i> = 9.1 Hz 1H, 3-H), 7.66 (dd, <i>J</i> = 9.0, 2.5 Hz, 1H, 4-H), 7.71 (d, <i>J</i> = 2.5 Hz, 1H, 6-H), 10.04 (s, 1H, SO ₂ NHCO).
Analyse élémentaire (%)	: C ₁₂ H ₁₇ ClN ₂ O ₄ S ; 320,79

	C	H	N	S
Calculés	44,99	5,34	8,73	9,99
Trouvés	45,21	5,52	8,83	9,53

N-cyclohexyl-N'-(5-chloro-2-éthoxybenzènesulfonyl)urée (47k)

Rendement	: 72 %
Point de fusion	: 189-190°C
IR (cm ⁻¹)	: 3357 (N-H) ; 1667 (C=O) ; 1340, 1161 (SO ₂)
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 1.05-1.64 (m, 10H, CH ₂ cyclohexyle), 1.34 (t, 3H, CH ₃ CH ₂ O), 3.29 (b, 1H, NHCH), 4.21 (q, 2H, CH ₃ CH ₂ O), 6.33 (d, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H, NHCH), 7.27 (d, <i>J</i> = 9.1 Hz, 1H, 3-H), 7.66 (dd, <i>J</i> = 9.0, 2.7 Hz, 1H, 4-H), 7.70 (d, <i>J</i> = 2.5 Hz, 1H, 6-H), 10.00 (s, 1H, SO ₂ NHCO).
Analyse élémentaire (%)	: C ₁₅ H ₂₁ ClN ₂ O ₄ S ; 360,86

	C	H	N	S
Calculés	49,93	5,87	7,76	8,88
Trouvés	49,78	5,87	8,10	8,67

N-phényl-N'-(5-chloro-2-éthoxybenzènesulfonyl)urée (47l)

Rendement	: 31 %
Point de fusion	: 194°C
IR (cm ⁻¹)	: 3341 (N-H) ; 1687 (C=O) ; 1352, 1159 (SO ₂)
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 1.32 (t, 3H, CH ₃ CH ₂ O), 4.22 (q, 2H, CH ₃ CH ₂ O), 7.02 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 1H, 4'-H), 7.24 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H, 3-H), 7.28 (d, 2H, 3',5'-H), 7.30 (d, 2H, 2',6'-H), 7.70 (dd, <i>J</i> = 9.0, 2.7 Hz, 1H, 4-H), 7.77 (d, <i>J</i> = 2.8 Hz, 1H, 6-H), 8.74 (s, 1H, NH ₂ C ₆ H ₅), 10.30 (s, 1H, SO ₂ NHCO).
Analyse élémentaire (%)	: C ₁₅ H ₁₅ ClN ₂ O ₄ S ; 354,81

	C	H	N	S
Calculés	50,78	4,26	7,90	9,04
Trouvés	50,76	4,31	8,10	9,53

Les dérivés thiourées

Ces dérivés sont obtenus en suivant les conditions expérimentales décrites pour les composés précédents (les dérivés urées) à partir des sulfonamides déjà préparés (44 a-d) et d'isothiocyanates appropriés.

N-éthyl-N'-(5-chloro-2-méthoxybenzènesulfonyl)thiourée (47e)

Rendement	: 69 %
Point de fusion	: 206-208°C
IR (cm ⁻¹)	: 3335 (N-H) ; 1181 (C=S) ; 1341,1138 (SO ₂).
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 1,00 (t, 3H, CH ₃ CH ₂), 3,42 (qt, 2H, CH ₃ CH ₂), 3,90(s, 3H, OCH ₃), 7.29 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H, 3-H), 7.72 (dd, <i>J</i> = 9.0, 2.7 Hz, 1H, 4-H), 7.76 (d, <i>J</i> = 2.5 Hz, 1H, 6-H), 8.37 (s, 1H, NHCH ₂ CH ₃), 11.28 (s, 1H, SO ₂ NHCS).
Analyse élémentaire (%)	: C ₁₀ H ₁₃ ClFN ₂ O ₃ S ₂ ; 308,8

	C	H	N	S
Calculés	38,89	4,24	9,07	20,76
Trouvés	38,76	4,25	9,13	20,68

N-isopropyl-N'-(5-chloro-2-méthoxybenzènesulfonyl)thiourée (47f)

Rendement	: 75 %
Point de fusion	: 209-210°C
IR (cm ⁻¹)	: 3338 (N-H) ; 1340,1150 (SO ₂)
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 1,00 (d, 6H, (CH ₃) ₂ CH ₂), 3,55 (st, 1H, (CH ₃) ₂ CH ₂), 3,90(s, 3H, OCH ₃), 6.25 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 1H, NHCH), 7.28 (d, <i>J</i> = 9.8 Hz, 1H, 3-H), 7.69 (d, <i>J</i> = 9.8 Hz, 1H, 4-H), 7.71 (s, 1H, 6-H), 10.28 (s, 1H, SO ₂ NHCS).
Analyse élémentaire (%)	: C ₁₁ H ₁₅ ClFN ₂ O ₃ S ₂ ; 322,84

	C	H	N	S
Calculés	40,92	4,68	8,68	19,86
Trouvés	41,02	4,78	8,60	19,62

N-benzyl-*N'*-(5-chloro-2-méthoxybenzènesulfonyl)thiourée (47g)

Rendement	: 60%
Point de fusion	: 184°C
IR (cm ⁻¹)	: 3338 (N-H) ; 1164 (C=S) ; 1351,1137 (SO ₂).
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 3.84 (s, 3H, OCH ₃), 4.67(d, <i>J</i> = 5.4 Hz, 2H, NHCH ₂),
δ (ppm)	7.14 (d, <i>J</i> = 6.9 Hz, 2H, 2',6'-H), 7.23 (d, 1H, 4'-H), 7.28 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H, 3-H), 7.30 (d, <i>J</i> = 6.8 Hz, 2H, 3',5'-H), 7.73 (dd, <i>J</i> = 8.8, 2.5 Hz, 1H, 4-H), 7.77 (d, <i>J</i> = 2.5 Hz, 1H, 6-H), 8.76 (t, <i>J</i> = 5.5 Hz, 1H, NHCH ₂), 11.45 (s, 1H, SO ₂ NHCS).
Analyse élémentaire (%)	: C ₁₅ H ₁₅ ClFN ₂ O ₃ S ₂ ; 370,88

	C	H	N	S
Calculés	48,58	4,08	7,55	17,29
Trouvés	48,47	4,14	7,69	16,90

N-isopropyl-*N'*-(5-fluoro-2-méthoxybenzènesulfonyl)thiourée (47i)

Rendement	: 85%
Point de fusion	: 179-180°C
IR (cm ⁻¹)	: 3323 (N-H) ; 1156 (C=S) ; 1341,1136 (SO ₂).
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 1.10 (d, 6H, (CH ₃) ₂ CH), 3.89 (s, 3H, OCH ₃), 4.19 (m,
δ (ppm)	1H, (CH ₃) ₂ CH), 7.30 (dd, <i>J</i> = 9.1, 4.1 Hz, 1H, 3-H), 7.55 (dd, <i>J</i> = 9.0, 3.2 Hz, 1H, 4-H), 7.57 (d, <i>J</i> = 3.2 Hz, 1H, 6-H), 8.15 (d, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H, NHCH), 11.08 (s, 1H, SO ₂ NHCS).
Analyse élémentaire (%)	: C ₁₁ H ₁₅ FN ₂ O ₃ S ₂ ; 306,39

	C	H	N	S
Calculés	43,12	4,93	9,14	20,93
Trouvés	43,07	4,94	9,16	20,70

N-isopropyl-N'-(5-chloro-2-éthoxybenzènesulfonyl)thiourée (47m)

Rendement	: 35%
Point de fusion	: 150-151°C
IR (cm ⁻¹)	: 3327 (N-H) ; 1197 (C=S) ; 1345, 1158 (SO ₂)
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 1.09 (d, <i>J</i> = 6.3 Hz, 6H, (CH ₃) ₂ CH), 1.33 (t, <i>J</i> = 6.9 x(2) Hz, 3H, CH ₃ CH ₂ O), 4.16 (m, 1H, (CH ₃) ₂ CH), 4.20 (q, 2H, CH ₃ CH ₂ O), 7.29 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H, 3-H), 7.70 (dd, <i>J</i> = 8.8, 2.4 Hz, 1H, 4-H), 7.76 (d, <i>J</i> = 2.5 Hz, 1H, 6-H), 8.14 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 1H, NHCH), 10.90 (s, 1H, SO ₂ NHCS).
δ (ppm)	
Analyse élémentaire (%)	: C ₁₂ H ₁₇ ClN ₂ O ₃ S ₂ ; 336,86

	C	H	N	S
Calculés	42,79	5,09	8,32	19,03
Trouvés	42,53	5,13	8,52	18,79

N-benzyl-N'-(5-chloro-2-éthoxybenzènesulfonyl)thiourée (47n)

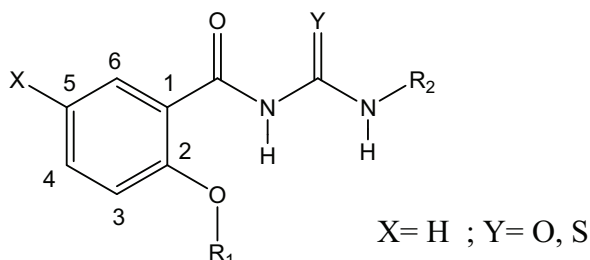
Rendement	: 68%
Point de fusion	: 185-186°C
IR (cm ⁻¹)	: 3311 (N-H) ; 1165 (C=S) ; 1355, 1138 (SO ₂)
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 1.30 (t, 3H, CH ₃ CH ₂ O), 4.17 (q, 2H, CH ₃ CH ₂ O), 4.66 (d, 2H, CH ₂ C ₆ H ₅), 7.14 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H, 2',6'-H), 7.24 (d, <i>J</i> = 6.9 Hz, 1H, 4'-H), 7.25 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H, 3-H), 7.27(d, <i>J</i> = 7.0 Hz, 2H, 3',5'-H), 7.70 (dd, <i>J</i> = 9.0, 2.4 Hz, 1H, 4-H), 7.78 (d, <i>J</i> = 2.2 Hz 1H, 6-H), 8.74 (t, <i>J</i> = 5.0 x (2) Hz, 1H, NHCH ₂), 11.33 (s, 1H, SO ₂ NHCS).
δ (ppm)	
Analyse élémentaire (%)	: C ₁₆ H ₁₇ ClN ₂ O ₃ S ₂ ; 384,91

	C	H	N	S
Calculés	49,93	4,45	7,28	16,66
Trouvés	50,14	4,52	7,67	16,63

***N*-(4-fluorophényl)-*N'*-(5-chloro-2-éthoxybenzènesulfonyl)thiourée (47o)**

Rendement	: 42,5%
Point de fusion	: 181-182°C
IR (cm ⁻¹)	: 3299 (N-H) ; 1169 (C=S) ; 1148 (SO ₂)
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 1.30 (t, 3H, CH ₃ CH ₂ O), 4.23 (q, 2H, CH ₃ CH ₂ O), 7.18 (t, $J = 8.7 \times (2)$ Hz, 2H, 2',6'-H), 7.29 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, 3-H), 7.47 (m, 2H, 3',5'-H), 7.70 (dd, $J = 8.2, 2.4$ Hz, 1H, 4-H), 7.79 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, 6-H), 10.05 (s, 1H, NH ₂ C ₆ H ₅), 11.33 (s, 1H, SO ₂ NHCS).
Analyse élémentaire (%)	: C ₁₅ H ₁₄ ClFN ₂ O ₃ S ₂ ; 388,86

	C	H	N	S
Calculés	46,37	3,63	7,20	16,49
Trouvés	46,80	3,86	7,41	16,55

VI.2.3. Molécules de la série III**VI.2.3.1. Synthèse des intermédiaires réactionnels****Méthode générale de synthèse de 48a-c**

Un mélange de 2-hydroxybenzamide (1g, 7,3 mmol) et de NaOH (0,4g, 10 mmol) est dissous dans l'éthanol (40 mL). Après 20 min, 1,5 éq d'iodo méthane (10,95 mmol) est ajouté et le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant 6 h. A la fin de la réaction, l'excès du solvant est évaporé sous pression réduite, le produit obtenu est lavé abondamment à l'eau, filtré et séché.

2-méthoxybenzamide (48a)

Aspect	: poudre blanche
Rendement	: 90%
Point de fusion	: 128°C
IR (cm ⁻¹)	: 3412 (N-H), 3169 (C-H aromatic), 1644 (C=O)
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 3.88 (s, 3H, CH ₃), 7.02 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H, arom 5-H),
δ (ppm)	7.12 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz 1H, arom 3-H), 7.45 (d, <i>J</i> = 1.9 Hz, 1H, arom 4-H), 7.62 (s, 2H, CONH ₂), 7.80 (dd, <i>J</i> = 7.6, 1.6 Hz, 1H, arom 6-H).
Analyse élémentaire (%)	: C ₈ H ₆ NO ₂

	C	H	N
Calculés	63,56	6,00	9,27
Trouvés	63,10	5,96	9,38

2-propyloxybenzamide (48b).

Ce dérivé est obtenu en suivant les conditions expérimentales décrites pour le composé (48a) à partir de 1g 2-hydroxybenzamide (7,3 mmol) et de 1-bromopropane (10,95 mmol).

Aspect	: poudre blanche
Rendement	: 92%
Point de fusion	: 101°C
IR (cm ⁻¹)	: 3446 (N-H), 3179 (C-H aromatic), 2965 (C-H aliphatic),
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	1654 (C=O)
δ (ppm)	: 1.00 (t, 3H, CH ₃), 1.80 (m, 2H, CH ₂), 4.09 (q, 2H, OCH ₂), 7.02 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H, arom 5-H), 7.12 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H, arom 3-H), 7.45 (dd, <i>J</i> = 8.5, 7.1 Hz, 1H, arom 4-H), 7.55 (s, 2H, CONH ₂), 7.80 (d, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H, arom 6-H).
Analyse élémentaire (%)	: C ₁₀ H ₁₃ NO ₂

	C	H	N
Calculés	67,02	7,31	7,82
Trouvés	67,22	7,43	7,78

2-benzyloxybenzamide (48c)

Aspect	: poudre blanche
Rendement	: 95%
Point de fusion	: 115-116°C
IR (cm ⁻¹)	: 3404 (N-H), 3190 (C-H aromatic), 1640 (C=O).
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 5.25 (s, 2H, CH ₂), 7.03 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H, arom 5- <i>H</i>),
δ (ppm)	7.21 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H, arom 3- <i>H</i>), 7.42 (m, 5H, arom),
	7.44 (d, <i>J</i> = 6.9 Hz, 1H, arom 4- <i>H</i>), 7.59 (s, 2H, CONH ₂),
	7.78 (dd, <i>J</i> = 7.7, 1.7 Hz 1H, arom 6- <i>H</i>). :
Analyse élémentaire (%)	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂

	C	H	N
Calculés	73,99	5,77	6,16
Trouvés	73,63	5,62	6,27

VI.2.3.1.Synthèse des molécules finales**Les dérivés urées****Mode opératoire général de synthèse des dérivés urées ou thiourées (49a-u)**

A une solution de 500 mg de l'un des benzamides déjà synthétisés dans un minimum de DMF refroidie à 0°C, on ajoute 100 mg de NaH. Le mélange est agité pendant 15 min, puis un isocyanate ou thioisocyanate approprié est ajouté. La solution ainsi formé est agité à température ambiante jusqu'à la fin de la réaction suivie par CCM. Le mélange est versé dans de l'eau froide et acidifié avec une solution d'HCl 1N. Le précipité formé est filtré, lavé à l'eau et séché.

***N*-éthyl-*N'*-(2-méthoxybenzèncarbonyl)urée (49a)**

Aspect	: poudre blanche
Rendement	: 50%
Point de fusion	: 70-72°C
IR (cm ⁻¹)	:3337 (N-H), 2925 (C-H aliphatic), 1706, 1673 (C=O).
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 1.11 (t, 3H, CH ₃ CH ₂), 3.23 (m, 2H, CH ₃ CH ₂), 3,91 (s,
δ (ppm)	3H, OCH ₃), 7.07 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H, 5- <u>H</u>), 7.19 (d,
	<i>J</i> = 8.2 Hz, 1H, 3- <u>H</u>), 7.55 (m, 1H, 4- <u>H</u>), 7.69 (dd, <i>J</i> = 7.7,
	1.7 Hz, 1H, 6- <u>H</u>), 8.49 (t, 1H, NHCH ₂ CH ₃), 10.04(s, 1H,

CONHCO).

Analyse élémentaire (%) : C₁₁H₁₄N₂O₃

	C	H	N
Calculés	59,45	6,35	12,61
Trouvés	60,59	6,52	12,24

N-isopropyl-N'-(2-méthoxybenzènegcarbonyl)urée (49b)

Aspect : poudre blanche

Rendement : 85%

Point de fusion : 92°C

IR (cm⁻¹) : 3287 (N-H), 2925 (C-H aliphatic), 1672 (C=O)

RMN ¹H(DMSO-d₆, 500 MHz) : 1.17 (d, 6H, (CH₃)₂CH), 3.83 (m, 1H, (CH₃)₂CH), 3.91 (s, 3H, OCH₃), 7.07 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, 5-H), 7.19 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, 3-H), 7.55 (m, 1H, 4-H), 7.69 (dd, *J* = 7.6, 1.6 Hz, 1H, 6-H), 8.39 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H, NHCH(CH₃)₂), 10.05(s, 1H, CONHCO)

Analyse élémentaire (%) : C₁₂H₁₆N₂O₃

	C	H	N
Calculés	61,00	6,83	11,86
Trouvés	60,27	6,93	11,35

N-sec-butyl-N'-(2-méthoxybenzènegcarbonyl)urée (49c)

Aspect : poudre blanche

Rendement : 80%

Point de fusion : 65-65,5°C

IR (cm⁻¹) : 3346, 3287 (N-H), 2968 (C-H aliphatic), 1690, 1660 (C=O).

RMN ¹H(DMSO-d₆, 500 MHz) : 0.88 (t, 3H, (CH₃CH₂)CH₃CH), 1.14 (d, 1H, (CH₃CH₂)CH₃CH), 1.50 (m, 2H, (CH₃CH₂)CH₃CH), 3.72 (m, 1H, (CH₃CH₂)CH₃CH), 3.91 (s, 3H, OCH₃), 7.08 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, 5-H), 7.19 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, 3-H), 7.55 (m, 1H, 4-H), 7.71 (dd, *J* = 7.6, 1.6 Hz, 1H, 6-H), 8.39 (d, *J*

= 7.6 Hz, 1H, $\text{NHCHCH}_3(\text{CH}_2\text{CH}_3)$, 10.05(s, 1H, CONHCO).

Analyse élémentaire (%) : $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$

	C	H	N
Calculés	62,38	7,25	11,19
Trouvés	62,07	7,32	10,95

N-cyclohexyl-N'-(2-méthoxybenzenecarbonyl)urée (49d)

Aspect : poudre blanche

Rendement : 81%

Point de fusion : 102-102,5°C

IR (cm^{-1}) : 3346, 3279 (N-H), 2922 (C-H aliphatic), 1705, 1666 (C=O)

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) : 1.18-1.90 (m, 10H, C_6H_{10}), 3.61(b, 1H, CHNH), 3.91 (s, 3H, OCH_3), 7.07 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, 5-H), 7.19 (d, $J = 8.2$ Hz 1H, 3-H), 7.55 (m, 1H, 4-H), 7.70 (dd, $J = 7.6$, 1.6 Hz, 1H, 6-H), 8.50 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, $\text{NHC}_6\text{H}_{11}$), 10.06(s, 1H, CONHCO).

Analyse élémentaire (%) : $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$

	C	H	N
Calculés	65,20	7,30	10,14
Trouvés	65,40	7,54	10,22

N-phényl-N'-(2-méthoxybenzenecarbonyl)urée (49e)

Aspect : poudre blanche

Rendement : 40%

Point de fusion : 134°C

IR (cm^{-1}) : 3238 (N-H), 1703, 1670 (C=O)

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) : 3.91 (s, 3H, OCH_3), 7.11 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, 5-H, 4'-H), 7.22 (d, 1H, 3-H), 7.36 (m, 2H, 3',5'-H), 7.57 (m, 3H, 4, 2', 6'-H), 7.73 (dd, $J = 7.6$, 1.6 Hz, 1H, 6-H), 10.46 (s, 1H, NHC_6H_5), 10.70 (s, 1H, CONHCO).

Analyse élémentaire (%) : C₁₅H₁₄N₂O₃

	C	H	N
Calculés	66,66	5,22	10,36
Trouvés	65,57	5,20	9,97

N-cyclohexyl-N'-(2-propyloxybenzènegcarbonyl)urée (49f)

Aspect : poudre blanche
 Rendement : 80%
 Point de fusion : 73-74°C
 IR (cm⁻¹) : 3355, 3280 (N-H), 2919 (C-H aliphatic), 1707, 1667 (C=O)
 RMN ¹H(DMSO-d₆, 500 MHz) : 1.03 (t, 3H, CH₃CH₂CH₂), 1.20-1.90 (m, 10H, C₆H₁₀),
 δ (ppm) 1.80 (m, 2H, CH₃CH₂CH₂), 3.61(b, 1H, CHNH), 4.12 (t, 3H, CH₃CH₂CH₂), 7.07 (t, J = 7.5 Hz, 1H, 5-H), 7.21 (d, J = 8.5 Hz, 1H, 3-H), 7.55 (m 1H, 4-H), 7.70 (dd, J = 7.7, 1.7 Hz, 1H, 6-H), 8.49 (d, J = 7.3 Hz, 1H, NHC₆H₁₁), 10.08(s, 1H, CONHCO).
 Analyse élémentaire (%) : C₁₇H₂₄N₂O₃

	C	H	N
Calculés	67,08	7,95	9,20
Trouvés	66,91	8,20	9,07

N-phenyl-N'-(2-propyloxybenzènegcarbonyl)urée (49g)

Aspect : poudre blanche
 Rendement : 64%
 Point de fusion : 72°C
 IR (cm⁻¹) : 3330 (N-H), 1715, 1664 (C=O)
 RMN ¹H(DMSO-d₆, 500 MHz) : 1.03 (t, 3H, CH₃CH₂CH₂), 1.84 (m, 2H, CH₃CH₂CH₂),
 δ (ppm) 4.12 (t, 3H, CH₃CH₂CH₂), 7.13 (t, 2H, 5, 4'-H), 7.23 (d, 1H, 3-H), 7.36 (t, 2H, 3', 5'-H), 7.59 (t, 3H, 4, 2', 6'-H), 7.84 (dd, 1H, 6-H), 10.45 (s, 1H, NHC₆H₅), 10.70 (s, 1H, CONHCO).

Analyse élémentaire (%) : C₁₇H₁₈N₂O₃

	C	H	N
Calculés	68,44	6,08	9,39
Trouvés	68,04	6,50	9,34

N-éthyl-N'-(2-benzyloxybenzènegcarbonyl)urée (49h)

Aspect : poudre blanche

Rendement : 40%

Point de fusion : 74-75°C

IR (cm⁻¹) : 3335 (N-H), 2925 (C-H aliphatic), 1698, 1660 (C=O)

RMN ¹H(DMSO-d₆, 500 MHz) : 1.09 (t, 3H, CH₃CH₂), 3.22 (q, 2H, CH₃CH₂), 5.27(s,2H, CH₂), 7.09 (t, *J* = 7.1 Hz; 1H, 5-H), 7.28 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, 3-H), 7.34-7.54 (m, 5H, CH₂C₆H₅), 7.55 (m, 1H, 4-H), 7.71 (dd, *J* = 7.5, 1.6 Hz, 1H, 6-H), 8.47 (bs, 1H, NHCH₂CH₃), 10.14(s, 1H, CONHCO).

