REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université de JIJEL – Faculté des sciences
Département de Chimie

Mémoire

pour obtenir le diplôme de Magister en chimie

Option : Chimie pharmaceutique

Présenté par

Nafila BOUIDER

SYNTHESE ET ETUDE PHARMACOLOGIQUE D'ANALOGUES OUVERTS DE BENZOTHIADIAZINE-1,1-DIOXYDES COMPORTANT UNE FONCTION SULFONYLURÉE

Soutenu publiquement : Le 03 / 07 / 2005

Devant le Jury :

Dr. A. YAHIA	**M.C**	**C.U. Oum El Bouaghi**	**Président**
Dr. S. KHELILI	**M.C**	**Université de Jijel**	**Rapporteur**
Dr. M. BELGHOBSI	**M.C**	**Université de Jijel**	**Examinateur**
Dr. E. LEGHOUCHI	**M.C**	**Université de Jijel**	**Examinateur**

جامعة جيجل
المكتبة المركزية
الجزء
TH-069
مصلحة الاقتناء
المكتبة المركزية
615/3

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université de JIJEL – Faculté des sciences
Département de Chimie

Mémoire

pour obtenir le diplôme de Magister en chimie

Option : Chimie pharmaceutique

Présenté par

Nafila BOUIDER

SYNTHESE ET ETUDE PHARMACOLOGIQUE D'ANALOGUES OUVERTS DE BENZOTHIADIAZINE-1,1-DIOXYDES COMPORTANT UNE FONCTION SULFONYLURÉE

Soutenu publiquement : Le 03 / 07 / 2005

Devant le Jury :

Dr. A. YAHIA	**M.C**	**C.U. Oum El Bouaghi**	**Président**
Dr. S. KHELILI	**M.C**	**Université de Jijel**	**Rapporteur**
Dr. M. BELGHOBSI	**M.C**	**Université de Jijel**	**Examinateur**
Dr. E. LEGHOUCHI	**M.C**	**Université de Jijel**	**Examinateur**

« Il n'y a pas d'hypothèses justes ou fausses ; il n'y a que des hypothèses stériles ou fertiles. »

Claude Bernard (1813-1878)

A ma mère

A mon père

A mes sœurs Chahrazed et Asma

A mon frère Loukman

A Ibtissem

A tous mes amis

Remerciements

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Pharmacologie et de Phytochimie de la faculté des sciences de l'université de Jijel.

Je suis très reconnaissante à Monsieur **Khelili Smail**, *Maître de conférences à l'université de Jijel d'avoir accepté de diriger ce travail. J'ai beaucoup apprécié son soutien pendant ces années, ces conseils ont été très enrichissants, je mesure la chance d'avoir bénéficié de ses compétences et de sa grande expérience.*

J'adresse mes remerciements à Monsieur **Yahia Abdelouahab**, *Maître de conférences au centre universitaire d'Oum EL Bouaghi d'avoir accepter de présider le jury.*

J'exprime mes vifs remerciements à Monsieur **Leghouchi Essaid**, *Maître de conférences à l'université de Jijel, directeur de laboratoire de pharmacologie et de phytochimie de m'avoir accueillie dans son laboratoire ainsi que pour les moyens mis à ma disposition. Je le remercie également d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

Mes remerciements vont également à Monsieur **Belghobsi Mabrouk**, *Maître de conférences à l'université de Jijel, chef de département de chimie, d'avoir accepté de siéger dans mon jury de thèse.*

J'ai un grand plaisir à remercier Monsieur **Lahoual Mesbah**, *Maître de conférences à l'université de Jijel, pour l'aide qu'il m'a apporté pour la réalisation des tests pharmacologiques ainsi pour ses conseils et ses encouragements.*

Je tiens particulièrement à remercier Madame **Bouraoui-Merabet Naïma**, *Maître de conférences à l'université de Jijel pour ces précieux conseils, son soutien moral et sa gentillesse qui m'ont été très utiles durant ces derniers mois.*

Je remercie très sincèrement Monsieur **Pirotte Bernard**, *Directeur du laboratoire de chimie pharmaceutique de l'université de Liège - Belgique de nous avoir permis d'effectuer gracieusement une partie des travaux de synthèse ainsi que les analyses de spectrométrie de RMN du proton et l'analyse élémentaire.*

Je profite également de l'occasion qui m'est donnée pour remercier tout le personnel de laboratoires de biologie de la faculté des sciences – Univerisité de Jijel de m'avoir facilité l'accès à tout le matériel des laboratoires.

Enfin, un grand merci à toutes les personnes qui m'ont soutenu durant cette période et à tous ceux qui ont contribué à réaliser ce travail.

Table des matières

INTRODUCTION

ANALYSE BIBLIGRAPHIQUE

A. PHARMACOLOGIE

I. Les canaux potassiques

I.1. Généralités..... 4

I.2. Les canaux potassiques..... 4

I.3. Modulation des canaux potassiques..... 6

I.3.1. Modulation endogène..... 6

I.3.2. Modulation exogène..... 6

II. Canaux potassiques sensibles à l'ATP

II.1. Introduction..... 8

II.2. Architecture moléculaire des canaux K_{ATP}..... 8

II.3. Modulation des canaux K_{ATP}..... 11

II.3.1. Modulation par les nucléotides cytosoliques..... 11

II.3.2. Modulation par les sulfonylurées..... 12

II.3.2.1. Rôle des sulfonylurées dans la sécrétion d'insuline..... 13

II.3.2.2. Les sulfonylurées et les canaux K_{ATP} des autres tissus..... 15

II.3.3. Hormones modulatrices des canaux K_{ATP}..... 16

II.3.4. Modulation des canaux potassiques K_{ATP} par les activateurs.....

II.3.4.1. Introduction..... 17

II.3.4.2. Les différentes familles d'activateur de canaux K_{ATP}..... 18

II.3.4.2.1. Dérivés de l'acide nicotinique..... 18

II.3.4.2.2. Les benzopyranes 18

II.3.4.2.3. Les cyanoguanidines 19

II.3.4.2.4. Les 1,2,4- benzothiadiazine-1,1-dioxydes..... 20

III. Les diurétiques thiazidiques

III.1. Rappel de la physiologie rénale..... 24

III.2. Pharmacologie des diurétiques thiazidiques 26

III.2.1. Effet diurétique 26
III.2.2. Effet antihypertenseur 27
III.2.3. Effets secondaire 27

B. PARTIE CHIMIQUE

I. Propriétés physico-chimiques des sulfonylurées et leurs méthodes de synthèse

I.1. Propriétés physico-chimiques 28
I.2. Méthodes de synthèse 29
I.2.1. Synthèse à partir des sulfonylisocyanates par interaction avec des amines 30
I.2.2. Synthèse à partir des sulfonamides 30
I.2.2.1. Interaction avec l'acide isocyanique 30
I.2.2.2. Interaction avec l'urée et les urées substituées 31
I.2.2.3. Interaction avec des nitrourées 32
I.2.2.4. Interaction avec les uréthanes 32
I.2.2.5. Interaction avec les chlorures de carbamyls 33
I.2.2.6. Interaction avec les isocyanates 33
I.2.3. Synthèse à partir d'autres sulfonylurées 34
I.2.4. Synthèse par désulfuration des sulfonylthiourées 35

TRAVAUX PERSONNELS

I. Synthèse des molécules

I.1. Stratégie de synthèse 36
I.1.1. Synthèse des composés de type A 37
I.1.2. Synthèse des composés de type B 40
I.2. Etude spectrale des molécules synthétisées 41
I.3. Partie expérimentale 44
I.3.1. Matériels et méthodes 44
I.3.2. Modes opératoires relatifs au type A 46
I.3.2. Modes opératoires relatifs au type B 50

II. Etude pharmacologique

II.1. Matériels et méthodes 53
II.1.1. Les animaux 53

II.1.2. Préparation des solutions administrées..... 53
II.1.3. Traitement des animaux..... 53
II.1.3.1. Evaluation de l'effet des composés sur la glycémie..... 53
II.1.3.2. Evaluation de l'effet diurétique..... 54
II.1.3.3. Etude des variations des taux du sodium, potassium et de l'acide urique plasmatique et urinaire..... 55
II.1.4. Les dosages..... 56
II.1.4.1. Dosage de la glycémie..... 56
II.I.4.2. Dosage du sodium et du potassium..... 57
II.1.4.3. Dosage de l'acide urique 57

III. Résultats et discussion

III.1. Variations de la glycémie en fonction du temps..... 59
III.2. Variations de la diurèse en fonction du temps..... 62
III.3. Effet des composés synthétisés sur les taux du sodium et du potassium sériques 65
III.4. Effet des composés synthétisés sur les taux de l'acide urique plasmatique..... 67
III.5. Effet des composés synthétisés sur l'excrétion du sodium et du potassium..... 68
III.6. Effet des composés synthétisés sur l'excrétion urinaire de l'acide urique..... 70

IV. Conclusion 72
V. Biobliographie..... 74

Liste des figures

1- Structure chimique du torasémide.....2

2- AWD 122-60 (un exemple de la classe des aminopyridines).....7

3- Structure chimique de quelques antiarhythmiques de classe III.....7

4- Structure octamérique (SUR/Kir6.x) du canal K_{ATP}.....9

5- Topologie membranaire des sous-unités SUR/Kir6.x du canal potassique.....10

6- Structure chimique de quelques sulfamides Hypoglycémiants.....13

7- Stimulation de la sécrétion d'insuline dans une cellule β.....14

8- Mécanisme d'action de la somatostatine.....17

9- Structure chimique du Nicorandil.....18

10- Structure chimique du cromakalim.....18

11- Structure chimique de quelque benzopyranes.....19

12- Structure chimique du pinacidil.....20

13- Structure chimique de P1075 isomère du pinacidil.....20

14- Structure chimique du diazoxide et de l'hydrochlorothiazide exemples de1,2,4 benzothiadiazine1,1dioxydes.....21

15- Numérotation des atomes de l'hétérocycle 1, 2, 4 benzotiadiazine 1,1 dioxide.....22

16- Division fonctionnelle du néphron.....25

17- Spectres IR des composés A1 et B1 superposés effectués en pastille de KBr.....42

18- Spectre RMN de proton du composé A1 effectué dans le DMSO-d_6.....43

19- Variations de la glycémie en fonction du temps après un traitement avec les différents composés synthétisés par voie orale.....60

20- Variations de la glycémie en fonction du temps après un traitement avec les différents composés synthétisés par voie intrapéritonéale.....61

21- Variations de la diurèse en fonction du temps après un traitement avec les différents composés synthétisés par voie orale.....63

22- Variations de la diurèse en fonction du temps après un traitement avec les différents composés synthétisés par voie intrapéritonéale.....64

23- Taux de sodium sérique 4h après traitement.....66

24- Taux de potassium sérique 4h après traitement.....67

25- Taux de l'acide urique plasmatique 4h après traitement.....68

26- Variations des Taux du sodium et du potassium urinaires sous l'effet des composés synthétisés.....70
27- Taux de l'acide urique urinaire 4 h après traitement.....71

Liste des tableaux

1- Principaux types et sous-classes des canaux potassiques.....5
2- Composition des K_{ATP} dans les différents tissus.....11
3- Composés cibles de la famille A.....39
4- Composés cibles de la famille B.....41
5- Variations de la glycémie (g/l) en fonction du temps après un traitement avec les différents composés synthétisés par voie orale.....59
6- Variations de la glycémie (g/l) en fonction du temps après un traitement avec les différents composés synthétisés par voie intrapéritonéale.....61
7- Variations de la diurèse ($ml.kg^{-1}$) en fonction du temps après un traitement avec les différents composés synthétisés par voie orale.....62
8- Variations de la diurèse ($ml.kg^{-1}$) en fonction du temps après un traitement avec les différents composés synthétisés par voie intrapéritonéale.....64
9- Variations des taux du sodium et du potassium sériques sous l'effet des différents composés synthétisés.....65
10- Variations des taux de l'acide urique plasmatique sous l'effet des différents composés synthétisés 67
11- Variation des taux du sodium et du potassium urinaires sous l'effet des différents composés synthétisés 69
12- Variation des taux de l'acide urique urinaire sous l'effet des différents composés synthétisés 70

Liste d'abréviations

$[ATP]_i$	concentration d'ATP intracellulaire
$[Ca^{2+}]_i$	concentration du calcium intracellulaire
^{3}H	tritium (isotope de l'hydrogène)
$^{42}K^{+}$	isotope du potassium
$^{86}Rb^{+}$	isotope du rubidium
ABC	protéine liant l'ATP (ATP-binding cassette protein)
ADP	adénosine diphosphate
ATP	adénosine triphosphate
BK_{Ca}	canal potassique calcium-dépendant à grande conductance
CCM	chromatographie sur couche mince
D_2O	eau deutérié
DMF	diméthylformamide
DMSO	diméthylsolfoxide
DMSO-d_6	DMSO deutérié
DTM	domaine transmembranaire
GABA	acide γ-aminobutyrique
GDP	guanosine diphosphate
GMPc	guanosine monophosphate cyclique
GTP	guanosine triphosphate
HCTZ	hydrochlorothiazide
IK_{Ca}	canal potassique calcium-dépendant à moyenne conductance
IC_{50}	concentration à 50 % de l'inhibition
K_A	canal potassique transitoire sortant (Transient outward rectifier)
K_{AA}	canal potassique modulé par l'acide arachidonique et acides gras
K_{Ach}	canal potassique activé par Acétylcholine
K_{ATP}	canal potassique sensible à l'ATP
Kir	canal potassique à rectification entrante (inward rectifier channel)
K_V	canal potassique à redresseur retardant
$Mg^{2+}ADP$	complexe magnésium-ADP

mV	millivolt
NBF	site de fixation de nucléotide (nucleotide binding fold)
pS	picosimens
R_f	rapport frontal
SK_{Ca}	canal potassique calcium-dépendant à basse conductance SK_{Ca}
STM	segment transmembranaire
SUR	récepteur de sulfonylurée (Sulfonylurea receptor)
THF	tetrahydrofurane
TMS	tetraméthylsilane

Introduction

Introduction

Les canaux potassiques, présents au niveau de membranes de nombreux types de cellules, constituent un groupe de canaux très variés. Parmi ceux-ci, le canal potassique sensible à l'ATP (canal K_{ATP}) a fait l'objet, ces dernières années, d'important travaux de recherche à cause de son rôle essentiel dans de nombreux processus physiologiques. Parmi ces processus, on peut citer la régulation de la sécrétion d'insuline et l'activité contractile des muscles lisses et du muscle cardiaque.

Le nombre d'agents chimiques stimulateurs de ces canaux n'a cessé d'augmenter au cours de ces dernières décennies. Ces molécules sont capables, par les potentialités qu'ils possèdent, de devenir de nouveaux agents pharmacologiques ou thérapeutiques dans le traitement de nombreuses affections en relation avec le fonctionnement de canaux K_{ATP} [3]. Les benzothiadiazine 1,1 dioxydes, des composés hétérocycliques décrits, dont le chef de file est le diazoxide, sont connus comme activateurs des canaux K_{ATP} surtout ceux du muscle lisse, où ils conduisent à une vasodilatation, et également ceux des cellules β-pancréatiques où ils inhibent la sécrétion de l'insuline. Le chlorothiazide et l'hydrochlorothiazide sont également deux benzothiadiazines 1,1 dioxydes dotés de propriétés antihypertensives par diminution de la volémie (effet diurétique), et qui représentent les diurétiques thiazidiques.

Par ailleurs, les sulfonylurées qui sont connues depuis longtemps, et utilisées dans le traitement du diabète non-insulino dépendant, à cause de leur effet hypoglycémiant, possèdent un effet inhibiteur sur ces canaux et sont sélectives vis-à-vis des cellules pancréatiques.

Objectif de la recherche

Dans ce travail de recherche, nous avons entrepris la synthèse et l'évaluation pharmacologique de composés de structure générale (II) (schéma 1), et qui résultent d'une simplification moléculaire du cycle benzothiadiazine, d'une part, et d'une substitution

bioisostérique d'autre part. Ces deux dernières opérations sont deux principes fondamentaux très utilisés en pharmacomodulation et en drug design.

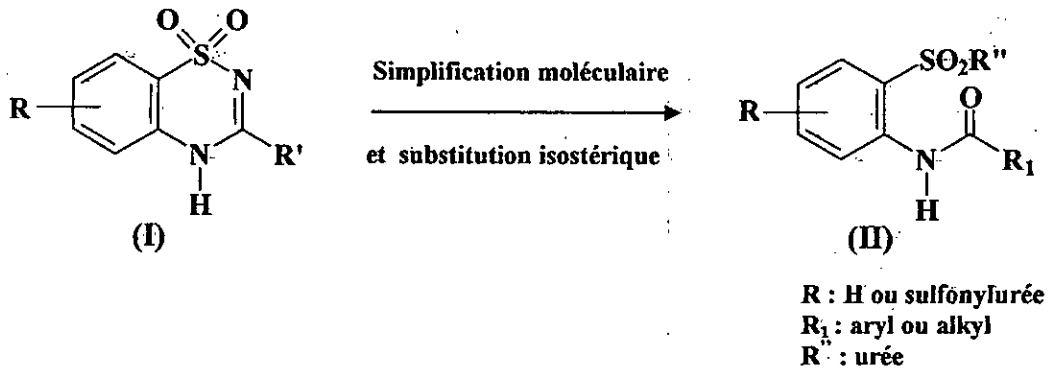


Schéma 1

L'étude pharmacologique a été faite sur un modèle d'animaux de laboratoire (rats Albinos) en appliquant des protocoles d'évaluation standards, et a consisté à :

- *L'étude de variations de la glycémie* : le but de cette étude est de connaître si les composés cibles seront hyperglycémiants, dans ce cas ils ressembleront plus au diazoxide, ou s'ils seront hypoglycémiants, et donc ressembleront aux sulfamides hypoglycémiants.
- *La mesure de la diurèse aqueuse* : Les molécules cibles issues d'une simplification moléculaire de l'hétérocycle benzothiadiazine ressemblent par leur structure au torasémide (fig.1) qui est un diurétique et antihypertenseur, et de ce fait, pourraient avoir les mêmes effets.

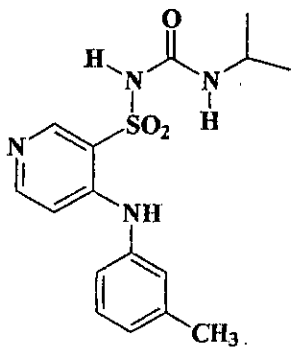


Fig.1 : Structure chimique du torasémide

- *Le dosage de quelques substances minérales et organiques dans le sang et l'urine* : Le but est de connaître, dans le cas où les composés cibles auraient un effet diurétique, leurs influences sur les taux sériques et urinaires des ions Na^+ et K^+ et celui de l'acide urique.

Analyse bibliographique

A. Pharmacologie

I . Les canaux potassiques

I.1. Généralités

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 coté extracellulaire pour transférer les ions essentiels tels que Na^+, K^+, Ca^{++} et Cl^- d'un coté à l'autre des membranes excitables et maintenir les processus cellulaires vitaux [1].

Les canaux ioniques sont généralement classés selon le principal ion qu'ils transportent et le mécanisme par lequel ils sont ouverts ou fermés. Ils ont été durant des décennies et le seront toujours cibles attractives pour les manipulations pharmacologiques et le développement de nouveaux médicaments [2]. Au cours des dernières décennies, de très nombreux études ont été centrées sur la modulation des canaux potassique, canaux perméables aux ions potassium, qui sont présents de manière massive et variée aussi bien dans les membranes plasmiques des cellules excitables que dans celles des cellules non-excitables, et qui sont extrêmement diversifiés tant au niveau de leurs conductances élémentaires que des mécanismes qui contrôlent leurs activités [3].

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 (tableau1), et leurs fonctions physiologiques sont encore loin d'être complètement élucidées [3]. Cependant, quelque uns sont bien connus tel comme 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 [4, 5, 6].

Les progrès qu'a connu la pharmacologie des canaux potassiques et dû 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 [7, 8].

La classification la plus récente des canaux potassiques (1996, tableau 1) est basée sur le mécanisme principal d'activation de ces canaux.

L'activation des canaux voltages-dépendant est régulée par le changement du potentiel de la membrane ce qui constitue un rôle important dans le contrôle de l'activité électrique des cellules excitables ; celle des canaux ligand-dépendant est régulée par plusieurs ligands : ATP, neurotransmetteurs et les protéines G [7, 8].

Tableau 1 : Principaux types et sous-classes de canaux potassiques [7].

Type de canaux potassiques	Sous-classes	Conductance
Canaux potassiques voltage-dépendant	- Canaux à redresseurs retardant K_v (Delayed rectifier)	5 – 60 pS
	- Canaux à rectification entrante Kir (Inward rectifier)	5 - 30 pS
	- Canaux transitoires sortants K_A (Transient outward rectifier)	~ 20 pS
Canaux potassiques sensibles aux ions Ca^{++}	- Canaux à grande conductance BK_{Ca}	100 - 250 pS
	- Canaux à moyenne conductance IK_{Ca}	18 – 50 pS
	- Canaux à basse conductance SK_{Ca}	10 – 14 pS
Canaux potassiques régulés par des ligands	- Canaux potassiques sensibles à l'ATP(K_{ATP})	20 – 60 pS
	- Canaux potassiques modulés par l'acide arachidonique et acides gras (K_{AA}).	
	- Canaux potassiques activés par Acétyl-choline (K_{Ach}).	25 – 50 pS

I.3. Modulation des canaux potassiques

I.3.1. Modulation endogène

Plusieurs substances endogènes ont été identifiées comme agents modulant l'activité des canaux potassiques. Il a été montré que les ligands telle que la sérotonine, régulent essentiellement les canaux potassiques neuronaux. Des neurotransmetteurs variés (acétylcholine, adénosine, somatostatine, GABA) activent des récepteurs spécifiques qui, à leur tour, modulent l'activité des canaux potassiques par des mécanisme couplés aux protéines G [9].

L'ATP affecte les canaux potassiques glandulaires, cardiaques et ceux des muscles lisses. Les canaux potassiques modulés par les ions calcium sont particulièrement importants dans les muscles lisses.

I.3.2. Modulation exogène

Le fonctionnement des canaux potassiques a pu être modulé par un certain nombre de substances naturelles ou synthétiques en tant qu'inhibiteurs ou activateurs.

Les toxines naturelles isolées à partir de plantes exotiques et les venins de scorpions et de serpents, ont montré des effets inhibiteurs sur certain type de canaux potassiques, et à cause de leur sélectivité, elles ont été très utilisées comme outils pharmacologiques dans l'identification des différentes sous-classe de canaux potassiques [10].

L'apamine, une toxine polypeptidique isolée à partir de venin d'abeille, est probablement la plus sélective de tout les bloqueurs, en particulier pour les canaux potassiques régulés par le calcium (SK_{Ca}).

La charybdotoxine, isolée du venin de scorpion, est généralement considérée comme un bloqueur sélectif des canaux potassiques lié au calcium (BK_{Ca}) dans les cellules du muscle squelettique et de muscle lisse .

La dendrotoxine, isolée du serpent vert, est une neurotoxine qui bloque les canaux potassiques transitoires extérieurs K_A, impliqués dans la phase rapide de repolarisation des neurones du système nerveux central [10, 11].

La strychnine et la phalloidine , deux alcaloïdes dont le premier est extrait d'une plante brésilienne et l'autre des champignons à chapeau morts, sont parmi les bloqueurs les plus efficaces des canaux potassiques voltage dépendant K_v [10].

Une grande variété de composés synthétiques appartenant à des classes chimiques diverses sont aussi capables de bloquer les canaux potassiques.

Les aminopyridines (Fig2) bloquent préférentiellement les canaux potassiques voltage-dépendants dans différents tissus et, à un certain degré les canaux potassiques sensibles à l'ATP [10, 12].

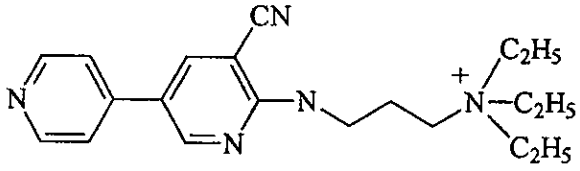
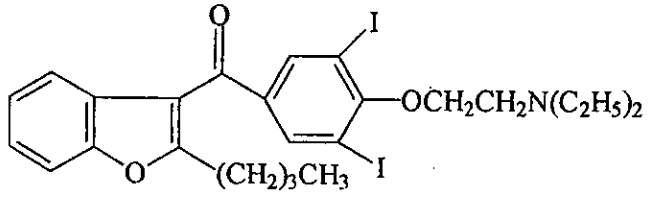
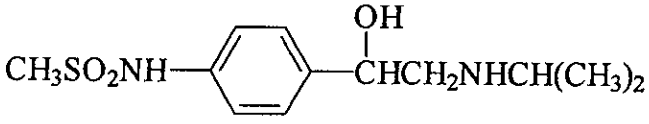


Fig. 2 : AWD 122-60 un exemple d'aminopyridines

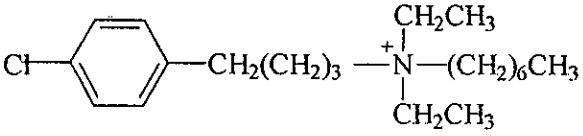
Les agents antiarhythmiques de classe III (Fig.3) dont le sotalol, le clofilium et l'amiodarone sont des prototypes, connus par leur prolongement de la durée du potentiel d'action en retardant la repolarisation par blocage des canaux à redresseurs retardant (K_V) du muscle cardiaque [13, 14].



Amiodarone



Sotalol



Clofilium

Fig. 3 : Structure chimique de quelques antiarhythmiques de classe III.

Les sulfonylurées font partie des bloqueurs les plus sélectifs des canaux régulés par l'ATP (K_{ATP}) dans divers tissus en particulier dans les cellules pancréatique β et le myocarde. Les ions ammonium quaternaires moins spécifiques, ont également le même effet que celui des sulfonylurées.

II. Canaux potassiques sensibles à l'ATP

II.1. Introduction

Un canal potassique régulé par le changement de concentrations intracellulaires d'ATP ($[ATP]_i$) a été décrit pour la première fois dans le muscle cardiaque [15]. Des canaux similaires dont leur conductances unitaires situées entre 40 – 80 pS, ont été aussi découverts dans les cellules sécrétrices de l'insuline et dans les muscles lisses et squelettiques [16,17]. Ces canaux constituent ce qui est classiquement décrit comme canaux potassiques sensibles à l'ATP ou ATP-dépendants et qui sont désignés (K_{ATP}).

Leur présence a été démontrée dans le tissu vasculaire aussi bien que non vasculaire tel que les muscles lisses gastro-intestinal, urinaire et utérin [18].

Donc, les canaux K_{ATP} sont présents dans une large variété de tissus ce qui les rend la famille des canaux potassiques la plus étudiée et qui attire un intérêt considérable à cause du rôle essentiel de ces canaux dans divers processus physiologiques fondamentaux.

II.2. Architecture moléculaire des canaux K_{ATP}

Les canaux K_{ATP} sont des protéines hétéromultimères composés de deux types de sous-unités : les sous-unités α qui forment le pore du canal et les sous–unités β formant les récepteurs des sulfonylurées SUR (sulfonylurea receptor) qui sont les régulateurs de l'activité du canal (Fig. 4) [19].

La sous-unité α 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. Telle est la structure canonique de sous-unités qui, assemblée en tétramère, forment des canaux potassiques à rectification entrante Kir (inwardly rectifying K^+ channel). Ces canaux conduisent mieux le courant qui entre dans la cellule que celui qui en sort.

Le canal Kir comporte dans son pore la séquence d'acides aminés Gly-Tyr-Phe-Gly, qui est la signature des canaux potassiques qui leur confère la sélectivité des ions K^+ [20].

Les canaux Kir forment une grande superfamille composée de groupes Kir_1 à Kir_7, mais il parait que seulement les membres du groupe Kir_6 ($Kir_{6.1}$,$Kir_{6.2}$) font partie des canaux K_{ATP}. Les acides aminés des $Kir_{6.1}$ et $Kir_{6.2}$ sont identiques à 71%.

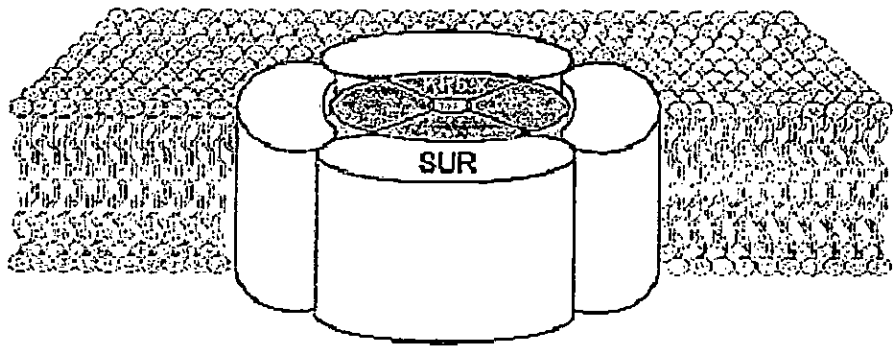


Fig. 4 : Structure octamérique (SUR/Kir6.x) du canal K_{ATP}.

Le SUR est une protéine formée d'environ de 1580 acides aminés. Les quatre SURs du canal sont groupés symétriquement autour du pore formé par les Kirs agissant comme des sous-unités régulatrices [21].

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 [19, 22].

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).

La sous-unité β des canaux K_{ATP}, le SUR, est constitué de 17 STM qui sont regroupés en trois domaines [23]. 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 NBF_1 et NBF_2 ce qui correspond à la structure canonique des protéines ABC (Fig. 5).
Les sites récepteurs des sulfonylurées et des activateurs se situent dans le dernier domaine transmenbranaire et ils sont très proches l'un de l'autre [24].

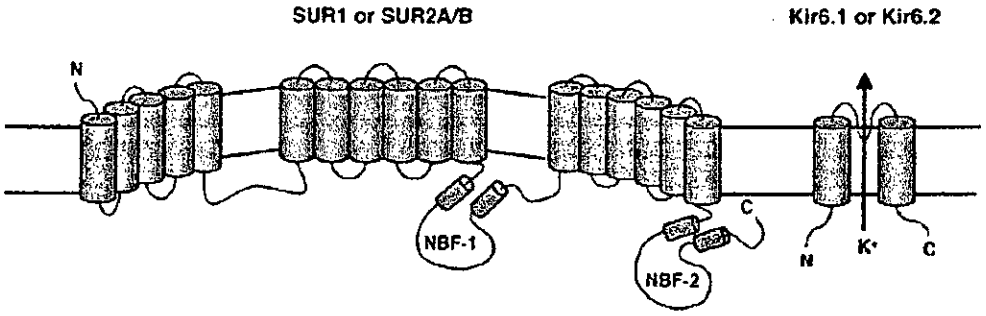


Fig. 5 : Topologie membranaire des sous-unités SUR/Kir6.x du canal potassique.

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) et le SUR 2 des muscles lisses [19, 20].
Les canaux K_{ATP} présents dans les différents tissus diffèrent, d'un tissus à l'autre, soi dans leur conductance unitaire soi dans leur sensibilité envers les bloqueurs comme l'ATP et les sulfonylurées, soi envers les activateurs.

Des études récentes ont montré que cette diversité résulte de différences dans la composition moléculaire des canaux K_{ATP}. Le tableau 2 montre la composition de ces canaux dans les différents tissus.

Tableau 2 : Composition des K_{ATP} dans les différents tissus [18, 25, 26].

Tissu	Composition du canal	Conductance unitaire (pS)	IC_{50} ATP
Cellule pancréatique β	$(SUR1/Kir6.2)_4$	80	30 µM
Cardiocytes	$(SUR2A/Kir6.2)_4$	80	30 µM
Muscle lisse vasculaire	$(SUR2B/Kir6.1)_4$	20	1mM
Non vasculaire	$(SUR2B/Kir6.2)_4$	60-80	30 µM
Neurones	$(SUR1/Kir6.2)_4$	80	30 µM

Les canaux K_{ATP} contenant des Kir6.2 sont très sensibles à L'ATP (IC_{50} = 10-30 µM) ; le site inhibiteur de l'ATP est formé par les extrémités amino- et carboxy- terminales de la sous-unité Kir6.2 [27]. Les canaux K_{ATP} basés sur Kir 6.1 ne sont que faiblement sensibles à l'ATP (IC_{50} = 1 mM).

II.3. Modulation des canaux K_{ATP}

II.3.1. Modulation par les nucléotides cytosoliques

Les canaux K_{ATP} sont inhibés par ATP intracellulaire en présence ou en absence des ions Mg^{2+} (IC_{50} = 10 µM) [16]. En plus de l'ATP, l'ADP libre, le diadénosino-polyphosphate, le GTP libre et le GDP sont aussi capables de réduire l'activité du canal K_{ATP} [16, 28]. Le site de fixation de ces nucléotides est localisé sur le Kir6, plus probablement dans la région proximale intracellulaire C-terminal [29, 30]. Les complexes Mg^{2+}-nucléotides cytosoliques comme l'ADP et le GDP stimule l'activité du canal K_{ATP} [31, 32]. Des études récentes ont démontré que l'augmentation du Mg^{2+}-ADP est le facteur principal qui induit l'ouverture du canal en présence de concentrations bloquantes d'ATP. Donc le Mg^{2+}-ADP peut être considéré comme l'ouvreur physiologique du canal K_{ATP} [33, 34].

Dans la cellule pancréatique β au repos, les canaux K_{ATP} sont ouverts. Une augmentation du rapport de concentrations cytosoliques d'ATP et d'ADP ([ATP]/[ADP]) conduit à l'inhibition ou la fermeture du canal K_{ATP}, en induisant une dépolarisation de la membrane

cellulaire suivie par l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendant et un influx du Ca^{2+}. Le calcium entrant stimule l'exocytose de granules d'insuline [35].

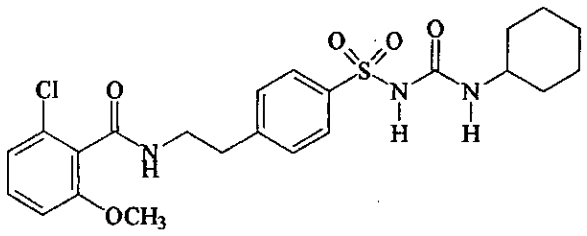
Donc le canal potassique sensible aux variations d'ATP intracellulaire assure une relation essentielle entre le niveau bioénergique de la cellule dans laquelle il est présent et les caractéristiques d'exitabilité électrique de la membrane [36].

II.3.2. Modulation par les sulfonylurées

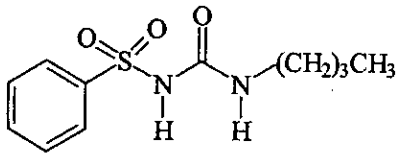
Les sulfamides hypoglycémiants (Fig.6) sont de vieux médicaments utilisés, depuis de nombreuses années, dans la thérapie par voie orale du diabète sucré non-insulino dépendant. Ils appartiennent chimiquement à la famille des sulfonylurées, proches structurellement des antibiotiques sulfonamidés.

C'est en 1942 que Jambon, à Montpellier, observa un effet hypoglycémiant important à la suite de l'utilisation d'un sulfamide antibactérien. C'est ensuite loubatières qui confirma expérimentalement et expliqua le mécanisme de l'effet hypoglycémiant.
Les sulfamides suscitent un regain d'intérêt depuis les progrès réalisés dans la connaissance de leur mécanisme d'action avec la mise en évidence de leurs propriétés antagonistes des canaux potassiques ATP-dépendants [37].

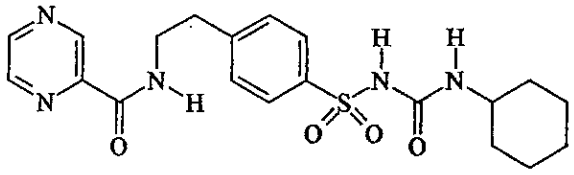
Ces canaux jouent un rôle-clé dans la sécrétion d'insuline par le pancréas. Par ailleurs, ils sont en relation étroite avec une variété de maladies qui vont du diabète aux désordres liés à l'ischémie cérébrale, en passant par l'hypertension et les arythmies cardiaques [38].



Glibenclamide



Tolbutamide



Glipizide

Fig. 6 : Structures chimiques de quelques sulfamides hypoglycémiants.

II.3.2.1. Rôle des sulfonylurées dans la sécrétion d'insuline

Au niveau pancréatique, l'insuline assure le contrôle de la concentration sanguine du glucose et, à l'inverse, la glycémie contrôle la sécrétion insulinique des cellules β.
Il a été démontré expérimentalement que :

- En l'absence d'exposition au glucose, la cellule β est bien polarisée (-70 à -60 mV) et possède alors un statut de cellule non excitable. Elle n'engendre pas de potentiel d'action et ne sécrète pas ou peu d'insuline. Dans cet état, de nombreux canaux potassiques, notamment les ATP-dépendant, sont ouverts.
- Lors de perfusion de glucose, la cellule se dépolarise, cette dépolarisation entraîne l'apparition d'une activité électrique spontanée avec des potentiels d'action répétitifs dont la longueur dépend en partie des concentrations en glucose, la cellule est devenue excitable. Après quelque temps, elle perd son excitabilité et pourra la retrouver si la perfusion de glucose persiste [39, 40].

Alors, le glucose a déclenché la production intracellulaire d'ATP qui a entraîné la fermeture des canaux potassiques ATP-dépendants. Cette dernière conditionne une succession d'autres évènements :

- La dépolarisation amène le potentiel de membrane au seuil d'activation des canaux calciques voltages dépendants, cette activation est responsable de la production de

potentiels répétitifs ; l'ouverture de ces canaux provoque l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire indispensable à la sécrétion d'insuline [37, 41].

- Ensuite, l'augmentation de $[Ca^{+2}]_{int}$ provoque l'ouverture des canaux potassiques calcium-dépendants, qui à son tour, entraîne la repolarisation cellulaire, ce qui élimine l'activité électrique répétitive [37].

Les sulfonylurées, comme le glucose, sont capable d'inhiber ces canaux et de provoquer la sécrétion d'insuline, mais d'une façon directe, contrairement au glucose qui agit, indirectement (Fig.7) [42, 43].

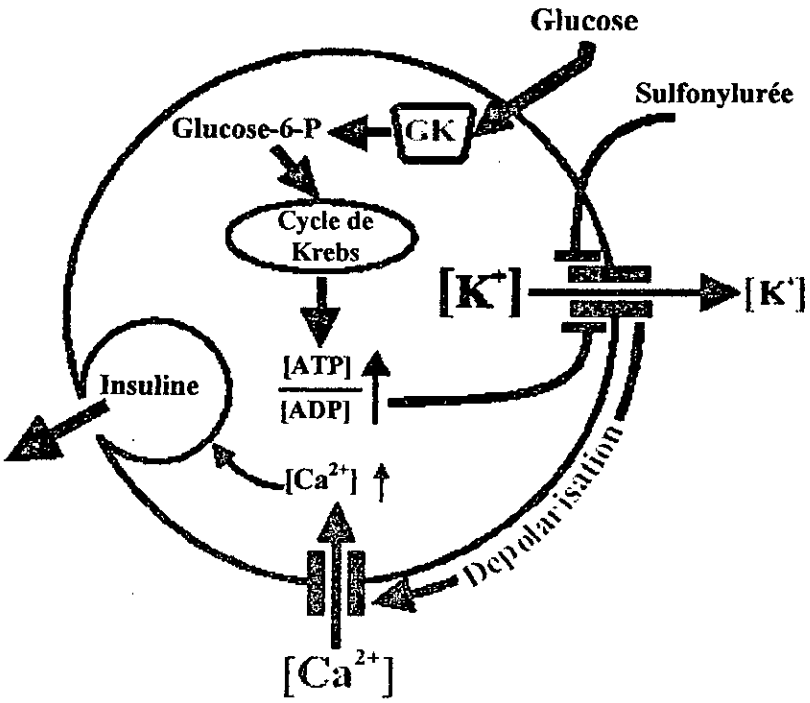


Fig. 7 : Stimulation de la sécrétion d'insuline dans une cellule β par le glucose et les sulfonylurées.

Le Tolbutamide (Fig.6) est considéré comme un prototype de ce qui est appelé les sulfonylurées de la première génération, alors que ceux de la deuxième génération sont représentés par le glibenclamide qui est le plus prescris comme antidiabétique orale dans le monde entier dans le traitement du diabète de type II [43].

Les composés de deuxième génération sont des inhibiteurs puissants de la fonction des canaux K_{ATP}. Le glibenclamide par exemple, agit à des concentrations de l'ordre de 0.1 à 1 nM, ceux de la première génération agissent à des concentrations 10^3 à 10^5 fois supérieures [43].

Les sulfonylurées sont aussi capables de se fixer aux canaux K_{ATP} dans d'autres tissus et se révèlent ainsi des inhibiteurs sélectifs de ces types de canaux à cause de la présence systématique de SUR dans ces canaux.

II.3.2.2. Les sulfonylurées et les canaux K_{ATP} des autres tissus

Dans la cellule cardiaque le rôle fonctionnel des canaux K_{ATP}, en situation physiologique normale semble inexistant. Cependant, il est probable que ces canaux soient aussi la cible d'hormones ou de neurotransmetteurs qui régulent leur activité comme le font la somatostatine et la galanine dans la cellule β pancréatique.

L'implication des canaux K_{ATP} dans le fonctionnement de la cellule cardiaque apparaît pendant une ischémie cardiaque. Parmi les évènements importants qui se produisent dans la cellule cardiaque ischémiée, 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 [49, 50].

Les anomalies d'électrogénèse observées pendant l'ischémie et qui sont associées aux fibrillations ventriculaires sont des conséquences de ce raccourcissement du potentiel d'action. Une application des sulfonylurées peut annuler ce raccourcissement du potentiel d'action dû à l'ouverture des canaux K_{ATP} [50].

L'existence de canaux potassiques dans le système nerveux central n'est pas sans intérêt dans la mesure ou l'élévation de la concentration de glucose extracellulaire stimule la sécrétion de GABA (acide γ-amino-butyrique) neurotransmetteur inhibiteur, dans la substance noire, par l'intermédiaire de l'activation de canaux calciques voltage dépendants à l'aide d'un mécanisme assez semblable à celui de la sécrétion d'insuline par les cellules β [37].

L'application de sulfonylurées stimulatrices de la sécrétion d'insuline provoque aussi la sécrétion du GABA dans la substance noire.

Les canaux K_{ATP} sont situés cette fois-ci au niveau synaptique, leur fermeture par le glucose (indirecte) ou par les sulfonylurées (directe) entraîne une dépolarisation des synapses, une entrée de Ca^{+2} par les canaux calcique synaptiques et une sécrétion de neurotransmetteurs.

Or, on sait que l'innervation gabaèrgique dans la substance noire possède un rôle anti-convulsivant essentiel ; l'inhibition des neurones dopaminergiques par le GABA joue un rôle primordial dans la limitation de la propagation des crises épileptiques [37].
Ceci correspond à l'utilisation ancienne de l'insuline pour provoquer des crises convulsives dans le traitement de certaines formes de dépressions, ainsi qu'aux convulsions accompagnant les comas hypoglycémiques chez les diabétiques.
Les canaux potassiques du système nerveux central sont assez différents de ceux du pancréas mais ont été révélés grâce aux récepteurs de haute affinité aux sulfonylurées localisés surtout dans la substance noire, le globus pallidus, mais aussi dans l'hippocampe [51,52].

II.3.2.3. Hormones modulatrices des canaux K_{ATP}

D'autres causes, notamment hormonales, peuvent activer les canaux K_{ATP} sans qu'il soit nécessaire de faire varier la concentration d'ATP intracellulaire. Parmi les hormones exerçant cet effet, la somatostatine qui inhibe la sécrétion de l'insuline par la cellule β.
L'hormone se fixe sur son récepteur et active une protéine liant le GTP (protéine G), provoquant l'activation des canaux K_{ATP}. Cette activation induit une hyperpolarisation qui diminue la probabilité d'ouverture des canaux calciques nécessaire à la libération de l'insuline (Fig.8) [44, 45].

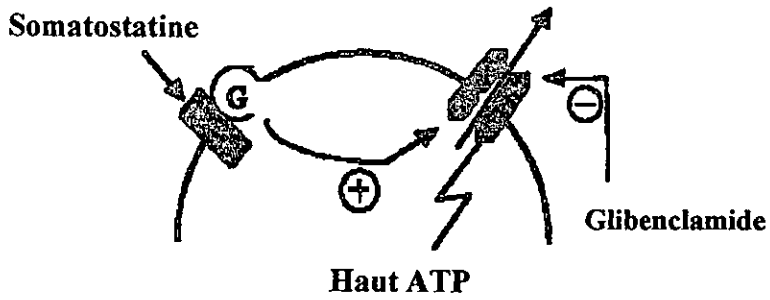


Fig 8 : Mécanisme d'action de la somatostatine.

La galanine, une autre hormone de découverte plus récente, est aussi hyperglycémiante par inhibition de la sécrétion d'insuline, elle fonctionne par le même mécanisme que la somatostatine c'est-à-dire la fixation de l'hormone sur son récepteur, l'activation d'une protéine G et par là l'activation des canaux K_{ATP} [46, 47, 48].
Dans ces deux cas l'activation du canal potassique est donc obtenue sans modification de concentration d'ATP intracellulaire et peut être bloqué par les sulfonylurées.

II.3.4. Modulation par les activateurs des canaux K_{ATP}

II.3.4.1 Introduction

Les activateurs ou les ouvreurs de canaux K_{ATP} constituent un groupe divers d'agents à l'origine caractérisés par leur capacité d'ouvrir les canaux potassiques dans le muscle lisse [53]. Cependant il est connu maintenant que leur action d'ouverture de canaux K_{ATP} est en plus exercée dans une variété de types de tissus comprenant les cellules β pancréatiques, les neurones et le muscle cardiaque [54].
Ces drogues augmentent la sortie des ions $^{42}K^+$ ou de son traceur $^{86}Rb^+$ dans les cellules du muscle lisse vasculaire en provoquant une hyperpolarisation, une activité réduite des canaux calciques voltage-dépendants et une réduction de l'activité électrique.
La diminution de la concentration cytosolique de Ca^{2+} qui en résulte, induit une inhibition de l'activité des cellules β sécrétrices et une relaxation des cellules musculaires [55].

II. 3.3.2 Les différentes familles d'activateurs de canaux K_{ATP}

II. 3.3.2.1. Dérivés de l'acide nicotinique

Le nicorandil (Fig.9), un vasodilatateur coronaire, a été le premier médicament pour lequel on a montré une hyperpolarisation des muscles lisses et une augmentation de la perméabilité de la membrane cellulaire aux ions potassium, probablement par activation des canaux potassiques [56].