Analyse élémentaire (%) : C₁₇H₁₈N₂O₃

	C	H	N
Calculés	68,44	6,08	9,39
Trouvés	68,44	6,28	9,10

N-isopropyl-N'-(2-benzyloxybenzènegcarbonyl)urée (49i)

Aspect : poudre blanche

Rendement : 87%

Point de fusion : 84-85°C

IR (cm⁻¹) : 3341, 3286 (N-H), 2925 (C-H aliphatic), 1690, 1664 (C=O).

RMN ¹H(DMSO-d₆, 500 MHz) : 1.15 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H, (CH₃)₂CH), 3.87 (m, 1H, (CH₃)₂CH), 5.27 (s, 2H, CH₂), 7.09 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, 5-H), 7.28 (d, 1H, 3-H), 7.34-7.54 (m, 5H, CH₂C₆H₅), 7.55 (m, 1H, 4-H), 7.71 (dd, *J* = 7.6, 1.6 Hz, 1H, 6-H), 8.36 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H, NHCH(CH₃)₂), 10.17(s, 1H, CONHCO).

Analyse élémentaire (%) : C₁₈H₂₀N₂O₃

	C	H	N
Calculés	69,21	6,48	8,97
Trouvés	68,98	6,96	8,59

N-pentyl-N'-(2-benzyloxybenzènegcarbonyl)uréé (49j)

Aspect : poudre blanche
 Rendement : 45%
 Point de fusion : 74°C
 IR (cm⁻¹) : 3350, 3300 (N-H), 2900 (C-H aliphatic), 1695, 1652 (C=O)
 RMN ¹H(DMSO-d₆, 500 MHz) : 0,96 (t, 3H, CH₃(CH₂)₄), 1.29 (m, 2H, CH₃CH₂CH₂(CH₂)₂), 1.33 (m, 2H, CH₃CH₂(CH₂)₃), 1.50 (m, 2H, CH₃(CH₂)₂CH₂CH₂), 3.16 (q, 2H, CH₃(CH₂)₃CH₂), 5.27 (s, 2H, CH₂), 7.09 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, 5-H), 7.28 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 3-H), 7.34-7.51 (m, 5H, CH₂C₆H₅), 7.55 (m, 1H, 4-H), 7.71 (dd, *J* = 7.6, 1.7 Hz, 1H, 6-H), 8.37 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, NHCH), 10.15(s, 1H, CONHCO).
 Analyse élémentaire (%) : C₂₀H₂₄N₂O₃

	C	H	N
Calculés	70,56	7,11	8,23
Trouvés	70,36	6,98	8,34

N-sec-butyl-N'-(2-benzyloxybenzènegcarbonyl)uréé (49k)

Aspect : poudre blanche
 Rendement : 65%
 Point de fusion : 62-63°C
 IR (cm⁻¹) : 3270 (N-H), 2962 (C-H aliphatic), 1687, 1661 (C=O)
 RMN ¹H(DMSO-d₆, 500 MHz) : 0.87 (t, 3H, (CH₃CH₂)CH₃CH), 1.12 (d, 1H, (CH₃CH₂)CH₃CH), 1.49 (m, 2H, (CH₃CH₂)CH₃CH), 3.71 (m, 1H, (CH₃CH₂)CH₃CH), 5.27 (s, 2H, CH₂), 7.09 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, 5-H), 7.28 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, 3-H), 7.34-

7.51 (m, 5H, CH₂C₆H₅), 7.55 (t, 1H, 4-H), 7.71 (dd, $J = 7.7, 1.7$ Hz, 1H, 6-H), 8.35 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, NHCH), 10.18(s, 1H, CONHCO)

Analyse élémentaire (%) : C₁₉H₂₂N₂O₃

	C	H	N
Calculés	69,92	6,79	8,58
Trouvés	70,30	7,13	8,28

N-cyclohexyl-N'-(2-benzyloxybenzènegcarbonyl)urée (49l)

Aspect : poudre blanche

Rendement : 82%

Point de fusion : 91-92°C

IR (cm⁻¹) : 3273 (N-H), 2929 (C-H aliphatic), 1689, 1666 (C=O)

RMN ¹H(DMSO-d₆, 500 MHz) : 1.20-1.90 (m, 10H, C₆H₁₀), 3.59 (b, 1H, CHNH), 5.27 (s, 2H, CH₂), 7.09 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, 5-H), 7.28 (d, 1H, 3-H), 7.34-7.51 (m, 5H, CH₂C₆H₅) 7.55 (t, 1H, 4-H), 7.71 (dd, 1H, 6-H), 8.46 (d, 1H, NHC₆H₁₁), 10.08 (s, 1H, CONHCO).

Analyse élémentaire (%) : C₁₇H₂₄N₂O₃

	C	H	N
Calculés	71,57	6,86	7,95
Trouvés	71,30	7,05	7,74

N-benzyl-N'-(2-benzyloxybenzènegcarbonyl)urée (49m)

Aspect : poudre blanche

Rendement : 40%

Point de fusion : 100-101°C

IR (cm⁻¹) : 3324, 3284 (N-H), 3031 (C-H aromatic), 1692, 1660 (C=O)

RMN ¹H(DMSO-d₆, 500 MHz) : 4.41(s, 2H, NHC₆H₅) 5.27 (s, 2H, OCH₂), 7.09 (t, $J = 7.6$ Hz 1H, 5-H), 7.25 (m, 1H, 3-H), 7.27-7.45(m, 10-H, CH₂C₆H₅), 7.55 (m, 1H, 4-H), 7.72 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, 6-H),

8.93 (t, $J=5.5$ Hz, 1H, NHCH_2), 10.30 (s, 1H, CONHCO).

Analyse élémentaire (%)

: $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$

	C	H	N
Calculés	73,32	5,59	7,77
Trouvés	73,72	5,40	7,58

N-éthyl-N'-(2-méthoxybenzènegcarbonyl)thiourée (49n)

Aspect : poudre blanche

Rendement : 62%

Point de fusion : 79.5°C

IR (cm^{-1}) : 3316 (N-H), 2924 (C-H aliphatic), 1661 (C=O)

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ (ppm) : 1.15 (t, 3H, CH_3CH_2), 3.61 (q, 2H, CH_3CH_2), 3.91 (s, 3H, OCH_3), 7.11 (t, $J=7.6$ Hz, 1H, 5- H), 7.24 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, 3- H), 7.60 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, 4- H), 7.86 (dd, $J= 7.3, 1.7$ Hz, 1H, 6- H), 10.67 (bs, 1H, NHCH_2CH_3), 10.93(s, 1H, CONHCS).

Analyse élémentaire (%)

: $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$

	C	H	N	S
Calculés	55,44	5,92	11,76	13,45
Trouvés	55,70	5,92	11,56	13,47

N-isopropyl-N'-(2-méthoxybenzènegcarbonyl)thiourée (49o)

Aspect : poudre blanche

Rendement : 60%

Point de fusion : 109,5- 110°C

IR (cm^{-1}) : 3317(N-H), 2929 (C-H aliphatic), 1655 (C=O)

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ (ppm) : 1.26 (d, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 3.61 (q, 2H, CH_3CH_2), 3.98 (s, 3H, OCH_3), 4.37 (m, 1H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$) 7.11 (t, $J = 7.6$ Hz 1H, 5- H), 7.24 (d, $J=7.9$ Hz, 1H, 3- H), 7.60 (m, 1H, 4- H), 7.86 (dd, $J=7.7, 1.5$ Hz, 1H, 6- H), 10.67 (bs, 1H, NHCH_2CH_3), 10.93(s, 1H, CONHCS).

Analyse élémentaire (%)

: $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$

	C	H	N	S
Calculés	57,12	6,39	11,10	12,70
Trouvés	57,51	6,50	11,23	13,78

N-sec-butyl-N'-(2-méthoxybenzènegcarbonyl)thiourée (49p)

Aspect	: poudre blanche
Rendement	: 42%
Point de fusion	: 79°C
IR (cm ⁻¹)	: 3308(N-H), 2926 (C-H aliphatic), 1656 (C=O)
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 0.91 (t, 3H, (CH ₃ CH ₂)CH ₃ CH), 1.22 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz, 3H, (CH ₃ CH ₂)CH ₃ CH), 1.63 (m, 2H, (CH ₃ CH ₂)CH ₃ CH), 3,91 (s, 3H, OCH ₃), 4.27 (m, 1H, (CH ₃ CH ₂)CH ₃ CH), 7.12 (t, 1H, 5-H), 7.25 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz 1H, 3-H), 7.61 (t, 1H, 4-H), 7.88 (dd, <i>J</i> =7.6, 1.6 Hz, 1H, 6-H), 10.66 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 1H, NHCHCH ₃ (CH ₂ CH ₃)), 10.94(s, 1H, CONHCS)
Analyse élémentaire (%)	: C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₂ S

	C	H	N	S
Calculés	58,62	6,81	10,52	12,04
Trouvés	58,80	6,88	10,66	11,88

N-phenyl-N'-(2-méthoxybenzènegcarbonyl)thiourée (49q)

Aspect	: poudre blanche
Rendement	: 55%
Point de fusion	: 154°C
IR (cm ⁻¹)	: 3325 (N-H), 1655 (C=O).
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 3.90 (s, 3H, OCH ₃), 6.98-7.50 (m, 9H, H _{arom}), , 8.65 (s, 1H, NHC ₆ H ₅), 9.79 (s, 1H, CONHCS).
Analyse élémentaire (%)	: C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₂ S

	C	H	N	S
Calculés	62,92	4,93	9,78	11,20
Trouvés	62,80	4,93	9,80	11,18

***N*-benzyl-*N'*-(2-méthoxybenzènegarboxyl)thiourée (49r)**

Aspect	: poudre blanche
Rendement	: 62%
Point de fusion	: 93-93,5°C
IR (cm ⁻¹)	: 3333 (N-H), 1657 (C=O)
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 3,99 (s, 3H, OCH ₃), 4.87 (d, 2H, CH ₂), 7.14 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 1H, 5-H), 7.26 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H, 3-H), 7.29-7.42 (m, 5H, CH ₂ C ₆ H ₅), 7.64 (m, 1H, 4-H), 7.87 (dd, <i>J</i> = 7.5, 1.6 Hz, 1H, 6-H), 10.06 (d, <i>J</i> = 5.2 Hz, 1H, NHCH ₂), 11.06 (s, 1H, CONHCS).
δ (ppm)	
Analyse élémentaire (%)	: C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₂ S

	C	H	N	S
Calculés	63,98	5,37	9,33	10,67
Trouvés	63,80	5,35	9,61	10,50

***N*-benzyl-*N'*-(2-propyloxybenzènegarboxyl)thiourée (49s)**

Aspect	: poudre blanche
Rendement	: 67%
Point de fusion	: 86-87°C
IR (cm ⁻¹)	: 3320, 3238 (N-H), 2966 (C-H aliphatic), 1661 (C=O)
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 1.08 (t, 3H, CH ₃ CH ₂ CH ₂), 1.92 (m, 2H, CH ₃ CH ₂ CH ₂), 4.20 (t, 2H, CH ₃ CH ₂ CH ₂), 4.88 (d, <i>J</i> = 5.7 Hz, 2H, NHCH ₂), 7.15 (t, <i>J</i> =7.4 Hz, 1H, 5-H), 7.27 (d, <i>J</i> =8.2 Hz, 1H, 3-H), 7.30 (d, <i>J</i> = 6.9 Hz, 1H, 4'-H)-7.38 (m, 4H, 2',3', 5', 6'-H), 7.64 (m, 1H, 4-H), 7.96 (dd, <i>J</i> =7.6, 1.6 Hz, 1H, 6-H), 11.11 (d, <i>J</i> =5.0 Hz, 1H, NHCH ₂), 11.18 (s, 1H, CONHCS).
δ (ppm)	
Analyse élémentaire (%)	: C ₁₈ H ₂₀ N ₂ O ₂ S

	C	H	N	S
Calculés	65,83	6,14	8,53	9,76
Trouvés	66,03	6,35	8,75	9,97

N-phényl-N'-(2-propyloxybenzènegcarbonyl)thiourée (49t)

Aspect	: poudre blanche
Rendement	: 57%
Point de fusion	: 72-73°C
IR (cm ⁻¹)	: 3446, 3204 (N-H), 3035 (C-H aromatique), 1651 (C=O)
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 0.99 (t, 3H, CH ₃ CH ₂ CH ₂), 1.80 (m, 2H, CH ₃ CH ₂ CH ₂),
δ (ppm)	4.07 (t, 2H, CH ₃ CH ₂ CH ₂), 4.87 (d, 2H, NHCH ₂), 7.12 (t, J = 7.4 Hz, 1H, 5-H), 7.25 (d, J=8.5 Hz, 1H, 3-H), 7.61 (m, 1H, 4-H), 7.88 (d, J=7.6 Hz, 1H, 6-H), 8.61 (t, J = 5.5 Hz, 1H, NHCH ₂), 9.85 (s, 1H, CONHCs).
Analyse élémentaire (%)	: C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₂ S

	C	H	N	S
Calculés	64,94	5,77	8,91	10,20
Trouvés	65,07	5,77	9,03	9,98

N-benzyl-N'-(2-benzyloxybenzènegcarbonyl)thiourée (49u)

Aspect	: poudre blanche
Rendement	: 47%
Point de fusion	: 100-101°C
IR (cm ⁻¹)	: 3290 (N-H), 3030 (C-H aromatique), 1648 (C=O).
RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 500 MHz)	: 4.85(s, 2H, NHCH ₂), 5.35 (s, 2H, OCH ₂), 7.14 (t, J =
δ (ppm)	7.6 Hz, 1H, 5-H), 7.19 (d, 1H, 3-H), 7.28-7.45(m, 10H, CH ₂ C ₆ H ₅), 7.55 (m, 1H, 4-H), 7.72 (d, J = 7.3 Hz, 1H, 6-H), 11.10 (t, J = 5.5 Hz, 1H, NHCH ₂), 11.16 (s, 1H, CONHCs).
Analyse élémentaire (%)	: C ₂₂ H ₂₀ N ₂ O ₂ S

	C	H	N	S
Calculés	70,19	5,35	7,44	8,52
Trouvés	69,93	5,24	7,54	8,71

VI.3. Détermination de la constante d'ionisation (pKa)

La détermination des valeurs des constantes d'ionisation (pKa) des composés choisis a été effectuée par la méthode spectrophotométrique.

D'une part, les composés sélectionnés ont été dissous dans l'eau pour fournir des solutions mère de concentration $2,5 \cdot 10^{-4}$ M, d'autre part, une série de tampons borate et phosphate, de pH allant de 3 à 10, sont préparés selon Sorensen.

Les échantillons à étudier ont été obtenus par mélange de 5 ml de la solution mère avec 20 ml du tampon approprié. Les spectres UV-visibles ont été enregistrés à température ambiante par rapport à un contrôle constitué de 5 ml d'eau et 20 ml du même tampon. La longueur d'onde a été choisie pour enregistrer une différence d'absorbance maximale entre les deux formes ionisée et non ionisée. L'absorbance des espèces neutres et ioniques de la substance a été déterminée d'une manière similaire, en utilisant une solution de la substance à la même concentration à 0,1 N de HCl et de NaOH 0,1N.

Après l'enregistrement de chaque spectre, le pH exact de la solution a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre et le pKa a été calculé en utilisant la formule d'Albert et Sergent [1971].

VI.4. Evaluation pharmacologique

VI.4.1. Modèle aortique

VI.4.1.1. Prélèvement de l'aorte thoracique de rat

Les rats, préalablement anesthésiés avec du pentobarbital, sont disséqués et l'aorte thoracique est prélevée immédiatement, libérée de la graisse et des tissus conjonctifs, et sectionnée en anneaux d'environ 2 à 3 mm d'épaisseur. Ces dernières manipulations sont réalisées le plus délicatement possible dans une solution de Krebs (en mM : NaCl 118, KCl 5.6, CaCl₂.2H₂O 2.4, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2, MgCl₂ 1.2, glucose 11) à température ambiante.

VI.4.1.2. Montage des anneaux aortiques sur leurs supports

Les anneaux de l'aorte thoracique de rat sont suspendus horizontalement dans des bains à organes de capacité de 10 mL, contenant une solution de Krebs thermostatée à 37 °C et dans laquelle barbote du carbogène (mélange O₂/CO₂ : 95/5%). Chaque anneau aortique est posé sur une tige inférieure, fixe, et sur un support triangulaire. Ce dernier est relié par un fil à une jauge de contrainte, qui est relié à un amplificateur, qui permet l'enregistrement de toute variation isométrique de la tension dans le muscle qui sera affichée sur l'écran et sauvegardée.

VI.4.1.3. Mesure de la contraction isométrique résiduelle d'aorte de rat

Les segments d'aorte sont préalablement soumis à une contrainte de 1,5g, exercée manuellement en écartant légèrement les deux tiges. Cette précontrainte correspond à une tension permettant d'avoir une réponse optimale avec 30 mmol/l de KCl. Après 60 min de détente, période au cours de laquelle le liquide du bain est renouvelé toutes les 15 min, les anneaux sont à nouveau soumis à la même contrainte ci-dessus et laissés se détendre pendant 15 min. Ensuite, les anneaux sont contractés par une solution de KCl 30 mM pendant 15 minutes (un plateau est atteint), suivie par une solution d'acétylcholine 5,5 µM qui relâchent les anneaux (dans le cas contraire il faut changer les anneaux et recommencer l'expérience dès le début). Après 15 minutes, les anneaux sont de nouveau contractés par une solution de KCl 30 mM durant un quart d'heure, puis perfusés par des concentrations croissantes des composés jusqu'à relaxation maximale de l'organe ou jusqu'à une concentration de 300 µM. La dose suivante n'est ajoutée que lorsque la réponse à la concentration précédente s'est stabilisée (avoir un palier stable).

VI.4.2. Mesure de la sécrétion statique d'insuline.

VI.4.2.1. Isolement des îlots pancréatiques

Les rats, préalablement assommés, sont tués par exsanguination. Après avoir pratiqué une incision abdominale, l'extrémité du canal cholédoque est clampé à l'aide d'une pince de Kocher. Une fine incision est réalisée dans la partie proximale (hépatique) du canal cholédoque et un petit cathéter y est inséré. Ce dernier est ensuite connecté à une seringue contenant 6.5 mg de collagénase P dans 15 ml de milieu de Hanks (en g/20 l : NaCl 160, KCl 8, CaCl₂.2H₂O 3,708, MgSO₄.7H₂O 4, KH₂PO₄ 1,2, Na₂HPO₄.2H₂O 1,2, NaHCO₃ 7), qui est injecté dans le pancréas. Dès que l'organe est suffisamment gonflé, il est isolé par détachement à l'aide de fins ciseaux en commençant par le côté de l'intestin et en terminant par le côté hépatique. Il est alors placé dans une boîte de Pétri contenant du milieu de Hanks où il est débarrassé de la graisse, de la majorité des vaisseaux et des ganglions lymphatiques. En procédant de manière similaire, trois pancréas sont isolés.

Le pancréas est ensuite découpé et est transvasé dans un tube de type Falcon. Le tube est placé durant 12 min dans un bain-marie maintenu à 37 °C. Par la suite, le tube dans lequel on a ajouté 30 ml de milieu de Hanks, est agité à la main jusqu'à obtention d'une solution homogène. Dès l'arrêt de ce traitement, le contenu du tube est dilué dans un cristalliseur avec la solution de Hanks. Les îlots sont lavés à plusieurs reprises et isolés par sédimentations successives. Ils sont finalement collectés à l'aide d'une pipette effilée préalablement siliconée et transférés dans un cristalliseur contenant du milieu de Hanks et 2,8 mmol/l de glucose. La collection des îlots de Langerhans se fait sous contrôle binoculaire avec un grossissement de 10 à 40 fois [Florence, 2010].

VI.4.2.2. Sécrétion statique d'insuline

Les îlots qui viennent d'être isolés sont placés par groupe de dix dans des petites cupules contenant chacune 1 ml de Krebs bicarbonaté (en mM : NaCl 115, KCl 5, CaCl₂.2H₂O 2,56, MgCl₂.6H₂O 1, NaHCO₃ 24 + 0.5 % d'albumine bovine fraction 5 dialysée) enrichi en glucose (2.8 mmol/l). Ils sont alors placés à une température de 37 °C pour une préincubation de 30 min durant laquelle ils sont continuellement gazés avec un mélange O₂ (95 %) / CO₂ (5 %). Après 30 minutes, le milieu de préincubation est éliminé et remplacé par 1 ml de Krebs contenant 16,7 mmol/l de glucose et la drogue à tester. Des expériences contrôles sont réalisées en l'absence de drogue ou en présence de diazoxide à la concentration de 50 µM. Les tubes sont de nouveau placés à 37 °C et gazés avec un mélange O₂ (95 %) / CO₂ (5 %), pour une période d'incubation de 90 min.

Après la période d'incubation, 0,1 ml du liquide d'incubation est prélevé et placé dans des tubes à hémolyse contenant 0,9 ml de tampon borate. Ces tubes sont conservés au congélateur à une température de -20 °C en vue du dosage radioimmunologique de l'insuline [Florence, 2010].

VI.4.2.3. Dosage radioimmunologique de l'insuline

Ce dosage se fait en utilisant du sérum anti-insulinique de cobaye, de l'insuline de rat comme étalon de référence et la méthode au charbon-dextran pour séparer l'insuline libre de l'insuline liée aux anticorps.

Des volumes de 50 µl de l'échantillon à doser ou de l'étalon de référence sont mélangés avec de l'insuline marquée (125I-insuline) diluée avec 200 µl de tampon borate (pH = 8,4) albuminé (0,5 % p/v) et avec le sérum anti-insulinique dilué dans 650 µl du même tampon. Une station de pipetage automatique est utilisée pour réaliser cette opération.

Après une incubation de 72 h à 4°C, 2,2 ml d'une suspension de charbon de bois (12,5 mg/ml) en tampon véronal (pH = 8,6), contenant du dextran (2,5 mg/ml) et du sérum de veau (10 % v/v) sont ajoutés à chaque tube. Après 20 min de repos à 4 °C, les tubes sont centrifugés durant 25 min à 3000 RPM. Le surnageant est ensuite prélevé et la radioactivité contenue dans le précipité est comptée dans un compteur gamma [Florence, 2010].

VI.4.3. Culture de cellules de muscle lisse aortique

Le protocole a été adapté à partir d'une méthode précédemment publiée [Golovina, Blaustein, 2006]. Des rats de 6 mois ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale de pentobarbital (60 mg / kg). L'aorte abdominale (pris à partir du diaphragme jusqu'à la bifurcation iliaque) a été enlevée et nettoyée de tissu adipeux adhérent, avant d'être lavées deux fois dans une solution saline tampon de HBSS (Invitrogen- Life Technologies Ltd., Paisley, UK, référence #14025-100) complétée par l'amphotéricine-B (2.5 µg/mL). Le vaisseau a été prédigéré dans une boîte de Pétri P35 contenant 2 ml de 1 mg / ml de collagénase II (Whorthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ, USA, référence #CLS2 LS004176) pendant 50 min (37°C, 5% CO₂). L'aorte a été ensuite lavée dans une solution HBSS-amphotéricine-B, avant que l'adventice enzymatiquement modifiée ait été enlevé par une pince. Le reste du vaisseau (intima + media) a été découpé en petits morceaux qui ont ensuite été digérés dans un tube de 5 ml pendant 1 h à 2 ml d'un mélange contenant 0,5 mg / ml d'élastase stérile (Whorthington Biochemical Corp., référence # ESL LS002292) et 1 mg/mL de collagénase II. Le produit de digestion a été centrifugé à 1200 rpm (350 x g)

pendant 10 minutes, puis remis en suspension dans 3 ml de solution HBSS-amphotéricine-B. Le tissu digéré est ensuite dissocié mécaniquement en rinçant plusieurs fois la solution à travers une pipette de 1 ml, en évitant la formation de bulles d'air. Les 3 ml de suspension de tissu digéré a été ensuite centrifugé de nouveau à 1200 rpm pendant 10 min, et le culot a été remis en suspension dans 100 μ L de milieu de culture DMEM (Invitrogen- Life Technologies Ltd., référence # 31966021) complétée par 20% de sérum de veau fœtal (SVF), 1% Penicillin/Streptomycin, dans deux puits pré-enduits par 0.1% gélatine d'une boîte de P24 (Merck, Darmstadt, Germany, référence #1.04078.1000). Les cellules musculaires vasculaires lisses (CMLVs) ont été laissés adhérer pendant 30 min (à 37 ° C, 5% CO₂), avant que le volume ait été complété jusqu'à 500 μ l avec le milieu de culture. Le contenu des puits a été laissé pendant 3 jours avant le premier changement de milieu de culture. Ce dernier a ensuite été remplacé tous les deux jours jusqu'à atteinte de confluence des cellules, ce qui était d'environ 6-7 jours. Ensuite les cellules ont étéensemencées. L'amplification de la culture cellulaire a ensuite été réalisée par trypsinisation des cellules et l'ensemencement en plusieurs puits revêtus de 0.1% gélatine.