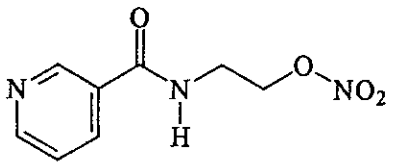


Fig. 9 : Structure chimique du Nicorandil.

Il agit également par un autre mécanisme puisque c'est un dérivé nitré, en libérant du monoxyde d'azote qui augment la concentration de GMP cyclique (GMPc) intracellulaire. Il entraîne une vasodilatation et est utilisé dans le traitement prophylactique des crises d'angine de poitrine. Ses effets indésirables sont des céphalées par vasodilatation des capillaires cérébraux [57].

II.3.3.2.2. Les benzopyranes

Le prototype de ces activateur potassiques et le cromakalim ou BRL 34916 (fig. 10). Par comparaison avec le nicorandil, le cromakalim qui est approximativement 100 fois plus actif, semble agir exclusivement par activation des canaux potassiques ATP-dépendants.

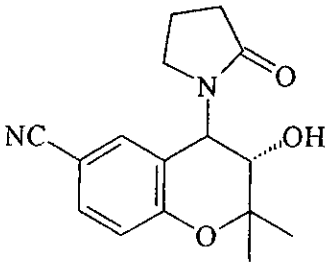


Fig. 10 : Structure chimique du cromakalim.

En raison de problème de toxicité, en particulier au niveau rénal, le développement du cromakalim a été suspendu en faveur de l'énantiomère lévogyre, le BRL38227 ou encore appelé levcromakalim. Ce dernier est de stéréochimie (-) (3S,4R). Plusieurs analogues du

cromakalim ont été synthétisés, par exemple le SDZ PCO 400, le EMD 52692 et beaucoup d'autres composés sont en développement (fig.11) [58, 59].

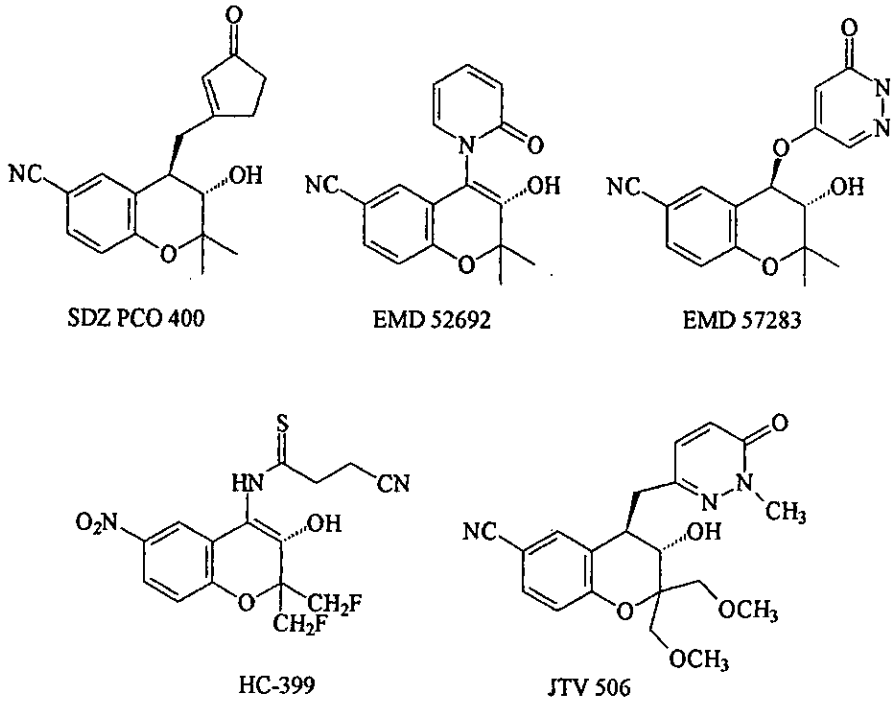


Fig. 11 : Structure chimique de quelques benzopyranes.

En plus de leur rôle dans la réduction de la pression sanguine par vasodilatation, les benzopyranes ont été étudiés en vue d'une utilisation dans la thérapie de l'asthme [60]. En effet certains benzopyranes comme le JTV 506 (Fig.11) 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 [61].

II.3.4.2.3. Les cyanoguanidines

Le pinacidil appartient à une autre classe d'activateurs des canaux K_{ATP}, il est introduit en plusieurs pays européens comme médicament antihypertenseur (Fig.12).

Cette pyridine substituée par une cyanoguanidine existe en forme racémique, mais l'activité réside surtout dans l'énantiomère (-) [62].

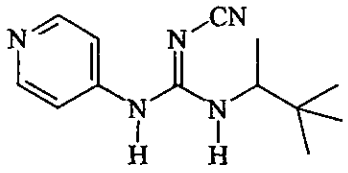


Fig. 12 : Structure chimique du pinacidil.

Dans les cellules du muscle lisse, il a été montré qu'à des concentrations très basses, le pinacidil est capable d'activer l'efflux de K^+ [63]. Ce composé peut également activer les canaux K_{ATP} dans les cellules β, les neurones et les cellules cardiaques [64, 65]. En plus du pinacidil, d'autres composés plus puissants ont été synthétisés, comme le P1060 [66] et le P1075 (Fig.13) [67]. Ce dernier et un isomère du pinacidil qui ne possède pas de centre d'asymétrie. Il est environ 30 fois plus puissant. Récemment le [^{3}H] P1075 a été utilisé comme traceur pour caractériser les interactions des activateurs et inhibiteurs potassiques avec leurs récepteurs [68].

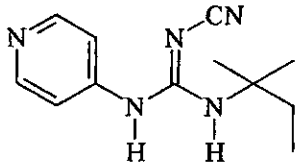


Fig. 13 : Structure chimique de P1075
isomère du pinacidil

II.3.3.2.4. Les 1, 2, 4 benzothiadiazine-1,1 dioxydes

Cette famille d'activateurs potassiques est illustrée par le diazoxide (Fig.14), un antihypertenseur dont l'administration chronique a été exclue en raison de son effet hyperglycémiant [69].

Le diazoxide a une structure chimique qui ressemble à celle des diurétiques thiazidiques mais ses propriétés pharmacologiques sont différentes, il favorise l'ouverture de canaux potassiques (K_{ATP}), augmente la polarisation des cellules vasculaires qui se relâchent,

Par voie orale, le diazoxide est encore quelque fois prescrit dans le traitement de certaines hypoglycémies [72] (diazoxide : PROCLICEM,Gél 25 et 100 mg). Son absorption après administration orale est bonne.

b- Effets indésirables du diazoxide

Le diazoxide peut provoquer une hypertension sévère après injection intraveineuse. Le risque existe dés lors de déclencher une crise d'angor, de provoquer un infarctus du myocarde ou un accident vasculaire cérébral. Il faut donc éviter son emploi chez les malades affectés d'une insuffisance coronarienne ou de troubles consécutives à une ischémie cérébrale. Les effets secondaires comme la rétention sodée et l'hyperglycémie n'ont en général pas l'occasion de se manifester lorsque le traitement est de courte durée [69, 72].

c- Influence des substitutions sur l'hétérocycle 1,2,4 benzothiadiazine-1,1 dioxyde

De nombreux dérivés de l'hétérocycle 1,2,4 benzothiadiazine-1,1 dioxide auquel appartient le diazoxide ont été synthétisés dans le but d'étudier leurs activités. Par exemple l'activité antihypertensive a été étudiée chez les 3-alkyl 1,2,4 benzothiadiazine 1,1 dioxides (fig.15).

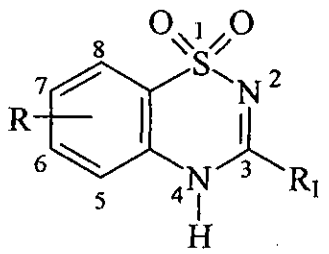


Fig. 15 : Numérotation des atomes de l'hétérocycle 1, 2, 4 benzotiadiazine 1,1 dioxide.

Les résultats de ces études ont montré que l'activité antihypertensive est réduite par une substitution en position 3 avec les chaînes alkyle les plus longues alors que les chaînes ramifiées, particulièrement en position α, tendent à augmenter cette activité. De même un carbone tertiaire dans cette position semble être favorable.

Les substituants alcényles présentent une activité comparable ou légèrement inférieure à celle de leurs homologues saturés. La modification de l'hydrocarbure saturé en position 3

par l'introduction d'un oxygène, d'un halogène, d'un azote ou d'un soufre, entraîne une chute marquée de l'activité.

Une substitution de la partie benzénique de l'hétérocycle par l'introduction d'un halogène en position 6 et 7 semble être favorable à une meilleure activité.

Le remplacement d'un chlore par un brome ne modifie pas l'activité de façon significative.

La présence d'un sulfamoyl (SO_2NH_2) ou d'un methylsulfonyl (CH_3SO_2) désactive la molécule, même en présence d'un chlore en positions 6 ou 7 [73].

Récemment, une grande série de composés reliés structuralement au diazoxide et ses dérivés ont été synthétisé en modifiant la structure de ses derniers par un remplacement bioisostérique du cycle chlorobenzénique avec un noyau pyridinique (schéma 2). Cette série de pyrido 1,2,4 thiadiazine 1,1 dioxides a montré un effet activateur sur les canaux K_{ATP} avec une sélectivité remarquable pour quelques tissus. Le degré de cette sélectivité dépend de la position de l'atome d'azote sur le cycle pyridinique et les chaînes aminoalkyles reliées à l'hétérocycle [74, 75].

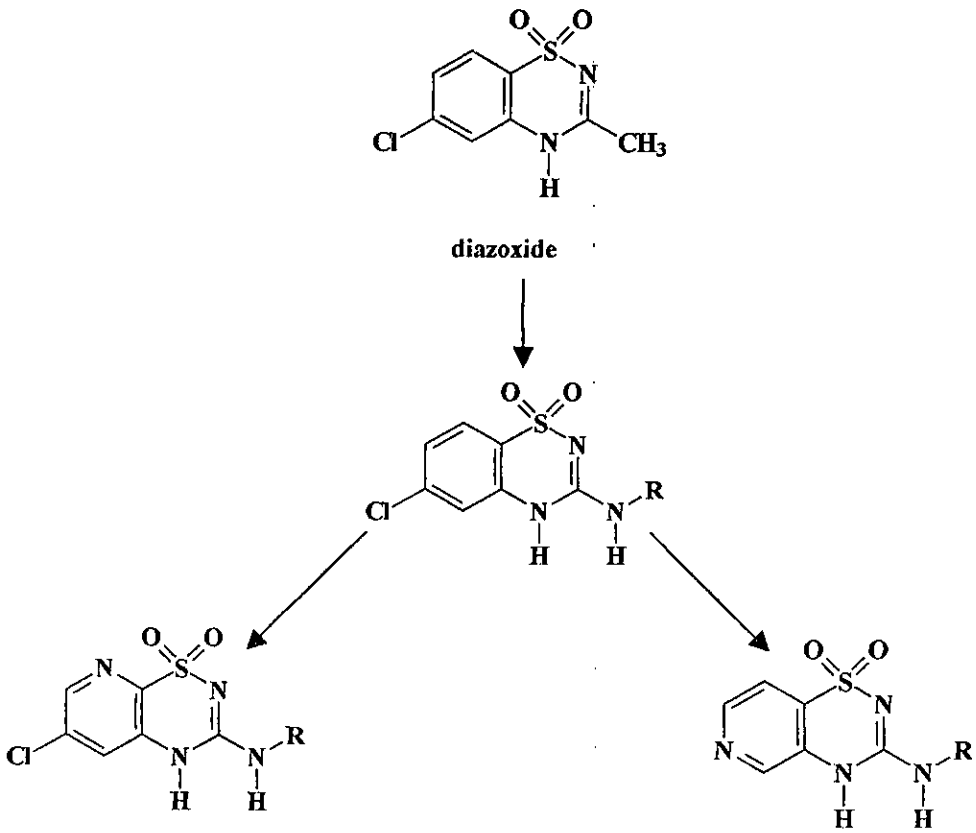


Schéma 2 : Substitution bioisostérique du cycle chlorobenzénique par une pyridine ou chloropyridine

III. Les diurétiques thiazidiques

Les diurétiques représentent une des classes de médicaments les plus prescrites. Leurs indications principales concernent l'hypertension artérielle et l'insuffisance cardiaque mais il existe d'autres indications telles que l'hypokaliémie. Un diurétique est une substance qui inhibe la réabsorption rénale du sodium et provoque donc une élimination excessive urinaire d'eau et de chlorure de sodium.

Les diurétiques thiazidiques constituent un type de la grande classe des diurétiques. Les principaux représentants de ce groupe, communément désignés sous le nom thiazides ou benzothiadiazines, sont des dérivés du chlorothiazide, lui-même synthétisé par condensation de la chlorodisulfaniline avec l'acide formique [69]. L'hydrochlorothiazide, un analogue réduit du chlorothiazide et possédant le même effet diurétique que lui, s'obtient par la condensation de la chlorodisulfonamide avec le formaldéhyde (Fig.14).

Le diazoxide, un activateur des canaux potassiques que nous venons de voir précédemment, est un dérivé thiazidique possédant une structure chimique très proche des diurétiques thiazidiques mais qui présente cependant des propriétés antidiurétiques.

Donc, l'action hypotensive du diazoxide apparaît par relaxation des fibres musculaires lisses artérielles à travers l'ouverture des canaux potassiques, alors que celle des diurétiques thiazidiques est le résultat de la diminution de la volémie par déplétion sodée suivie par diminution de la résistance vasculaire périphérique.

III.1. Rappel de la physiologie rénale

Chaque rein contient plus d'un million de minuscules néphrons, qui sont les unités structurales et fonctionnelles des reins. Les néphrons assurent la formation de l'urine. Chaque néphron (Fig.16) comprend deux structures principales : un glomérule, qui est un bouquet de capillaires, et un tubule rénal. Ce dernier est constitué de trois parties, le tubule contourné proximale (partie la plus proche du glomérule), l'anse de Henlé et le tubule contourné distal qui se jette dans le tubule rénal collecteur [76].

La formation de l'urine est le résultat de trois processus : la filtration glomérulaire, la réabsorption et la sécrétion tubulaire.

• *La filtration* est un processus passif et non sélectif qui dépend de la concentration des constituants de part et d'autre du filtre ainsi que du débit sanguin. Le filtrat glomérulaire contient tous les constituants du plasma ayant un poids moléculaire inférieur à 68000. Il contient donc de l'eau, des sels minéraux (anions et cations), des nutriments (glucose, ac.Aminés...) et des déchets azotés (urée, acide urique).

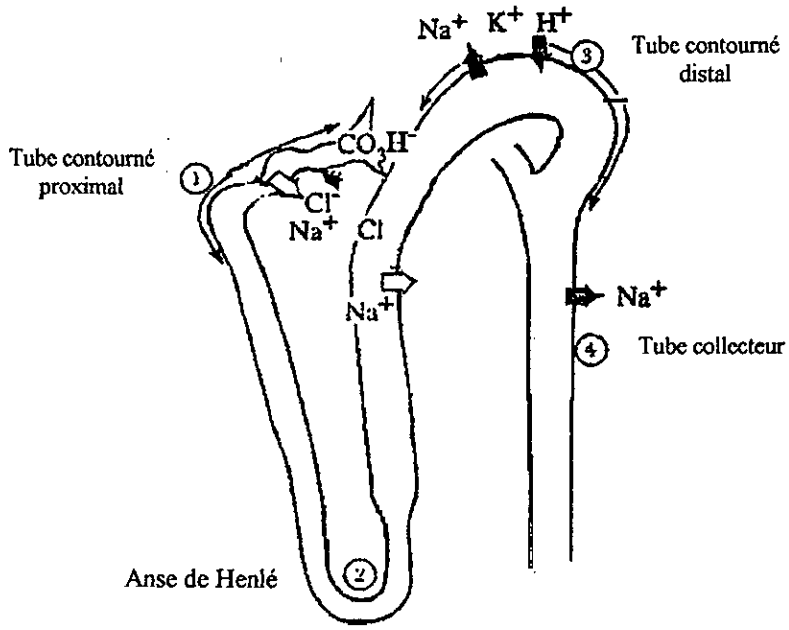


Fig. 16 : Division fonctionnelle du néphron.

• *La réabsorption* : outre les déchets et les ions en excès qui doivent être éliminés du sang, le filtrat contient un grand nombre de substances utiles, notamment de l'eau, du glucose, des acides aminés et des ions, qui doivent être réabsorbées et renvoyées dans le sang. La réabsorption se fait à plusieurs niveaux du tubule :

- Au niveau du tubule proximal, partie la plus longue du tube ayant une grande surface d'échange, il y a une réabsorption active du sodium présent à forte concentration, environ 65% du sodium filtré y est réabsorbé, l'ion bicarbonate, l'ion sulfate, du glucose, et divers acides et acides aminés. Les mécanismes impliqués sont, notamment le cotransport Na^+/substrat et l'échange Na^+/H^+. Le potassium y est également réabsorbé mais il est présent à une concentration

beaucoup plus faible que le sodium. Cette réabsorption active entraîne une réabsorption passive de l'eau pour rétablir l'isotonie de part et d'autre de la paroi tubulaire.

- Au niveau de l'anse de Henlé, il y a réabsorption passive de l'eau au niveau de la branche descendante et réabsorption active de sodium, potassium et chlorure par le cotransport Na^+/K^+-$2Cl^-$ au niveau de la branche ascendante, partie large de l'anse qui n'est pas perméable à l'eau et est appelée segment de dilution. Environ 25% du sodium est réabsorbé à ce niveau.
- Au niveau du tube distal, dans la partie initiale, il y a réabsorption de sodium par cotransport Na^+/Cl^-, prés de 10% du sodium y est réabsorbé, dans la deuxième partie, il y a réabsorption du sodium favorisée par l'aldostérone.
- Dans le tube collecteur, il y a réabsorption passive de l'eau mais seulement en présence de l'hormone antidiurétique (ADH) qui ouvre les pores permettant la réabsorption, il y a également des échanges entre le sodium et le potassium.

- *La sécrétion tubulaire* : au niveau du tube proximal, il y a sécrétion d'ions H^+ et de nombreux médicaments à fonction acide : acide para-aminohipprique, diurétiques thiazidiques, pénicilline, acide salicylique et à fonction basique comme l'histamine, la thiamine, et la morphine.

Au niveau de l'anse de Henlé, il n'y a pas de sécrétion, alors que dans le tube distal il y a sécrétion d'ions H^+, d'ammoniaque et de potassium. L'urine de l'anse ne contient guère de potassium, l'urine définitive en contient car elle est sécrétée au niveau distal [57, 69].

III.2. Pharmacologie des diurétiques thiazidiques

Les thiazides couramment utilisés sont bien absorbés après administration orale. Leur fixation protéique est importante. Certains sont métabolisés, leurs métabolites étant généralement inactifs. Ils sont éliminés principalement par filtration et sécrétion tubulaires rénales.

III.2.1. Effet diurétique

Les diurétiques agissent en inhibant la réabsorption du sodium à différents niveaux du néphron. Les thiazides agissent au niveau de la portion initial du tube distal par inhibition du cotransport de type symport Cl^-/Na^+ après avoir été sécrétés dans la lumière

du tube proximal, en réduisant la réabsorption du sodium, de chlorure et dans une moindre mesure le potassium.

Ils augmentent l'élimination de bromure et d'iodure parallèlement à celle du chlorure et modérément la diurèse aqueuse.

Dans le plasma, ils diminuent la concentration de potassium, ce sont des diurétiques hypokaliémiants et augmentent légèrement celle de l'acide urique en diminuant sa sécrétion tubulaire [57].

III.2.2. Effet antihypertenseur

Plus de leur action qui consiste à inhiber la réabsorption de sodium au niveau du tubule rénal, les thiazides comme tous les diurétiques sont, en outre, hypotenseurs. Cependant ils ne provoquent une baisse de la pression artérielle que lorsque leur effet salidiurétique est installé. Leur effet hypotenseur est associé à une diminution transitoire du débit cardiaque et à une augmentation modérée des résistances périphériques. Dans une seconde phase, tandis que la pression artérielle reste abaissée, le débit cardiaque se normalise et les résistances périphériques diminuent. En inhibant les flux ioniques de sodium et même de calcium, au niveau de la membrane de la fibre musculaire lisse vasculaire, les thiazides réduisent la réactivité des vaisseaux aux agents hypertenseurs (noradrénaline, angiotensine, vasopressine). Cette action musculaire directe pourrait rendre compte de la réduction des résistances périphériques. Il apparaît que les effets salidiurétiques, hypovolémiants et de protection vasculaire à l'égard des agents hypertenseurs participent à l'action antihypertensive des diurétiques. Les thiazides et tous les autres classes de diurétiques potentialisent l'action antihypertensive des autres hypotenseurs et permettent le plus souvent la réduction de posologie [57, 69].

III.2.3. Effets secondaires

Comme toute substance active, les diurétiques thiazidiques peuvent entraîner divers effets indésirables : hypokaliémie, diminution de la tolérance au glucose, probablement par diminution de la sécrétion d'insuline, élévation discrète de l'uricémie qui peut aggraver les crises de goutte chez les patients goutteux, aggravation d'une insuffisance rénale et possibilité d'hyponatrémie chez les personnes âgées [69].

B. Partie chimique

I. Propriétés physico-chimiques des sulfonylurées et leurs méthodes de synthèse

I.1. Propriétés physico-chimiques

Les sulfonylurées sont des substances solides, le plus souvent bien cristallisées, en forme de poudres blanches ou légèrement jaunes, avec un caractère acide. Leur solubilité dans les solvants organiques varie avec la complexité de leurs structures, les composés contenants un groupe urée libre ($RSO_2NHCONH_2$) peuvent être cristallisés à partir du point d'ébullition de l'eau ; ceux qui contiennent des substituants additionnels ($R_1SO_2NHCONHR_2$) sont généralement plus solubles dans les solvants polaires que les solvants hydrocarbonés et très peu solubles dans l'eau [77].

La présence du radical sulfamoyl confère des propriétés acides aux sulfonylurées. Elles se solubilisent en milieu alcalin par formation de sels stables qui se cristallisent en forme de solides brillants, par addition d'alcool à leurs solutions aqueuses concentrées [78, 79].

Dans une solution aqueuse diluée d'hydroxyde de sodium, le *p*-nitrophenylsulfonylurée se dégrade en dioxyde de soufre et en *p*-nitrophenylurée (Schéma 3)

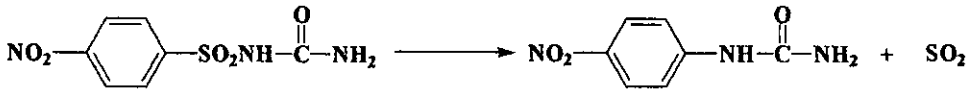


Schéma 3

Cette réaction a été étudiée beaucoup plus avec les guanidines car les benzensulfonylguanidines contenants un groupe nitro en position para ou ortho sont décomposés de façon similaire en milieu alcalin [80, 81].

Dans la spectrophotométrie ultraviolette, les sulfonylurées présentent des absorptions dues essentiellement au(x) reste(s) aromatique(s) et la copule sulfonylurée.

En spectrophotométrie infrarouge, la majorité des sulfonylurées présentent dans leurs spectres des bandes d'absorption dues aux vibrations suivantes :

Type de vibration	Bande d'absorption
ν N-H	~ 3190 et 3280 cm^{-1}
ν SO_2-N et ν S=O	~1335 et 1165 cm^{-1}
ν C=O	~1660 – 1700 cm^{-1}

Les tests utilisés pour l'identification des sulfonylurées surtout pour celles qui sont des médicaments sont des tests classiques :

- Détermination du point de fusion.
- Comparaison du spectre infrarouge à celui d'une substance chimique de référence.
- Spectrophotométrie ultraviolette.
- Chromatographie sur couche mince de gel de silice avec agent fluorescent et comparaison du rapport frontal (R_f) avec celui d'une substance chimique de référence.