VI.4.4. Mesure du taux d'élastine extracellulaire par ELISA

Le protocole utilisé ici a été adapté à partir d'une méthode précédemment publiée [Giro *et al.*, 1984, Davidson *et al.*, 1997]. Les cellules du muscle lisse vasculaire ont été privées de sérum pendant une nuit dans du DMEM contenant seulement 1% de SVF, afin de limiter la prolifération des cellules, avant trypsinisation et l'ensemencement à 25 000 cellules / puits dans une plaque de P96, où les cellules ont été laissées adhérer pendant une nuit. Le milieu de culture a ensuite été retiré et remplacé par du nouveau 1 % SVF-DMEM dans lequel les molécules à tester (en solution dans le DMSO) ont été ajoutés. Pour chaque concentration de chaque molécule, 3-9 puits ont été utilisées. En outre, les cellules de 8 puits ont été baignées dans 1% SVF-DMEM contenant du DMSO seul, comme contrôle négatif. Les cellules des autres puits ont été baignées dans 1% SVF-DMEM contenant 1 mM minoxidil, activateur des canaux K_{ATP}, utilisés comme contrôle positif, qui a été précédemment montré pour induire une forte augmentation de l'élastine extracellulaire [Giro *et al.*, 1984].

L'effet de l'activateur des canaux K_{ATP}, le diazoxide (50 μ M), utilisé comme référence dans les expériences de pharmacologie vasculaires, a été également étudié.

Les cellules des puits supplémentaires ont été baignées dans 1% SVF-DMEM (sans DMSO) comme contrôle négatif pour l'effet de minoxidil, puisque le minoxidil a été solubilisé dans l'eau à la concentration utilisée.

Dans certains puits, 10 μ M de glibenclamide, un bloqueur des canaux K_{ATP} , a été ajouté aux molécules testées pendant toute l'expérience afin de vérifier si l'effet des composés conçus passerait par l'activation des canaux K_{ATP} .

Chaque expérience, c'est à dire chaque test effectué sur chaque concentration de chaque molécule synthétisée, a été au moins triplé dans les cellules de différentes cultures ($n = 3-4$). Les expériences témoins (milieu + DMSO ou l'eau, diazoxide, minoxidil) ont été effectuées dans chaque plaque utilisée pour les tests ELISA, conduisant à plusieurs puits ($n = 8-9$).

Les cellules utilisées dans nos expériences provenaient de six cultures cellulaires distinctes. Dans tous les cas, la concentration de DMSO dont les cellules a été exposées était $<1\%$. Au bout de 48 h, c'est à dire le temps pour permettre la synthèse et l'excrétion de l'élastine, les cellules ont été lavées trois fois avec du PBS (Life Technologies Ltd Invitrogen-, référence # 14040174), puis fixées pendant 10 minutes dans 4% de para formaldéhyde à température ambiante. Après 10 minutes, l'absorbance de chaque puits - une fonction d'élastine extracellulaire en nombre de pièces a été mesurée à 450 nm.

Les puits ont été de nouveau lavées trois fois avec du PBS, avant le blocage des sites de liaison non spécifiques avec 2% de BSA contenant du PBS pendant 30 min à 37 ° C, puis lavé 3 fois avec 0,1% de Tween- contenant PBS.

Après cette étape, les cellules ont été incubées avec l'anticorps primaire de l'élastine (Elastin Products Company Inc., Owensville, MO, USA, référence #RA75) à 1: 1000 dans 2% BSA contenant du PBS pendant 1 h à 37 ° C.

Les cellules ont ensuite été lavées trois fois avec 0,1% de Tween contenant PBS avant incubation avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort (HRP) (Abcam, Paris, FRANCE, anti-goat antibody, référence #6741) à 1: 50 000 pendant 1 h à 37 ° C dans l'obscurité. Les cellules ont ensuite été lavées trois fois avec 0,1% de Tween contenant PBS, avant 100 μ l de 3,3',5,5'-tetraméthylbenzidine (TMB) (Millipore, Billerica, MA, USA, référence #ES022), les substrat de HRP, ont été ajoutés à chaque puits pendant 30 minutes dans l'obscurité à température ambiante. La réaction est ensuite stoppée par addition de 100 μ l d'acide sulfurique 0,3M à chaque puits.

Chaque concentration de chaque molécule a été testée dans différentes cultures cellulaires. La signification statistique des différences entre les groupes a été évaluée en utilisant la méthode ANOVA à 2 facteurs pour l'analyse des effets de la molécule et de concentration, et ANOVA à un facteur pour la comparaison de l'effet de 1 mM de minoxidil. $P \leq 0,05$ a été considéré statistiquement significatif.

VI.4.5. Evaluation pharmacologique *in vivo*

Les animaux (Rats Wistar adultes) avaient libre accès à l'eau et à la nourriture. Des rats conscients ont été placés 60 min avant le prélèvement de sang et pendant toute la durée de l'étude dans des petites Chambrettes.

Au temps zéro, les produits à tester dissous dans du DMSO (0,2 ml) ont été administrés par voie orale à une dose de 50 mg / kg. Les animaux utilisés comme témoin ont reçu un volume équivalent de DMSO (0,2 ml). Une goutte de sang a été prélevée à partir de la queue à l'instant 0, 1, 2, 3 et 4 h. [Nguyen *et al.*, 2002]. La concentration de glucose sanguin a été mesurée en utilisant des bandelettes réactives en combinaison avec un glucomètre (ACCU-CHEK active, Roche, Mannheim).

Bibliographie

A

Aguilar-Bryan L, Nichols C. G, Wechsler S. W, Clement J. P, Boyd A. E, Gonzalez G, Herrerasosa H, Nguy K, Bryan J, Nelson D. A., Cloning of the β cell high-affinity sulfonylurea receptor: A regulator of insulin secretion. *Science.*, **1995**, 268, 423-6.

Albert A, Serjeant E.P., In The Determination of Ionization Constants. Chapman & Hall: London, **1971**, 44–64.

Allard B and Lazdunski M., Pharmacological properties of ATP-sensitive K^+ channels in mammalian skeletal muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.*, **1993**, 236, 419-26.

Ashcroft F. M and Gribble F. M., New windows on the mechanism of action of K_{ATP} channel openers. *Trends. Pharmacol. Scie.*, **2000**, 21, 439-45.

Ashcroft F. M, Gribble F. M., Correlating structure and function in ATP-sensitive K^+ channels. *Trends. Neurosci.*, **1998**, 21, 288-94.

Ashcroft F.M, Gribble F.M., ATP-sensitive K^+ channels and insulin secretion: their role in health and disease. *Diabetologia.*, **1999**, 42, 903-19.

Ashcroft S.J. H, Ashcroft F.M., Properties and function of ATP-sensitive K-channels. *Cell Signal.*, **1990**, 2, 197-214.

Ashfield R, Gribble F.M, Ashcroft S.J, Ashcroft F.M., Identification of the high-affinity tolbutamide site on the SUR1 subunit of the K_{ATP} channel. *Diabetes.*, **1999**, 48, 1341-7.

Ashwood V.A, Cassidy F, Evans J.M, Gagliardi S, Stemp G., Synthesis and antihypertensive activity of pyran oxygen and amide nitrogen replacement analogues of the potassium channel activator cromakalim. *J Med Chem.*, **1991**, 34, 3261-7.

B

Babenko A. P, Gonzalez G, Bryan J., Pharmacology of Sulfonylurea Receptors. *J. Bio Chem.*, **2000**, 275, 717-20.

Babenko A.P, Gonzalez G, Bryan J., The tolbutamide site of SUR1 and a mechanism for its functional coupling to K_{ATP} channel closure. *FEBS Lett.*, **1999**, 459, 367-76.

Bayés M, Magano L.F, Rivera N, Flores R, Pérez Jurado L.A., Mutational mechanisms of Williams-Beuren syndrome deletions. *Am. J. Hum. Genet.*, **2003**, 73(1), 131-51.

Beech D. J, Zhang H, Nakao K, Bolton T. B., K-channel activation by nucleotide diphosphates and its inhibition by glibenclamide in vascular smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.*, **1993**, 110, 573-82.

Bellingham C.M, Woodhouse K.A, Robson P, Rothstein S.J, Keeley F.W., Self-aggregation characteristics of recombinantly expressed human elastin polypeptides. *Biochim. Biophys. Acta.*, **2001**, 1550(1), 6-19.

Bernardi H, Bidard J.N, Fosset M, Hugues M, Moure C, Rehm H, Remoy G, Schmid-Antomarchi H., Molecular properties of potassium channel. *Arzneim, Forsh/ Drug.Res.*, **1989**, 39, 159-63.

Bernardi H, Fosset F, Lazdunski M., Characterization, purification, and affinity labeling of the brain [³H]glibenclamide-binding protein, a putative neuronal ATP-regulated K⁺ channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1988**, 85, 9816-20.

Blondeau N, Plamondon H, Richelme C, Heurteaux C, Lazdunski M., K_{ATP} channel openers, adenosine agonists and epileptic preconditioning are stress signals inducing hippocampal neuroprotection. *Neuroscience.*, **2000**, 100, 465-74.

Brayden J. E., Functional roles of K_{ATP} channels in vascular smooth muscle. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **2002**, 29, 312-16.

Briones A.M, Arribas S.M, Salices M., Role of extracellular matrix in vascular remodeling of hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, **2010**, 19(2), 187-94.

Buchheit K.H, Manley P, et al., KCO912: a potent and selective opener of ATP dependent potassium (K_{ATP}) channels which suppresses airways hyperreactivity at doses devoid of cardiovascular effects. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **2002**, 365, 220-30.

C

Carlson T.R, Hu H, Braren R, Braren R, Kim Y.H, Wang R.A., Cell-autonomous requirement for beta1 integrin in endothelial cell adhesion, migration and survival during angiogenesis in mice. *Development*, **2008**, 135, 2193–202.

Clement J. P, Kunjilwar K, Gonzalez G, Schwanstecher M, Panten U, Aguilar-Bryan L, Bryan J., Association and stoichiometry of K_{ATP} channel subunits. *Neuron.*, **1997**, 18, 827-38.

Collin S, Levy B., Physiopathologie de l'hyporéactivité vasculaire au cours des états de choc. *Réanimation.*, **2008**, 17, 101-10.

Connor J. A, Stevens C. F., Inward and delayed outward membrane currents in isolated neural somata under voltage clamp. *J. physiol.*, **1971**, 213, 1-19.

Cook D. L and Hales N., Intracellular ATP directly blocks K^+ channels in pancreatic B-cells. *Nature.*, **1984**, 311, 271-73.

Cook N. S and Quast U., Potassium channel pharmacology. *In Potassium Channels: Structure, Classification, Function and Therapeutic Potential.* N. S. Cook. *Chichester, Ellis Horwood: 1990*, 181-255.

Csiszar K., Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.*, **2001**, 70, 1-32.

D

Davidson J. M, LuValle P. A, Zoia O, Quagliano D. Jr, Giro M., Ascorbate differentially regulates elastin and collagen biosynthesis in vascular smooth muscle cells and skin fibroblasts by pretranslational mechanisms. *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, 345-52.

de Tullio P, Pirotte B, Lebrun P, Fontaine J, Dupont L, Antoine M.H, Ouedraogo R, Khelili S, Maggetto C, Masereel B, Diouf O, Podona T, Delarge J., 3- and 4-substituted 4*H*-pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxides as potassium channel openers: synthesis, pharmacological evaluation, and structure-activity relationships. *J. Med. Chem.*, **1996**, 39, 937-48.

De Weille J. R , Fosset M , Epelbaum J, Lazdunski M., Effectors of ATP-sensitive K⁺ channels inhibit the regulatory effects of somatostatin and GH-releasing factor on growth hormone secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1992**, 187, 1007-14.

Deanfield J.E, Halcox J.P, Rabelink T.J., Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation.*, **2007**, 115(10), 1285-95.

Debelle L, Tamburro A.M., Elastin: molecular description and function. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **1999**, 31(2), 261-72.

Douppnik C. A, Davidson N, Lester H. A., The inward rectifier potassium channel family. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **1997**, 5, 268-77.

Doyle D.A, Cabral J. M, Pfuetzner R. A, Kuo A, Gulbis J. M, Cohen S. L, Chait B. T, MacKinnon R., The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science.*, **1998**, 280, 69-77.

Duca L, Floquet N, Alix A.J, Haye B, Debelle L., Elastin as a matrikine. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **2004**, 49, 235-44.

Dunne M. J, Cosgrove K. E, Shepherd R. M, Aynsley-Green A, Lindley K. J., Hyperinsulinism in infancy: From basic science to clinical disease. *Physiol. Rev.*, **2004**, 84, 239-75.

During M. J, Leone P, Davis K. E, Kerr D, Sherwin R. S., Glucose modulates rat substantia nigra GABA release in vivo via ATP-sensitive potassium channels. *J. Clin. Invest.*, **1995**, 95, 2403-8.

E

Edwards G and Weston A.H., Structure-activity relationships of K⁺ channel openers. *Trends. Pharmacol. Sci*, **1990**, 11, 417-22.

Escande D, Thuringer D, Leguern S, and Cavero I., The potassium channel opener cromakalim (BRL34915) activates ATP-dependent K⁺ channels in isolated cardiac myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1988**, 154, 620-25.

Evans M. L, McCrimmon R. J, Flanagan D. E, Keshavarz T, Fan X, McNay E.C, Jacob R.J, Sherwin R.S., Hypothalamic ATP-sensitive K⁺ Channels Play a Key Role in Sensing Hypoglycemia and Triggering Counterregulatory Epinephrine and Glucagon Responses. *Diabetes.*, **2004**, 53, 2542-51.

F

Fabiyi A.C, Gopalakrishnan M, Lynch J.J 3rd, Brioni J.D, Coghlan M.J, Brune M.E. In vivo evaluation of the potency and bladder-vascular selectivity of the ATP-sensitive potassium channel openers (-)-cromakalim, ZD6169 and WAY-133537 in rats. *BJU. Int.* **2003**, 91,284-90.

Fan Z, Nakayama K, Hiraoka M., Multiple actions of pinacidil on adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in guinea-pig ventricular myocytes. *J.Physiol.*,**1990**, 430, 273-95.

Faury G, Chabaud A, Ristori M.T, Robert L, Verdetti J. Effect of age on the vasodilatory action of elastin peptides. *Mech. Ageing. Dev.*, **1997**, 95(1-2), 31-42.

Faury G, Garnier S, Weiss A.S, Wallach J, Fülöp T. Jr, Jacob M.P, Mecham R.P, Robert L, Verdetti J. Action of tropoelastin and synthetic elastin sequences on vascular tone and on free Ca²⁺ level in human vascular endothelial cells. *Circ. Res.*, **1998b**, 82(3), 328-36.

Faury G, Ristori M.T, Verdetti J, Jacob M.P, Robert L., Effect of elastin peptides on vascular tone. *J. Vasc. Res.*, **1995**, 32(2),112-9.

Faury G, Ristori M.T, Verdetti J, Jacob M.P, Robert L., Role of the elastin-laminin receptor in the vasoregulation. *C. R. Acad. Sci III.* **1994**, 317(9), 807-11.

Faury G, Usson Y, Robert-Nicoud M, Robert L, Verdetti J., Nuclear and cytoplasmic free calcium level changes induced by elastin peptides in human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1998a**, 95(6), 2967-72.

Faury G., Role of the elastin-laminin receptor in the cardiovascular system. *Pathol Biol.* **1998**; 46, 517-526.

Faury G.,Function-structure relationship of elastic arteries in evolution: from microfibrils to elastin and elastic fibres. *Pathol. Biol. (Paris)*, **2001**, 49:310-325.

Fhayli W, Ghandour Z, Mariko B, Pezet M et Faury G., Rôle de l'élastine et des microfibrilles de la paroi artérielle au cours du développement et du vieillissement : complémentarité ou opposition ? *Biologie Aujourd'hui.*, **2012**, 206 (2), 87-102.

Fitridge R, Thompson M.M., Mechanisms of vascular disease : a textbook for vascular surgeons., Cambridge ; New York: *Cambridge University Press*; 2007.

Florence X, Sebille S, de Tullio P, Lebrun P, Pirotte B., New R/S-3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-1 benzopyrans as K_{ATP} channel openers: Modulation of the 4-position. *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, 17, 7723-31.

Florence X, Conception, synthèse et évaluation pharmacologique d'analogues originaux de cromakalim en tant qu'activateurs des canaux potassique ATP-dépendants. Thèse de doctorat, Université de Liège, **2010**.

Forte A, Della Corte A, De Feo M, Cerasuolo F, Cipollaro M., Role of myofibroblasts in vascular remodelling: focus on restenosis and aneurysm. *Cardiovasc. Res.*, **2010**, 88, 395–405.

Fozard J.R, Manley P. W., Potassium channel openers : Agents for the treatment of airway hyperactivity. *Prog. Respir. Res. Basel, Karger.*, **2001**, 31, 77-80.

Franck H, Puschmann A, Schudsziarra V, Allescher H. D., Functional evidence for a glibenclamide-sensitive K^+ channel in rat ileal smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.*, **1994**, 271, 379-86.

Fulop T, Jacob M.P, Wallach J, Hauck M, Seres I, Varga Z, Robert L., The elastin-laminin receptor. *J. Soc. Biol.*, **2001**, 195, 157-64.

G

Garlid K.D, Paucek P, Yarovyarovoy V, Sun X.C, Schindler P.A., The mitochondrial K_{ATP} channel as a receptor for potassium channel openers. *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 8796-9.

Geigy J.R, A.G, Manufacture of sulfonamide derivatives. British patent, (538,884), 1941, 1-3. *Chem. Abstracts.*, **1942**, **36**, 3512.

Giblin J. P, Quinn K, Tinker A., The cytoplasmic C-terminus of the sulfonylurea receptor is important for K_{ATP} channel function but is not key for complex assembly or trafficking. *Eur. J. Biochem.*, **2002**, 269, 5303-13.

Giebisch G., Canaux potassiques et rein. *Néphrologie*, **2000**, 21, 223-28.

Girard J.P, Springer T.A., High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol. Today.*, **1995**, 16, 449-57.

Giro M.G, Hill K. E, Sandberg L. B, Davidson J. M., Quantitation of Elastin Production in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells by a Sensitive and Specific Enzyme-Linked Immunoassay. *Coll. Relat. Res.*, **1984**, 4, 21-34.

Giudicessi J. R, Ackerman M. J., Potassium-channel mutations and cardiac arrhythmias diagnosis and therapy. *Nat. Rev. Cardiol.*, **2012**, 9, 319-32.

Gloyn A. L, Siddiqui J, Ellard S., Mutations in the genes encoding the pancreatic β cell K_{ATP} channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) in diabetes mellitus and hyperinsulinism. *Hum. Mutat.*, **2006**, 27, 220-31.

Golovina V.A, Blaustein M. P. Preparation of primary cultured mesenteric artery smooth muscle cells for fluorescent imaging and physiological studies. *Nat. Protoc.*, **2006**, 1, 2681-7.

Gomez D, Owens GK. Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.*, **2012**, 95(2), 156-64.

Gribble F. M, Tucker S. J, Haug T, Ashcroft F. M., MgATP activates the β cell K_{ATP} channel by interaction with its SUR1 subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1998**, 95(12), 7185-7190.

Grover G.J, McCullough J.R, D'Alonzo A.J, Sargent C.A, Atwal K.S., Cardioprotective profile of the cardiac-selective ATP-sensitive potassium channel opener BMS-180448. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **1995**, 25, 40-50.

Grover G.J, Newburger J, Sleph P.G, Dzwonczyk S, Taylor S.C, Ahmed S.Z, Atwal K.S., Cardioprotective effects of the potassium channel opener cromakalim: stereoselectivity and effects on myocardial adenine nucleotides. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1991**, 257, 156-62.

H

Haak E, Making N-sulfonylureas, U.S patent, (2, 385,571), 1945, 1-3, *Chem Abstracts*. **1946**, 40, 603.

Hambrock A, Kayar T, Stumpp D, Osswald H., Effect of Two Amino Acids in TM17 of Sulfonylurea Receptor SUR1 on the Binding of ATP-Sensitive KChannel Modulators. *Diabetes.*, **2004**, 53, 128-34.

Hamilton T. C, Weir S.W, et al. Comparison of the effects of BRL 34915 and verapamil on electrical and mechanical activity in rat portal vein. *Br. J. Pharmacol.*, **1986**, 88, 103-11.

Hamilton T.C, and Weston A.H., Cromakalim, nicorandil and pinacidil : Novel drugs which open potassium channels in smooth muscle. *Gen. pharmac.*, **1989**, 20, 1-9.

Hatakeyama N, Wang Q, Goyal R. K, Akbarali H. I., Muscarinic suppression of ATP-sensitive K^+ channel in rabbit esophageal smooth muscle. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **1995**, 268, C877-85.

Hayashi A, Suzuki T, Wachi H, Tajima S, Nishikawa T, Murad S, Pinnell S.R., Minoxidil stimulates elastin expression in aortic smooth muscle cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1994**, 315(1), 137-41.

Henquin J.C, Meissner H.P., Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on ^{86}Rb fluxes and membrane potential in pancreatic beta cells. *Biochem. Pharmacol.*, **1982**, 31, 1407-15.

Hille B, potassium channels and chloride channels. *In* Ionic channels of excitable membranes. *Sunderland, Sinauer Associates.*, 1992, 115-39.

Hodgkin A.L, Huxley A.F., A quantitative description of membrane current and its application to conductance and excitation in nerve. *J. Physiol. (Lond)*, **1952**, 117, 500-44.

Hopkins W.F, Fatherazi S, Cook D.L., The oral hypoglycemic agent, U-56324, inhibits the activity of ATP-sensitive potassium channels in cell-free membrane patches from cultured mouse pancreatic B-cells. *FEBS. Letters.*, **1990**, 277, 101-4.

I

Inagaki N, Gono T, Clement J. P, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S, Bryan J., Reconstitution of I-KATP: An inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science.*, **1995**, 270, 1166-70.

Inagaki N, Gono T, Clement J. P, Wang C. Z, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Seino S., A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K^+ channels. *Neuron.*, **1996**, 16, 1011-7.

Inagaki N, Inazawa J, Seino S., cDNA sequence, gene structure, and chromosomal localization of the human ATP-sensitive potassium channel, uK_{ATP}-1, gene (KCNJ8). *Genomics.*, **1995**, 30, 102-4.

Indik Z, Abrams W.R, Kucich U, Gibson C.W, Mecham R.P, Rosenbloom J., Production of recombinant human tropoelastin: characterization and demonstration of immunologic and chemotactic activity. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1990**, 280(1), 80-6.

Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T., ATP-sensitive K^+ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature.*, **1991**, 352, 244-7.

Inoue R, Okabe K, et al., A newly identified Ca^{2+} dependent K^+ channel in the smooth muscle membrane of single cells dispersed from the rabbit portal vein. *Pflügers. Archiv. Eur. J. Physiol.*, **1986**, 406, 138-43.

Isomoto S, Kondo C, Yamada M, Matsumoto S, Higashiguchi O, Horio Y, Matsuzawa Y, Jacob M.P., Matrice extracellulaire et vieillissement vasculaire. *M/S.* **2006**; 22(3), 273-8.