Cette dernière est, en général, efficace et suffisante. A titre d'exemple, pour le gliclazide, la pharmacopée française utilise des plaques de gel de silice et une phase mobile constituée d'acide formique, de méthanol et de chloroforme (2 : 6 : 4) [37].

I.2. Méthodes de synthèse des sulfonylurées

A l'opposé des N-carbonylurées, de formule générale R'CONHCONHR, qui sont facilement préparées par action des chlorures d'acides carboxyliques ou de leurs anhydrides sur une urée appropriée, les sulfonylurées, de manière inattendue, n'ont pas été obtenues par réaction analogue impliquant des halogénures de sulfonyls (schéma 4).

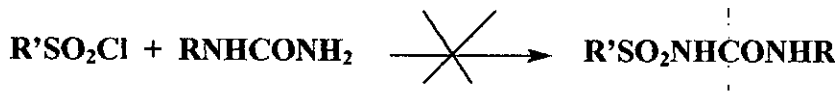


Schéma 4

I.2.1. Synthèse à partir des sulfonylisocyanates par interaction avec des amines

Les sulfonylisocyanates sont des composés de formule générale RSO_2NCO ou R peut être un halogène, un alkyle ou un aryl. La polarité du groupe sulfonyl attaché au système cumulatif de doubles liaisons, rend ces molécules beaucoup plus réactives que les isocyanates vis-à-vis d'un nucléophile sur l'atome de carbone central.

Les sulfonylisocyanates sont préparés, dans des conditions appropriées, à partir d'halogénures de l'acide sulfonique et d'isocyanates métalliques dont le métal est souvent de l'argent dans une solution de nitrobenzène (schéma 5) [82].

$$RSO_2Cl \xrightarrow{MNCO/solvant} RSO_2NCO + MCl$$

Schéma 5

Ils réagissent facilement avec l'ammoniac et les amines pour donner les sulfonylurées correspondantes (schéma 6) [82].

$$R'SO_2NCO + RNH_2 \longrightarrow R'SO_2NHCONHR$$

Schéma 6

I.2.2. Synthèse à partir des sulfonamides

Les sulfonylurées sont obtenues à partir des sulfonamides par des méthodes généralement utilisées pour convertir des amines en urées. Les réactifs utilisés dans ces méthodes sont l'acide isocyanique, les esters isocyaniques ou des substances qui se décomposent en ces derniers dans les conditions de synthèse. Les urées, nitrourées, urèthanes et le chlorure de carbamyl peuvent servir de source d'acide isocyanique. Leurs analogues N-alkylés et N-arylés ainsi que certains dérivés d'acides et des bromoamides, ont été employés comme source d'isocyanates d'alkyles ou aryles.

I.2.2.1. Interaction avec l'acide isocyanique

La réaction de Wohler entre l'acide isocyanique et les amines a été appliquée avec succès dans la préparation des urées. Le premier composé de ce type décrit dans la littérature a été, en fait, préparé par cette méthode.

A l'opposé des amines qui se condensent rapidement avec les isocyanates en solution acide, les sulfonamides ne réagissent pas dans ces conditions, Ce-ci ; est illustré par la réaction du *p*-aminobenzénsulfonamide avec l'acide isocyanique qui donne le *p*-sulfonamido-phénylurée (schéma7).

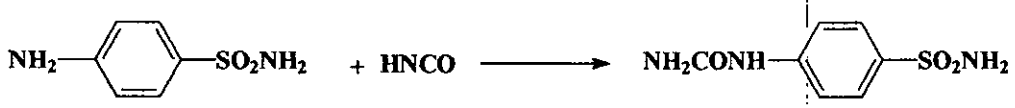


Schéma 7

La réaction avec les sulfonamides se déroule en milieu alcalin ou neutre, mais elle est plus lente qu'avec les amines. Un chauffage prolongé d'un arylsulfonamide avec un isocyanate en milieu hydroalcoolique alcalin, par exemple, donne de bons rendements en arylsulfonylurées. Quelques sulfonylurées aliphatiques ont été également préparées par ce procédé (schéma 8) [83,84].

$$RSO_2NH_2 + HCNO \longrightarrow RSO_2NHCONH_2$$

Schéma 8

I.2.2.2. Interaction avec l'urée et les urées substituées

Les sulfonylurées sont souvent préparées à partir d'urées et de sulfonamides. Toutefois le caractère acide de ces derniers nécessite la présence de bases (schéma 9) [83,84].

$$2R'SO_2NH_2 + 2NH_2CONHR \xrightarrow[-(NH_4)_2CO_3]{Na_2CO_3/H_2O} 2R'SO_2N(Na)CONHR$$

$$R'SO_2NHK + NH_2CONHR \xrightarrow{-NH_3} R'SO_2N(K)CONHR$$

Schéma 9

Par exemple le chauffage prolongé d'un mélange de *p*-acétamidobenzénsulfonamide, d'urée et de carbonate de sodium dans l'éthanol aqueux conduit à un très bon rendement en *p*-acétamidobenzénsulfonylurée (schéma 10) [84].

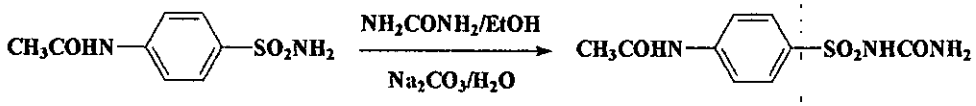


Schéma 10

I.2.2.3. Interaction avec des nitrourées

Davis et Blanchard [84,85] furent les premiers à utiliser cette méthode pour synthétiser des urées substituées. Depuis, cette méthode a été utilisée pour la préparation des sulfonylurées. Le sulfonamide est chauffé à reflux avec le sel monosodique de la nitrourée ou avec le carbonate de sodium et la nitrourée, dans l'éthanol à 80 % jusqu'à cessation du dégagement du dioxyde nitreux. En général, les rendements sont excellents (schéma 11).

$$R'SO_2NH_2 + NO_2N(Na)CONH_2 \xrightarrow[-\,H_2O]{-NO_2} R'SO_2N(Na)CONH_2$$

Schéma 11

I.2.2.4. Interaction avec les uréthanes

Les uréthanes se décomposent sous certaines conditions pour donner de l'acide isocyanique ou des isocyanates et de l'alcool. Pour cette raison, ils ont été utilisés avec succès dans la préparation des sulfonylurées. La réaction se fait par chauffage du sulfonamide et de l'urée en l'absence de solvant à 100°C, jusqu'à ce qu'il n'y ait plus libération d'éthanol. La réaction peut également être utilisée à 110-120°C dans un solvant comme l'alcool monométhylique de l'éthylène glycol (schéma 12) [85, 86].

$$RNHCOOC_2H_5 \longrightarrow RNCO + C_2H_5OH$$

$$R'SO_2NH_2 + RNHCOOC_2H_5 \longrightarrow R'SO_2NHCONHR + C_2H_5OH$$

Schéma 12

I.2.2.5. Interaction avec les chlorure de carbamyls

Le chlorure de carbamyl et ses analogues se condensent facilement avec les sulfonamides pour donner des sulfonylurées (schéma 13) [85, 87].

$$R'SO_2NH_2 + R_2NCOCl \longrightarrow R'SO_2NHCONR_2 + HCl$$

Schéma 13

I.2.2.6. Interaction avec les isocyanates

La condensation des isocyanates avec les sulfonamides est une méthode générale de préparation des sulfonylurées, 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 [83,86]. L'effet catalytique des amines tertiaires dans la condensation des isocyanates avec des composés hydroxylés est bien connu et la cinétique de la réaction a été étudiée en détail [88]. L'addition de l'amine tertiaire comme catalyseur dans la condensation des isocyantes avec les amines n'est pas nécessaire car ces dernières réagissent facilement avec les isocyanates, à l'opposé des sulfonamides qui ont un caractère essentiellement acide, l'effet catalytique et très significatif [89]. Cette différence de réactivité entre le groupe sulfamoyl et le groupe amine vis-à-vis des isocyanates est illustrée par la réaction suivante que nous avons déjà décrit avec l'acide isocyanique (schéma 14).

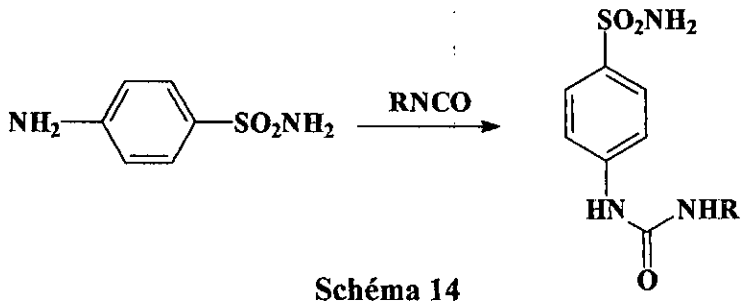


Schéma 14

Une procédure alternative consiste à former le sel sodique du sulfonamide dans le DMF à 0°C en utilisant le NaH comme base, puis d'ajouter l'isocyanate et de continuer la réaction à température ambiante (schéma 15) [90].

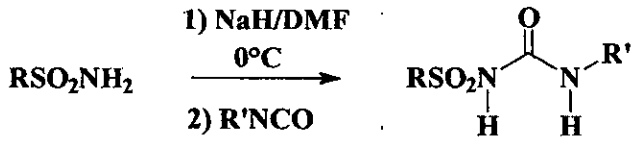


Schéma 15

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 manipule sous hotte aspirante.

I.2.3. Synthèse à partir d'autres sulfonylurées

La réaction d'une sulfonylurée du type $R'SO_2NHCONH_2$, avec une amine fournit dans certaines conditions une sulfonylurée plus substituée (schéma 16) [91].

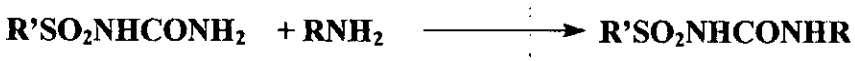


Schéma 16

I.2.4. Synthèse par désulfuration des sulfonylthiourées

En présence d'acides minéraux, la plupart des agents oxydants transforment les thiourées en dithioformamidine. En milieu neutre, par contre, le permanganate, l'eau oxygénée et d'autres agents d'oxydation donnent principalement des urées. Certains oxydes et sels de métaux lourds (plomb, mercure, cuivre et argent) qui, en milieu alcalin déplacent le sulfure d'hydrogène des sulfonylthiourées en formant des cyanamides, donnent des urées en milieu neutre (schéma17) [91].

$$\mathbf{R'SO_2NHCSNHR + 2\,AgNO_3 \xrightarrow[-Ag_2S]{H_2O} R'SO_2NHCONHR + 2HNO_3}$$

Schéma 17

Travaux Personnels

Synthèse des molécules

I. Synthèse des molécules

I.1. Stratégie de synthèse

Rappelons que notre but dans ce travail est de synthétiser des molécules dérivées de l'hétérocycle benzothiadiazine 1,1 dioxyde avec un squelette ouvert en introduisant la fonction sulfonylurée sur ce dernier. C'est un procédé classique très utilisé en pharmacomodulation et qui s'appelle simplification moléculaire.

Dans ce cadre nous avons proposé deux modèles structuraux, qui nous ont donné deux familles de composés par différentes substitutions des radicaux de la molécule type.

Les structures moléculaires de ces types de composés sont illustrées par le schéma 18.

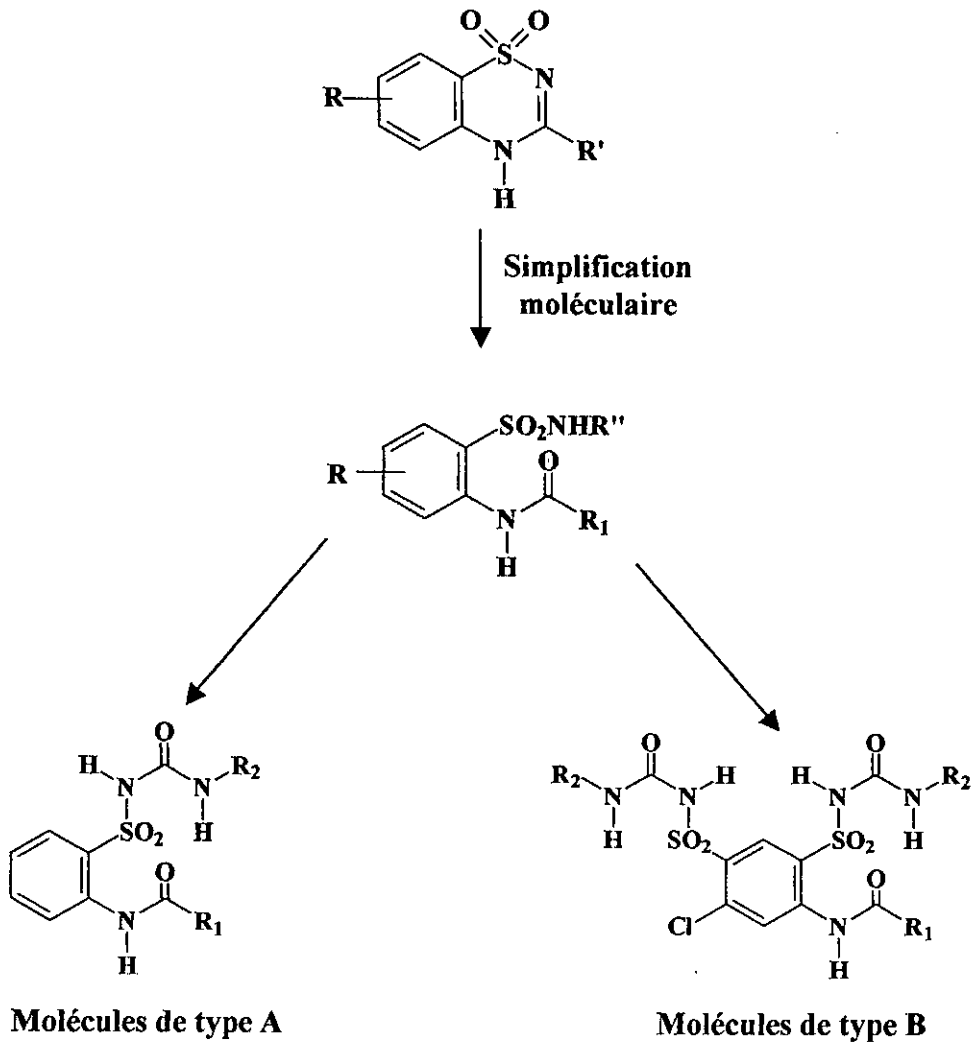


Schéma 18

I.1.1. Synthèse des composés de type A

La synthèse des molécules de type **A** comporte deux étapes essentielles. La première consiste à transformer la fonction amine de l'*o*-aminobenzénsulfonamide de départ en fonction amide

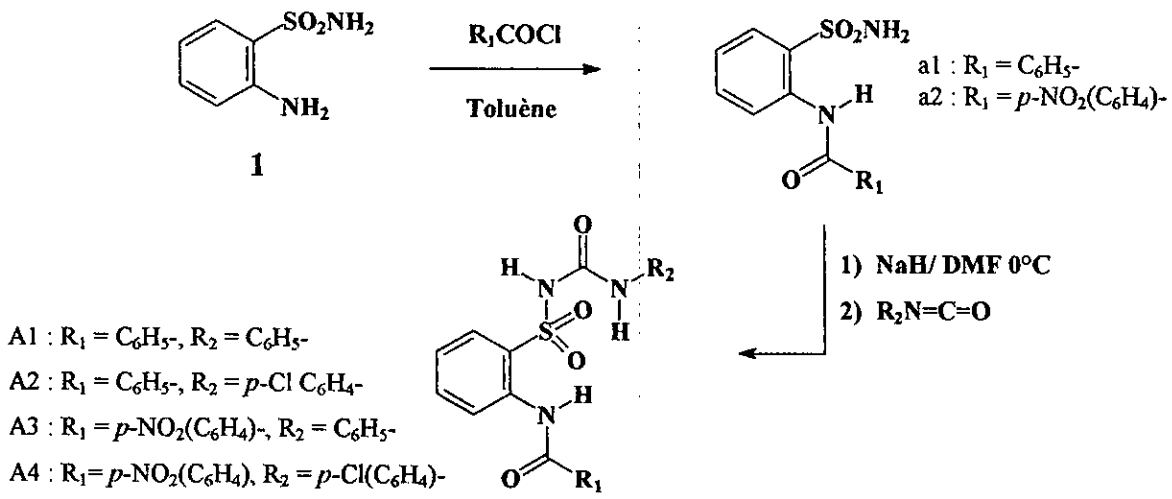


Schéma 19

Dans cette étape nous avons préparé deux molécules, le 2-phénylamidobenzén-sulfonamide (a1) et le 2-(*p*-nitrophénylamido)benzénsulfonamide (a2) à partir de l'*o*-aminobenzénsulfonamide (**1**) en le chauffant à reflux avec le chlorure d'acyl approprié dans le toluène ou le benzène.

Donc la réaction est une simple condensation entre les deux molécules avec libération d'une molécule d'HCl.

Les deux réactions ont un bon rendement. Les chromatogrammes sur couche mince de silice montrent que les mélanges réactionnels à la fin des réactions sont dépourvus des molécules de départ.

Dans la deuxième étape, on introduit la fonction sulfonylurée sur le groupement sulfamoyl des deux composés a1 et a2, ce qui correspond à un greffage du synthon sulfonylurée par condensation des isocyanates sur le groupement sulfamoyl.

Dans un premier temps, nous avons traité les 2-arylamidobenzénsulfonamides (a1, a2) avec l'hydrure de sodium (NaH) dans le DMF à 0°C, la suite de la réaction se fait à température ambiante avec des durés allant de 10 à 16 heures en ajoutant un isocyanate approprié (schéma 20) [90]. Nous avons utilisé l'isocyanate de phényl et l'isocyanate de *p*-chlorophényl.

➢ ***Mécanisme proposé de la réaction***

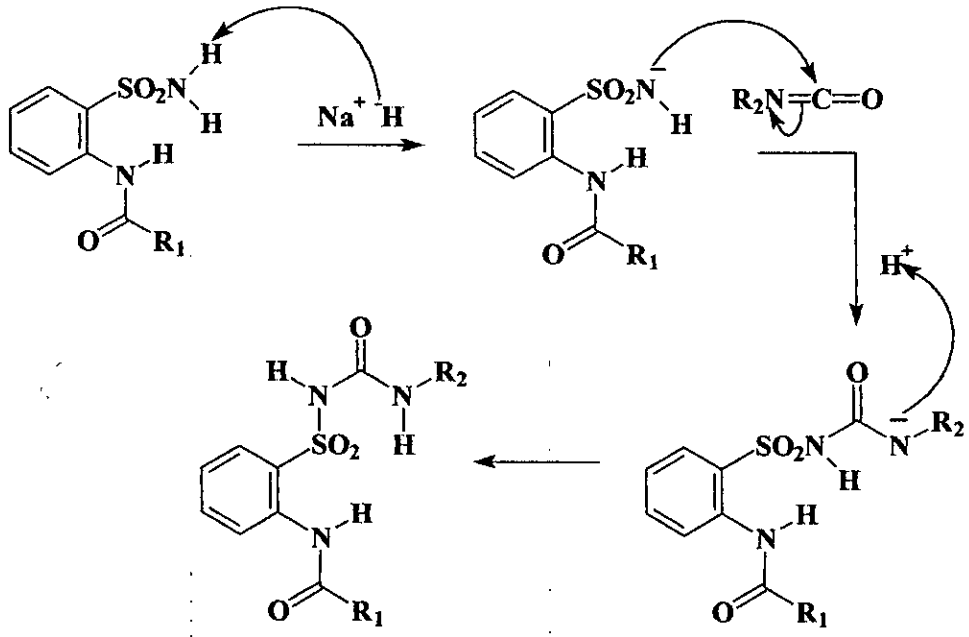
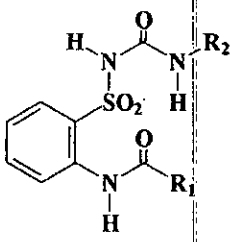
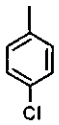
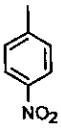
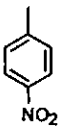


Schéma 20

Le tableau 3 rassemble les composés de type A préparés.

Tableau 3 : Composés cibles de la famille A



Composé	R_1	R_2	Formule brute
A1			$C_{20}H_{17}N_3SO_4$
A2			$C_{20}H_{16}ClN_3SO_4$
A3			$C_{20}H_{16}N_4SO_6$
A4			$C_{20}H_{15}ClN_4SO_6$

I.1.2. Synthèse des composés de type B

Les composés de type B possèdent deux groupements sulfonylurées en position méta l'un par rapport à l'autre. Pour atteindre cette structure nous avons utilisé le 4-amino-6-chloro-1,3-benzénedisulfonamide comme produit de départ et qui comporte deux groupements sulfamoyls (schéma 21).

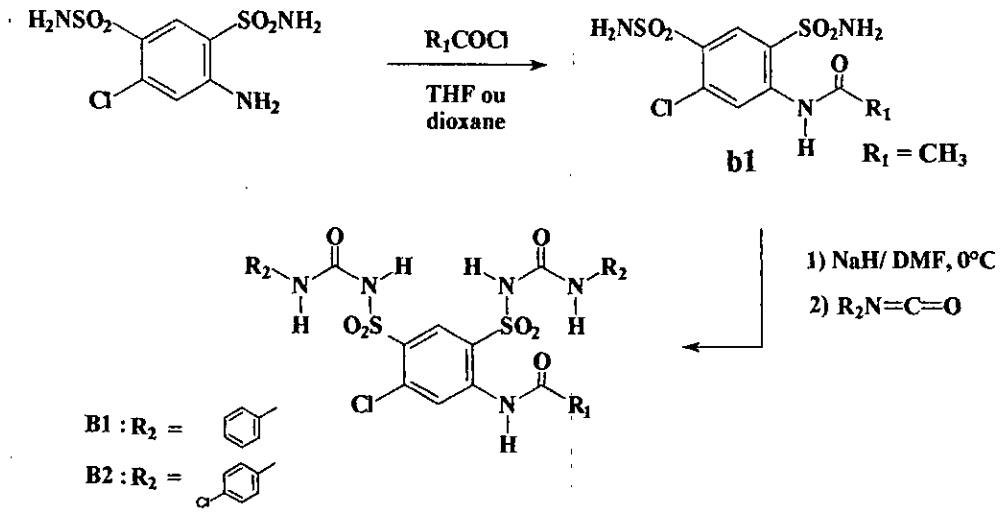


Schéma 21

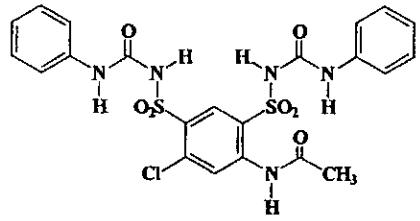
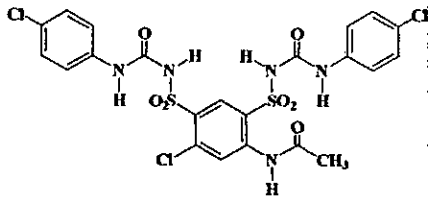
La première étape consiste à faire réagir le 4-amino-6-chloro-1,3 benzénedisulfonamide avec un chlorure d'acyl dans le tetrahydrofurane (THF) ou le dioxane comme solvants pour convertir la fonction amine en amide.