J

Jahangir A and Terzic A., K_{ATP} channel therapeutics at the bedside. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **2005**, 39, 99-112.

Janbon M, Chapal J, Vedel A, Schaap J., Accidents hypoglycémiques graves par un sulfamidothiodiazol (le VK 57 ou 2254 RP). *Montpellier med.*, **1942**, 441, 21-2.

K

Kahle W, Leonhardt H, Platzer W. Anatomie. Tome 2, viscères. 2 éd. Paris : *Flammarion Médecine-Sciences*, **1990**.

Karschin A, Brockhaus J, Ballanyi K., K_{ATP} channel formation by the sulphonylurea receptors SUR1 with Kir6.2 subunits in rat dorsal vagal neurons in situ. *J. Physiol.*, **1998**, 509, 339-46.

Kazic T, Gojkovic Bukarica L.J., Ion channels and drug development focus on potassium channels and their modulators. *Med and boil.*, **1999**, 6, 23-30.

Kelleher C.M, McLean S.E, Mecham R.P., Vascular extracellular matrix and aortic development. *Curr. Top. Dev. Biol.*, **2004**, 62,153-88.

Khelili S, De Tullio P, Lebrun P, Fillet M, Antoine M. H, Ouedraogo R, Dupont L, Fontaine J, Felekidis A, Leclerc G, Delarge J, Pirotte B., Preparation and pharmacological evaluation of the R-and S-Enantiomers of 3-(2'-Butylamino)-4H-and 3-(3'-Methyl-2'-butylamino)-4H-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide, Two tissue selective ATP-sensitive potassium channel openers. *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, 7, 1513-20.

Khelili S, Florence X, Bouhedja M, Abdelaziz S, Mechouch N, Yekhlef M, de Tullio P, Lebrun P, Pirotte B. Synthesis and activity on rat aorta rings and rat pancreatic beta cells of ring-opened analogues of benzopyran-type potassium channel activators. *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, 16, 6124-30.

Khelili S, Lebrun P, de Tullio P, Pirotte B., Synthesis and pharmacological evaluation of some N-arylsulfonyl-N-methyl-N'-(2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran- 4-yl)ureas structurally related to cromakalim. *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, 14, 3530-4.

Khelili S, Leclerc G, Faury G and Verdetti J., Synthesis and vasodilator effects of 3- and 7-sulphonylurea-1,2,4-benzothiadiazin-1,1-dioxydes on rat aorta. *Bioorg. Med. Chem.*, **1995**, 3, 495-503.

Kielty C.M, Baldock C, Lee D, Rock M.J, Ashworth J.L, Shuttleworth C.A. Fibrillin: from microfibril assembly to biomechanical function. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **2002a**, 357(1418), 207-17.

Kielty C.M, Sherratt M.J, Shuttleworth C.A., Elastic Fibres. *J. Cell. Sci.*, **2002c**, 115, 2817-28.

Kielty C.M, Wess T.J, Haston L, Ashworth J.L, Sherratt M.J, Shuttleworth C.A., Fibrillin-rich microfibrils: elastic biopolymers of the extracellular matrix. *J. Muscle. Res. Cell. Motil.*, **2002b**, 23(5-6), 581-96.

Kielty C.M., Elastic fibres in health and disease. *Expert. Rev. Mol. Med.*, **2006**, 8(19), 1-23.

Kis B, Nagy K, Snipes J. A, Rajapakse N. C, Horiguchi T, Grover G. J, Busija D.W., The mitochondrial KATP channel opener BMS-191095 induces neuronal preconditioning. *Neuroreport.*, **2004**, 15, 345-9.

Kolb H.A., Potassium channels in excitable and non-excitable cells. *In Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **1990**, 115, 51-91.

Kurachi Y., A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K⁺ channel. *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 24321-4.

L

Lebrun P, Devreux V, Hermann M, Herchuelz A., Pinacidil inhibits insulin release by increasing K⁺ outflow from pancreatic B-cells. *Eur. J. Pharmacol.*, **1988**, 15, 6, 283-6.

Lebrun P, Devreux V, Hermann M, Herchuelz A., Similarities between the effects of pinacidil and diazoxide on ionic and secretory events in rat pancreatic islets., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1989**, 250, 1011-8.

Lebrun P, Fontaine J., Relaxation Response to Pinacidil and Diazoxide in the Mouse Isolated Distal Colon., *Pharmacol.* **1990**, 40, 21-26.

Ledoux J, Werner M. E, Brayden J. E, Nelson M. T., Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology (Bethesda)*, **2006**, 21, 69-78.

Li D.Y, Brooke B, Davis E.C, Mecham R.P, Sorensen L.K, Boak B.B, Eichwald E, Keating M.T., Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis. *Nature.*, **1998**, 393(6682), 276-80.

Liss B, Bruns R, Roeper J., Alternative sulfonylurea receptor expression defines metabolic sensitivity of K-ATP channels in dopaminergic midbrain neurons. *EMBO J.*, **1999**, 18, 833-46.

Liss B, Roeper J., Molecular physiology of neuronal K-ATP channels. *Mol. Membr. Biol.*, **2001**, 18, 117-27.

Liu Y, Sato T, O'Rourke B, Marban E., Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation.*, **1998**, 9, 2463-9.

Löffler-Walz C, Hambrock A, Quast U., Interaction of K_{ATP} Channel Modulators with Sulfonylurea Receptor SUR2B : Implication for Tetramer Formation and Allosteric Coupling of Subunits. *Mol. Pharmacol.*, **2002**, 2, 407-14.

Long M.M, King V.J, Prasad K.U, Freeman B.A, Urry D.W., Elastin repeat peptides as chemoattractants for bovine aortic endothelial cells. *J. Cell. Physiol.*, **1989**, 140(3), 512-8.

Lu C, Halvorsen S.W., Channel activators regulate ATP-sensitive potassium channel (KIR6.1) expression in chick cardiomyocytes. *FEBS Lett.*, **1997**, 412, 121-25.

M

Mannhold R., K_{ATP} Channel Openers : Structure-Activity Relationships and Therapeutic Potential. *Med. Res. Rev.*, **2004**, 24, 213-66.

Martinez-Lemus L.A., The dynamic structure of arterioles. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **2012**; 110(1), 5-11.

Matsumoto T, Nagayama K., Tensile properties of vascular smooth muscle cells: bridging vascular and cellular biomechanics. *J. Biomech.* **2012**, 45(5),745-55.

McNicholas C.M, Gugginot W.B, Schwiebertt E.M, Hebertt S.C, Giebisch G, Egani M.E., Sensitivity of a renal K⁺ channel (ROMK2) to the inhibitory sulfonylurea compound glibenclamide is enhanced by coexpression with the ATP-binding cassette transporter cystic fibrosis transmembrane regulator (subunit interaction / ATP-sensitive K⁺ channel/phosphorylation). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1996**, 93, 8083- 88.

Meech R. W., Calcium-Dependent Potassium Activation in Nervous Tissues. *Annu. Rev. Biophys. Bio.*, **1978**, 7, 1-18.

Mikhailov M. V, Mikhailova E. A, Ashcroft S. J., Molecular structure of the glibenclamide binding site of the β -cell K_{ATP} channel. *FEBS Lett.*, **2001**, 499, 154-60.

Miki T, Iwanaga T, Nagashima K, Ihara Y, Seino S., Roles of ATP-Sensitive K^+ Channels in Cell Survival and Differentiation in the Endocrine Pancreas. *Diabetes.*, **2001**, 50, S48-S51.

Minor D. L Jr, Masseling S. J, Jan Y; N, Jan L. Y., Transmembrane Structure of an Inwardly Rectifying Potassium Channel. *Cell.*, **1999**, 879-91.

Mithieux S.M, Weiss A.S. Elastin. *Adv. Protein. Chem.*, **2005**, 70, 437-61.

Mochizuki S, Brassart B, Hinek A., Signaling pathways transduced through the elastin receptor facilitate proliferation of arterial smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277(47), 44854-63.

Mukai E, Ishida H, Horie M, Noma A, Seino Y, Takano M., The antiarrhythmic agent cibenzoline inhibits K_{ATP} channels by binding to Kir6.2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1998**, 251, 477-81.

N

Nelson M.T, Brayden J.E., Regulation of arterial tone by calcium-dependent K^+ channels and ATP-sensitive K^+ channels. *Cardiovasc. Drugs. Ther.*, **1993** Aug ;7 Suppl 3, 605-10.

Nichols C. G, Lopatin A. N., Inward rectifier potassium channels. *Annu. Rev. Physiol.*, **1997**, 59, 171-91.

Nichols C. G, Shyng S. L, Nestorowicz A, Glaser B, Clement J. P, Gonzales G, Aguilar-Bryan L, Permutt L, Bryan J., Adenosine Diphosphate as an Intracellular Regulator of Insulin Secretion. *Science.*, **1996**, 272, 1785-87.

Nielsen F.E, Bodvarsdottir T.B, Worsaae A, MacKay P, Stidsen C.E, Boonen H.C.M, Pridal L, Arkhammar P.O.G, Wahl P, Ynddal L, Junager F, Dragsted N, Tagmose T.M, Mogensen J.P, Koch A, Treppendahl S.P, Bondo Hansen J., 6- Chloro-3-alkylamino-4H-thieno[3,2-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide derivatives potently and selectively activate ATP sensitive potassium channels of pancreatic b-cells. *J.Med.Chem.*, **2002**, 45, 4171-87.

Noma A., ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. *Nature*, **1983**, 305, 147-48.

O

O'Connell A.D, Leng Q, Dong K, MacGregor G.G, Giebisch G, Hebert S.C., Phosphorylation-regulated endoplasmic reticulum retention signal in the renal outer-medullary K₊ channel (ROMK). *PNAS*, **2005**, 102, 9954-9.

Okada Y, Yanagisawa T, et al., BRL 38227 (levcromakalim)-induced hyperpolarization reduces the sensitivity to Ca²⁺ of contractile elements in canine coronary artery. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **1993**, 347, 438-44.

Olson T.M, Michels V.V, Urban Z, Csiszar K, Christiano A.M, Driscoll D.J, Feldt R.H, Boyd C.D, Thibodeau S.N. A 30 kb deletion within the elastin gene results in familial supraaortic stenosis. *Hum. Mol.Genet.*, **1995** Sep;4(9), 1677-9.

Ooyama T, Fukuda K, Oda H, Nakamura H, Hikita Y., Substratum-bound elastin peptide inhibits aortic smooth muscle cell migration in vitro. *Arteriosclerosis* **1987**; 7(6), 593-8.

P

Parent L, Sauvé R, Bernèche S, Roux B., A bas les barrières... d'énergie dans les canaux potassiques. *Med. Sci.*, **2002**, 18, 605-09.

Patel A, Fine B, Sandig M, Mequanint K., Elastin biosynthesis: the missing link in tissue-engineered blood vessels. *Cardiovasc. Res.*, **2006**, 71:40-9.

Petersen E, Wågberg F, Angquist KA. Serum concentrations of elastin-derived peptides in patients with specific manifestations of atherosclerotic disease. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, **2002**, 24, 440-4.

Pezet M, Jacob M.P, Escoubet B, Gheduzzi D, Tillet E, Perret P, Huber P, Quaglino D, Vranckx R, Li D.Y, Starcher B, Boyle W.A, Mecham R.P, Faury G., Elastin haploinsufficiency induces alternative aging processes in the aorta. *Rejuvenation. Res.* **2008** Feb, 11, 97-112.

Piper I, Minshall E, Downing S. J, Hollingsworth S, Sadraei H., Effects of several potassium channel openers and glibenclamide on the uterus of the rat. *Br. J. Pharmacol.* **1990**, 101, 901-7.

Pirotte B, deTullio P, Lebrun P, Antoine M.H, Fontaine J, Masereel B, Schynts M, Dupont L, Herchuelz A, Delarge J., 3-(Alkylamino)-4H-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine1,1-dioxides as powerful inhibitors of insulin release from rat pancreatic b-cells : A new class of potassium channel openers ?, *J. Med. Chem.*, **1993**, 36, 3211-13.

Pirotte B, Ouedraogo R, De Tullio P, Khelili S, Somers F, Boverie S, Dupont L, Fontaine J, Damas J, Lebrun P., 3-Arylamino-H-pyrido [2,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxyde structurally related to diazoxide and pinacidil as potassium channel openers vacular smooth muscle cells : Design, synthesis, and pharmacological evaluation. *J. Med. Chem.*, **2000**, 43, 1456-66.

Plant T. D, Henquin J. C., Phentolamine and yohimbine inhibit ATP-sensitive K⁺ channels in mouse pancreatic beta-cells. *Br. J. Pharmacol.*, **1990**, **101**, 115-20.

Pocai A, Lam K. T, Gutierrez-Juarez R, Obici S, Schwartz G. J, Bryan J, Aguilar-Bryan L, Rossetti L., Hypothalamic K_{ATP} channels control hepatic glucose production. *Nature.*, **2005**, 434, 1026-31.

Proks P, Ashcroft F.M., Phentolamine block of K_{ATP} channels is mediated by Kir6.2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **1997**, 94, 11716-20.

Q

Quast U., ATP-sensitive K⁺ channels in the kidney. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.*, **1996**, 354, 213-25.

Quast U, Guillon J.M, Cavero I., Cellular pharmacology of potassium channel openers in vascular smooth muscle. *Cardiovasc. Res.*, **1994**, 28, 805-10.

Quayle J.M, Nelson M. T, Standen N.B., ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol. Rev.*, **1997**, 77, 1165-232.

R

Raveaud S, Mezin P, Lavanchy N, Starcher B, Mecham R.P, Verdetti J, Faury G., Effects of chronic treatment with a low dose of nicorandil on the function of the rat aorta during ageing. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **2009**, 36(10), 988-94.

Reeves W.B, Shah S.V., Activation of Potassium Channels Contributes to Hypoxic Injury in Proximal Tubules. *J. Clin. Invest.*, **1994**, 94, 2289-94.

Reimann F, Ashcroft F. M., Inwardly rectifying potassium channels. *Curr .Opin. Cell. Biol.*, **1999**, 11, 503-8.

Rennier K, Ji J.Y., Effect of shear stress and substrate on endothelial DAPK expression, caspase activity, and apoptosis. *BMC. Res. Notes.*, **2013**, 6(1):10.

Ronner P, Higgins T.J , Kimmich G.A. Inhibition of ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic beta-cells by nonsulfonylurea drug linogiride. *Diabetes.*, **1991**, 40, 885-92.

Rosenbloom J, Abrams W.R, Mecham R., Extracellular matrix 4: the elastic fiber. *FASEB J.* **1993**, 7(13), 1208-18.

Roth J.S, Degering F., The preparation of sulfanilamide derivatives containing a urea or thiourea grouping. *Amr. Chem. Soc.*, **1945**, 44, 2595.

Rudijanto A., The Role of Vascular Smooth Muscle Cells on the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Acta. Med. Indones.*, **2007**, 39(2), 86-93.

Rudy B., Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience.*, **1988**, 25, 729-49.

S

Sebille S, de Tullio P, Becker B, Antoine M.H, Boverie S, Pirotte B, Lebrun P., 4,6-Disubstituted 2,2-Dimethylchromans Structurally Related to the K_{ATP} Channel Opener Cromakalim: Design, Synthesis, and Effect on Insulin Release and Vascular Tone. *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 614-21.

Sebille S, De Tullio P, Boverie S, Antoine M.H, Lebrun P, Pirotte B. Recent developments in the chemistry of potassium channel activators: the cromakalim analogs. *Curr. Med. Chem.*, **2004**, 11, 1213-22.

Sebille S, de Tullio P, Florence X, Becker B, Antoine M.H, Michaux C, Wouters J, Pirotte B, Lebrun P., New R/S-3,4-dihydro-2,2-dimethyl-6-halo-4-(phenylaminothiocarbonylamino)-2H-1- benzopyrans structurally related to (+/-)-cromakalim as tissue-selective pancreatic beta-cell K_{ATP} channel openers. *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, 16, 5704-19.

Senior R.M, Griffin G.L, Mecham R.P, Wrenn D.S, Prasad K.U, Urry D.W., Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly, a repeating peptide in elastin, is chemotactic for fibroblasts and monocytes. *J. Cell. Biol.*, **1984**, 99(3), 870-4.

Smith D. G, 4-amido-3,4-Dihydro-2H- benzothiopyran-3-ols and their sulphoxid and sulphone derivatives- cromakalim analogs. *J.Chem. Soc. Perkin. Trans I*, **1990**, 3187-91.

Smith et al 1989.

Somers F, Les 3-alkylamino-4H-benzothiasiazine 1,1-dioxydes et les 3-alkylamino-1,2,4-benzodithiazine 1,1-dioxydes : conception, synthèse, et évaluation pharmacologique en tant qu'activateurs potentiels des canaux potassiques ATP-dépendants. Thèse de doctorat, université de Liège, **2001**.

Sorrell J.M, Caplan A.I. Fibroblasts-a diverse population at the center of it all. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.*, **2009**, 276, 161-214.

Spofford C.M, Chilian W.M., The elastin-laminin receptor functions as a mechanotransducer in vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **2001**, 280(3),1354-60.

Standen N.B., K_{ATP} Channels in Vascular Smooth Muscle: Structure, Regulation and Functional Roles. *J. Clin. Basic. Cardiol.*, **2003**, 6: 7.

Standen, N. Quayle J. M, Davies N. W, Brayden J. E, Huang Y, Nelson M.T., Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle., *Science.*, **1989**, 245(4914), 177-80.

Stenmark K.R, Yeager M.E, El Kasmi K.C, Nozik-Grayck E, Gerasimovskaya E.V, Li M, Riddle S.R, Frid M.G., The Adventitia: Essential Regulator of Vascular Wall Structure and Function. *Annu. Rev. Physiol.*, **2013**, 75, 23-47.

Stephan D, Salamon E, Weber H, Russ U, Lemoine H, Quast U., K_{ATP} channel openers of the benzopyran type reach their binding site via the cytosol. *Br. J. Pharmacol.*, **2006**, 149, 199-205.

Sumpio B.E, Riley J.T, Dardik A. Cells in focus: endothelial cell. *Int. J Biochem. Cell. Biol.*, **2002**, 34, 1508-12.

Suzuki M, Kotake K, Fujikura K, Inagaki N, Suzuki T, Gono T, Seino S, Takata K., Kir6.1: A possible subunit of ATP-sensitive K⁺ channels in mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1997**, 241, 693-7.

T

Tajima S, Hayashi A, Suzuki T, Nishikawa T., Stimulation of elastin expression by minoxidil in chick skinfibroblasts. *Arch. Dermatol. Res.*, **1995**, 287, 494-7

Tajima S, Wachi H, Uemura Y, Okamoto K., Modulation by elastin peptide VGVAPG of cell proliferation and elastin expression in human skin fibroblasts. *Arch. Dermatol. Res.* **1997**, 289,489–92.

Tamburro A.M, Bochicchio B, Pepe A., The dissection of human tropoelastin: from the molecular structure to the self-assembly to the elasticity mechanism. *Pathol. Biol. (Paris)*. **2005**, 53(7), 383-9.

Tassabehji M, Metcalfe K, Hurst J, Ashcroft G.S, Kielty C, Wilmot C, Donnai D, Read A.P, Jones C.J., An elastin gene mutation producing abnormal tropoelastin and abnormal elastic fibres in a patient with autosomal dominant cutis laxa. *Hum. Mol. Genet.*, **1998**, 7(6), 1021-8.

Terzic A, Jahangir A, Kurachi Y., Cardiac ATP sensitive K⁺ channels : regulation by intracellular nucleotides and K⁺ channel-opening drugs. *Am. J. Physiol.*, **1995**, 269, C525-45.

Thuringer D and Caverio I., Les canaux potassiques inhibés par l'ATP cellulaire : une aventure physiologique à suspense moléculaire. *Médecine/Sciences*, **1997**, 13, 1049-52.

Topliss J. G, Konzelman L. M, Shapiro E. P, Sperber N, Roth F. E., Antihypertensive Agents II : 3-substituted 2H- 1,2,4-benzothiadiazine 1,1 dioxyde, *J. Med. Chem.*, **1964**, 7, 269-73.

Triggle C.R, Samuel S.M, Ravishankar S, Marei I, Arunachalam G, Ding H., The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **2012** Jun, 90(6), 713-38.

Trube G, Rorsman P, Ohno-Shosaku T., Opposite effect of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent K⁺ channel in mouse pancreatic β -cells. *Pflugers. Arch.*, **1986**, 407, 493-99.

Tsoporis J, Keeley F.W, Lee R.M, Leenen F.H., Arterial vasodilation and vascular connective tissue changes in spontaneously hypertensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **1998**, 31(6):960-2.

U

Uhde I, Toman A, Gross I, Schwanstecher C, Schwanstecher M., Identification of the potassium channel opener site on sulfonylurea receptors. *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 28079-82.

Uitto J., Biochemistry of the elastic fibers in normal connective tissues and its alterations in diseases. *J. Invest. Dermatol.* **1979**, 72, 1–10.

V

Van Eys G.J, Niessen P.M, Rensen S.S., Smoothelin in vascular smooth muscle cells. *Trends. Cardiovasc. Med.* **2007**, 17(1), 26-30.

Vanhoutte P.M, Rimele T.J., Role of the endothelium in the control of vascular smooth muscle function. *J. Physiol. (Paris)*. **1982**; 78(7), 681-6.

Varani J, Dame M.K, Rittie L, Fligel S.E, Kang S, Fisher G.J, Voorhees J.J., Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in

fibroblast function and defective mechanical stimulation. *Am. J. Pathol.*, **2006** Jun, 168(6), 1861-8.

Varga Z, Jacob M.P, Robert L, Fülöp T. Jr., Identification and signal transduction mechanism of elastin peptide receptor in human leukocytes. *FEBS Lett.*, **1989**, 258(1), 5-8.

Vrhovski B, Weiss A.S., Biochemistry of tropoelastin. *Eur. J. Biochem.*, **1998**, 258(1), 1-18.

W

Wachi H, Seyama Y, Yamashita S, Suganami H, Uemura Y, Okamoto K, Yamada H, Tajima S., Stimulation of cell proliferation and autoregulation of elastin expression by elastin peptide VPGVG in cultured chick vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.*, **1995**, 368(2), 215-9.

Wickenden A. D., Potassium channels as anti-epileptic drug targets, *Neuropharmacol.*, **2002**, 43, 1055-60.

Wordpress.com, Découverte d'une cellule eucaryote : une vrai usine ! Nov **2011**.

Wynne B.M, Chiao C.W, Webb R.C., Vascular Smooth Muscle Cell Signaling Mechanisms for Contraction to Angiotensin II and Endothelin-1. *J. Am. Soc. Hypertens.*, **2009**, 3(2), 84-95.

X

Xu J, Chen Y, Li M., High-throughput technologies for studying potassium channels progresses and challenges. *Drug. Discov. Today : Targets.*, **2004**, 3, 32-38.

Y

Yamada K, Inagaki N., ATP-sensitive K(+) channels in the brain: sensors of hypoxic conditions. *News. Physiol. Sci.*, **2002**, 17, 127-30.

Yan F.F, Lin C. W, Weisiger E, Cartier E. A, Taschenberger G, Shyng S. L., Sulfonylureas correct trafficking defects of ATP-sensitive potassium channels caused by mutations in the sulfonylurea receptor. *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 11096-105.

VIII Annexe

Publication originale découlant de cette thèse



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc

Design and synthesis of new potassium channel activators derived from the ring opening of diazoxide: Study of their vasodilatory effect, stimulation of elastin synthesis and inhibitory effect on insulin release



Nafila Bouider^a, Wassim Fhayli^b, Zeinab Ghandour^b, Marjorie Boyer^b, Kamel Harrouche^a, Xavier Florence^c, Bernard Pirotte^{d,*}, Philippe Lebrun^c, Gilles Faury^b, Smail Khelili^a

^a Laboratoire de Phytochimie et de Pharmacologie, Département de Chimie, Faculté des Sciences Exactes et informatique, Université de Jijel, B.P. 98 Ouled Aissa, 18000 Jijel, Algeria

^b Laboratoire 'Hypoxie: Physiopathologie Cardiovasculaire et Respiratoire' (HP2), INSERM U1042-Université Grenoble Alpes, F-38042 La Tronche, France

^c Laboratoire de Pharmacodynamie et de Thérapeutique, Université Libre de Bruxelles, Faculté de Médecine, 808, Route de Lennik, B-1070 Bruxelles, Belgium

^d Laboratoire de Chimie Pharmaceutique, Center for Interdisciplinary Research on Medicines (CIRM), Université de Liège, 1, Avenue de l'Hôpital, B-4000 Liège, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 December 2014

Revised 19 February 2015

Accepted 20 February 2015

Available online 27 February 2015

Keywords:

Potassium channel opener

Diazoxide

Benzenesulfonylurea

Benzenesulfonylthiourea

Benzenecarbonylurea

Benzenecarbonylthiourea

Elastin synthesis

Myorelaxant activity

Insulin secretion

Glycaemia

ABSTRACT

Benzenesulfonylureas and benzenesulfonylthioureas, as well as benzenecarbonylureas and benzenecarbonylthioureas, were prepared and evaluated as myorelaxants on 30 mM KCl-precontracted rat aortic rings. The most active compounds were further examined as stimulators of elastin synthesis by vascular smooth muscle cells and as inhibitors of insulin release from pancreatic β -cells. The drugs were also characterized for their effects on glycaemia in rats. Benzenesulfonylureas and benzenesulfonylthioureas did not display any myorelaxant activity on precontracted rat aortic rings. Such an effect could be attributed to their ionization at physiological pH. By contrast, almost all benzenecarbonylureas and benzenecarbonylthioureas displayed a myorelaxant activity, in particular the benzenecarbonylureas with an oxybenzyl group linked to the *ortho* position of the phenyl ring. The vasodilatory activity of the most active compounds was reduced when measured in the presence of 80 mM KCl or in the presence of 30 mM KCl and 10 μ M glibenclamide. Such results suggested the involvement, at least in part, of K_{ATP} channels. Preservation of a vasodilatory activity in rat aortic rings without endothelium indicated that the site of action of such molecules was located on the vascular smooth muscle cells and not on the endothelial cells. Some of the most active compounds also stimulated elastin synthesis by vascular smooth muscle cells. Lastly, most of the active vasorelaxant drugs, except **15k** and **15t** at high concentrations, did not exhibit marked inhibitory effects on the insulin releasing process and on glycaemia, suggesting a relative tissue selectivity of some of these compounds for the vascular smooth muscle.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channels control insulin release,^{1,2} vascular tone³ and may protect heart,⁴ kidney,⁵ and

brain under metabolic stress.⁶ Channel inhibition by ATP and stimulation by nucleotide diphosphates allow the membrane potential and cell excitability to be regulated by the cellular metabolic state.

The K_{ATP} channel is an octameric complex of 4 Kir6.x and 4 SURx subunits.^{7,8} The pore-forming Kir6.x subunit belongs to the inwardly rectifying family of potassium channels.^{8–10} There are two isoforms: Kir6.1, which is found in vascular smooth muscle, and Kir6.2, which has a widespread tissue distribution. Binding of ATP to Kir6.x induces K_{ATP} channel closure. The sulfonylurea receptor (SUR) belongs to the ABC transporter family.⁹ It functions as a regulatory subunit, which mediates, inter alia, channel inhibition by sulfonylurea drugs such as glibenclamide.^{11,12} Differences in endogenous K_{ATP} channel properties and pharmacology¹³ may

Abbreviations: K_{ATP} channel, ATP-sensitive potassium channel; Kir, inwardly rectifying potassium channel; SUR, sulfonylurea receptor; PCO, potassium channel opener; ABC transporter, ATP-binding cassette transporter; DMF, dimethylformamide; d_6 -DMSO, deuterated dimethyl sulfoxide; TMS, tetramethylsilane; NMR, nuclear magnetic resonance; TLC, thin layer chromatography; DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; FCS, fetal calf serum; HRP, horseradish peroxidase; PBS, phosphate-buffered saline; BSA, bovine serum albumin; TMB, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine.

* Corresponding author. Tel.: +32 4 366 43 65; fax: +32 4 366 43 62.

E-mail address: b.pirotte@ulg.ac.be (B. Pirotte).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2015.02.043>

0968-0896/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

be accounted for by differences in subunit composition: Kir6.2 and SUR1 in pancreatic insulin-secreting cells, Kir6.2 and SUR2A in cardiac myocytes, Kir6.2/Kir6.1 and SUR2B in smooth muscle cells, and Kir6.2 and SUR1 in central neurons.¹⁴

Several drugs were found to activate the K_{ATP} channels. Such pharmacological or therapeutic agents, collectively termed potassium channel openers (PCOs), stabilize membrane excitability and preserve metabolic expenditure.¹⁵ As a result, PCOs are able to inhibit insulin release from pancreatic β -cells¹⁶ and exert a relaxant effect on different smooth muscles.¹⁷

Potassium channel openers constitute a family of chemically diverse compounds that belong to numerous structural classes. They include benzopyrans (cromakalim, **1**), cyanoguanidines (pinacidil, **2**), benzothiadiazines (diazoxide, **3**), nicotinamides (nicorandil, **4**), and pyrimidines (minoxidil, **5**) (Fig. 1).^{16,18–20}

Cromakalim is a potent myorelaxant but a poor inhibitor of insulin secretion,^{21–23} in contrast to diazoxide, which is active on both insulin-secreting cells (inhibitor) and vascular smooth muscle cells (vasodilator).²⁴ Optimization of the diazoxide structure provided compounds such as BPDZ 73 (**6**) and BPDZ 44 (**7**), which potently and selectively activated the K_{ATP} channels of pancreatic β -cells (Fig. 2).^{25,26}

Modification of the benzothiadiazine core structure by ring opening has never been attempted so far. Thus, in order to develop new PCOs with improved pharmacological properties, we undertook the synthesis of some simplified compounds resulting both from the opening of the thiadiazine ring of 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides and the introduction of urea or thiourea moieties. The SO_2 group has also been replaced by its

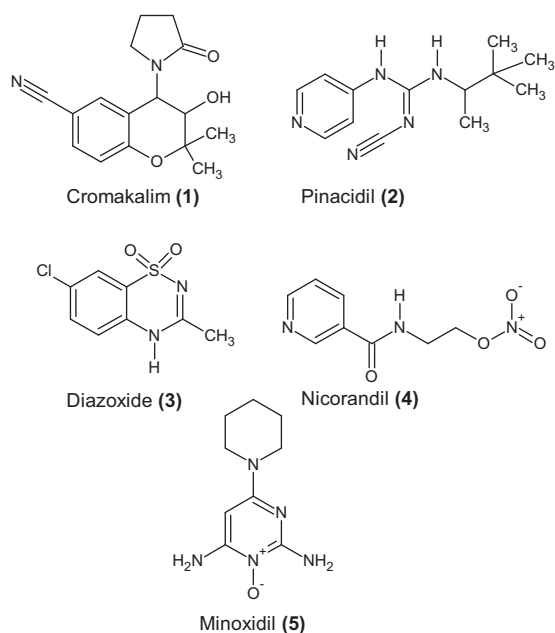


Figure 1. Chemical structure of some K_{ATP} channels openers.

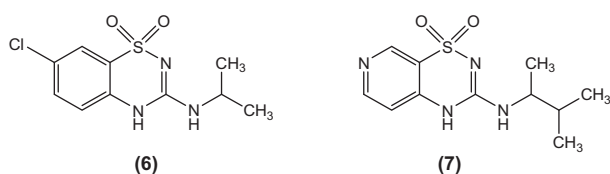


Figure 2. Examples of K_{ATP} channel openers resulting from structural modifications of diazoxide.

non-classical isoster $C=O$, while NH was replaced by an oxygen atom. Such structural modifications led to two new series of ring-opened analogues of diazoxide and 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides (series **A** and **B**), as illustrated in Figure 3.

This strategy was inspired by previous work consisting in the opening of the pyranic ring of cromakalim, a dihydrobenzopyran, and the introduction of urea and sulfonyleurea groups, which provided simpler new molecules with substantial vasodilatory properties.²⁷

It should be pointed out that the **A** and **B** series can also be virtually obtained by simplification of glibenclamide, a well-known K_{ATP} channel blocker (Fig. 4).²⁸ However, this observation is only fortuitous and did not direct our strategy for the development of new series of compounds expected to be potassium channel openers and not blockers.

The present work reports the synthesis and pharmacological testing of the vasodilatory activity of compounds belonging to series **A** and **B** on KCl-precontracted rat aorta rings. Some of the most potent compounds have also been tested as potential stimulators of elastin production by vascular smooth muscle cells.

Elastin is the main extracellular matrix protein composing the elastic fibers, which endow extensible tissues (including skin,

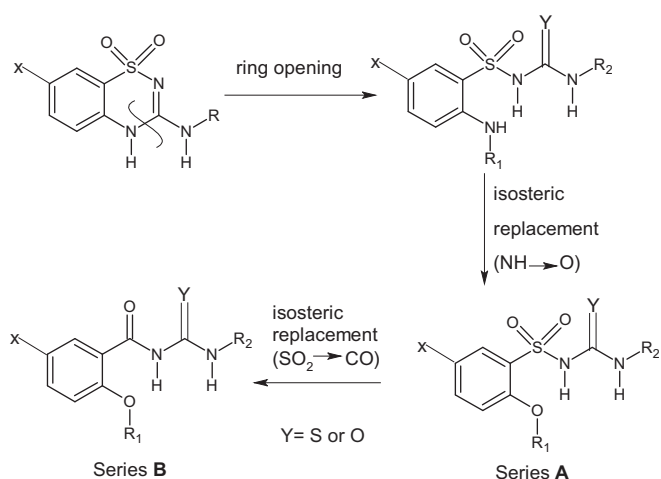


Figure 3. Simplification of 3-alkylamino-4*H*-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides leading to two new series of compounds (**A** and **B**).

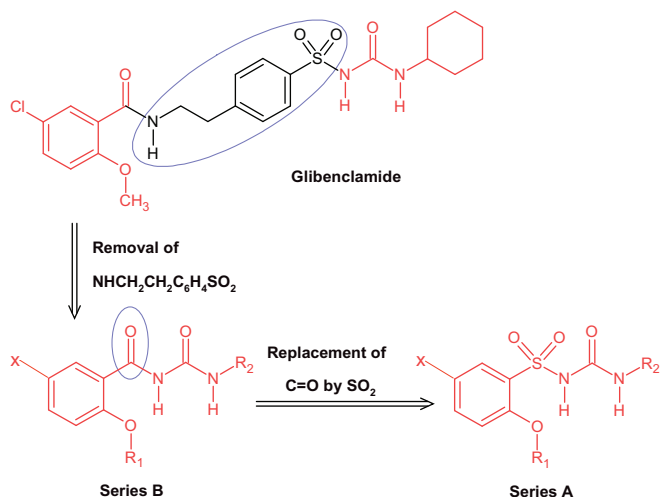


Figure 4. Structural modulation of glibenclamide leading to series **A** and **B**.

lungs and arteries) with elasticity. Elasticity is the essential mechanical property that allows large arteries to smoothly transform the pulsatile and discrete blood volumes ejected during the cardiac cycle into a continuous flow, therefore leading to appropriate hemodynamics. The elastin gene is only expressed during the foetal life and childhood, and elastin is therefore not replaced and degraded regularly during adulthood and ageing, leading to a progressive stiffening of the arteries and subsequent cardiovascular dysfunction.²⁹ Also, abnormal arterial morphogenesis, remodelling and function—potentially leading to death—have been linked to a genetic heterozygous deficiency in elastin characterized by low levels of the protein, such as in supravalvular aortic stenosis (SVAS) or Williams syndrome.^{30–32} In normal ageing and the above-cited syndromes, the patients would therefore benefit from an up regulation of the elastin gene, which would increase the deficient of elastin content of the arteries and improve the arterial function.

It has already been demonstrated that the potassium channel opener minoxidil increases the expression of the elastin gene, in vitro in skin fibroblasts and vascular smooth muscle cells^{33,34} and in vivo in rats, leading to an increase in the arterial content in elastin.³⁵ A similar effect of another potassium channel opener, nicorandil, has also been demonstrated.³⁶ More recently, it has been demonstrated that minoxidil, diazoxide, and pinacidil (PCOs) increased mRNAs encoding proteins and enzymes involved in elastic fiber formation, whereas glibenclamide had the opposite effect.³⁷ For these reasons, the investigation of the potential overexpression of elastin in vascular smooth muscle cells by application of the newly synthesized potassium channel openers described here is of high interest.

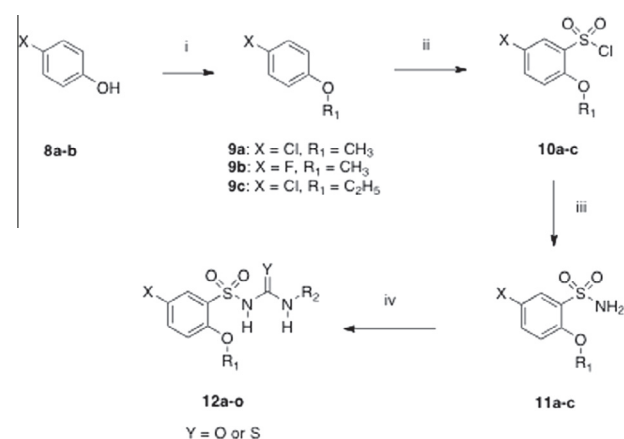
A series of experiments were also conducted in order to verify that the biological effects of series **A** and **B** compounds were mediated by K_{ATP} channel activation. Selected compounds were also examined on pancreatic β -cells as putative inhibitors of insulin secretion, reflecting their K_{ATP} channel opening activity on the pancreatic endocrine tissue, and their effects on glycaemia were measured. Finally, the ionization constant (pK_a) of selected compounds was determined in order to collect information about the prominent form of the compounds in physiological media.

2. Chemistry

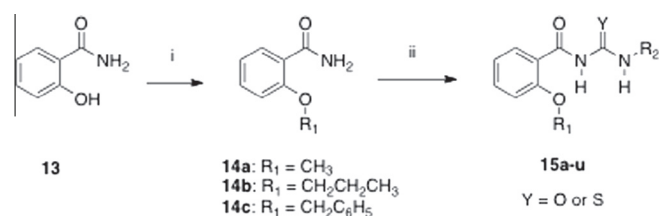
The synthetic pathway to sulfonylureas and sulfonylthiureas (**A**) is described in Scheme 1. The compounds were obtained from the appropriate *para*-halophenols in four successive steps. Firstly, an appropriate *para*-halophenol (**8a,b**) was alkylated by means of the appropriate alkyl halide in the presence of potassium carbonate to provide the 1-halo-4-alkoxybenzenes **9a–c**. The ether intermediates **9a–c** were then treated with chlorosulfonic acid in chloroform, at 0 °C, leading to benzenesulfonyl chlorides **10a–c**. The latter were converted into benzenesulfonamides **11a–c** after reaction with concentrated ammonium hydroxide. Finally, sulfonamides **11**, after their conversion to the corresponding sodium salts, provided the final sulfonylureas and sulfonylthiureas **12a–o** by reaction with the appropriate isocyanate ($R_2N=C=O$) or isothiocyanate ($R_2N=C=S$).

The synthetic route used to prepare carbonylureas and carbonylthiureas (**B**) involved two steps (Scheme 2). Starting from 2-hydroxybenzamide, 2-alkoxybenzamides **14a–c** were prepared by reaction with an appropriate alkyl halide in ethanol in the presence of sodium hydroxide. Treatment of intermediates **14a–c** with sodium hydride, then with an appropriate isocyanate or isothiocyanate, yielded the final compounds **15a–u**.

All compounds from series **A** (**12a–o**) and **B** (**15a–u**) were purified by crystallization and characterized by IR, ¹H NMR and



Scheme 1. Reagents: (i) K₂CO₃, R₁X, acetone; (ii) HClO₃S; (iii) NH₄OH, dioxane; (iv) NaH, R₂NCO or R₂NCS, DMF.



Scheme 2. Reagents: (i) NaOH, R₁X, EtOH; (ii) NaH, R₂NCO or R₂NCS, DMF.

elemental analyses to obtain the final materials with the chemical purity required prior to pharmacological evaluation.

3. Results and discussion

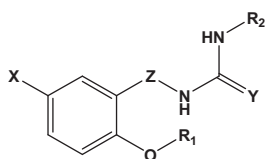
Compounds **12a–o** and **15a–u** were evaluated for their ability to relax rat aortic rings precontracted with 30 mM KCl (Table 1). Diazoxide was used as a reference vasodilator and PCO. On the vascular tissue, diazoxide provoked a marked myorelaxant activity ($EC_{50} = 21.6 \mu\text{M}$).

As observed in Table 1, all the sulfonyl(thio)ureas **12** were found to be inactive on rat aorta rings as vasodilators ($EC_{50} > 300 \mu\text{M}$) while most compounds of the second series (carboxy(thio)ureas **15**) exhibited a substantial vasorelaxant effect, some of them being equipotent or even more potent than diazoxide (such as the most active compound **15k**, $EC_{50} = 12.2 \mu\text{M}$). It can also be observed, with the carboxyureas, that the preferred R₁ chain for myorelaxant activity was the benzyl chain [see for example **15h** ($EC_{50} = 16.7 \mu\text{M}$), **15j** ($EC_{50} = 17.3 \mu\text{M}$)]. The carboxythiureas analogues were generally found to be equipotent to their corresponding ureas and some of them reached or slightly overtook the activity of diazoxide, that is **15n**, **15o** and **15t**, with $EC_{50} = 15.2 \mu\text{M}$, $18.6 \mu\text{M}$ and $16.5 \mu\text{M}$, respectively.

The inactivity of series **A** compounds (**12a–o**) could be attributed to their acidic character, as suggested by their pK_a values (between 4.5 and 5.7; see Table 2). At physiological pH, the nitrogen atom between the SO₂ and the C=O groups in the **A** series of molecules is expected to be mainly ionized, while the analogue nitrogen atom in the **B** series (**15a–u**) is probably not ionized even at pH = 10. This feature indicates that the presence of a non-ionized NH group linked to the C=O function in the **B** series could be essential for the biological activity.

In order to verify whether the vasorelaxant effects were mediated by K_{ATP} channel activation, additional experiments were performed on: (i) 30 mM K⁺-depolarized rat aorta rings in the

Table 1
Effect of compounds from series **A** and **B** on the contractile activity of K⁺-depolarized rat aorta rings



Compd	X	Z	R ₁	R ₂	Y	Vasorelaxant activity EC ₅₀ ^a (μM)
12a	Cl	SO ₂	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	O	>300 (6)
12b	Cl	SO ₂	CH ₃	C ₆ H ₁₁	O	>300 (6)
12c	Cl	SO ₂	CH ₃	C ₆ H ₅	O	>300 (6)
12d	Cl	SO ₂	CH ₃	<i>p</i> -F-C ₆ H ₄	O	>300 (6)
12e	Cl	SO ₂	CH ₃	C ₂ H ₅	S	>300 (6)
12f	Cl	SO ₂	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	S	>300 (6)
12g	Cl	SO ₂	CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅	S	>300 (6)
12h	F	SO ₂	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	O	>300 (6)
12i	F	SO ₂	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	S	>300 (6)
12j	Cl	SO ₂	CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃) ₂	O	>300 (6)
12k	Cl	SO ₂	CH ₂ CH ₃	C ₆ H ₁₁	O	>300 (6)
12l	Cl	SO ₂	CH ₂ CH ₃	C ₆ H ₅	O	>300 (6)
12m	Cl	SO ₂	CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃) ₂	S	>300 (6)
12n	Cl	SO ₂	CH ₂ CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅	S	>300 (6)
12o	Cl	SO ₂	CH ₂ CH ₃	<i>p</i> -F-C ₆ H ₄	S	>300 (6)
15a	H	C=O	CH ₃	C ₂ H ₅	O	>100 (5)
15b	H	C=O	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	O	91.4 ± 24.1 (4)
15c	H	C=O	CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	O	31.8 ± 1.4 (5)
15d	H	C=O	CH ₃	C ₆ H ₁₁	O	35.9 ± 1.4 (6)
15e	H	C=O	CH ₃	C ₆ H ₅	O	26.7 ± 5.9 (4)
15f	H	C=O	CH ₂ CH ₂ CH ₃	C ₆ H ₁₁	O	58.2 ± 11.2 (6)
15g	H	C=O	CH ₂ CH ₂ CH ₃	C ₆ H ₅	O	59.6 ± 1.9 (5)
15h	H	C=O	CH ₂ C ₆ H ₅	C ₂ H ₅	O	16.7 ± 2.2 (3)
15i	H	C=O	CH ₂ C ₆ H ₅	CH(CH ₃) ₂	O	26.8 ± 3.5 (3)
15j	H	C=O	CH ₂ C ₆ H ₅	C ₅ H ₁₁	O	17.3 ± 0.5 (5)
15k	H	C=O	CH ₂ C ₆ H ₅	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	O	12.2 ± 1.8 (6)
15l	H	C=O	CH ₂ C ₆ H ₅	C ₆ H ₁₁	O	33.8 ± 6.1 (5)
15m	H	C=O	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₅	O	21.1 ± 2.7 (6)
15n	H	C=O	CH ₃	C ₂ H ₅	S	15.2 ± 2.3 (5)
15o	H	C=O	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	S	18.6 ± 2.3 (6)
15p	H	C=O	CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	S	36.6 ± 2.1 (5)
15q	H	C=O	CH ₃	C ₆ H ₅	S	34.5 ± 3.8 (9)
15r	H	C=O	CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅	S	47.2 ± 12.0 (3)
15s	H	C=O	CH ₂ CH ₂ CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅	S	71.1 ± 4.7 (5)
15t	H	C=O	CH ₂ CH ₂ CH ₃	C ₆ H ₅	S	16.5 ± 2.0 (6)
15u	H	C=O	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₅	S	>100 (5)
Diazoxide						21.6 ± 3.0 (9)

^a EC₅₀ is the drug concentration (μM) giving 50% relaxation of the 30 mM KCl-induced contraction. Results are expressed as means ± sem; *n* refers to the number of experiments.

Table 2
Ionization constants of some compounds of series **A**

Compounds	X	Z	R ₁	R ₂	Y	pK _a ^a
12a	Cl	SO ₂	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	O	5.65
12b	Cl	SO ₂	CH ₃	C ₆ H ₁₁	O	5.46
12c	Cl	SO ₂	CH ₃	C ₆ H ₅	O	4.50
12f	Cl	SO ₂	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	S	5.74
12h	F	SO ₂	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	O	5.52

^a The pK_a values for series **B** compounds could not be determined because all UV-visible spectra were identical in this series at all tested pH values.

continuous presence of 10 μM glibenclamide, a specific blocker of K_{ATP} channels, and (ii) 80 mM K⁺-depolarized rat aorta rings; two experimental conditions in which the vasodilator activity of K_{ATP} channel activators is known to be suppressed or markedly decreased.³⁸

As shown in Table 3, the presence of glibenclamide in the bathing medium provoked a noticeable increase in the EC₅₀ value of the selected compounds, suggesting the involvement of K_{ATP} channels in the vasodilatory activity of these molecules. It must be noted that the glibenclamide-induced increases in the EC₅₀ values were lower for the **B** series compounds (about 2 fold) than for diazoxide (about 8 fold), suggesting that K_{ATP} channels only partly mediate the vasorelaxation.