Nous avons utilisé comme chlorure d'acyle le chlorure d'acétyl ($R_1 = CH_3$) pour aboutir au 4-acétamido-6-chloro-1,3 benzénedisulfonamide. La réaction avec l'anhydride acétique conduit au même composé mais avec un rendement plus faible par rapport au premier cas.

Pour accéder aux molécules finales, nous avons fait réagir le composé b1 avec différent isocyanates après un traitement avec l'hydrure de sodium dans les mêmes conditions que nous avons déjà décrit avec les composés de la famille A.

Nous avons ainsi préparé deux composés originaux finals (Tableau 4).

Tableau 4 : composés finals de la famille B

Composé	Formule brute
 B1	$C_{22}H_{20}ClN_5S_2O_7$
 B2	$C_{22}H_{11}Cl_3N_5S_2O_7$

I.2. Etude spectrale des molécules synthétisées

Après l'étape d'élaboration des molécules cibles, nous avons utilisé plusieurs méthodes d'analyse à fin de confirmer les structures obtenues.

Tous les composés sont recristallisés dans des solvants appropriés pour éliminer les impuretés qui peuvent se produire au cours de la synthèse.

L'analyse élémentaire des composés finals a donné des pourcentages en carbone, hydrogène, azote et en soufre comparable à ceux calculés théoriquement.

Les spectres infrarouge ont montré les bandes de vibrations caractéristiques des groupements fonctionnels présents dans les différents composés qui sont les suivantes :

- Vibrations d'élongation de liaisons N-H localisées entre 3200 et 3350 cm^{-1}.
- Vibrations d'élongation de SO_2 situées à 1160 et 1350 cm^{-1}.
- Vibrations d'élongation de carbonyle (C=O) des groupements sulfonylurée et amide situées entre 1650 et 1700 cm^{-1} (Fig.17).

D'après la structure des composés synthétisés, nous constatons la présence de deux types de protons : les protons aromatiques (CH_{arom}) et les protons de groupes (N-H).

Les spectres RMN de proton de tous les composés finals révèlent les signaux de ces types de protons à des déplacements chimiques spécifiques. Les signaux des protons aromatiques

apparaissent entre 7,00 et 8,20 ppm, alors que les protons N-H présentent des signaux entre 8,30 et 10,75 ppm (Fig.18). Les signaux des protons de groupes N-H ont été détectés en réalisant le spectre avant et après addition de quelque gouttes de D_2O, dans le but de les faire disparaître.

Le groupe méthyl de la fonction amide des composés B1 et B2 présente un signal à 2,20 ppm.

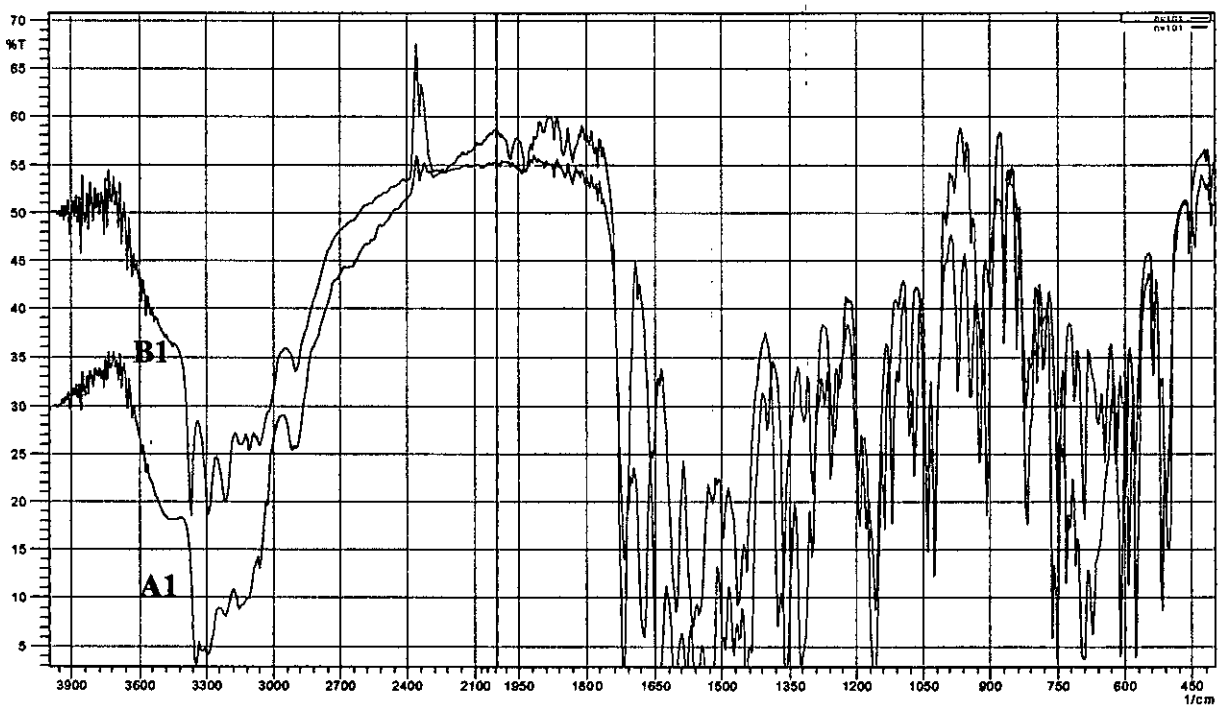


Fig. 17 : Spectres infrarouge des composés A1 et B1 superposés effectués en pastille de KBr à 2%

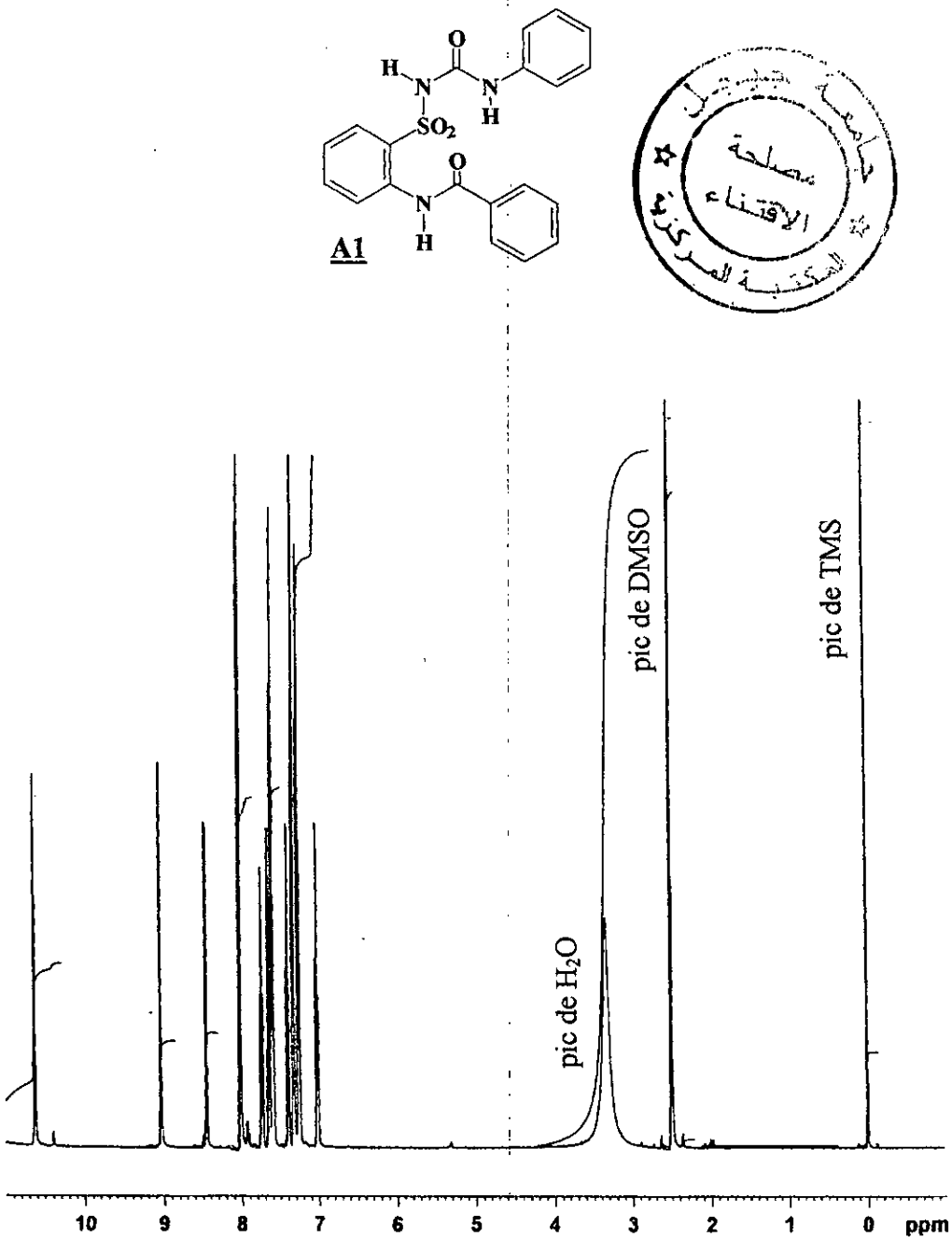


Fig. 18 : Spectre RMN de proton de A1 effectué dans le DMSO-d_6 à 500 MHz

I.3. Partie expérimentale

I.3.1. Matériels et méthodes :

I.3.1.1. Produits et solvants utilisés :

La préparation des molécules intermédiaires et finales a été faite selon des méthodes de synthèse organique connues et réalisables dans des conditions expérimentales simples. Nous avons utilisé comme produits de départ :

- le 2-aminobenzénsulfonamide pour la synthèse des molécules de type A.
- le 4-amino-6-chloro-1,3-benzénedisulfonamide pour la synthèse des molécules de type B.

Les solvants utilisés pour les différentes réactions et recristallisations des composés synthétisés et les phases mobiles pour la CCM sont :

- acétone : solvant de recristallisation.
- acétate d'éthyl : phase mobile.
- DMF : solvant de réaction.
- éthanol : solvant de recristallisation.
- éther diétylique : phase mobile.
- méthanol : phase mobile.
- THF : solvant de réaction.
- toluène : solvant de réaction.

Toutes les réactions ont été régulièrement contrôlées par chromatographie sur couche mince de gel de silice (support en aluminium) MERCK 60 F_{524}.

I.3.1.2. Méthodes d'analyse et matériels :

Pour confirmer les structures des composés synthétisés nous avons utilisé les méthodes physico-chimiques d'analyse suivantes : la spectrométrie infrarouge, la résonance magnétique nucléaire du proton, la microanalyse élémentaire, la mesure du point de fusion et la chromatographie liquide sur couche mince (CCM).

a- Spectrométrie Infrarouge (IR)

Les analyses ont été réalisées en milieu solide, sur des pastilles contenant l'échantillon dilué à 2 % dans du KBr, avec un appareil SHIMADZU 8400.

b- Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire RMN

Les spectres RMN du proton ont été réalisés à 500 MHz avec un appareil BURCKER. Les échantillons ont été préparés dans le DMSO deutérié (DMSO-d_6) car c'est le solvant qui solubilise mieux les produits. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm (δ).

Les abréviations conventionnelles utilisées pour la description des spectres sont les suivantes :

s : singulet

d : doublet

dd : doublet de doublet

t : triplet

m : multiplet

c- Microanalyse

L'analyse élémentaire (C, H, N, S) a été effectuée par un analyseur élémentaire Carlo-Erba EA 1108.

d- Point de fusion

Ils sont pris par un banc KOFLER après étalonnage et ne sont pas corrigés.

e- Chromatographie liquide sur couche mince

Elle a été réalisée sur couche mince de gel de silice MERCK 60 F_{524} pour contrôler la pureté des composés et déterminer les rapports frontaux R_f.

I.3.1.3. Désignation des composés synthétisés :

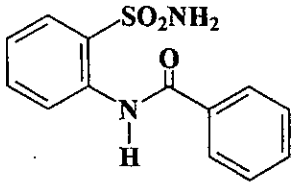
Les composés finals sont désignés par une lettre majuscule montrant le type de composé suivie par un chiffre arabe (**A1**, **B1**....).

Les composés intermédiaires sont désignés par une lettre minuscule relative au type de composés suivie par un chiffre arabe (**a1**, **b1**....).

I.3.2. Modes opératoires relatifs aux composés de type A

➢ **2-(phénylamido)benzénsulfonamide a1 :**

1g (5,80 mmol) de *o*-aminobenzénsulfonamide et 1,2 ml (5.80 mmol) de chlorure de benzoyl sont chauffés à reflux dans 30 ml de toluène pendant 4 heurs. Après refroidissement, le précipité formé est filtré puis séché.



a1

Recristallisation : méthanol/eau

Rendement : 94%.

Point de fusion : 190 –194°C.

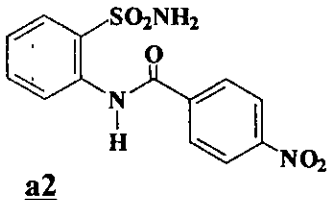
IR (KBr 2 %, ν cm^{-1}) : ν (NH) = 3300, 3360 ; ν (CO) = 1660 ; ν (SO_2) = 1115, 1160, 1230, 1335 ; ν (CH_{arom}) = 3050.

➢ **2-(*p*-nitrophénylamido)benzénsulfonamide a2 :**

Pour le mode opératoire voir composé a1.

Réactifs : 1 g de *o*-aminobenzésulfonamide, 1,2 ml de chlorure de *p*-nitobenzoyl.

Solvant : toluène



a2

Recristallisation : méthanol/eau

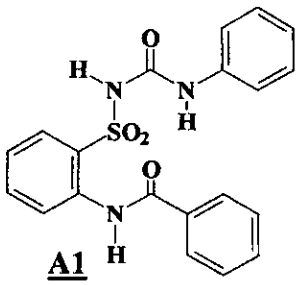
Rendement : 95 %

Point de fusion : 218 –221°C

IR (KBr 2 %, ν cm^{-1}) : ν (NH) = 3200, 3300 ; ν (CO) = 1670 ; ν (SO_2) = 1160, 1250, 1350 ; ν (CH_{arom}) = 3090, 3120 ; ν (NO_2) = 1540.

➢ **2-phénylamido-N-(phénylaminocarbonyl)-benzénesulfonamide : A1**

A une solution de 0,5g de **a1** dans un minimum de DMF refroidie à 0°C, on ajoute 0,1g de NaH. Le mélange est agité pendant 15 minutes puis 0,2 ml d'isocyanate de phényl est ajouté. La solution ainsi formée est agitée à température ambiante pendant 15 heures puis versée dans 20 ml d'eau et filtrée. Le filtrat est acidifié avec une solution d'HCl 2N. Le précipité formé est filtré, lavé à l'eau et séché.



A1

Recristallisation : Acétone/eau.

Rendement : 95 %

Point de fusion : 216 –218°C.

R_f : 0,68 dans l'AcOET/éther (40/60) sur gel de silice.

Microanalyse élémentaire:

$C_{20}H_{17}N_3SO_4$, M = 395,4	C (%)	H (%)	N (%)	S (%)
Calculé	60,75	4,33	10,63	8,11
Trouvé	60,72	4,30	10,61	8,09

IR (KBr 2 %, ν cm^{-1}) : ν (NH) = 3210, 3280, 3360 ; ν (CO) = 1640 ; ν (**CO** urée) = 1720 ; ν (SO_2) = 1160, 1290, 1250, 1325 ; ν (CH_{arom}) = 3055, 3100.

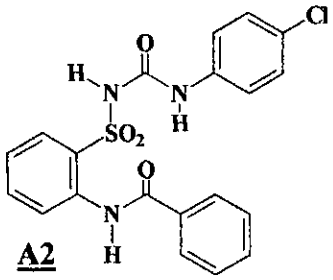
RMN^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6, δ ppm) : 7,00 (1t, 1H, C$\underline{H}_{arom}$) ; 7,30 (1dd, 5H, C$\underline{H}_{arom}$) ; 7,40 (1t, 1H, C$\underline{H}_{arom}$) ; 7,60 (1dd, 3H, C$\underline{H}_{arom}$) ; 7,75 (1t, 1H, C$\underline{H}_{arom}$) ; 8,00 (1d, 3H, C$\underline{H}_{arom}$) ; 8,45 (1s, 1H, N$\underline{H}$) ; 9,00 (1s, 1H, N$\underline{H}$) ; 10,60 (1s, 1H, NH).

➢ **2-phénylamido-N-(*p*-chlorophénylaminocarbonyl)- benzénesulfonamide A2 :**

Pour le mode opératoire voir composé **A1**.

Réactifs : 0,5 g de **a1**, 0,2 ml d'isocyanate de *p*-chlorophényl et 0,1 g de NaH.

Solvant : DMF



A2

Recristallisation : Ethanol/eau.

Rendement : 95 %.

Point de fusion : 239 –240°C.

R_f : 0,72 dans l'AcOET/éther (50/50) sur gel de silice.

Microanalyse élémentaire :

$C_{20}H_{16}ClN_3SO_4$, M = 429,89	C (%)	H (%)	N (%)	S (%)
Calculé	55,88	3,75	9,78	7,46
Trouvé	55,86	3,72	9,81	7,47

IR (KBr 2 %, ν cm^{-1}) : ν (NH) = 3210, 3300 ; ν (CO) = 1640 ; ν (**CO** urée) =1700 ; ν (SO_2) = 1160, 1200, 1330 ; ν (CH_{arom}) = 3060, 3100.

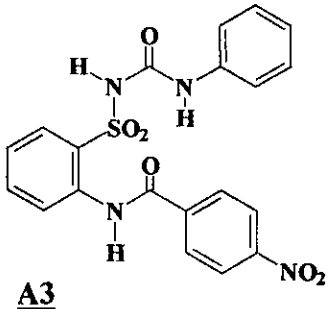
RMN^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6, δ ppm) : 7,35 (1m, 6H, $C\underline{H}_{arom}$) ; 7,60 (1dd, 3H, $C\underline{H}_{arom}$) ; 7,75 (1t, 1H, $C\underline{H}_{arom}$) ; 8,00 (1d, 3H, $C\underline{H}_{arom}$) ; 8,50 (1s, 1H, N$\underline{H}$) ; 9,20 (1s, 1H, N$\underline{H}$) ; 10,60 (1s, 1H, N$\underline{H}$).

➢ **2-(*p*-nitrophénylamido)-N-(phénylaminocarbonyl)-benzénesulfonamide A3 :**

Pour le mode opératoire voir le composé **A1**.

Réactifs : 0,5 g de **a2**, 0,2 ml d'isocyanate de phényl et 0,1 g de NaH.

Solvant : DMF



A3

Recristallisation : Ethanol/eau.

Rendement : 95 %.

Point de fusion : 233 –235°C.

R_f : 0,62 dans l'AcOET/éther (50/50) sur gel de silice.

Microanalyse élémentaire:

$C_{20}H_{16}N_4SO_6$, M = 440,3	C (%)	H (%)	N (%)	S (%)
Calculé	54,54	3,66	12,72	7,28
Trouvé	54,52	3,64	12,69	7,25

IR (KBr 2 %, ν cm^{-1}) : ν (NH) = 3350, 3280 ; ν (CO) = 1650 ; ν (**CO**urée) = 1700 ; ν (SO_2) = 1160, 1200, 1350 ; ν (CH_{arom}) = 3060, 3100 ; ν (NO_2) = 1540.

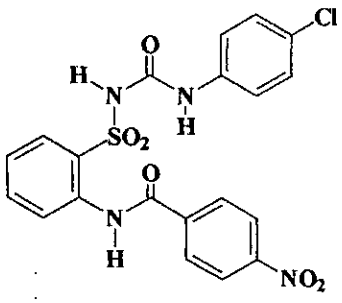
RMN^{1}H (500 MHz, DMSO-d$_6$, δ ppm) : 7,00 (1d, 1H, C<u>H</u>$_{arom}$) ; 7,30 (1dd, 4H, C<u>H</u> $_{arom}$) ; 7,45 (1t, 1H, C<u>H</u>$_{arom}$) ; 7,75 (1t, 1H, C<u>H</u> $_{arom}$) ; 8,05 (1d, 1H, C<u>H</u>$_{arom}$) ; 8,20 (1d, 3H, C<u>H</u>$_{arom}$) ; 8,30 (1s, 1H, N<u>H</u>) ; 8,40 (1s, 2H, C<u>H</u>$_{arom}$) ; 9,05 (1s, 1H, N<u>H</u>) ; 10,75 (1s, 1H, N<u>H</u>).

- **2-*p*-nitrophénylamido-N-(*p*-chlorophénylaminocarbonyl) -benzénesulfonamide <u>A4</u> :**

Pour le mode opératoire voir le composé **<u>A1</u>**.

Réactifs : 0,5 g de **<u>a2</u>**, 0,2 ml d'isocyanate de *p*-chlorophényle et 0,1g de NaH.

Solvant : DMF



<u>A4</u>

Recristallisation : Ethanol/eau.

Rendement : 90 %.

Point de fusion : 240°C.

R_f : 0,52 dans l'AcOET/éther (40/60) sur gel de silice.

Microanalyse élémentaire :

$C_{20}H_{15}ClN_4SO_6$, M = 474,88	C (%)	H (%)	N (%)	S (%)
Calculé	50,59	3,18	11,80	6,75
Trouvé	50,56	3,15	11,77	6,79

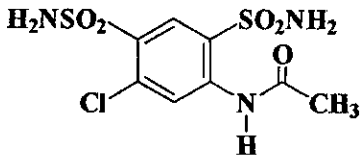
IR (KBr 2 %, ν cm^{-1}) : ν (NH) = 3220,3280, 3340 ; ν (CO) = 1650 ; ν (**CO**urée) = 1700 ; ν (SO_2) = 1160, 1250, 1350 ; ν (CH_{arom}) = 3100 ; ν (NO_2) = 1540.

RMN^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6, δ ppm) : 7,35 (1dd, 4H, C<u>H</u>$_{arom}$) ; 7,45 (1t, 1H, C<u>H</u>$_{arom}$) ; 7,75 (1t, 1H, C<u>H</u>$_{arom}$) ; 8,05 (1d, 1H, C<u>H</u>$_{arom}$) ; 8,20 (1d, 3H, C<u>H</u>$_{arom}$) ; 8,30 (1s, 1H, N<u>H</u>) ; 8,45 (1s, 2H, C<u>H</u>$_{arom}$) ; 9,20 (1s, 1H, N<u>H</u>) ; 10,75 (1s, 1H, N<u>H</u>).

I.3.3. Modes opératoires relatifs aux composés de type B

- **4-acétamido-6-chloro-1,3-benzénedisulfonamide <u>b1</u>**

1g (5,80 mmol) de 4-amino-6-chloro1,3-benzéndisulfonamide et 1,2 ml (5.80 mmol) de chlorure d'acétyl sont chauffés à reflux dans 30 ml de THF ou de dioxane pendant 4 heurs. Après refroidissement, le solvant est éliminé sous vide au rotavapor. Le résidu blanc est lavé à l'eau jusqu'à ce que le filtrat présente un pH neutre, puis séché.