Moreover, the preservation of myorelaxant effects together with the increases in the EC₅₀ values recorded on rat aorta rings precontracted by 80 mM KCl were also indicative for a non-exclusive involvement of K_{ATP} channels in the vasorelaxant response. This was illustrated by the concentration-dependent rightward

Table 3
Myorelaxant effect of selected compounds on 30 mM KCl-precontracted rat aorta rings in the absence or presence of 10 μM glibenclamide, as well as on 80 mM KCl-precontracted rat aorta rings

Compound	KCl 30 mM EC ₅₀ ^a (μM)	KCl 30 mM + Glib. 10 μM EC ₅₀ ^a (μM)	KCl 80 mM EC ₅₀ ^a (μM)
15h	16.7 ± 2.2 (3)	38.0 ± 3.6* (6)	36.6 ± 3.8 [§] (6)
15k	12.2 ± 1.8 (6)	20.2 ± 2.3* (7)	45.6 ± 6.6** (5)
15n	15.2 ± 2.3 (5)	28.2 ± 6.0 (5)	57.1 ± 4.6 [§] (5)
15o	18.6 ± 2.3 (6)	28.1 ± 4.3 (4)	38.1 ± 2.8** (4)
15t	16.5 ± 2.0 (6)	64.9 ± 14.7** (3)	121.0 ± 10.9 [§] (6)
Diazoxide	19.5 ± 2.7 (6) ^b	163.4 ± 41.2 (6) ^b	>300 (6) ^b

p < 0.05 was considered significant. **p* < 0.05; ***p* < 0.01; [§]*p* < 0.001.

^a EC₅₀ is the drug concentration (μM) giving 50% relaxation of the 30 or 80 mM KCl-induced contraction (mean ± sem). Number in parentheses refers to the number of individual experiments performed in each group. Glib: glibenclamide.

^b Published results (Ref. 46). Statistical analysis was performed comparing the EC₅₀ in the presence of glibenclamide and at KCl 80 mM versus EC₅₀ at KCl 30 mM.

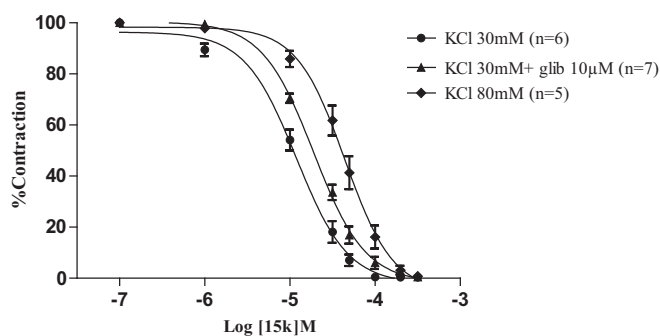


Figure 5. Concentration-response curve of compound **15k** on 30 mM KCl-induced rat aorta rings, in the absence or presence of 10 μM glibenclamide (glib), and 80 mM KCl-precontracted rat aorta rings. Data are expressed as mean ± sem of (*n*) rat aorta rings.

Table 4
Myorelaxant effect of selected compounds on 30 mM KCl-precontracted rat aorta rings with and without endothelium

Compound	Rat aorta rings with endothelium EC ₅₀ ^a (μM)	Rat aorta rings without endothelium EC ₅₀ ^a (μM)
15h	16.7 ± 2.2 (3)	17.2 ± 2.6 (6)
15k	12.2 ± 1.8 (6)	15.3 ± 1.7 (5)
15n	15.2 ± 2.3 (5)	17.4 ± 1.9 (4)
15o	18.6 ± 2.3 (6)	15.7 ± 1.2 (5)
15t	16.5 ± 2.0 (6)	12.0 ± 0.5 (5)

^a EC₅₀ is the drug concentration (μM) giving 50% relaxation of the 30 mM KCl-induced contraction (mean ± sem). Number in parentheses refers to the number of individual experiments performed in each group.

Table 5
Effects of compounds **15h**, **15k**, **15n**, **15o**, **15t** and diazoxide on insulin secretion from rat pancreatic islets [mean \pm sem (*n*)]

Compd	X	Z	R ₁	R ₂	Y	Residual insulin secretion (%) mean \pm sem (<i>n</i>)	
						50 μ M	10 μ M
15h	H	C=O	CH ₂ C ₆ H ₅	C ₂ H ₅	O	113.3 \pm 5.8 (24)	110.2 \pm 5.3 (23)
15k	H	C=O	CH ₂ C ₆ H ₅	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	O	21.4 \pm 1.9 (22)	90.1 \pm 5.1 (23)
15n	H	C=O	CH ₃	C ₂ H ₅	S	99.6 \pm 4.8 (24)	94.1 \pm 6.3 (22)
15o	H	C=O	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	S	104.7 \pm 5.4 (24)	90.9 \pm 3.6 (23)
15t	H	C=O	CH ₂ CH ₂ CH ₃	C ₆ H ₅	S	44.9 \pm 2.1 (23)	83.8 \pm 3.5 (23)
Diazoxide	—	—	—	—	—	28.8 \pm 2.4 (21) ^a	70.0 \pm 3.6 (22) ^a

^a Published results (Ref. 46).

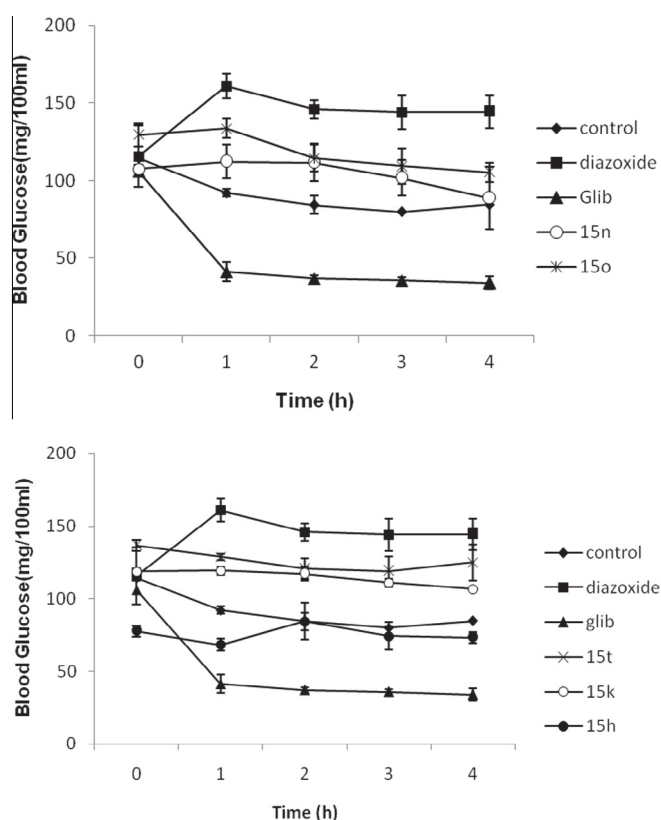


Figure 6. Time courses for the changes in blood glucose levels in rats orally administered at time zero with compounds **15n**, **15o**, **15t**, **15k**, **15h** (50 mg/kg), diazoxide (50 mg/kg) or glibenclamide (0.25 mg/kg). Data are expressed as mean values \pm sem of three rats (*n* = 3).

shift of the concentration-response curves for **B** series compounds, such as **15k** (Fig. 5).

As shown in Table 4, most examples of active compounds on aorta rings (**15h**, **15k**, **15n**, **15o**, **15t**) roughly maintained the same vasorelaxant potency in the presence or absence of endothelium, indicating that the mechanism and site of action of these compounds were endothelium-independent.

Compounds **15h**, **15k**, **15n**, **15o**, **15t** and the reference compound diazoxide were also examined on rat pancreatic islets in order to evaluate their ability to affect the glucose-induced insulin release. As shown in Table 5, most compounds were inactive on insulin secretion except **15t** and **15k** which exhibited a significant inhibitory effect at a 50 μ M concentration (residual insulin secretion: 44.9% and 21.4%, respectively). Such results suggest a relative tissue selectivity of some of these compounds for the vascular smooth muscle.

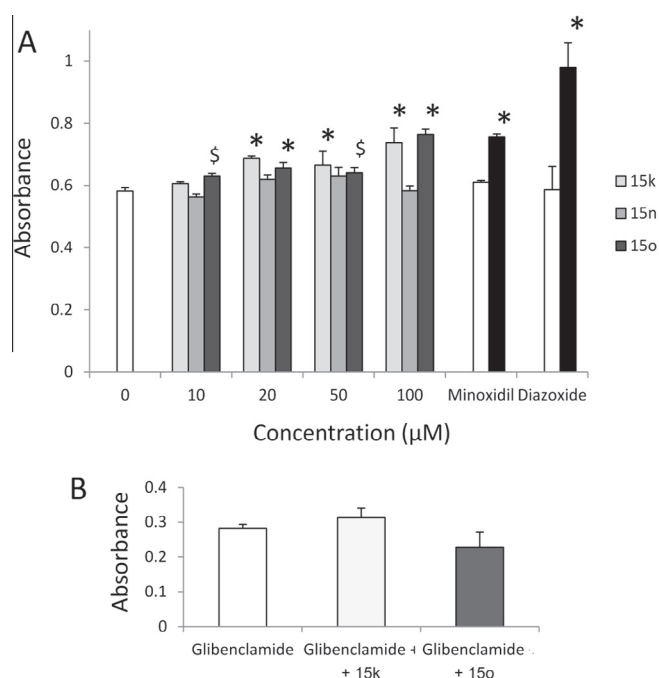


Figure 7. Effect of original molecules on elastin production by vascular smooth muscle cells. (A) Elevation of absorbance as a function of different concentrations of molecules **15k**, **15n** and **20o** was compared to the effects of the carrier alone (DMSO), 1 mM minoxidil or 50 μ M diazoxide. For minoxidil effect, the control has been changed because this molecule was solubilized in water at the concentration used: white bar = control (no DMSO, no minoxidil); black bar = minoxidil. (B) Presence of 10 μ M glibenclamide during the whole experiment abolished the stimulation of elastin production induced by 100 μ M **15k** or **15o**. The absorbance is representative of extracellular elastin quantity (*n* = 3–4 in each group of test synthesized molecules, *n* = 6–9 in each positive or negative control group). Significance difference with the corresponding control: **P* \leq 0.05, ^s*P* \leq 0.07.

Compounds **15h**, **15k**, **15n**, **15o** and **15t** were further evaluated in vivo to measure blood glucose concentration in rats. Figure 6 revealed that the tested compounds displayed a weak effect on the blood glucose concentration compared to the reference compounds, diazoxide (hyperglycemic agent) and glibenclamide (hypoglycemic agent), which induced a hyperglycemic and a hypoglycemic effect, respectively. Thus, compounds **15t** and **15k**, which were able to inhibit insulin secretion in vitro, were without marked effect on blood glucose concentration. Such an observation might result from poor bioavailability or rapid metabolism in vivo after oral administration.

Finally, some of the most vasoactive compounds were tested in another biological model, that is, the elastin production by cultured vascular smooth muscle cells. Compounds **15k**, **15n** and

15o in solution in DMSO were applied to the cells at different concentrations: 0 (DMSO alone added to cells), 10, 20, 50 and 100 μM (Fig. 7). While compound **15n** had no effect on elastin production compared to the effect of DMSO alone, a concentration-dependent effect was observed with compounds **15k** and **15o**. Elastin production by vascular smooth muscle cells was significantly increased at concentrations as low as 20 μM for **15k** and **15o** (2-way ANOVA, $P \leq 0.05$). At 100 μM **15k** or **15o**, the elastin production was increased by about 30% while minoxidil induced the same effect but at concentration of 1 mM. In additional experiments, compound **15h** was found to be unable to enhance elastin production at concentrations of 10 and 20 μM (data not shown). It is interesting to note that the stimulatory effects of **15k** and **15o** on elastin production were totally abolished by 10 μM glibenclamide; indicating a putative involvement of K_{ATP} channels in elastin production (Fig. 7B).

The reference compound diazoxide was also tested on elastin production by vascular smooth muscle cells. Compared to experimental control conditions (DMSO alone), a significant activation of elastin production was observed at 50 μM (+67%, 1-way ANOVA).

4. Conclusion

Starting from the K_{ATP} channel openers 3-alkylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxides, structural modulation by ring opening led to two series of compounds (series **A** and **B**). Series **A** molecules (benzenesulfonylureas and benzenesulfonylthiureas) were found to be devoid of vasorelaxant activity by contrast to series **B** compounds (benzenecarbonylureas and benzenecarbonylthiureas); some of the latter drugs being even more active as vasorelaxants than the reference compound diazoxide (**15h**, **15j**, **15k**, **15n**, **15o** and **15t**). Our results strongly suggest that the lack of activity of series **A** molecules was dependent on their ionization at physiological pH, as a result of the acidic character linked to the sulfonylurea function. The vasodilatory activity of selected series **A** compounds (**15h**, **15k**, **15n**, **15o** and **15t**) was decreased in the presence of 10 μM glibenclamide and was reduced on rat aorta rings precontracted with 80 mM KCl. Such data suggested, at least in part, a potential involvement of K_{ATP} channels. The preservation of a vasodilatory activity in rat aortic rings deprived of endothelium indicated that the site of action of the molecules was located on the vascular smooth muscle cells and not on the endothelial cells.

The selected compounds, namely **15h**, **15k**, **15n**, **15o** and **15t**, at 50 μM , did not display a marked inhibitory effect on insulin secretion from pancreatic β -cells (except **15k** and **15t**) and on glycaemia, which suggested a relative tissue selectivity of some of these vasorelaxant compounds for the vascular smooth muscle.

In addition, some of the most potent vasorelaxant drugs from series **B** (**15k** and **15o**) also exhibited a substantial stimulatory action on the production of elastin, the main component of the arterial wall responsible for its elasticity and allowing appropriate hemodynamics.³⁹ This effect was again abolished by 10 μM glibenclamide; indicating a putative involvement of K_{ATP} channels in elastin production.

Taken together, molecules such as **15k** and **15o** could represent a class of vasorelaxant drugs, which, in the long term, could improve arterial elasticity and hemodynamics through their ability to increase elastin production. Further *in vivo* tests need to be performed to ascertain such a hypothesis. Additional perspectives also consist in the re-evaluation of the activity of series **A** molecules after methylating the NH group linked to the SO_2 group responsible for their ionization.

5. Experimental section

5.1. Chemistry

Reagents, starting materials and solvents were purchased from common commercial suppliers and were used as received. Melting points were determined on Stuart SMP 3 apparatus and were not corrected. IR spectra were recorded as KBr pellets on a Perkin-Elmer 1000 FTIR spectrophotometer. The ^1H NMR spectra were recorded at ambient temperature on a Bruker Avance (500 MHz) instrument using $\text{DMSO-}d_6$ as solvent with TMS as an internal standard. Chemical shifts (δ) are given in parts per million and splitting patterns are designated as follows: s, singlet; d, doublet; dd, double doublet; t, triplet; q, quadruplet; m, multiplet, b, broad and bs broad singlet. Elemental analyses (C, H, N, S) were realized on a Thermo Scientific Flash EA 1112-elemental analyzer and were within $\pm 0.4\%$ of the theoretical values. All reactions were followed by thin layer chromatography performed on silica gel Merck 60 F₂₅₄.

5.1.1. General procedure for preparing 9a–c

p-Halophenol (78 mmol), potassium carbonate (117 mmol) and methyl iodide (117 mmol) were mixed together in acetone (60 mL) and refluxed for 3 h. Acetone was removed by evaporation under reduced pressure and the residue was extracted with Et_2O (3×50 mL). The ether layer was dried over anhydrous MgSO_4 and evaporated.

5.1.1.1. 1-Chloro-4-methoxybenzene (9a). Yellow oil (79%); ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz) δ : 3.73 (s, 3H, OCH_3), 6.96 (d, 2H, 3,5-*H*), 7.33 (d, 2H, 2,6-*H*).

5.1.1.2. 1-Fluoro-4-methoxybenzene (9b). The product was separated on silica gel column chromatography using $\text{EtOAc}/\text{hexane}$ (10/90) as eluent. Yellow oil (58%); ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz) δ : 3.73 (s, 3H, OCH_3), 6.75 (d, 2H, 3,5-*H*), 6.86 (d, 2H, 2,6-*H*).

5.1.1.3. 1-Chloro-4-ethoxybenzene (9c). Colorless oil (89%); ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz) δ : 1.32 (t, 3H, OCH_2CH_3), 4.00 (q, 2H, OCH_2CH_3), 6.95 (d, 2H, 3,5-*H*), 7.30 (d, 2H, 2,6-*H*).

5.1.2. General procedure for preparing 11a–c

The solution of 1-halo-4-alkoxybenzene **9** (8.5 g) in chloroform (50 mL) was introduced in a 250 mL three-necked flask, equipped with a magnetic stirrer, a thermometer, a calcium chloride guard and a dropping reagent. The solution was cooled to 0 $^\circ\text{C}$ and added dropwise to chlorosulfonic acid (15 mL). After completion, the reaction mixture was heated to room temperature, left for 2 h, and then poured over crushed ice. The resulting mixture was extracted with chloroform. The organic extracts were dried over sodium sulfate and concentrated under reduced pressure until crystallization. The resulting sulfonyl chlorides (7–8 g) (**10a–c**) were dissolved in 60 mL dioxane and added dropwise to a 30% m/v solution of ammonia (100 mL). The reaction mixture was concentrated under reduced pressure, leading to a solid which was collected by filtration, washed with cold water, and dried.

5.1.2.1. 5-Chloro-2-methoxybenzenesulfonamide (11a). (45%); mp 152–153 $^\circ\text{C}$; IR (KBr) ν : 3323, 3259 (N–H); 1329, 1166 (SO_2) cm^{-1} ; ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz) δ : 3.90 (s, 3H, OCH_3), 7.24 (s, 2H, SO_2NH_2), 7.25 (d, 1H, 3-*H*), 7.63 (d, 1H, 4-*H*), 7.67 (s, 1H, 6-*H*). Anal. ($\text{C}_7\text{H}_8\text{ClNO}_3\text{S}$) theoretical: 37.93 C, 3.64 H, 6.32 N, 14.46 S. Found: 38.02 C, 3.64 H, 6.36 N, 14.31 S.

5.1.2.2. 5-Fluoro-2-methoxybenzenesulfonamide (11b). (40%); mp 174–175 °C; IR (KBr) ν : 3323, 3259 (N–H); 1329, 1166 (SO₂) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 3.89 (s, 3H, OCH₃), 7.22 (s, 2H, SO₂NH₂), 7.24 (dd, 1H, 3-*H*), 7.43 (dd, 1H, 4-*H*), 7.48 (dd, 1H, 6-*H*). Anal. (C₇H₈FNO₃S) theoretical: 40.97 C, 3.93 H, 6.83 N, 15.62 S. Found: 41.01 C, 3.92 H, 7.18 N, 15.60 S.

5.1.2.3. 5-Chloro-2-ethoxybenzenesulfonamide (11c). (47%); mp 156–157 °C; IR (KBr) ν : 3367, 3269 (N–H); 1321, 1163 (SO₂) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 1.36 (t, 3H, OCH₂CH₃), 4.21 (q, 2H, OCH₂CH₃), 7.11 (s, 2H, SO₂NH₂), 7.25 (d, 1H, 3-*H*), 7.61 (dd, 1H, 4-*H*), 7.67 (d, 1H, 6-*H*). Anal. (C₈H₁₀ClNO₃S) theoretical: 40.77 C, 4.28 H, 5.94 N, 13.60 S. Found: 41.97 C, 4.35 H, 6.08 N, 13.74 S.

5.1.3. General procedure for preparing sulfonylurea and sulfonylthiourea compounds (12a–o)

Sodium hydride (100 mg) was added to a cooled solution of sulfonamide **16** (500 mg) in anhydrous DMF. The mixture was stirred for 15 min, after which an appropriate isocyanate or isothiocyanate was added. Stirring was continued at room temperature until completion of the reaction monitored by TLC. The mixture was poured into cold water and filtered. The filtrate was acidified with 1 N HCl. The resulting precipitate was collected by filtration, washed with water and dried.

5.1.3.1. N-Isopropyl-N'-(5-chloro-2-methoxybenzenesulfonyl)urea (12a). White powder (76%); mp 198–199 °C, IR (KBr) ν : 3338 (N–H); 1666 (C=O); 1340, 1161 (SO₂) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 0.98 (d, 6H, CH(CH₃)₂), 3.55 (st, 1H, CH(CH₃)₂), 3.90 (s, 3H, OCH₃), 6.22 (d, 1H, NHCH), 7.28 (dd, 1H, arom 3-*H*), 7.70 (d, 1H, arom 4-*H*), 7.71 (d, 1H, arom 6-*H*), 10.25 (s, 1H, SO₂NHCO). Anal. (C₁₁H₁₅ClN₂O₄S) theoretical: 43.07 C, 4.93 H, 9.13 N, 10.45 S. Found: 43.11 C, 4.95 H, 9.30 N, 10.42 S.

5.1.3.2. N-Pentyl-N'-(5-chloro-2-methoxybenzenesulfonyl)urea (12b). White powder (70%); mp 147–148 °C, IR (KBr) ν : 3326 (N–H); 1657 (C=O); 1351, 1160 (SO₂) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 0.81 (t, 3H, CH₃(CH₂)₄), 1.11 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂(CH₂)₂), 1.21 (m, 2H, CH₂CH₂(CH₂)₃), 1.30 (m, 2H, CH₂(CH₂)₂CH₂CH₂), 2.92 (q, 2H, CH₂(CH₂)₃CH₂), 3.90 (s, 3H, OCH₃), 6.37 (t, 1H, NHCH₂), 7.28 (d, 1H, arom 3-*H*), 7.69 (d, 1H, arom 4-*H*), 7.71 (d, 1H, arom 6-*H*), 10.44 (s, 1H, SO₂NHCO). Anal. (C₁₃H₁₉ClN₂O₄S) theoretical: 46.63 C, 5.72 H, 8.37 N, 9.58 S. Found: 46.60 C, 5.73 H, 8.59 N, 9.64 S.

5.1.3.3. N-Phenyl-N'-(5-chloro-2-methoxybenzenesulfonyl)urea (12c). White powder (43%); mp 176–177 °C; IR (KBr) ν : 3344 (N–H); 1687 (C=O); 1353, 1164 (SO₂) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 3.92 (s, 3H, OCH₃), 7.02 (t, 1H, arom 4'-*H*), 7.25 (d, 2H, arom 3'-*H*, 5'-*H*), 7.28 (d, 1H, arom 3-*H*), 7.31 (d, 2H, arom 2'-*H*, 6'-*H*), 7.72 (dd, 1H, arom 4-*H*), 7.77 (d, 1H, arom 6-*H*), 8.71 (s, 1H, NHC₆H₅), 10.40 (s, 1H, SO₂NHCO). Anal. (C₁₄H₁₃ClN₂O₄S) theoretical: 49.34 C, 3.85 H, 8.22 N, 9.41 S. Found: 49.32 C, 4.08 H, 8.19 N, 9.01 S.

5.1.3.4. N-(4-Fluorophenyl)-N'-(5-chloro-2-methoxybenzenesulfonyl)urea (12d). White powder (30%); mp 270 °C; IR (KBr) ν : 3334 (N–H); 1638 (C=O); 1315, 1153 (SO₂) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 3.92 (s, 3H, OCH₃), 7.02 (t, 2H, arom 3'-*H*, 5'-*H*), 7.29 (d, 1H, arom 3-*H*), 7.34 (dd, 2H, arom 2'-*H*, 6'-*H*), 7.72 (dd, 1H, arom 4-*H*), 7.77 (d, 1H, arom 6-*H*), 7.95 (s, 1H, NHC₆H₅), 10.10 (s, 1H, SO₂NHCO). Anal. (C₁₄H₁₂ClFN₂O₄S) theoretical: 46.87 C, 3.37 H, 7.81 N, 8.94 S. Found: 47.15 C, 3.42 H, 8.01 N, 8.84 S.

5.1.3.5. N-Ethyl-N'-(5-chloro-2-methoxybenzenesulfonyl)thiourea (12e). White powder (69%); mp 206–208 °C, IR (KBr) ν : 3335 (N–H); 1181 (C=S); 1341, 1138 (SO₂) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 1.00 (t, 3H, CH₃CH₂), 3.42 (q, 2H, CH₂CH₂), 3.90 (s, 3H, OCH₃), 7.29 (d, 1H, arom 3-*H*), 7.72 (dd, 1H, arom 4-*H*), 7.76 (d, 1H, arom 6-*H*), 8.37 (s, 1H, NHCH₂CH₃), 11.28 (s, 1H, SO₂NHCS). Anal. (C₁₀H₁₃ClFN₂O₃S₂) theoretical: 38.89 C, 4.25 H, 9.07 N, 20.76 S. Found: 38.76 C, 4.25 H, 9.13 N, 20.68 S.