<u>b1</u>

Recristallisation :

Rendement :

Point de fusion : 264° C

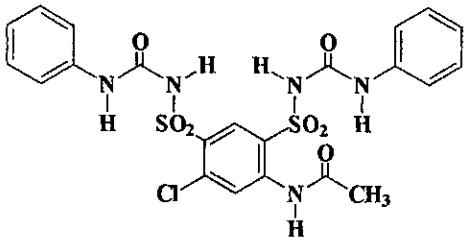
IR (KBr 2 %, ν cm^{-1}) : ν (NH) = 3220, 3260, 3330, 3420 ; ν (CO) = 1700 ; (SO_2) = 1160, 1240, 1290, 1320, 1340 ; ν (CH_{arom}) = 3060, 3090.

- **4-acétamido-6-chloro-N,N'-di (phénylaminocarbonyl1)-1,3-benzène-disulfonamide : <u>B1</u>**

Pour le mode opératoire voir le composé **<u>A1</u>**.

Réactifs : 0,5 g de **<u>b1</u>**, 0,2 ml d'isocyanate de phényl et 0,1 g de NaH.

Solvant : DMF



B1

Recristallisation : Ethanol/eau.

Rendement : 95 %

Point de fusion : 246 –250° C.

R_f : 0,33 dans l'AcOET/éther (50/50) sur silice.

Microanalyse élémentaire :

$C_{22}H_{20}ClN_5S_2O_7$, M = 566,01	C (%)	H (%)	N (%)	S (%)
Calculé	46,69	3,56	12,37	11,33
Trouvé	46,71	3,58	12,40	11,35

IR (KBr 2 %, ν cm^{-1}) : ν (NH) = 3230, 3260, 3380 ; ν (CO) = 1680, 1720 ; ν (SO_2) = 1160, 1175, 1250, 1320, 1365 ; ν (CH_{arom}) = 3060, 3110.

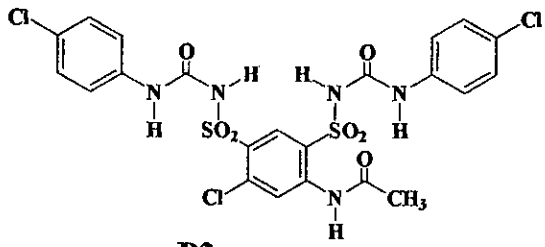
RMN^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6, δ ppm) : 7,00 (1s, 2H, C<u>H</u>$_{arom}$) ; 7,25 (1m, 4H, C<u>H</u> $_{arom}$) ; 7,30 (1d, 2H, C<u>H</u>$_{arom}$) ; 7,40 (1d, 2H, C<u>H</u>$_{arom}$) ; 2,25 (1s, 3H, C<u>H</u>$_3$) ; 8,60 (1s, 1H, N<u>H</u>) ; 8,65 (1s, 1H, N<u>H</u>) ; 8,75 (1s, 1H, N<u>H</u>) ; 9,20 (1s, 1H, N<u>H</u>) ; 10,25 (1s, 1H, N<u>H</u>).

- **4-acétamido-6-chloro-N,N'-di (*p*-chlorophénylaminocarbonyl)-1,3-benzène-disulfonamide <u>B2</u> :**

Pour le mode opératoire voir le composé **<u>A1</u>**.

Réactifs : 0,5 g de <u>b1</u>, 0,2 ml d'isocyanate de *p*-chlorophényl et 0,1 g de NaH.

Solvant : DMF



B2

Recristallisation : Ethanol/eau.

Rendement : 95 %.

Point de fusion : 259 –260°C.

R_f : 0,35 dans l'AcOET/éther (50/50) sur gel de silice.

Microanalyse élémentaire :

$C_{22}H_{18}Cl_3N_5S_2O_7$, M = 634,90	C (%)	H (%)	N (%)	S (%)
Calculé	41,62	2,86	11,03	10,10
Trouvé	41,60	2,83	11,00	10,08

IR (KBr 2 %, ν cm^{-1}) : ν (NH) = 3220, 3280, 3380 ; ν (CO) = 1680,1720 ; ν (SO_2) = 1160, 1240, 1290, 1370 ; ν (CH_{arom}) = 3040, 3115.

RMN^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6, δ ppm) : 7,30 (1m, 8H, C<u>H</u> $_{arom}$) ; 7,40 (1d, 2H, C<u>H</u> $_{arom}$) ; 2,20 (1s, 3H, C<u>H</u>$_3$) ; 8,60 (1s, 1H, N<u>H</u>) ; 8,65 (1s, 1H, N<u>H</u>) ; 8,90 (1s, 1H, N<u>H</u>) 9,30 (1s, 1H, N<u>H</u>) ; 10,20 (1s, 1H, N<u>H</u>).

Etude pharmacologique

II. Etude pharmacologique

II.1. Matériel et méthodes

II.1.1. Les animaux

Notre étude a été réalisée sur des rats Wistar Albinos femelles pesant environ 250 g. Les animaux sont répartis en plusieurs groupes de 3 rats chacun, dans des cages en plastique ou en métal. Ils ont libre accès à l'eau et à la nourriture. La température de l'animalerie est maintenue à 22° C.

II.1.2. Préparation des solutions administrées

II.1.2.1. Préparation des solutions des composés synthétisés

Les solutions administrées sont généralement préparées avec de l'eau distillée. Pour solubiliser les sulfonylurées qui sont des composés insolubles dans l'eau, nous avons utilisé un autre solvant. D'après la littérature, les sulfonylurées sont bien solubles dans le DMSO et les solvants organiques halogénés comme le chloroforme et le dichlorométhane [37].

Nous avons utilisé 4 ml de solution pour chaque composé à 12,5 mg/ml pour avoir une dose de 50 mg/kg. Une telle solution est préparée en solubilisant 50 mg du composé à tester dans un minimum du DMSO (2% du volume préparé). Après solubilisation on complète le volume à 4 ml avec de l'eau distillée en ajoutant 2-3 gouttes d'une solution saturée de bicarbonate de sodium pour éviter la précipitation.

II.1.2.2. Préparation des solutions des médicaments

Nous avons utilisé trois médicaments comme référence pour comparer les résultats des composés à tester, à savoir le tolbutamide et le glibenclamide purs en tant qu'hypoglycémiants et l'hydrochlorothiazide pur en tant que diurétique. Les solutions de ces trois médicaments sont préparées selon la même méthode décrite ci-dessus.

II.1.3. Traitement des animaux

II.1.3.1. Evaluation de l'effet des composés sur la glycémie

Les animaux sont divisés en 4 groupes chacun contenant 3 rats. Ils ont libre accès à l'eau et la nourriture juste avant le test. Nous avons utilisé deux voies d'administration, la voie orale (gavage) et intrapéritonéale.

a- Administration par voie orale

Les composés sont administrés par gavage à l'aide d'une sonde métallique par prise de 1 ml pour chaque animal. Les animaux sont classés en 4 groupes comme suit :

- Groupe 1 (3 rats) : animaux témoins recevant 1ml d'eau distillée.
- Groupe 2 (3 rats) : animaux traités avec une solution de tolbutamide à une dose de 50 mg/kg.
- Groupe 3 (3 rats) : animaux traités par une solution de glibenclamide à une dose de 0,25 mg/kg.
- Groupe 4 (3 rats) : animaux recevant une solution du composé à tester à une dose de 50 mg/kg.

b- Administration par voie intrapéritonéale

Le protocole et similaire à celui du premier test (voie orale). 1 ml de solution de chaque composé à tester est injectée aux même doses décrites ci-dessus.

Le prélèvement du sang est effectué juste avant le traitement et après 1, 2 et 3 heures au niveau du sinus caverneux à l'aide d'un tube capillaire enfoncé dans l'angle antérieur de l'œil, le sang monté dans le capillaire est récupéré dans des tubes à hémolyse.
Les échantillons de sang ainsi prélevés subissent une centrifugation de 3000 tours/minute pendant 10 minutes, le sérum et récupéré dans des épendorfs pour le dosage.

II.1.3.2. Evaluation de l'effet diurétique

Ce test consiste à mesurer le volume de l'urine chez le rat mis en surcharge hydrique puis traité par le composé à tester.
Les animaux sont mis en diète totale 18 heures avant le test, ils sont répartis en 4 groupes dans des cages à métabolisme au nombre de trois rats par cage.

a- Administration par voie orale

Les composés sont administrés en solution par gavage à un volume de 1 ml pour chaque animal.

- Groupe 1 (témoin 1) : animaux témoins ne recevant aucun produit.
- Groupe 2 (témoin 2) : animaux recevant 40 ml/kg d'une solution de NaCl 0.9 % par voie orale.

- Groupe 3 (traité par l'hydrochlorothiazide) : animaux recevant 40 ml/kg de solution de NaCl 0.9 % suivie immédiatement de l'hydrochlorothiazide à une dose de 50 mg/kg.
- Groupe 4 (traité par le produit à tester) : animaux recevant 40 ml/kg de solution de NaCl 0.9% suivie immédiatement du produit à tester à une dose de 50 mg/kg.

La lecture des volumes des urines des 4 groupes s'effectue chaque heure pendant 4 heures [92].

b- Administration par voie intrapéritonéale

Les animaux sont répartis en 4 groupes tels que :

- Groupe 1 (témoin 1) : animaux témoins ne recevant aucun produit.
- Groupe 2 (témoin 2) : animaux recevant 40 ml/kg d'une solution de NaCl 0.9% par voie orale.
- Groupe 3 : chaque animal reçoit 40 ml/kg de NaCl 0.9 % per os et 1 ml de solution de l'hydrochlorothiazide est injecté par voie intrapéritonéale à une dose de 50 mg/kg.
- Groupe 4 : chaque animal reçoit 40 ml/kg de NaCl 0.9 % per os et 1ml de solution du composé à tester avec la même dose (50 mg/kg) par voie intrapéritonéale.

Les urines des 3 rats de chaque cage sont collectées et mesurées chaque heure pendant 4 heures [92].

II.1.3.3. Etude de l'effet des composés sur les taux sériques et urinaires du sodium du potassium et de l'acide urique.

Les composés sont administrés en solution par gavage à un volume de 1 ml pour chaque animal.

- Groupe 1 (témoin 1) : animaux témoins ne recevant aucun produit.
- Groupe 2 (témoin 2) : les animaux recevant 40 ml/kg d'une solution de NaCl 0.9 % par voie orale.
- Groupe 3 : animaux recevant 40 ml/g de solution de NaCl 0.9 % suivie immédiatement de l'hydrochlorothiazide à une dose de 50 mg/kg par voie orale.
- Groupe 4 : animaux recevant 40 ml/g de solution de NaCl 0.9 % puis le produit à tester avec la même dose 50 mg/kg que le médicament diurétique par voie orale.

Le prélèvement du sang s'effectue 4 heures après administration avec la méthode que nous avons déjà décrit. Le sang est centrifugé immédiatement après le prélèvement, le sérum récupéré est conservé pour le dosage. Les urines récoltées pendant 4 heures sont également conservées pour le dosage.

II.1.4. Les dosages

II.1.4.1. Dosage de la glycémie

La glycémie est dosée par une méthode enzymatique colorimétrique à la glucose oxydase. Le sérum doit être séparé le plus rapidement possible des cellules sanguines afin d'éviter la glycolyse.

- ***principe du dosage***

En présence de glucose oxydase, le glucose est oxydé en acide gluconique. L'eau oxygénée, libérée au cours de la réaction, réagit sous l'action de la peroxydase, avec le phénol et l'amino-4-phénazone, pour former un complexe rose. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en glucose (schéma 21).

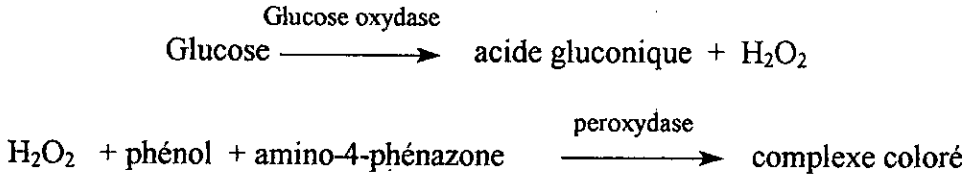


Schéma 21

- ***Mode opératoire***

Dans des tubes à essai on mesure les volumes suivants :

	Dosage	Etalon	Blanc
Sérum	10 µl	-	-
Etalon	-	10 µl	-
Réactif	1 ml	1 ml	1 ml

Les mélanges sont laissés reposer 15 mn à 37°C. La lecture des absorbances se fait par référence au blanc réactif à 505 nm avec un spectrophotomètre UV SHIMADZU 1240. Les valeurs de la glycémie sont exprimées en g/l.

II.I.4.2. Dosage du sodium et du potassium

Le sodium et le potassium sont dosés par photométrie de flamme. Pour le dosage de la kaliémie et de la natrémie, le sang est centrifugé immédiatement après le prélèvement pour empêcher la diffusion du sodium et du potassium globulaire qui peut se produire dès que le sang est retiré de l'organisme.

Le dosage de la kaliéurie et la natréurie s'effectue sur des urines diluées 1/10 dans de l'eau distillée. Les valeurs sont exprimées en mmol/l.

- ***Principe de la méthode***

La spectrophotométrie de flamme repose sur la mesure de la radiation émise par l'élément à doser, lorsqu'on vaporise l'échantillon préalablement dissous par une flamme. Cette dernière prend une coloration caractéristique qui dépend de la nature des atomes qui la traversent et d'une intensité proportionnelle à leur concentration.

II.1.4.3. Dosage de l'acide urique

L'acide urique est dosé par une méthode colorimétrique. Le dosage dans le sérum se fait directement alors que dans l'urine après une dilution de 1/10 dans l'eau distillée.

- ***Principe du dosage***

En présence d'uricase, l'acide urique est oxydé en allantoine et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier, sous l'action de la peroxydase, oxyde un chromogène (3,5-dichloro-2-hydroxbenzène sulfonate et amino-antipyrine) pour former un complexe coloré (schéma 22).

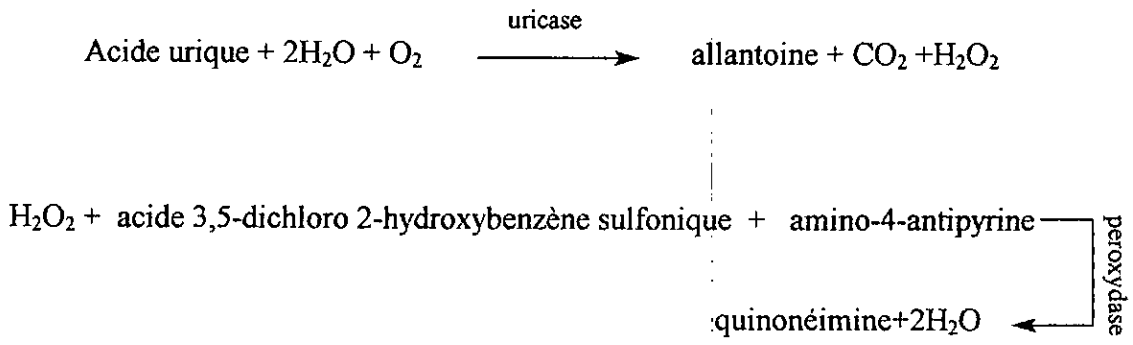


Schéma 22

➢ ***Mode opératoire***

Dans des tubes à essai on mesure les volumes suivants :

	Dosage	Etalon	Blanc
Echantillon	25 µl	-	-
Etalon	-	25 µl	-
Réactif	1 ml	1 ml	1 ml

La lecture des densités optiques se fait après incubation de 5 mn à 37° C avec le spectrophotomètre UV à une longueur d'onde de 510 nm. Les concentrations sont exprimées en mg/l.

Résultats et discussion

III. Résultats et discussion

III.1. variations de la glycémie en fonction du temps

Les résultats des dosages de la glycémie des animaux recevant les différents composés à une dose de 50 mg/kg, le tolbutamide à 50 mg/kg et le glibenclamide à 0,25 mg/kg par voie orale sont rapportés dans le tableau 5.

D'après les résultats, le tolbutamide à 50 mg/kg et le glibenclamide à 0,25 mg/kg provoquent une hypoglycémie très significative dès la 1ère heure et qui persiste jusqu'à 3 heures et atteint une valeur de 0,42 ± 0,02 g/l pour le tolbutamide et 0,45 ± 0,07 g/l pour le glibenclamide contre 1,06 g/l chez le témoin.

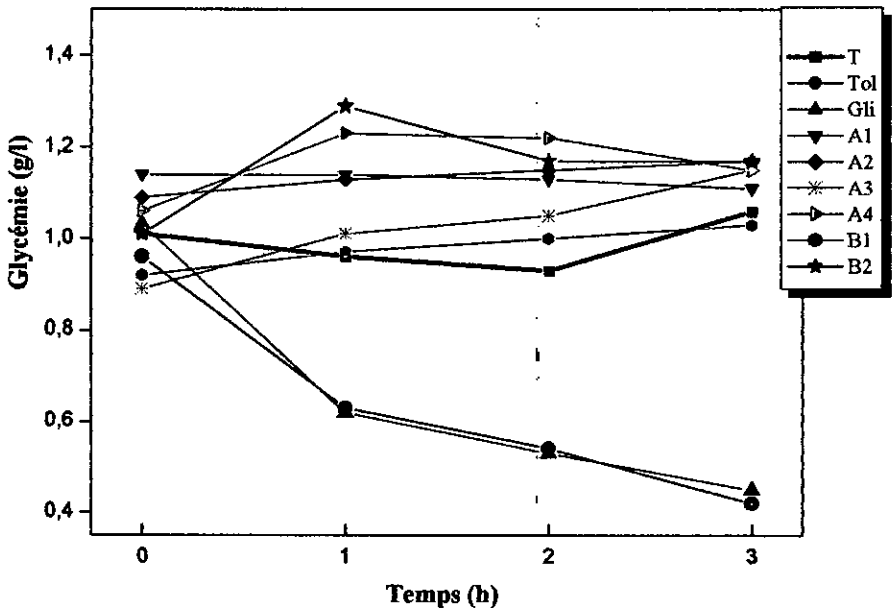
Par contre, la glycémie demeure quasiment constante lors du traitement par les six composés synthétisés pendant 3 heures après administration, sauf avec les composés A4 et B2 où on remarque une augmentation significative de la glycémie à 1h puis elle diminue de nouveau.

Tableau 5: Variations de la glycémie (g/l) en fonction du temps après un traitement avec les différents composés par voie orale.

	Glycémie avant administration (g/l)	Glycémie après administration (g/l)		
		1h	**2h**	**3h**
Témoin	1.01 ± 0.04	0.96 ± 0.05	0.93 ± 0.09	1.06 ± 0.09
Tolbutamide	0.96 ± 0.13 ^{ns}	0.63 ± 0.07 **	0.54 ± 0.10 **	0.42 ± 0.02 ***
Glibenclamide	1.03 ± 0.12 ^{ns}	0.62 ± 0.09 **	0.53 ± 0.03 **	0.45 ± 0.07 ***
A1	1.14 ± 0.07 ^{ns}	1.14 ± 0.03 **	1.13 ± 0.02 *	1.11 ± 0.04 ^{ns}
A2	1.09 ± 0.06 ^{ns}	1.13 ± 0.01 **	1.15 ± 0.02 *	1.17 ± 0.04 ^{ns}
A3	0.89 ± 0.06 ^{ns}	1.01 ± 0.07 ^{ns}	1.05 ± 0.06 ^{ns}	1.15 ± 0.13 ^{ns}
A4	1.06 ± 0.01 ^{ns}	1.23 ± 0.07 **	1.22 ± 0.09 *	1.15 ± 0.02 ^{ns}
B1	0.92 ± 0.04 ^{ns}	0.97 ± 0.05 ^{ns}	1.00 ± 0.05 ^{ns}	1.03 ± 0.11 ^{ns}
B2	1.01 ± 0.06 ^{ns}	1.29 ± 0.14 ***	1.17 ± 0.07 ^{ns}	1.17 ± 0.05 ^{ns}

Chaque valeur correspond à la moyenne ± écart type.
ns $p > 0,05$; * $p > 0,01$; ** $p > 0,001$; *** $p \leq 0,001$.

Les variations de glycémie pendant les 3 heures de traitement sont illustrées par la figure19. La glycémie à 0 h correspond à la glycémie avant administration.



T : témoin, Tol : tolbutamide, Gli : glibenclamide.

Fig. 19 : Variations de la glycémie en fonction du temps après un traitement avec les différents composés par voie orale.

Le tableau 6 regroupe les valeurs de la glycémie des animaux recevant les différents composés à une dose de 50 mg/kg, le tolbutamide à 50 mg/kg et le glibenclamide à 0.25 mg/kg par voie intrapéritonéale.

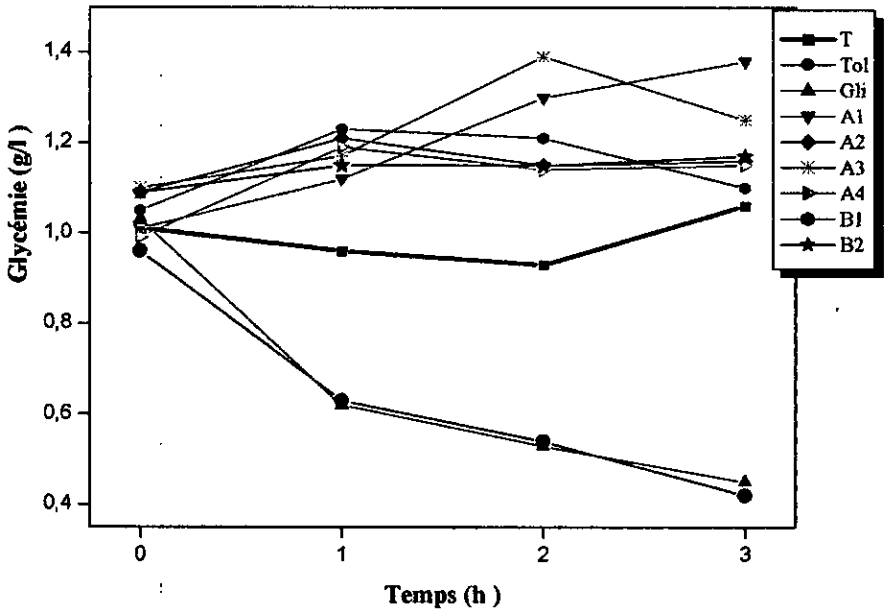
D'après le tableau 6 et la figure 20, nous constatons que les six composés synthétiques administrés par voie intrapéritonéale entraînent des perturbations sur la glycémie. Ces perturbations sont traduites par une augmentation de glycémie entre la 1ère et la 2ème heure, par exemple à 2 heure, la glycémie atteint une valeur de 1,38 ± 0,11 g/l chez le groupe recevant le composé A3 contre 0,93 ± 0,09 g/l chez le témoin.

A 3 heure après administration, on remarque une légère diminution de glycémie avec la majorité des composés sauf le composé A1 où la glycémie continue à augmenter pour atteindre une valeur de 1,38 ± 0,13 g/l.

Tableau 6 : Variations de la glycémie (g/l) en fonction du temps après un traitement avec les différents composés par voie intrapéritonéale.