5.1.3.6. N-Isopropyl-N'-(5-chloro-2-methoxybenzenesulfonyl)thiourea (12f). White powder (75%); mp 209–210 °C; IR (KBr) ν : 3338 (N–H); 1340, 1150 (SO₂) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 1.00 (d, 6H, (CH₃)₂CH₂), 3.55 (st, 1H, (CH₃)₂CH₂), 3.90 (s, 3H, OCH₃), 6.25 (d, 1H, NHCH), 7.28 (d, 1H, 3-*H*), 7.69 (dd, 1H, 4-*H*), 7.71 (d, 1H, 6-*H*), 10.28 (s, 1H, SO₂NHCS). Anal. (C₁₁H₁₅ClFN₂O₃S₂) theoretical: 40.92 C, 4.68 H, 8.68 N, 19.86 S. Found: 41.02 C, 4.78 H, 8.60 N, 19.62 S.

5.1.3.7. N-Benzyl-N'-(5-chloro-2-methoxybenzenesulfonyl)thiourea (12g). White powder (60%); mp 184 °C, IR (KBr) ν : 3338 (N–H); 1164 (C=S); 1351, 1137 (SO₂) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 3.84 (s, 3H, OCH₃), 4.67 (d, 2H, NHCH₂), 7.14 (d, 2H, arom 2'-*H*, 6'-*H*), 7.23 (d, 1H, arom 4'-*H*), 7.28 (d, 1H, arom 3-*H*), 7.30 (d, 2H, arom 3'-*H*, 5'-*H*), 7.73 (dd, 1H, arom 4-*H*), 7.77 (d, 1H, arom 6-*H*), 8.76 (t, 1H, NHCH₂), 11.45 (s, 1H, SO₂NHCS). Anal. (C₁₅H₁₅ClFN₂O₃S₂) theoretical: 48.58 C, 4.08 H, 7.55 N, 17.29 S. Found: 48.47 C, 4.14 H, 7.69 N, 16.90 S.

5.1.3.8. N-Isopropyl-N'-(5-fluoro-2-methoxybenzenesulfonyl)urea (12h). White powder, (85.7%); mp 193.5–194 °C, IR (KBr) ν : 3338 (N–H), 1664 (C=O), 1340, 1156 (SO₂) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 1.00 (d, 6H, (CH₃)₂CH), 3.55 (m, 1H, (CH₃)₂CH), 3.90 (s, 3H, OCH₃), 6.20 (d, 1H, NHCH₂CH₃), 7.28 (d, 1H, arom 3-*H*), 7.51 (dd, 1H, arom 4-*H*), 7.53 (d, 1H, arom 6-*H*), 10.20 (s, 1H, SO₂NHCO). Anal. (C₁₁H₁₅FN₂O₄S) theoretical: 45.51 C, 5.21 H, 9.65 N, 11.04 S. Found: 45.50 C, 5.17 H, 9.82 N, 11.16 S.

5.1.3.9. N-Isopropyl-N'-(5-fluoro-2-methoxybenzenesulfonyl)thiourea (12i). White powder, (85%) mp 179–180 °C; IR (KBr) ν : 3323 (N–H), 1156 (C=S), 1341, 1136 (SO₂), ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 1.10 (d, 6H, (CH₃)₂CH), 3.89 (s, 3H, OCH₃), 4.19 (m, 1H, (CH₃)₂CH), 7.30 (dd, 1H, arom 3-*H*), 7.55 (dd, 1H, arom 4-*H*), 7.57 (d, 1H, arom 6-*H*), 8.15 (d, 1H, NHCH), 11.08 (s, 1H, SO₂NHCS). Anal. (C₁₁H₁₅FN₂O₃S₂) theoretical: 43.12 C, 4.93 H, 9.14 N, 20.93 S. Found: 43.07 C, 4.94 H, 9.16 N, 20.70 S.

5.1.3.10. N-Isopropyl-N'-(5-chloro-2-ethoxybenzenesulfonyl)urea (12j). White powder, (49%) mp 173.5–174 °C; IR (KBr) ν : 3346 (N–H); 1670 (C=O), 1337, 1163 (SO₂) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 0.99 (d, 6H, (CH₃)₃CH), 1.34 (t, 3H, CH₃CH₂O), 3.55 (m, 1H, (CH₃)₃CH), 4.21 (q, 2H, CH₂CH₂O), 6.25 (d, 1H, NHCH), 7.27 (d, 1H, arom 3-*H*), 7.66 (dd, 1H, arom 4-*H*), 7.71 (d, 1H, arom 6-*H*), 10.04 (s, 1H, SO₂NHCO). Anal. (C₁₂H₁₇ClN₂O₄S) theoretical: 44.99 C, 5.34 H, 8.73 N, 9.99 S. Found: 45.21 C, 5.52 H, 8.83 N, 9.53 S.

5.1.3.11. N-Cyclohexyl-N'-(5-chloro-2-ethoxybenzenesulfonyl)urea (12k). White powder, (72%) mp 189–190 °C, IR (KBr) ν : 3357 (N–H), 1667 (C=O), 1340, 1161 (SO₂) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 1.05–1.64 (m, 10H, CH₂ cyclohexyl), 1.34 (t, 3H, CH₃CH₂O), 3.29 (b, 1H, NHCH), 4.21 (q, 2H, CH₂CH₂O), 6.33 (d, 1H, NHCH), 7.27 (d, 1H, arom 3-*H*), 7.66 (dd, 1H, arom 4-*H*), 7.70 (d, 1H, arom 6-*H*), 10.00 (s, 1H, SO₂NHCO). Anal. (C₁₅H₂₁ClN₂O₄S) theoretical: 49.93 C, 5.87 H, 7.76 N, 8.88 S. Found: 49.78 C, 5.87 H, 8.10 N, 8.68 S.

5.1.3.12. N-Phenyl-N'-(5-chloro-2-ethoxybenzenesulfonyl)urea (12l). White powder, (31%) mp 194 °C, IR (KBr) ν : 3341 (N–H), 1687 (C=O), 1352, 1159 (SO₂) cm⁻¹, ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 1.32 (t, 3H, CH₃CH₂O), 4.22 (q, 2H, CH₃CH₂O), 7.02 (t, 1H, arom 4'-H), 7.24 (d, 2H, arom 3'-H, 5'-H), 7.30 (d, 2H, arom 2'-H, 6'-H), 7.70 (dd, 1H, arom 4-H), 7.77 (d, 1H, arom 6-H), 8.74 (s, 1H, NHC₆H₅), 10.30 (s, 1H, SO₂NHCO). Anal. (C₁₅H₁₅ClN₂O₄S) theoretical: 50.78 C, 4.26 H, 7.90 N, 9.04 S. Found: 50.76 C, 4.31 H, 8.10 N, 9.53 S.

5.1.3.13. N-Isopropyl-N'-(5-chloro-2-ethoxybenzenesulfonyl)thiourea (12m). White powder, (35%) mp 150–151 °C, IR (KBr) ν : 3327 (N–H), 1197 (C=S), 1345, 1158 (SO₂) cm⁻¹, ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 1.09 (d, 6H, (CH₃)₂CH), 1.33 (t, 3H, CH₃CH₂O), 4.16 (m, 1H, (CH₃)₂CH), 4.20 (q, 2H, CH₃CH₂O), 7.29 (d, 1H, arom 3-H), 7.70 (dd, 1H, arom 4-H), 7.76 (d, 1H, arom 6-H), 8.14 (d, 1H, NHCH), 10.90 (s, 1H, SO₂NHCS). Anal. (C₁₂H₁₇ClN₂O₃S₂) theoretical: 42.79 C, 5.09 H, 8.32 N, 19.04 S. Found: 42.53 C, 5.13 H, 8.52 N, 18.79 S.

5.1.3.14. N-Benzyl-N'-(5-chloro-2-ethoxybenzenesulfonyl)thiourea (12n). White powder, (68%) mp 185–186 °C, IR (KBr) ν : 3311 (N–H), 1165 (C=S), 1355, 1138 (SO₂), ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 1.30 (t, 3H, CH₃CH₂O), 4.17 (q, 2H, CH₃CH₂O), 4.66 (d, 2H, CH₂C₆H₅), 7.14 (d, 2H, arom 2'-H, 6'-H), 7.24 (d, 1H, arom 4'-H), 7.25 (d, 1H, arom 3-H), 7.27 (d, 2H, arom 3'H, arom 5'-H), 7.70 (dd, 1H, arom 4-H), 7.78 (d, 1H, arom 6-H), 8.74 (t, 1H, NHCH₂), 11.33 (s, 1H, SO₂NHCS). Anal. (C₁₆H₁₇ClN₂O₃S₂) theoretical: 49.93 C, 4.45 H, 7.28 N, 16.66 S. Found: 50.14 C, 4.52 H, 7.67 N, 16.63 S.

5.1.3.15. N-(4-Fluorophenyl)-N'-(5-chloro-2-ethoxybenzenesulfonyl)thiourea (12o). White powder, (43%); mp 181–182 °C, IR (KBr) ν : 3299 (N–H), 1169 (C=S), 1148 (SO₂) cm⁻¹, ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 1.30 (t, 3H, CH₃CH₂O), 4.23 (q, 2H, CH₃CH₂O), 7.18 (t, 2H, arom 2'-H, 6'-H), 7.29 (d, 1H, arom 3-H), 7.47 (t, 2H, arom 3'-H, 5'-H), 7.70 (d, 1H, arom 4-H), 7.79 (d, 1H, arom 6-H), 10.05 (s, 1H, NHC₆H₅), 11.33 (s, 1H, SO₂NHCS). Anal. (C₁₅H₁₄ClFN₂O₃S₂) theoretical: 46.37 C, 3.63 H, 7.20 N, 16.49 S. Found: 46.80 C, 3.86 H, 7.41 N, 16.55 S.

5.1.4. General procedure for preparing 14a–c

The mixture of 2-hydroxybenzamide (1 g, 7.3 mmol) and NaOH (0.4 g, 10 mmol) was stirred in EtOH (40 mL). Then, an appropriate alkyl halide (10.95 mmol) was added and the reaction medium was refluxed for 6 h. The excess of solvent was evaporated under reduced pressure, leading to a residue, which was triturated with water, filtered and dried.

5.1.4.1. 2-Methoxybenzamide (14a). White powder (90%); mp 128 °C, IR (KBr) ν : 3412 (N–H), 3169 (C–H aromatic), 1644 (C=O) cm⁻¹, ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 3.88 (s, 3H, CH₃), 7.02 (t, 1H, arom 5-H), 7.12 (d, 1H, arom 3-H), 7.45 (t, 1H, arom 4-H), 7.62 (s, 2H, CONH₂), 7.80 (d, 1H, arom 6-H). Anal. (C₈H₆NO₂) theoretical: 63.56 C, 6.00 H, 9.27 N. Found: 63.10 C, 5.96 H, 9.38 N.

5.1.4.2. 2-Propoxybenzamide (14b). White powder (92%); mp 101 °C, IR (KBr) ν : 3446 (N–H), 3179 (C–H aromatic), 2965 (C–H aliphatic), 1654 (C=O) cm⁻¹, ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 1.00 (t, 3H, CH₃), 1.80 (m, 2H, CH₂), 4.09 (q, 2H, OCH₂), 7.02 (t, 1H, arom 5-H), 7.12 (d, 1H, arom 3-H), 7.45 (t, 1H, arom 4-H), 7.62 (s, 2H, CONH₂), 7.80 (d, 1H, arom 6-H). Anal. (C₁₀H₁₃NO₂) theoretical: 67.02 C, 7.31 H, 7.82 N. Found: 67.22 C, 7.43 H, 7.78 N.

5.1.4.3. 2-Benzyloxybenzamide (14c). White powder (95%); mp 115–116, IR (KBr) ν : 3404 (N–H), 3190 (C–H aromatic), 1640 (C=O) cm⁻¹, ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 5.25 (s, 2H, CH₂), 7.03 (t, 1H, arom 5-H), 7.21 (d, 1H, arom 3-H), 7.42 (m, 5H, arom), 7.44 (t, 1H, arom 4-H), 7.59 (s, 2H, CONH₂), 7.78 (dd, 1H, arom 6-H). Anal. (C₁₄H₁₃NO₂) theoretical: 73.99 C, 5.77 H, 6.16 N. Found: 73.63 C, 5.62 H, 6.27 N.

5.1.5. General procedure for preparing 15a–u

Sodium hydride (100 mg) was added to a cooled solution of the appropriate benzamide **14** (500 mg) in anhydrous DMF. The mixture was stirred for 15 min, and the appropriate isocyanate (or isothiocyanate) was added. Stirring was continued at room temperature until completion of the reaction monitored by TLC. The mixture was poured into cold water and acidified with 1 N HCl. The precipitate was collected by filtration, washed with water and dried.

5.1.5.1. N-Ethyl-N'-(2-methoxybenzenecarbonyl)urea (15a). White powder (50%), mp 70–72 °C; IR (KBr) ν : 3337 (N–H), 2925 (C–H aliphatic), 1706, 1673 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 1.11 (t, 3H, CH₃CH₂), 3.23 (m, 2H, CH₃CH₂), 3.91 (s, 3H, OCH₃), 7.07 (t, 1H, 5-H), 7.19 (d, 1H, 3-H), 7.55 (t, 1H, 4-H), 7.69 (dd, 1H, 6-H), 8.49 (t, 1H, NHCH₂CH₃), 10.04 (s, 1H, CONHCO). Anal. (C₁₁H₁₄N₂O₃) theoretical: 59.45 C, 6.35 H, 12.61 N. Found: 60.59 C, 6.52 H, 12.24 N.

5.1.5.2. N-Isopropyl-N'-(2-methoxybenzenecarbonyl)urea (15b). White powder (85%); mp 92 °C; IR (KBr) ν : 3287 (N–H), 2925 (C–H aliphatic), 1672 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 1.17 (d, 6H, (CH₃)₂CH), 3.83 (m, 1H, (CH₃)₂CH), 3.91 (s, 3H, OCH₃), 7.07 (t, 1H, 5-H), 7.19 (d, 1H, 3-H), 7.55 (t, 1H, 4-H), 7.69 (dd, 1H, 6-H), 8.39 (t, 1H, NHCH(CH₃)₂), 10.05 (s, 1H, CONHCO). Anal. (C₁₂H₁₆N₂O₃) theoretical: 61.00 C, 6.83 H, 11.86 N. Found: 61.27 C, 6.93 H, 11.35 N.

5.1.5.3. N-Sec-butyl-N'-(2-methoxybenzenecarbonyl)urea (15c). White powder (80%); mp 65–65.5 °C; IR (KBr) ν : 3346, 3287 (N–H), 2968 (C–H aliphatic), 1690, 1660 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 0.88 (t, 3H, (CH₃CH₂)CH₃CH), 1.14 (d, 1H, (CH₃CH₂)CH₃CH), 1.50 (m, 2H, (CH₃CH₂)CH₃CH), 3.72 (m, 1H, (CH₃CH₂)CH₃CH), 3.91 (s, 3H, OCH₃), 7.08 (t, 1H, 5-H), 7.19 (d, 1H, 3-H), 7.55 (t, 1H, 4-H), 7.71 (dd, 1H, 6-H), 8.39 (d, 1H, NHCHCH₃(CH₂CH₃)), 10.05 (s, 1H, CONHCO). Anal. (C₃₁H₁₈N₂O₃) theoretical: 62.38 C, 7.25 H, 11.19 N. Found: 62.07 C, 7.32 H, 10.95 N.

5.1.5.4. N-Cyclohexyl-N'-(2-methoxybenzenecarbonyl)urea (15d). White powder (81%); mp 102–102.5 °C; IR (KBr) ν : 3346, 3279 (N–H), 2922 (C–H aliphatic), 1705, 1666 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 1.18–1.90 (m, 10H, C₆H₁₀), 3.61 (b, 1H, CHNH), 3.91 (s, 3H, OCH₃), 7.07 (t, 1H, 5-H), 7.19 (d, 1H, 3-H), 7.55 (t, 1H, 4-H), 7.70 (dd, 1H, 6-H), 8.50 (d, 1H, NHC₆H₁₁), 10.06 (s, 1H, CONHCO). Anal. (C₁₅H₂₀N₂O₃) theoretical: 65.20 C, 7.30 H, 10.14 N. Found: 65.40 C, 7.54 H, 10.22 N.

5.1.5.5. N-Phenyl-N'-(2-methoxybenzenecarbonyl)urea (15e). White powder (40%); mp 134 °C; IR (KBr) ν : 3238 (N–H), 1703, 1670 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 3.91 (s, 3H, OCH₃), 7.11 (t, 2H, 5-H, 4'-H), 7.22 (d, 1H, 3-H), 7.36 (t, 2H, 3',5'-H), 7.57 (t, 3H, 4, 2', 6'-H), 7.73 (dd, 1H, 6-H), 10.46 (d, 1H, NHC₆H₅), 10.70 (s, 1H, CONHCO). Anal. (C₁₅H₁₄N₂O₃) theoretical: 66.66 C, 5.22 H, 10.36 N. Found: 66.57 C, 5.20 H, 9.97 N.

5.1.5.6. N-Cyclohexyl-N'-(2-propyloxybenzenecarbonyl)urea (15f). White powder (80%); mp 73–74 °C; IR (KBr) ν : 3355, 3280 (N–H), 2919 (C–H aliphatic), 1707, 1667 (C=O) cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 1.03 (t, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.20–1.90 (m, 10H, C_6H_{10}), 1.80 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.61 (b, 1H, CHNH), 4.12 (t, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 7.07 (t, 1H, 5-H), 7.19 (d, 1H, 3-H), 7.55 (t, 1H, 4-H), 7.70 (dd, 1H, 6-H), 8.49 (d, 1H, $\text{NHC}_6\text{H}_{11}$), 10.08 (s, 1H, CONHCO). Anal. ($\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3$) theoretical: 67.08 C, 7.95 H, 9.20 N. Found: 66.91 C, 8.20 H, 9.07 N.

5.1.5.7. N-Phenyl-N'-(2-propyloxybenzenecarbonyl)urea (15g). White powder (64%); mp 72 °C; IR (KBr) ν : 3330 (N–H), 1715, 1664 (C=O) cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 1.03 (t, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.84 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 4.12 (t, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 7.13 (t, 2H, 5, 4'-H), 7.23 (d, 1H, 3-H), 7.36 (t, 2H, 3', 5'-H), 7.59 (t, 3H, 4, 2', 6'-H), 7.84 (dd, 1H, 6-H), 10.45 (s, 1H, NHC_6H_5), 10.70 (s, 1H, CONHCO). Anal. ($\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$) theoretical: 68.44 C, 6.08 H, 9.39 N. Found: 68.04 C, 6.50 H, 9.34 N.

5.1.5.8. N-Ethyl-N'-(2-benzyloxybenzenecarbonyl)urea (15h). White powder (40%); mp 74–75 °C; IR (KBr) ν : 3335 (N–H), 2925 (C–H aliphatic), 1698, 1660 (C=O) cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 1.09 (t, 3H, CH_3CH_2), 3.22 (q, 2H, CH_3CH_2), 5.27 (s, 2H, CH_2), 7.19 (t, 1H, 5-H), 7.28 (d, 1H, 3-H), 7.34–7.54 (m, 5H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 7.55 (t, 1H, 4-H), 7.71 (dd, 1H, 6-H), 8.47 (t, 1H, NHCH_2CH_3), 10.14 (s, 1H, CONHCO). Anal. ($\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$) theoretical: 68.44 C, 6.08 H, 9.39 N. Found: 68.44 C, 6.28 H, 9.10 N.

5.1.5.9. N-Isopropyl-N'-(2-benzyloxybenzenecarbonyl)urea (15i). White powder (87%); mp 84–85 °C; IR (KBr) ν : 3341, 3286 (N–H), 2925 (C–H aliphatic), 1690, 1664 (C=O) cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 1.15 (d, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 3.87 (m, 1H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 5.27 (s, 2H, CH_2), 7.09 (t, 1H, 5-H), 7.28 (d, 1H, 3-H), 7.34–7.54 (m, 5H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 7.55 (t, 1H, 4-H), 7.71 (dd, 1H, 6-H), 8.36 (d, 1H, $\text{NHCH}(\text{CH}_3)_2$), 10.17 (s, 1H, CONHCO). Anal. ($\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$) theoretical: 69.21 C, 6.48 H, 8.97 N. Found: 68.98 C, 6.96 H, 8.59 N.

5.1.5.10. N-Pentyl-N'-(2-benzyloxybenzenecarbonyl)urea (15j). White powder (45%); mp 74 °C; IR (KBr) ν : 3350, 3300 (N–H), 2900 (C–H aliphatic), 1695, 1652 (C=O) cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 0.96 (t, 3H, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4$), 1.29 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2$), 1.33 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3$), 1.50 (m, 2H, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.16 (q, 2H, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2$), 5.27 (s, 2H, CH_2), 7.09 (t, 1H, 5-H), 7.28 (d, 1H, 3-H), 7.34–7.51 (m, 5H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 7.55 (t, 1H, 4-H), 7.71 (dd, 1H, 6-H), 8.37 (d, 1H, NHCH), 10.15 (s, 1H, CONHCO). Anal. ($\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3$) theoretical: 70.56 C, 7.11 H, 8.23 N. Found: 70.36 C, 6.98 H, 8.34 N.

5.1.5.11. N-Sec-butyl-N'-(2-benzyloxybenzenecarbonyl)urea (15k). White powder (65%); mp 62–63 °C; IR (KBr) ν : 3334, 3270 (N–H), 2962 (C–H aliphatic), 1687, 1661 (C=O) cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 0.87 (t, 3H, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)\text{CH}_3$), 1.12 (d, 1H, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)\text{CH}_3$), 1.49 (m, 2H, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)\text{CH}_3$), 3.71 (m, 1H, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)\text{CH}_3$), 5.27 (s, 2H, CH_2), 7.09 (t, 1H, 5-H), 7.28 (d, 1H, 3-H), 7.34–7.51 (m, 5H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 7.55 (t, 1H, 4-H), 7.71 (dd, 1H, 6-H), 8.35 (d, 1H, NHCH), 10.18 (s, 1H, CONHCO). Anal. ($\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$) theoretical: 69.92 C, 6.79 H, 8.58 N. Found: 70.30 C, 7.13 H, 8.28 N.

5.1.5.12. N-Cyclohexyl-N'-(2-benzyloxybenzenecarbonyl)urea (15l). White powder (82%); mp 91–92 °C; IR (KBr) ν : 3273 (N–H), 2929 (C–H aliphatic), 1689, 1666 (C=O) cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 1.20–1.90 (m, 10H, C_6H_{10}), 3.59 (b, 1H, CHNH), 5.27 (s, 2H, CH_2), 7.09 (t, 1H, 5-H), 7.28 (d, 1H, 3-H),

7.34–7.51 (m, 5H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 7.55 (t, 1H, 4-H), 7.71 (dd, 1H, 6-H), 8.46 (d, 1H, $\text{NHC}_6\text{H}_{11}$), 10.08 (s, 1H, CONHCO). Anal. ($\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3$) theoretical: 71.57 C, 6.86 H, 7.95 N. Found: 71.60 C, 7.05 H, 7.74 N.

5.1.5.13. N-Benzyl-N'-(2-benzyloxybenzenecarbonyl)urea (15m). White powder (40%); mp 100–101 °C; IR (KBr) ν : 3324, 3284 (N–H), 3031 (C–H aromatic), 1692, 1660 (C=O) cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 4.41 (s, 2H, NHCH_2), 5.27 (s, 2H, OCH_2), 7.09 (t, 1H, 5-H), 7.19 (d, 1H, 3-H), 7.27–7.45 (m, 10H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 7.55 (t, 1H, 4-H), 7.72 (dd, 1H, 6-H), 8.93 (t, 1H, NHCH_2), 10.30 (s, 1H, CONHCO). Anal. ($\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$) theoretical: 73.32 C, 5.59 H, 7.77 N. Found: 73.72 C, 5.40 H, 7.58 N.

5.1.5.14. N-Ethyl-N'-(2-methoxybenzenecarbonyl)thiourea (15n). White powder (62%); mp 79.5 °C; IR (KBr) ν : 3316 (N–H), 2924 (C–H aliphatic), 1661 (C=O) cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 1.15 (t, 3H, CH_3CH_2), 3.61 (q, 2H, CH_3CH_2), 3.91 (s, 3H, OCH_3), 7.11 (t, 1H, 5-H), 7.24 (d, 1H, 3-H), 7.60 (t, 1H, 4-H), 7.86 (dd, 1H, 6-H), 10.67 (t, 1H, NHCH_2CH_3), 10.93 (s, 1H, CONHCS). Anal. ($\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$) theoretical: 55.44 C, 5.92 H, 11.76 N, 13.45 S. Found: 55.70 C, 6.12 H, 11.56 N, 13.47 S.

5.1.5.15. N-Isopropyl-N'-(2-methoxybenzenecarbonyl)thiourea (15o). White powder (60%); mp 109.5–110 °C; IR (KBr) ν : 3317 (N–H), 2929 (C–H aliphatic), 1655 (C=O) cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 1.26 (d, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 3.61 (q, 2H, CH_3CH_2), 3.98 (s, 3H, OCH_3), 4.37 (m, 1H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 7.11 (t, 1H, 5-H), 7.24 (d, 1H, 3-H), 7.60 (t, 1H, 4-H), 7.86 (dd, 1H, 6-H), 10.67 (t, 1H, NHCH_2CH_3), 10.93 (s, 1H, CONHCS). Anal. ($\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$) theoretical: 57.12 C, 6.39 H, 11.10 N, 12.70 S. Found: 57.51 C, 6.50 H, 11.23 N, 12.78 S.

5.1.5.16. N-Sec-butyl-N'-(2-methoxybenzenecarbonyl)thiourea (15p). White powder (42%); mp 79 °C; IR (KBr) ν : 3308 (N–H), 2926 (C–H aliphatic), 1656 (C=O) cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 0.91 (t, 3H, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)\text{CH}_3$), 1.22 (d, 3H, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)\text{CH}_3$), 1.63 (m, 2H, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)\text{CH}_3$), 3.91 (s, 3H, OCH_3), 4.27 (m, 1H, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)\text{CH}_3$), 7.12 (t, 1H, 5-H), 7.25 (d, 1H, 3-H), 7.61 (t, 1H, 4-H), 7.88 (dd, 1H, 6-H), 10.66 (d, 1H, $\text{NHCHCH}_3(\text{CH}_2\text{CH}_3)$), 10.94 (s, 1H, CONHCS). Anal. ($\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$) theoretical: 58.62 C, 6.81 H, 10.52 N, 12.04 S. Found: 58.80 C, 6.88 H, 10.66 N, 11.88 S.

5.1.5.17. N-Phenyl-N'-(2-methoxybenzenecarbonyl)thiourea (15q). White powder (55%); mp 154 °C; IR (KBr) ν : 3325 (N–H), 1655 (C=O) cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 3.90 (s, 3H, OCH_3), 6.98–7.50 (m, 9H, H arom), 8.65 (s, 1H, NHC_6H_5), 9.79 (s, 1H, CONHCS). Anal. ($\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$) theoretical: 62.92 C, 4.93 H, 9.78 N, 11.20 S. Found: 62.90 C, 4.91 H, 9.80 N, 11.18 S.

5.1.5.18. N-Benzyl-N'-(2-methoxybenzenecarbonyl)thiourea (15r). White powder (62%); mp 93–93.5 °C; IR (KBr) ν : 3333 (N–H), 1657 (C=O) cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 3.99 (s, 3H, OCH_3), 4.87 (d, 2H, CH_2), 7.14 (t, 1H, 5-H), 7.26 (d, 1H, 3-H), 7.29–7.42 (m, 5H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 7.64 (t, 1H, 4-H), 7.87 (dd, 1H, 6-H), 7.87 (d, 1H, NHCH_2), 11.06 (s, 1H, CONHCS). Anal. ($\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$) theoretical: 63.98 C, 5.37 H, 9.33 N, 10.67 S. Found: 63.80 C, 5.35 H, 9.61 N, 10.50 S.

5.1.5.19. N-Benzyl-N'-(2-propyloxybenzenecarbonyl)thiourea (15s). White powder (67%); mp 86–87 °C; IR (KBr) ν : 3320, 3238 (N–H), 2966 (C–H aliphatic), 1661 (C=O) cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 1.08 (t, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.92 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 4.20 (t, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 4.88 (d, 2H, NHCH_2), 7.15

(t, 1H, 5-*H*), 7.27 (d, 1H, 3-*H*), 7.30 (t, 1H, 4'-*H*), 7.38 (m, 4H, 2', 3', 5', 6'-*H*), 7.64 (t, 1H, 4-*H*), 7.96 (dd, 1H, 6-*H*), 11.11 (t, 1H, NHCH₂), 11.18 (s, 1H, CONHCS). Anal. (C₁₈H₂₀N₂O₂S) theoretical: 65.83 C, 6.14 H, 8.53 N, 9.76 S. Found: 66.03 C, 6.35 H, 8.75 N, 9.97 S.

5.1.5.20. N-Phenyl-N'-(2-propyloxybenzencarbonyl)thiourea (15t). White powder (57%); mp 72–73 °C; IR (KBr) ν : 3446, 3204 (N–H), 3035 (C–H aromatic), 1651 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 0.99 (t, 3H, CH₃CH₂CH₂), 1.80 (m, 2H, CH₃CH₂CH₂), 4.07 (t, 2H, CH₃CH₂CH₂), 4.87 (d, 2H, CH₂), 7.12 (t, 1H, 5-*H*), 7.25 (d, 1H, 3-*H*), 7.61 (t, 1H, 4-*H*), 7.88 (dd, 1H, 6-*H*), 8.61 (s, 1H, NHCH₂), 9.85 (s, 1H, CONHCS). Anal. (C₁₇H₁₈N₂O₂S) theoretical: 64.94 C, 5.77 H, 8.91 N, 10.20 S. Found: 65.07 C, 5.77 H, 9.03 N, 9.98 S.

5.1.5.21. N-Benzyl-N'-(2-benzyloxybenzencarbonyl)thiourea (15u). White powder (47%); mp 100–101 °C; IR (KBr) ν : 3290 (N–H); 3030 (C–H aromatic); 1648 (C=O), cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 4.85 (s, 2H, NHCH₂), 5.35 (s, 2H, OCH₂), 7.14 (t, 1H, 5-*H*), 7.19 (d, 1H, 3-*H*), 7.28–7.45 (m, 10H, CH₂C₆H₅), 7.55 (t, 1H, 4-*H*), 7.72 (dd, 1H, 6-*H*), 11.10 (t, 1H, NHCH₂), 11.16 (s, 1H, CONHCO). Anal. (C₂₂H₂₀N₂O₂S) theoretical: 70.19 C, 5.35 H, 7.44 N, 8.52 S. Found: 69.93 C, 5.24 H, 7.54 N, 8.71 S.

5.2. pK_a determination

Determination of the pK_a value of selected compounds was performed by a spectrophotometric method.⁴³ UV–visible spectra were recorded on a Hitachi U 3010 Spectrophotometer. Compounds were dissolved in water to provide mother solutions at 2.5 · 10⁻⁴ M, and a series of borate and phosphate buffers, ranging from pH 3 to pH 10, were prepared according to Sorensen. The samples were obtained by mixing 5 mL of the mother solution with 20 mL of the appropriate buffer. UV–visible spectra were recorded at ambient temperature with respect to a control consisting of 5 mL H₂O and 20 mL of the same buffer. The wavelength was selected to record a maximum absorbance difference between the ionized and the non-ionized forms. The absorbance of the neutral and ionic species of the drug was determined in a similar way, using a solution of equal drug concentration in 0.1 N HCl and 0.1 N NaOH. After each shot spectrum, the exact pH of the solution was measured by means of a pH meter and the pK_a was calculated using the formula of Albert and Serjeant.⁴⁰

5.3. Biological assays

5.3.1. Measurements of tension in rat aorta rings

Diazoxide was tested as the reference compound. Experiments were performed with aorta removed from adult Wistar rats (Elevages Janvier 2010, France). A section of the thoracic aorta was cleared of adhering fat and connective tissue and was cut into transverse rings (2–3 mm long). The segments were suspended under 1.5 g tension by means of steel hooks in an organ bath containing a physiological solution (in mM: NaCl 118, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25, glucose 5, pH = 7.36). The physiological solution was maintained at 37 °C and continuously bubbled with a mixture of O₂ (95%) and CO₂ (5%). Isometric contractions of the aortic rings were measured with a force-displacement transducer. After 60 min of equilibration, contractile activity was induced by increasing the extracellular concentration of K⁺: 30 or 80 mM KCl. High KCl was applied until the end of the experiment. When the tension had stabilized, increasing concentrations of the tested drug were cumulatively added to the bath until maximal relaxation. Some experiments were performed in the presence of 10 μM of the K_{ATP} channel blocker glibenclamide.

The relaxation response was expressed as percentage of the contractile response to KCl. The EC₅₀ values (concentration evoking 50% inhibition of the plateau phase induced by KCl) were assessed from concentration–response curves.

5.3.2. Aortic smooth muscle cell culture

The protocol was adapted from a previously published method.⁴¹ 6 month-old rats were anaesthetised by intraperitoneal injection of pentobarbital (60 mg/kg). The abdominal aorta (taken from the diaphragm to the iliac bifurcation) was harvested and cleaned of adhering fat before being washed twice in saline buffer HBSS (Invitrogen-Life Technologies Ltd, Paisley, UK, reference #14025-100) supplemented with amphotericin-B (2.5 μg/mL). The vessel was pre-digested in a P35 Petri dish containing 2 mL of a 1 mg/mL collagenase II (Whorthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ, USA, reference #CLS2 LS004176) for 50 min (37 °C, 5% CO₂). The aorta was then washed in HBSS–amphotericin-B solution, before the enzymatically-altered adventitia was removed by using tweezers. The rest of the vessel, that is intima + media, was cut into small pieces which were then digested in a 5 mL tube for 1 h in 2 mL of a mix containing 0.5 mg/mL sterile elastase (Whorthington Biochemical Corp., reference # ESL LS002292) and 1 mg/mL collagenase II. The digestion product was centrifuged at 1200 rpm (350×g) for 10 min, and then re-suspended in 3 mL HBSS–amphotericin-B solution. The digested tissue was then mechanically dissociated by flushing the solution several times through a 1 mL pipette, while avoiding the formation of air bubbles. The 3 mL digested tissue suspension was then centrifuged again at 1200 rpm for 10 min, and the pellet was re-suspended in 100 μL culture medium DMEM (Invitrogen-Life Technologies Ltd, reference #31966021) supplemented with 20% fetal calf serum (FCS), 1% Penicillin/Streptomycin, in two wells–pre-coated with 0.1% gelatin of a P24 plate (Merck, Darmstadt, Germany, reference #1.04078.1000). A 30 min period was left for vascular smooth muscle cell (VSMC) adhesion (at 37 °C, 5% CO₂), before the volume was completed up to 500 μL with culture medium. The well content was left for 3 days before the first culture medium change. The culture medium was then replaced every two days, until cell confluence was reached, which was about 6–7 days after the cells were seeded. Amplification of the cell culture was then performed by cell trypsinisation and seeding in several 0.1% gelatin-coated wells.

5.3.3. Measurement of insulin release from incubated rat pancreatic islets

Experiments were performed with pancreatic islets isolated from adult fed Wistar rats. Groups of 10 islets, each derived from the same batch of islets, were preincubated for 30 min at 37 °C in 1 mL of a physiological salt medium (in mM: NaCl 115, KCl 5, CaCl₂ 2.56, MgCl₂ 1, NaHCO₃ 24) supplemented with 2.8 mM glucose, 0.5% (w/v) dialysed albumin (fraction V, Sigma) and equilibrated against a mixture of O₂ (95%) and CO₂ (5%). The islets were then incubated at 37 °C for 90 min in 1 mL of the same medium containing 16.7 mM glucose and, in addition, the reference or the required compound. The release of insulin was measured radioimmunologically using rat insulin as a standard.⁴²

Residual insulin secretion was expressed as a percentage of the value recorded in control experiments (100%); that is in the absence of drug and presence of 16.7 mM glucose.

5.3.4. Measurement of glucose level in rat blood

Animals (adult fed Wistar albino rats) had free access to water and received a standard pellet diet. Conscious rats were placed for 60 min prior blood sampling and throughout the duration of the

study in a small cabinet. At zero time, drugs dissolved in DMSO (0.2 mL) were orally administrated at a dose of 50 mg/kg. Control animals received an equivalent volume of DMSO (0.2 mL). A drop of blood was taken from the tail at time 0, 1, 2, 3 and 4 h. Blood glucose concentration was measured using a reagent strip in combination with a glucometer (ACCU-CHEK Active, Roche, Mannheim).⁴³

5.3.5. Measurement of the extracellular elastin content by ELISA

The protocol used here was adapted from a previously published method.^{44,45} Vascular smooth muscle cells were deprived of serum overnight in DMEM containing only 1% FCS, in order to limit cell proliferation, before trypsinisation and seeding at 25,000 cells/well in a P96 plate, where the cells were left to adhere for another night. The culture medium was then removed and replaced by fresh 1% FCS-DMEM into which the molecules to be tested (in solution in DMSO) were added. For each concentration of each molecule, 3–9 wells were used. In addition, the cells of 8 wells were bathed in 1% FCS-DMEM containing DMSO only, as the negative control. The cells of other wells were bathed in 1% FCS-DMEM containing 1 mM of the K_{ATP} channel opener minoxidil as the positive control which has previously been shown to induce a strong increase in extracellular elastin.⁴⁴ The effect of the K_{ATP} channel opener diazoxide (50 μ M), used as a reference in the vascular pharmacology experiments, was also studied. The cells of additional wells were bathed in 1% FCS-DMEM (without DMSO) as the negative control for minoxidil effect since minoxidil was solubilized in water at the concentration used. In some wells, 10 μ M of the K_{ATP} channel blocker glibenclamide was added to the tested molecules during the whole experiment in order to verify that the effects of the designed compounds were mediated by activation of the K_{ATP} channels. Each experiment, that is, each test performed on each concentration of each synthesized molecule, was at least triplicated in cells from different cultures ($n = 3-4$). Control experiments (medium plus DMSO or water, diazoxide, minoxidil) were performed in each plate used for the ELISA tests, leading to more wells ($n = 8-9$). The cells used in our experiments originated from 6 separate cell cultures. In all cases, DMSO concentration exposed to the cells was <1%. After 48 h, that is, the time to allow for elastin synthesis and excretion, the cells were washed 3 times with PBS (Invitrogen-Life Technologies Ltd, reference #14040174), then fixed for 10 min in 4% paraformaldehyde at room temperature. The wells were washed again 3 times with PBS, before blockade of the non-specific binding sites with 2%BSA containing-PBS for 30 min at 37 °C, then washed 3 times with 0.1% Tween-containing PBS. After this step, the cells were incubated with the primary antibody to elastin (Elastin Products Company Inc., Owensville, MO, USA, reference #RA75) at 1:1000 in 2% BSA containing-PBS for 1 h at 37 °C. The cells were then washed 3 times with 0.1% Tween-containing PBS before incubation with the secondary antibody coupled to horseradish peroxidase (HRP) (Abcam, Paris, FRANCE, anti-goat antibody, reference #6741) at 1:50,000 for 1 h at 37 °C in the dark. The cells were then washed 3 times with 0.1% Tween-containing PBS, before 100 μ L 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) (Millipore, Billerica, MA, USA, reference #ES022), the substrate of HRP, were added to each well for 30 min in the dark at room temperature. The reaction was then stopped by addition of 100 μ L 0.3 M sulfuric acid to each well. After 10 min, the absorbance of each well—a function of extracellular elastin quantity—was measured at 450 nm.

Each concentration of each molecule was tested in different cell cultures. The statistical significance of the differences between groups was assessed by using 2-way ANOVA for analysis of the effects of the molecule and concentration, and 1-way ANOVA for

the comparison to the effect of 1 mM minoxidil. Unless otherwise indicated, $P \leq 0.05$ was considered as statistically significant.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research, the French CMEP-Tassili and the National Fund for Scientific Research (F.N.R.S., Belgium) from which P. Lebrun is Research Director. The authors gratefully acknowledge the technical assistance of Stéphane Counerotte, Fabienne Leleux, Aibech Riad and Bouraoui Hadia.

References and notes

- Ashcroft, F. M. *Am. J. Physiol.* **2007**, *293*, E880.
- Ashcroft, F. M. *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 2047.
- Standen, N. B.; Quayle, J. M.; Davies, N. W.; Brayden, J. E.; Huang, Y.; Nelson, M. T. *Science* **1989**, *245*, 177.
- Kane, G. C.; Liu, X. K.; Yamada, S.; Olson, T. M.; Terzic, A. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2005**, *38*, 937.
- Quast, U. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1996**, *354*, 213.
- Yamada, K.; Ji, J. J.; Yuan, H. J.; Miki, T.; Sato, S.; Horimoto, N.; Shimizu, T.; Seino, S.; Inagaki, N. *Science* **2001**, *292*, 1543.
- Shyng, S. L.; Nichols, C. G. *J. Gen. Physiol.* **1997**, *110*, 655.
- Inagaki, N.; Gono, T.; Clement, J. P., 4th; Namba, N.; Inazawa, J.; Gonzalez, G.; Aguilar-Bryan, L.; Seino, S.; Bryan, J. *Science* **1995**, *270*, 1166.
- Aguilar-Bryan, L.; Nichols, C. G.; Wechsler, S. W.; Clement, J. P., 4th; Boyd, A. E.; Gonzalez, G.; Herrera-Sosa, H.; Nguy, K.; Bryan, J.; Nelson, D. A. *Science* **1995**, *268*, 423.
- Nichols, C. G.; Koster, J. C.; Enkvetchakul, D.; Flagg, T. P. *Biol. Membr.* **2006**, *23*, 101.
- Aguilar-Bryan, L.; Bryan, J. *Endocr. Rev.* **1999**, *20*, 101.
- Ashcroft, F. M.; Gribble, M. *Trends Neurosci.* **1998**, *21*, 288.
- Edwards, G.; Weston, A. H. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1993**, *33*, 597.
- Aguilar-Bryan, L.; Clement, J. P., 4th; Gonzalez, G.; Kunjilwar, K.; Babenko, A.; Bryan, J. *Physiol. Rev.* **1998**, *78*, 227.
- Zingman, L. V.; Hodgson, D. M.; Bast, P. H.; Kane, G. C.; Perez-Terzic, C.; Gumina, R. J.; Pucar, D.; Bienengraeber, M.; Dzeja, P. P.; Miki, T.; Seino, S.; Alekseev, A. V.; Terzic, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 13278.
- Lebrun, P.; Antoine, M.-H.; Herchuelz, A. *Life Sci.* **1992**, *51*, 795.
- Quast, U. *Trends Pharmacol. Sci.* **1993**, *14*, 332.
- Coghlan, M. J.; Carroll, W. A.; Gopalakrishnan, M. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1627.
- Mannhold, R. *Med. Res. Rev.* **2004**, *24*, 213.
- Richer, C.; Pratz, J.; Mulder, P.; Mondot, S.; Giudicelli, J. F.; Cavero, I. *Life Sci.* **1990**, *47*, 1693.
- Dunne, M. J.; Aspinall, R. J.; Petersen, O. H. *Br. J. Pharmacol.* **1990**, *99*, 169.
- Weir, S. W.; Weston, A. H. *Br. J. Pharmacol.* **1986**, *88*, 121.
- Hamilton, T. C.; Weir, S. W.; Weston, A. H. *Br. J. Pharmacol.* **1986**, *88*, 103.
- Quast, U.; Cook, N. S. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1989**, *250*, 261.
- de Tullio, P.; Becker, B.; Boverie, S.; Dabrowski, M.; Wahl, P.; Antoine, M. H.; Somers, F.; Sebille, S.; Ouedraogo, R.; Hansen, J. B.; Lebrun, P.; Pirotte, B. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3342.
- Pirotte, B.; de Tullio, P.; Lebrun, P.; Antoine, M.-H.; Fontaine, J.; Masereel, B.; Schynts, M.; Dupont, L.; Herchuelz, A.; Delarge, J. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3211.
- Khelili, S.; Florence, X.; Bouhedja, M.; Abdelaziz, S.; Mechouch, N.; Yekhlef, M.; de Tullio, P.; Lebrun, P.; Pirotte, B. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 6124.
- Groop, L. C. *Diabetes Care* **1992**, *15*, 737.
- Pezet, M.; Jacob, M. P.; Escoubet, B.; Gheduzzi, D.; Tillet, E.; Perret, P.; Huber, P.; Quaglino, D.; Vranckx, R.; Li, D. Y.; Starcher, B.; Boyle, W. A.; Mecham, R. P.; Faury, G. *Rejuvenation Res.* **2008**, *11*, 97.
- Ewart, A. K.; Jin, W.; Atkinson, D.; Morris, C. A.; Keating, M. T. *J. Clin. Invest.* **1994**, *93*, 1071.
- Nickerson, E.; Greenberg, F.; Keating, M. T.; McCaskill, C.; Shaffer, L. G. *Am. J. Hum. Genet.* **1995**, *56*, 1156.
- Wu, Y. Q.; Sutton, V. R.; Nickerson, E.; Lupski, J. R.; Potocki, L.; Korenberg, J. R.; Greenberg, F.; Tassabehji, M.; Shaffer, L. G. *Am. J. Med. Genet.* **1998**, *78*, 82.
- Hayashi, A.; Suzuki, T.; Wachi, H.; Tajima, S.; Nishikawa, T.; Murad, S.; Pinnell, S. R. *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *315*, 137.
- Tajima, S.; Hayashi, A.; Suzuki, T.; Nishikawa, T. *Arch. Dermatol. Res.* **1995**, *287*, 494.
- Tsoporis, J.; Keeley, F. W.; Lee, R. M.; Leenen, F. H. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1998**, *31*, 960.
- Raveaud, S.; Mezoin, P.; Lavanchy, N.; Starcher, B.; Mecham, R. P.; Verdetti, J.; Faury, G. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2009**, *36*, 988.
- Slove, S.; Lannoy, M.; Behmoaras, J.; Pezet, M.; Sloboda, N.; Lacolley, P.; Escoubet, B.; Buján, J.; Jacob, M.-P. *Hypertension* **2013**, *62*, 794.
- Bray, K. M.; Weston, A. H.; Duty, S.; Newgreen, D. T.; Longmore, J.; Edwards, G.; Brown, T. J. *Br. J. Pharmacol.* **1991**, *102*, 337.
- Faury, G. *Pathol. Biol. (Paris)* **2001**, *49*, 310.

40. Albert, A.; Serjeant, E.P. In *The Determination of Ionization Constants*, Chapman & Hall: London, 1971; pp 44–64.
41. Golovina, V. A.; Blaustein, M. P. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2681.
42. Lebrun, P.; Antoine, M.-H.; Devreux, V.; Hermann, M.; Herchuelz, A. J. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1990**, *255*, 948.
43. Nguyen, Q. A.; Antoine, M. H.; Ouedraogo, R.; Hermann, M.; Sergooris, J.; Pirotte, B.; Masereel, B.; Lebrun, P. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *63*, 515.
44. Giro, M. G.; Hill, K. E.; Sandberg, L. B.; Davidson, J. M. *Coll. Relat. Res.* **1984**, *4*, 21.
45. Davidson, J. M.; LuValle, P. A.; Zoia, O.; Quaglino, D., Jr.; Giro, M. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 345.
46. Pirotte, B.; Ouedraogo, R.; de Tullio, P.; Khelili, S.; Sommers, F.; Boverie, S.; Dupont, L.; Fontaine, J.; Damas, J.; Lebrun, P. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1456.