	Glycémie avant administration (g/l)	Glycémie après administration (g/l)		
		1h	**2h**	**3h**
Témoin	1.01 ± 0.04	0.96 ± 0.05	0.93 ± 0.09	1.06 ± 0.09
Tolbutamide	0.96 ± 0.13 ^{ns}	0.63 ± 0.07 **	0.54 ± 0.10 **	0.42 ± 0.02 ***
Glibenclamide	1.03 ± 0.12 ^{ns}	0.62 ± 0.09 **	0.53 ± 0.03 **	0.45 ± 0.07 ***
A1	1.10 ± 0.11 ^{ns}	1.12 ± 0.02 **	1.30 ± 0.20 *	1.38 ± 0.13 *
A2	1.09 ± 0.07 ^{ns}	1.21 ± 0.05 **	1.15 ± 0.07 *	1.16 ± 0.04 ^{ns}
A3	1.10 ± 0.05 ^{ns}	1.17 ± 0.05 **	1.39 ± 0.11 **	1.25 ± 0.09 ^{ns}
A4	0.99 ± 0.09 ^{ns}	1.19 ± 0.01 **	1.14 ± 0.02 *	1.15 ± 0.02 ^{ns}
B1	1.05 ± 0.09 ^{ns}	1.23 ± 0.02 ***	1.21 ± 0.03 **	1.10 ± 0.01 ^{ns}
B2	1.09 ± 0.12 ^{ns}	1.15 ± 0.07 *	1.15 ± 0.10 *	1.17 ± 0.11 ^{ns}

Chaque valeur correspond à la moyenne ± écart type.
ns $p > 0,05$; * $p > 0,01$; ** $p > 0,001$; *** $p \leq 0,001$.



T : témoin, Tol : tolbutamide, Gli : glibenclamide.

Fig .20 : Variations de la glycémie en fonction du temps après un traitement avec les différents composés par voie intrapéritonéale.

III.2. Variations de la diurèse en fonction du temps

Les résultats de variations de la diurèse sont montrés dans les tableau 7 et 8. Les valeurs représentent les volumes d'urine, exprimées en ml kg^{-1}, collectées 1, 2, 3 et 4h après administration d'une dose de 50 mg/kg des différents composés.

Le traitement par voie orale avec l'hydrochlorothiazide (HCTZ) à une dose de 50 mg/kg montre une augmentation de la diurèse marquée dès la 1ère heure par rapport aux groupes témoins. Cette variation s'accentue jusqu'à 4 heures où on constate un volume d'urine total égale à 28,40 ml/kg contre 11,06 ml/kg chez le témoin 2 recevant 40 ml/kg de NaCl 0,9 %.

A la dose de 50 mg/kg administrée par voie orale, nos composés synthétiques entraînent une légère élévation de diurèse à la 1ère heure, cette élévation paraît claire 4 heures après administration où on remarque des diurèses considérables par apport aux témoins. Entre les six composés, le composé A1 semble le plus actif, la diurèse chez le groupe d'animaux recevant ce dernier atteint une valeur de 18 ml/kg contre 11,06 ml/kg chez le témoin 2 (tableau 7, figure 21). Néanmoins, le composé le plus actif A1 reste relativement moins actif que l'hydrochlorothiazide.

Tableau 7 : Variations de la diurèse (ml kg^{-1}) en fonction du temps après un traitement avec les différents composés par voie orale.

	1h	2h	3h	4h
Témoin 1	0.77	2.48	4.66	7.10
Témoin 2	1.68	5.15	8. 90	11.06
Hydrochlorothiazide	6.24	14.75	22.77	28.40
A1	2.53	9.66	14.33	18.00
A2	2.46	4.33	10.53	14.66
A3	1.33	4.00	8.60	13.33
A4	0.93	6.33	9.33	12.33
B1	2.33	5.80	11.33	14.33
B2	2.46	4.66	9.00	15.33

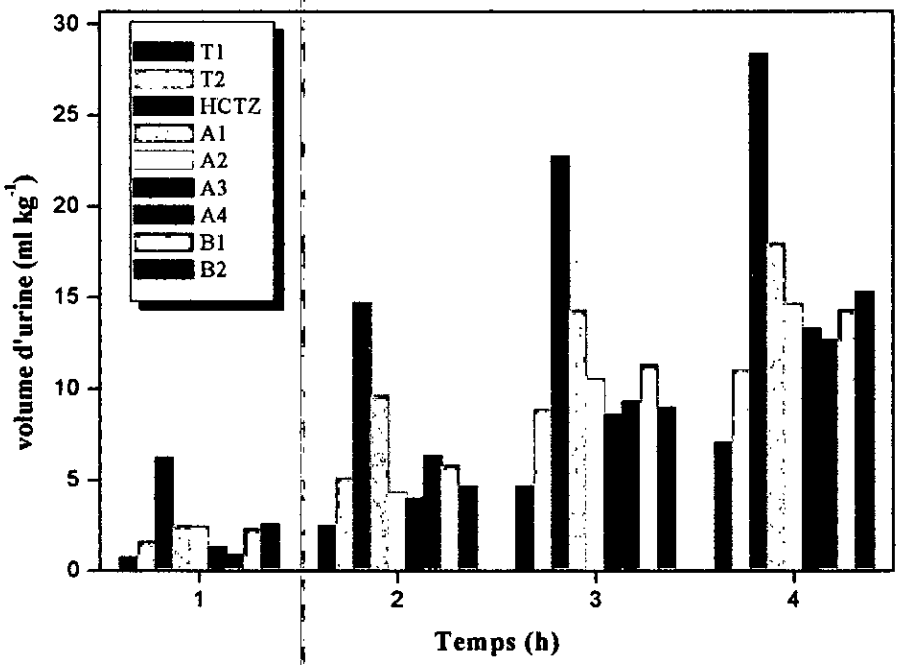


Fig. 21 : Variations de la diurèse en fonction du temps après un traitement avec les différents composés par voie orale

D'après les résultats rapportés dans le tableau 8 et la figure 22, l'hydrochlorothiazide (HCTZ) injecté par voie intrapéritonéale à la dose de 50 mg/kg montre un effet diurétique similaire à celui observé par voie orale. Ceci confirme que le médicament est actif par les deux voies. Par contre les six composés synthétiques injectés par voie intrapéritonéale ne présentent aucun effet diurétique. Les valeurs de diurèse après 4 heures sont très faibles par rapport à celles enregistrées au cours du traitement par voie orale.

Tableau 8 : Variations de la diurèse (ml kg^{-1}) en fonction du temps après un traitement avec les différents composés par voie intrapéritonéale.

	1h	2h	3h	4h
Témoin 1	0.77	2.48	4.66	7.10
Témoin 2	1.68	5.15	8. 90	11.06
Hydrochlorothiazide	3.80	5.15	22.00	26.66
A1	1.33	2.93	4.13	6.00
A2	1.33	5.06	5.33	8.00
A3	0.53	0.66	1.33	5.60
A4	0.66	1.60	5.06	8.00
B1	0.80	2.40	4.66	9.06
B2	0.80	2.66	4.26	10.40

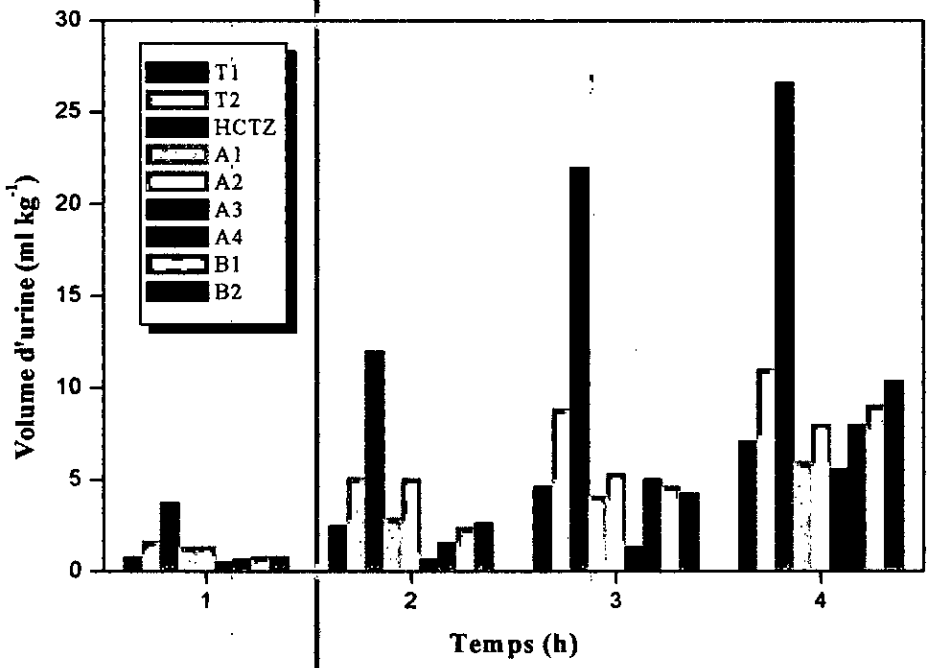


Fig. 22 : Variations de la diurèse en fonction du temps après un traitement avec les différents composés par voie intrapéritonéale.

III.3. Effet des composés sur les taux du sodium et du potassium sériques

Le tableau 9 rassemble les résultats des dosages sériques du sodium et du potassium enregistrés 4 h après administration d'une dose de 50 mg/kg des différents composés par voie orale.

Tableau 9 : variations des taux du sodium et du potassium sériques sous l'effet des différents composés.

	Na^+(mmol/l)	K^+(mmol/l)
Témoin 1	146.4 ± 3.41	6.59 ± 0.08
Témoin2	149.1 ± 1.20	7.20 ± 0.40
Hydrochlorthiazide	145.0 ± 1.03 *	6.22 ± 0.36 *
A1	146.1 ± 0.97 *	6.72 ± 0.76 ns
A2	146.9 ± 1.74 ns	6.49 ± 0.11 *
A3	146.4 ± 2.02 ns	6.44 ± 0.02 *
A4	144.1 ± 0.38 **	6.00 ± 0.14 **
B1	147.5 ± 0.98 ns	6.19 ± 0.29 *
B2	144.5 ± 1.06 **	5.98 ± 0.33 *

Chaque valeur correspond à la moyenne ± écart type
ns $p > 0,05$; * $p > 0,01$; ** $p > 0,001$. Les significations de différence des résultats sont calculées par rapport au témoin 2.

Les figures 23 et 24 montrent respectivement les variations de la natrémie et la kaliémie sous l'effet des différents composés

D'après la figure 21, nous constatons que l'administration de 40 ml/kg de NaCl 0,9 % chez le témoin 2 entraîne une légère augmentation de sodium sérique par rapport au témoin 1 qui n'a reçu aucun produit.

Le traitement d'animaux recevant le même volume de NaCl 0,9 % par le médicament salidiurétique HCTZ provoque une diminution importante de natrémie. Cette hyponatrémie est également constatée avec les composés synthétiques et d'une façon significative avec les deux composés A4 et B2. Les taux de sodium enregistrés avec ces deux derniers sont respectivement 144,1 ± 0,38 $mmol.l^{-1}$ et 144,5 ± 1,06 $mmol.l^{-1}$ contre 149,1 ± 1,20 $mmol.l^{-1}$ chez le témoin 2.

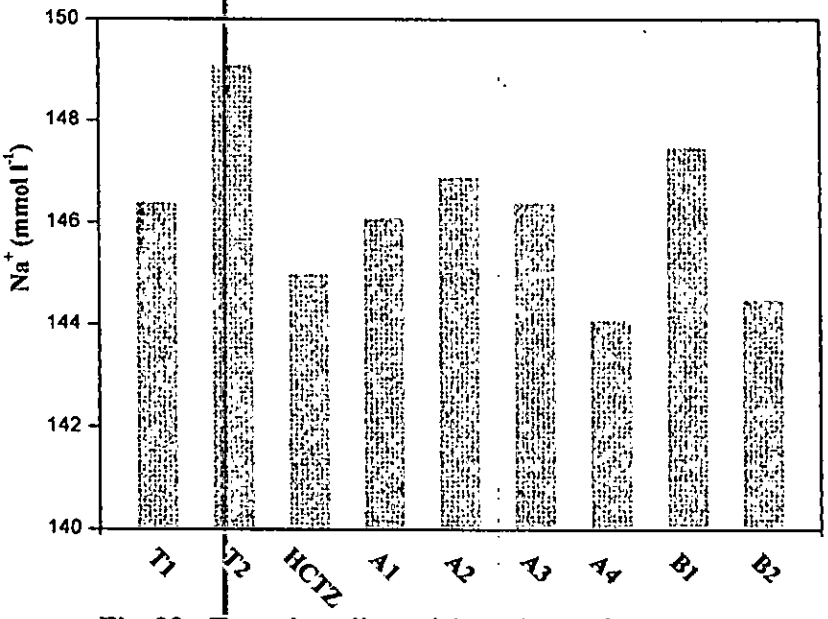


Fig. 23 : Taux de sodium sérique 4h après traitement

La figure 24 montre que L'HCTZ qui est un diurétique hypokaliémiant incite une diminution significative de kaliémie par rapport au témoin 2 recevant du NaCl 0.9 %. Cette diminution est également constatée chez les groupes d'animaux recevant les six composés synthétiques avec des degrés variables. Nous remarquons que l'effet hypokaliémiant du composé B1 est comparable à celui de l'hydrochlorothiazide alors que les composés A4 et B2 donnent un effet plus marqué que celui de ce dernier.

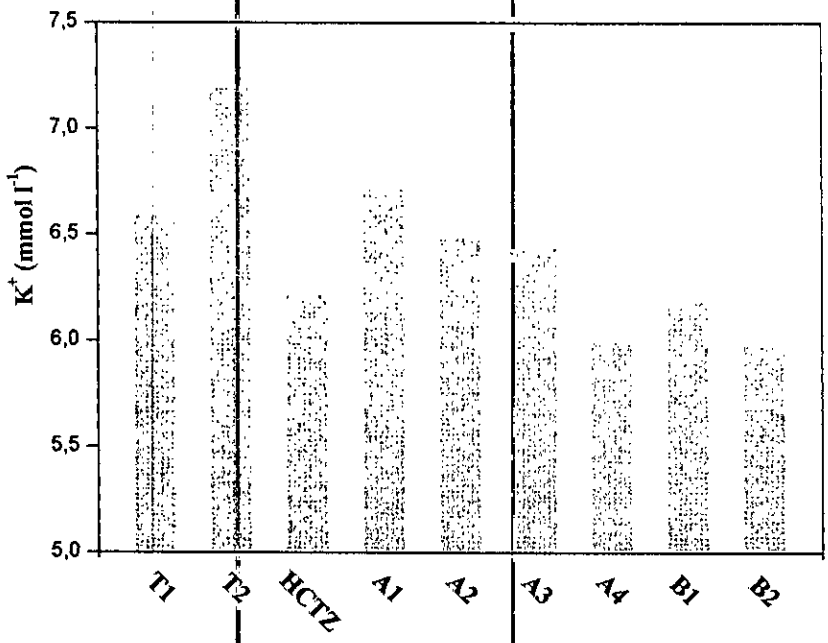


Fig. 24 : Taux de potassium sérique 4h après traitement

III.4. Effet des composés sur les taux de l'acide urique plasmatique

Les résultats des dosages de l'acide urique dans le sang enregistrés 4 h après administration d'une dose de 50 mg/g de différents composés sont représentés dans le tableau 9 et illustrés par la figure 25.

Tableau 10 : Variations des taux de l'acide urique plasmatique sous l'effet des différents composés.

	Témoin 1	Témoin 2	HCTZ	A1	A2	A3	A4	B1	B2
Acide urique (mg/l)	17.00 ± 4.32	18.66 ± 2.06	17.66 ± 4.72 ns	18.33 ± 2.36 ns	25.33 ± 3.25 *	17.78 ± 0.73 ns	14.34 ± 1.49 *	14.93 ± 3.35 ns	16.75 ± 2.58 ns

La figure 25 montre une augmentation importante d'acide urique seulement dans le groupe d'animaux recevant le composé A2. Cependant, une diminution significative d'uricémie a été constatée chez le groupe recevant le composé A4 dont le taux d'acide urique marqué est de 14,34 ± 1,49 mg/l contre 18,66 ± 2,06 mg/l chez le témoin 2. Dans les groupes d'animaux recevant l'hydrochlorothiazide et les autres composés, les concentrations d'acide urique plasmatique demeurent pratiquement équivalents à ceux des groupes témoins.

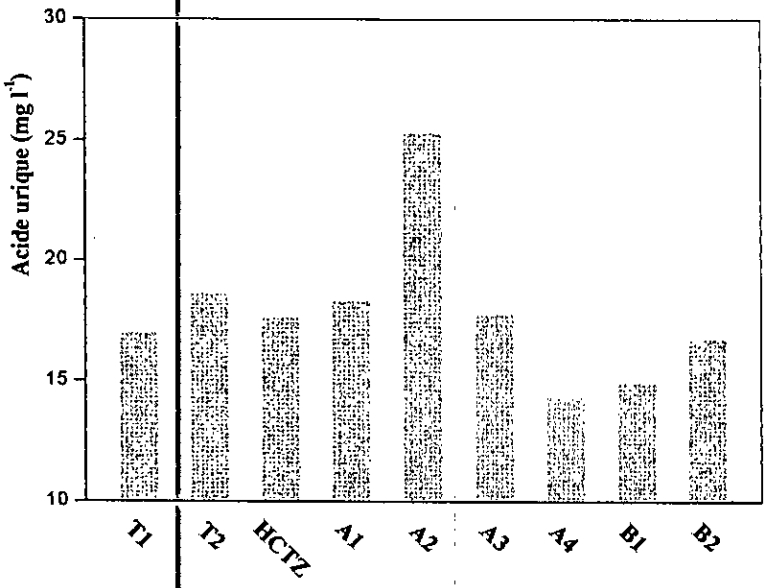


Fig. 25 : Taux d'acide urique plasmatique 4h après traitement

III.5. Effet des composés synthétisés sur l'excrétion du sodium et du potassium

Les résultats des dosages du sodium et du potassium dans les urines récoltées pendant 4 heures après administration d'une dose de 50 mg/kg des différents composés par voie orale sont représentés dans le tableau 11.

Tableau 11 : Variation des taux du sodium et du potassium urinaire sous l'effet des différents composés.

	Na^+(mmol/l)	K^+(mmol/l)
Témoin 1	89.5	62.4
Témoin2	120.8	67.2
Hydrochlorthiazide	155.3	102.2
A1	131.4	66.1
A2	109.9	73.3
A3	99.5	76.3
A4	145.2	60.6
B1	126.4	84.7
B2	134.8	115.4

La figure 26 montrent l'effet des composés synthétisés sur l'excrétion urinaire du sodium et du potassium.

D'après la figure, l'effet salidiurétique de l'hydrochlorothiazide chez le groupe d'animaux traité par ce dernier est très claire, où on constate des taux de sodium et de potassium élevés par rapport aux groupes témoins.

Les groupes d'animaux recevant les différents composés à une dose de 50 mg/kg montrent également une augmentation des taux du sodium urinaire avec des degrés variables. Le composé A4 donne un effet natriurétique comparable à celui constaté avec l'HCTZ, cet effet est aussi observé avec les composés A1, B1, B2 d'une façon significative par rapport au témoin 2. Chez les même groupes d'animaux, nous observons que l'excrétion du potassium augmentent mais d'une façon non significative sauf chez le groupe recevant le composé B2 où l'augmentation est hautement significative (115.4 $mmol.l^{-1}$ contre 67.2 $mmol.l^{-1}$ chez le témoin 2). Le taux urinaire de potassium enregistré avec ce composé est plus marqué que celui avec l'HCTZ.

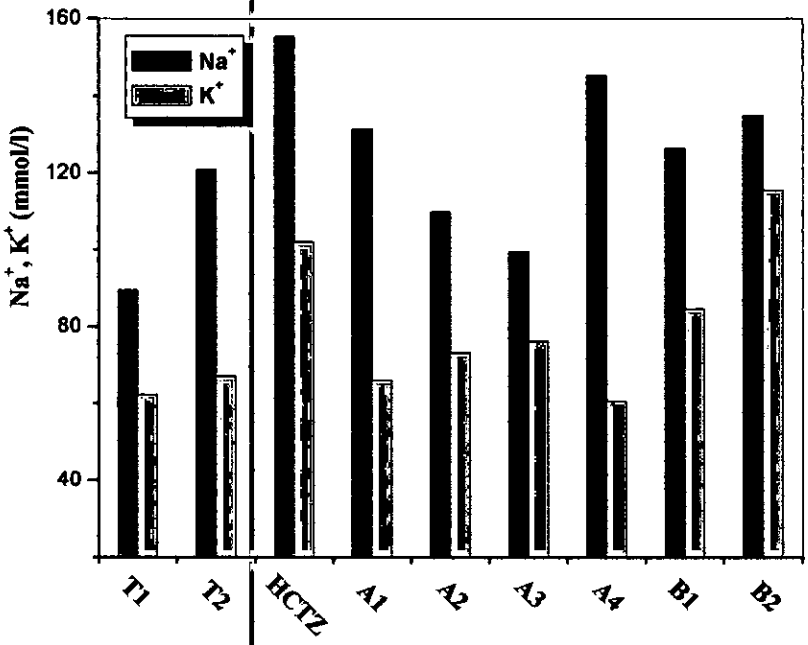


Fig. 26 : Variations des Taux du sodium et du potassium urinaire sous l'effet des composés.

III.6. Effet des composés synthétisés sur l'excrétion urinaire d'acide urique

Les résultats des dosages de l'acide urique dans les urines récoltées 4 heures après administration d'une dose de 50 mg/kg des différents composés par voie orale sont représentés dans le tableau 12 et la figure 27.

Tableau 12 : Variation des taux de l'acide urique urinaire sous l'effet des différents composés.

	Témoin 1	Témoin 2	HCTZ	A1	A2	A3	A4	B1	B2
Acide urique (mg/l)	60.7	67.7	58.8	44.7	57.6	64.0	57.6	67.4	81.7

D'après les résultats, nous constatons que l'hydrochlorothiazide (HCTZ), à la dose de 50 mg/kg, réduit l'excrétion d'acide urique, cette réduction est également observée avec les composé A2 et A4 d'une façon comparable à l'HCTZ et s'accentue avec le composé A1 dont le taux d'acide urique enregistré atteint une valeur de 44.7 $mmol.l^{-1}$ contre 67.7 $mmol.l^{-1}$ chez le témoin 2.

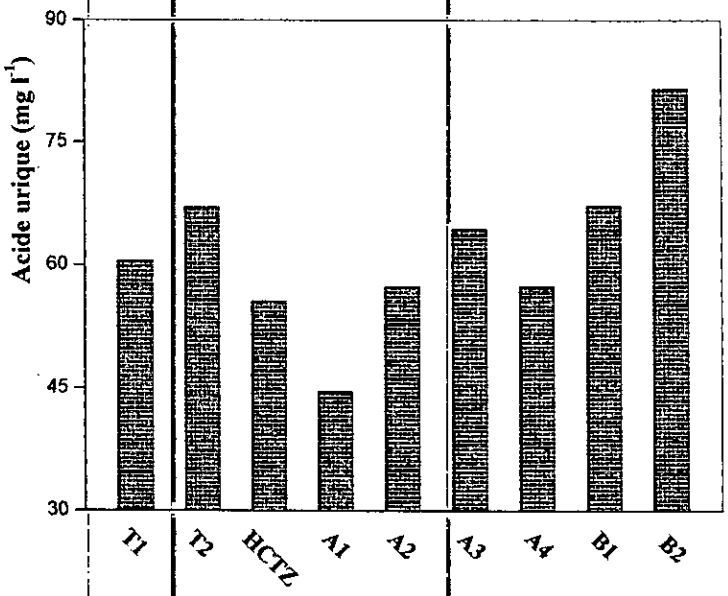


Fig. 27 : Taux de l'acide urique urinaire 4 h après traitement

Les composés A3 et B1 n'entraîne aucune variation sur les concentrations de l'acide urique, par rapport à celle du témoin 2, par contre le composé B2 provoque une augmentation très significative où le taux d'acide urique excrété prend une valeur de 81.7 $mmol.l^{-1}$ contre 67.7 $mmol.l^{-1}$ chez le témoin 2. Donc le composé B2 possède un effet uricosurique contrairement aux diurétiques thiazidiques qui réduisent l'excrétion de l'acide urique ce qui constitue l'un de leur effets secondaires.

Conclusion

IV. Conclusion

Notre pharmacomodulation du cycle benzothiadiazine, à savoir la simplification moléculaire et la substitution isostérique, a conduit à deux familles de composés (A et B). La synthèse des molécules cibles a été réalisée en deux étapes dont la deuxième consiste à fixer la fonction sulfonylurée. Les structures des molécules cibles ont été confirmées par spectrométrie infrarouge et de RMN de proton.

L'étude pharmacologique a consisté à tester les composés obtenus in-vivo sur des rats Albinos pour déterminer leurs effets sur la glycémie et la diurèse.

Les résultats de cette étude ont montré que :

- En général, les composés synthétisés n'entraînent pas un effet significatif sur la glycémie que se soit par voie orale ou par voie intrapéritonéale, bien qu'ils possèdent tous au moins une fonction sulfonylurée. Néanmoins, A1 et A3 provoquent une légère augmentation de glycémie par rapport aux rats témoins, mais qui reste dans les limites normales de la glycémie des rats (0,6- 1,35 g/l). Ceci indique que ce type de composés ne sont ni activateur ni inhibiteurs de canaux K_{ATP}.
- En ce qui concerne l'effet diurétique, les composés administrés par voie orale ont montré au bout de 4 heures des diurèses considérables par rapport à celles du témoin. Cet effet a été très marqué avec les composés de type A en particulier le composé A1. Cet effet sur la diurèse par voie orale reste toutefois relativement moins important que celui du composé diurétique de référence, à savoir l'hydrochlorothiazide. Cependant, le traitement par les composés administrés par voie intrapéritonéale ne montrent aucun effet diurétique.

  Cette différence de résultats entre les deux voies orale et intrapéritonéale nous a conduit à suggérer que les composés administrés par voie orale exercent leurs effets après soit une modification chimique au niveau de l'estomac soit après métabolisation au niveau du foie.

  L'effet diurétique intéressant constaté chez certains produits de type A ou B est à relier avec un effet antihypertenseur résultant de la diminution de la volémie. En outre, cet effet est à relier également avec une diminution du travail cardiaque.

Les dosages de sodium, de potassium et de l'acide urique dans le sang et l'urine nous ont permis de connaître l'influence des composés synthétisés sur les taux de ces substances :

- Une légère diminution de la natrémie et de la kaliémie a été constatée avec les composés mais avec des degrés variables. Le composés A4 et B2 ont montré des valeurs comparables à celles de l'HCTZ utilisé comme référence.
- L'effet natriurétique a été constaté avec la majorité des composés (A1, A4, B1, B2), alors que l'effet kaliurétique n'a été observé, d'une façon significative, qu'avec le composé B2 où nous avons enregistré un taux de potassium excrété plus élevé que celui de l'HCTZ.

  L'absence de l'effet kaliurétique chez les composés A1 et A4 leur confère une sélectivité d'excrétion au sodium, ce qui constitue un avantage pour leur utilisation, car l'excrétion excessive de potassium a été toujours considérée comme effet indésirable en conduisant à une hypokaliémie.
- Une stimulation d'excrétion urinaire de l'acide urique a été constatée avec les composés B1 et B2 avec lesquels on a enregistré des concentrations d'acide uriques urinaire élevées, contrairement à l'HCTZ qui induit une légère rétention de l'acide urique ce qui constitue un de ces effets secondaires.

En perspective, ce travail de recherche préliminaire sera complété dans un proche avenir par ce qui suit :

- Synthèse d'autres analogues notamment en modifiant la nature des deux groupes R_1 et R_2 par introduction de divers substituants aromatiques et aliphatiques.
- Détermination des constantes d'acidité pour connaître la forme chimique sous laquelle se trouvent les composés à pH physiologique.
- Evaluation de l'effet antihypertenseur in vivo.
- Effectuer des tests pharmacologiques et biochimiques pour essayer de déterminer le site d'action de ces composés.

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

[1] Hodgkin AL, Huxley AF, A quantitative description of membrane current and its application to conductance and exitation in nerve, *J. Physiol. (Lond)*, 1952, **117**, 500-44.

[2] Laniado ME, Abel PD, Lalani EN, Ion channels new explanations for old discases, *Brit. Med. J.*, 1997, **315**, 1171-72.

[3] Kazic T, Gojkovic Bukarica LJ, Ion channels and drug development focus on potassium channels and their modulators, *Med and biol*, 1999, Vol **6**, 23-30.

[4] Hamilton TC, and Weston AH, Cromakalim, nicorandil and pinacidil : Novel drugs which open potassium channels in smooth muscle, *Gen. pharmac.*, 1989, **20**, 1-9.

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

[6] Bernardi H, Bidard JN, Fosset M, Hugues M, Moure C, Rehm H, Remoy G, Schmid-Antomarchi H, Molecular propreties of potassium channel, *Artzneim, Forsh/ Drug.Res.*, 1989, **39**, 159-163.

[7] Anonymous, Receptor and ion channel nomenclature. *Trends pharmacol. Sci.*, 1996, Suppl **7** : 70.

[8] Gojkovic Bukarica LJ, Kazic T, Zdravkovie M, Ion channels, *Clinical cardiovascular pharmacology*, 3 Edition 1997, **45**, 62.

[9] Alfred G. Gikman , G proteins : Transducers of receptor-generated signals, *Ann. Rev. Biochem*, 1987, **65**, 615-649.

[10] Cooks NS, Potassium channels : structure, classification, function and therapeutique potential., *Ellis Harwood Ltd*, London 1990.

[11] Schweitz H, Bidard JN, Maes P and Lazdunski M, Charybdotoxin is a new member of the K^+ channel familly that includes desdrotoxin I and mast cell degranulating peptide, *Biochemestry*, 1989, **28**, 9708-9714.

[12] Edwards G, Weston AH, Effect of potassium channel modulating drug on isolated smooth muscl., In SZEKERES V, PAPP JP, Handbook of experimental pharmacology, vol **III**, *Springer, Heidelbery* 1994, 469-531.

[13] Calatsky J, Argetieri TM, Potaium channel blockers as antiarrythmic drugs, *Drug. Rev.*, 1994, **33** , 235-29.

[14] Van Gelder IC, Brugemann J, Crjns HJGM, Current treatment recommendations in antiarrythmie therapy, *Drugs*, 1998, **55** , 331-346.

[15] Noma A, ATP-regulated K^+channels in cardiac muscle, *Nature*, 1983, **305** , 147-148 .

[16] Cook DL, Hals CN, Intracellular ATP directly blocks K^+channels in pancreatic β cells, *Nature*, 1984, **311** , 271-273.

[17] De Weille J, Schmid-Antomarchi H, Fosset M, Lazdunski M, ATP-sensitive K^+channels that are blocked by hypoglycemia inducing sulfonylureas in insulin-secreting cell are activated by galanin, a hyperglycemia inducing hormone proc, *Natl. Acad. Sci.*, 1988, **85**, 1312-16.

[18] Quale JM, Nelon MT, Standen B, ATP-sensitive an inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle, *Physiol. Rev.*, 1997, **77** , 1165-1232.

[19] Inagaki N, Gonoi T,Clement IV JP, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar Bryan L, Seino S, Bryan J, Reconstitution of IK_{ATP} an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor, *Science*, 1995, **270** , 1166-1170.

[20] Doyle DA, Cabral JM, Pfuetzner RA, The structure of the potassium channel : molecular basic of K^+ conduction and selectivity. *Science*, 1998, **280** , 67-77.

[21] Inagaki N, Gonoi T, Clement IV JP, Wang CZ, Aguilar-Bryan L, Brayen J and Seino , A family of sulfonylurea receptors determine the Pharmacological properties of ATP-senitive potassium channels, *Neuron*, 1996, **16** , 1011-17.

[22] Inagaki N, Tsurra Y, Namba N, Mauda K, Gonoi T, Hone M, Serio Y, Mizuta M and Seino S, Cloning and functionnel characterisation of a novel ATP-Sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissus, including pancreatic Islets, pituitary, skeletal muscle, and heart. *J. Biol. chem.*, 1995, **270** , 5691-94.

[23] Tusndy GE, Bakos E, Varadi A, Sarkady B, Membrane topology distinquishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters, *FEBS Lett.*, 1997, **402** , 1-3.

[24] Uhde I, Tomah A, Gross, Scwanstecher C, Scwanstecher M, Identification of potassium channel opener site on sulfonylurea receptor, *J. Biol. chem.*, 1999, **274**, 28079-82.

[25] Quast U, ATP-sensitive K^+ channels in the kidney, *Naunyn- Schmiderberg's Arch. Pharmacol.*, 1996, **354** , 213-25.

[26] Sakurer H, Trapps S, Liss B, Ashcroft FM, Altered functional properties of K_{ATP} channel conferred by a novel splice variant of SUR_1, *J. Physiol. (Lond)*, 1999, **521**, 337-350.

[27] Tucker SJ, Gribble FM, Proks P, Molecular determinants of K_{ATP} channel inhibition by ATP, *EMBO Journal*,. 1998, **17** , 3290-96.

[28] Martin F, Pintor J, Rovira JM, Ripollc, Miras-Portugal MT, Soria B, intracellular diadenosine polyphosphates : A novel second messenger in a stimulus secretion coupling, *FASEB*, 1998, **12** , 1499-1506.

[29] Darin P, Lil, Wang J, K_{ATP} channel inhibition by ATP requires distinct functional domains of the cytoplasmic C terminus of the pore-forming subunit, *Porc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, **95** , 13953-58.

[30] Markworth E, Schwanstecher C, Schwanstecher M, ATP 4-mediates closure of pancreatic beta-cell ATP-sensitive potassium channels by interaction with 1 of 4 identical sites, *Diabetes*, 2000, **49**, 1408-1413.

[31] Dune MJ, Petersen OH, Intracellular ADP activates K^+ channel that are inhibited by ATP in a insulin secreting cell-line, *FEBS Lett.*, 1986, **208** , 59-62.

[32] Findlgy I, The effects of magnesium upon adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in a rat insulin-secreting cell line, *J. Physiol.*, 1987, **391** , 611-629.

[33] Nichols CG, Shyng SL, Nestorwicz A, Glaser B, Clement JP, Gonzalez G, Aguilar Bryan L, Permutt MA, Bryan j, Adenosine diophosphate as an intracellular regulator of insulin secretion, *Science*, 1996, **272** , 1785-87.

[34] Thuringer D, Cavero I, Les canaux potassiques inhibés par l'ATP cellulaire : Une ouverture physiologique à suspense moléculaire, *Med. Sci.*, 1997 , **13** , 1049-52.

[35] Lazdunki M, Les canaux potassiques sensibles à l'ATP ou les suites imprévues de l'étude des sulfamides hypoglycémiants, *Med. Sci.*, 1990, **6** , 279-285.

[36] Ashcroft FM, Adenosine 5-triphosphate-sensitive potassium channel, *Ann. Rev. Neurosci.*, 1998, **11**, 97-118.

[37] Traité de chimie thérapeutique : Médicaments en relation avec des systèmes hormonaux volume 4, *AFECT*, 1995, chapitre II 60-83.

[38] Gros GJ, Auchampach JA, Role of ATP dependant potassium channels in myocardial ischaemia, *Cardiovasc. Res.*, 1992, **26** , 1011-16.

[39] Rorsman P and Tawbe G, Glucose dependant K^+-channel in pancreatic β cells are regulated by intracellular ATP, *Pflügers*, 1985, **405** , 305-309.

[40] Frances M, Ashcroft FM, Donna E, Harrison Stephen JH, Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic β cells, *Nature*, 1984, **312**, 446-448.

[41] Henquin JE, Jonas JS, Sato Y, Regulation of insulin secretion by chandes in Ca^{2+} concentration and action in pancreatic β-cells, *Adv. Mol. Cell. Biol.*, 1999, **29**, 245-275.

[42] Gorus FK, Schuit FC, Intveld PA, Gepts W, Pipeleers DG, Intraction of sulfonylureas with pacréatic β cells, *Diabetes*, 1988, **37**, 1090-95.

[43] Schmid-Antomarchi H, De Weille J, Fosset M, Lazdunski M, The antidiabetic sulfonylurea glibenclamide is a potent blocker of the ATP-modulated K^+ channel insulin secreting cells, *Biochemical and physical Research communications*, 1987, **146**, 21-25.

[44] Pace C, Tarvin J.T, Somatostatine : Mechanisme of action in pancreatic iselt β-cells, *Diabetes*, 1981, **30**, 836-42.

[45] De Weille J, Schmid-Antomarchi H, Fosset M, Lazdunski M, Regulation of ATP-sensitive K^+ channels in insulinoma cells activation by somatostatine and protein kinase C and the role of cAMP, *proc. Nalt. Acad .Sci. USA*, 1989, **86**, 2971-75.

[46] Dunning B.E, Ahrén B, Veith R. C, Bottcher G. J, Galanin: a novel pancreatic neuropeptide, *Am. J. Physiol.*, 1986, **251**, 127-133.

[47] Ahrén B, Arkhammar P, Berggren P. O, Nilsson T, Galanin inhibits glucose-stimulated insulin release by a mechanism involving hyperpolarization and lowering of cytoplamic free Ca^{2+}concentration., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, **140**, 1059-63.

[48] Dunne M. J, Bullett M. J, Li G, Wollheim C. B, Petersen O. H, Galanin activates nucleotide-dependent K^+ channels in insulin-secreting cells via a pertussis-sensitive G-protein, *EMBO. J.*, 1989, **8**, 412-20.

[49] Trube G, Hescherler J, Inward rectifying channels in isolated patches of the heart cell membranes : ATP-dependence and comparison with cell-attached patches, *Pflügers Arch. Eur. J. Phys.*, 1984, **401**, 178-184.

[50] Fosset M, De Weille J.R, Green R.D, Schmid-Antomarchi H, Lazdunski M, Antidiabetic sulfonylureas control action potential properties in heart cells via high affinity receptors that are linked to ATP-dependent K^+ channels, *J. Biol. Chem.*, 1988, **263**, 7933-36.

[51] Gehlert D.R, Mais D.E, Gackenheimer S.L, Krushinski J.H, Robertson D.W, Localisation of ATP sensitive potassium channels in the rat brain using a novel radioligand, [^{125}I] iodoglibenclamide, *Eur. J. Pharmacol.*, 1990, **186**, 373-75.

[52] Treherne J. M, Ashford M. L. J, The regional distribution of sulfonylurea binding sites in rat brain, *Neuroscience*, 1991, **40**, 523-31.

[53] Edwards G, Weston A. H, Potassium channel openers and vascular smooth muscle relaxation. *Pharmacol. Ther.*, 1990, **48**, 237-58.

[54] Cook NS, Quast U, Potassium channel pharmacology : Potassium channels structure, classisication, function and therapeutic potential, *Ellis Horwood, Chichester*, 1990, 181-255.

[55] Edwards G, Weston A.H, Pharmacology of the potassium channel openers, *Cardiovasc. Drugs Ther.*, 1995, **9**, 185-93.

[56] Escande D, Thuringer D, Le Guern S, Courteix J, Laville M, Cavero I, Potassium channel openers act through an activation of ATP-sensitive K^+ channels in guincaping cardiac myocytes, *Pflügers. Arch.*, 1989, **414**, 669-75.

[57] Traité de chimie thérapeutique : Médicaments du système cardiovasculaire, Volume 3, *AFECT*, 1992, chapitre I, 21-46.

[58] Rolf Bergmann, Volker Eiermann and Rolf Gericke, 4-heterocyclyoxy-2H-1-benzopyran potassium channel activators, *J. Med. Chem.*, 1990, **33**, 2759-67.

[59] Nilsen-Kudsk JE, Boesgaard S, Aldershvile J, K^+ channel opening : a new drug principle in cardiovascular medicine heart., 1966, **76**, 109-16.

[60] Lawson K, Potassium channel activation : A potential therapeutic approach., *Pharmacol. Ther.* 1996, **70**, 39-63.

[61] John R, Fozard Paul W, Manley, Potassium channel openers : Agents for the treatment of airway hyperractivity, *Prog. Respir. Basel, Karger*, 2001, vol **31**, 77-80.

[62] Cook D L, Ashford M L. J, Hales C N, ATP sensitive K^+ channels in pancreatic β-cells Spare channel hypothesis, *Diabetes*, 1988, **37**, 495-98.

[63] Quast U, Potassium channel openers : Pharmacological and clinical aspects. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 1992, **6**, 279-93.

[64] Schwanstecher C, Bassen D, K_{ATP} channel on somata of sping neurones in rat candate neucleus : ragulation by drug and nucleotids, *Br. J. Pharmacol.*, 1997, **121(2)**, 193-98.

[65] Schwanstecher M, Brandt C, Behrends S, Schatt U, Panten U, Effect of Mg-ATP on pinacidil-induced displacement of glibenclamide from the sulfonylurea receptor in a pancreatic β-cell line and rat cerebral cortex, *Br. J. Pharmacol.*, 1992, **106**, 295-301.

[66] Ibbotson T, Edwards G, Noack T, Weston A. H, Effects of P1060 and Aprikalim on whole cell currents in rat portal vein : inhibition by glibenclamide and phentolamine, *Br. J. Pharmacol.*, 1993, **108**, 991-998.

[67] Bray K. M, Quast U, A spesific binding site for K^+-channel opener in rat aorta, *J. Biol. Chem.*, 1992, **267**, 11689-92.

[68] Paul W, Manley, Quast U, Anders H and Bray K, Synthesis of radioligand binding studies with a triatiated pinacidil analogue receptor interactions of structurally different classes of potassium channel openers and blokers, *J. Med. Chem.*, 1993, **36**, 2004-10.

[69] Schorderet M, Pharmacologie : Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques, 1989, Edition Slatkine.

[70] 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.

[71] Trube G, Rorsman P, Ohno-Shosakn T, Opposite effect of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent K^+ channel in mouse pancreatic β-cells. *Pflugrs Arch.* 1986, **407**, 493-99.

[72] Norman Altszuler, Jennifer Hampshire and Ety Mprarru, On the mechanism of diazoxide-induced hypoglycemia, *Diabetes*, 1977, **26**, 931-35.

[73] Topliss J. G, Konzelman L. M, Shapiro E. P, Sperber N and Roth F. E, Antihypertensive Agents II : 3-substituted 2H- 1,2,4-benzothiadiazine 1,1 dioxyde, *J. Med. Chem.*, 1964, **7**, 269-73.

[74] Pirotte B, Ouedraogo R, De Tullio P, Khelili S, Somers F, Boverie S, Dupont L, Fontaine J, Damas J, and Lebrun Ph, Ouedraogo R, 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.

[75] Khelili S, De Tullio P, Lebrun Ph, Fillet M, Antoine M. H, Ouedraogo R, Dupont L, Fontaine J, Felekidis A, Leclerc G, Delarge J, and 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, *Bioorganic & Med. Chem.*, 1999, **7**, 1513-20.

[76] Elaine N. Marieb, Biologie humaine : Anatomie et physiologie, chapitre 15 système urinaire, 2000.

[77] Frisk A.R., *Aceta Med Scand*, 1943, Suppl.142, 1.

[78] Geigy A. G., J. R, British patent 604, 259; *Chem Abstracts.* 1948, **43**, 3779.

[79] Geigy A. G., J. R, Suiss patent 247, 123; *Chem. Abstracts.*1949, **43**, 6234.

[80] Backer H. J and Moed H. D, *Rec. trav. Chim*, 1947, **66**,689.

[81] Backer H. J and Moed H. D, *Bull. Soc. Chim Belges*,1948, **57**, 211.

[82] Ulriche H, The chemistry of sulfonylisocyanates, *Chem. Rev.*, 1965, **6**, 369-376.

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

[84] Kurze E, Cyanamides, Part.V. N-aryl-N'arylsulfonylureas, *J Chem. Soc.*, 1959, 1258-1262.

[85] Martin H, Hirt R and Straub A, 4-aminobenzensulfon carbamic acid derivative, U. S. patent, (2,411,661), 1976, 1-4., *Chem. Abstracts.*, 1947, **41**, 6284.

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

[87] Martin H, Hirt R and Straub A, Sulfaniyl carbamic acid derivatives and their manufacture, U.S. patent, (2,371,178), 1945, 1-2., *Chem.Abstracts*, 1945, **39**, 3792.

[88] Arnold R. G, Nelson J.A., and Verbanc J. J., Recent advance in isocyanates chemistry, *Chem. Rev.*, 1957, **57**, 47-76.

[89] Jay S. Roth and Ed. F. Degering, preparation of sulfanilamide The derivatives containing a urea or thiourea grouping, J. *Am.Chem. Soc.*, 1945, **67**, 126-128.

[90] Khelili S, Leclerc G, Faury G and Verdetti J, Synthesis and vasodilator effects of 3- and 7-sulfonylurea-1,2,4-benzothiadiazin-1,1-dioxydes on rat aorta, *Bioorganic & Med. Chem.*, 1995, Vol 3, 495-503.

[91] Geigy J.R., A.G., British patent 604, 259., *Chem Abstracts*, 1949, **43**, 1061.

[92] Maserel B, Schynts J, Krzesinski M, Pirotte B, Rorive G, and Delarge J. A sulphonylthiourea (BM20) related to torasemide, a new loop diuretic with relative potassium-sparing properties., *J.Pharm. Pharmacol.*, 1993, **45**, 720-724.

Résumé

Ce travail de recherche a consisté à synthétiser des analogues ouverts de benzothiadiazine-1,1- dioxydes par simplification moléculaire puis introduction de fonctions sulfonylurées. Les composés synthétisés ont montré un effet diurétique intéressant par voie orale alors qu'il est inexistant par voie intrapéritonéale. En outre, ces composés n'ont montré aucun effet sur la glycémie. Ceci ouvre la voie à de nouvelles perspectives à ce type de composés et nous encourage à développer d'autres analogues.

Mots clés : Benzothiadiazine, sulfonylurée, simplification moléculaire, canaux K_{ATP}, glycémie, effet diurétique.

Abstract

The aim of this research is the synthesis of open analogues of benzothiadiazine-1,1-dioxydes by mean of molecular simplification and introduction of sulfonylurea moieties. The synthesized compounds showed an interesting diuretic effect when administrated orally but they had no effect when administrated intraperitneally. Furthermore, these componds did not show any effect on glycemia. These results have opened the way to new perspectives for this new type of molecules and encourraged us to developpe new analogues.

Key words : Benzothiadiazine, sulfonylurea, molecular simplification, K_{ATP} channels, glycemia, diuretic effect.

ملخص:

إن الهدف من هذا البحث هو تحضير مركبات ذات بنية مبسطة مشتقة من الحلقة الغير متجانسةBenzothiadiazine-1,1-dioxyde باستعمال طريقة التبسيط الجزيئي ثم تثبيت وظيفة السولفونيل يورياsulfonylurée.

المركبات المحضرة أظهرت تأثيرا معتبرا علي ادرار البول عند تناولها عن طريق الفم غير أن التأثير كان منعدما عند حقنها داخل الصفاق، في حين لم تبدي هذه المركبات أي تأثير على نسبة الغلوكوز في الدم. هذه النتائج تفتح المجال أمام تحضير مركبات أخرى من هذا النوع و دراسة تأثيراتها.

الكلمات المفتاحية : Benzothadiazine ، سولفونيل يوريا، تبسيط جزيئي، قنوات البوتاسيوم الحساسة للـATP نسبة الغلوكوز في الدم، تأثير ادرار البول.