

ORIGINALS

Etude expérimentale d'un nouveau sulfamide hypoglycémiant particulièrement actif, le HB 419 ou glibenclamide*

I. Action bêta-cytotrope et insulino-sécrétrice

A. LOUBATTÈRES, M. M. MARIANI, G. RIBES, H. de MALBOSC et J. CHAPAL

Reçu le 22 juillet, 1968

Experimental study on glibenclamide (HB 419), a new, particularly active, hypoglycaemic sulphonamide. I. Beta-cytotropic action and insulin secretion

Summary. Glibenclamide or HB 419 is a new, particularly active hypoglycaemic sulphonylurea. In the normal, conscious dog, HB 419 administered intravenously was 240 or 440 times more active than tolbutamide, depending on whether the dosage is expressed in grams or in moles. The hypoglycaemic effect did not occur in the totally pancreatectomized dog. HB 419 stimulated insulin secretion. HB 419 administered intravenously in the anaesthetized dog increased insulinaemia in the pancreatico-duodenal vein for 7 h, which represents the duration of the experiment. After oral administration of 2 mg/kg, the increase of peripheral insulinaemia persisted for 24 h. Hyperinsulinaemia was also found in the pancreatico-duodenal vein in the conscious dog, when a catheter was permanently inserted into the said vein. The direct insulin-secreting effect has been shown on the isolated, perfused rat pancreas *in vitro*. This drug also counteracted the inhibitory effect of diazoxide on insulin-secretion both *in vivo* and *in vitro*. — Furthermore, this drug potentiated the effects of insulin in the pancreatectomized dog.

Résumé. Le glibenclamide ou HB 419 est un nouveau sulfonuryluree hypoglycémiant particulièrement actif. Chez le chien normal éveillé, par voie intra-veineuse, il est 240 ou 440 fois plus actif que le tolbutamide suivant que les doses sont exprimées en poids ou en moles. Cette action hypoglycémiante ne se manifeste pas chez le chien totalement dépancréaté. — Ce produit stimule la sécrétion d'insuline. *In vivo* chez le chien anesthésié l'administration intra-veineuse de HB 419 augmente l'insulinémie dans la veine pancréatico-duodénale pendant les 7 h que dure l'expérience. A 2 mg/kg per os l'augmentation de l'insulinémie périphérique persiste 24 h après l'administration. L'hyperinsulinémie a été également décelée dans la veine pancréatico-duodénale, chez l'animal éveillé, grâce à un cathéter placé à demeure dans cette veine. *In vitro*

l'action insulino-sécrétrice directe a été démontrée sur le pancréas isolé et perfusé du rat. Cette substance s'oppose en outre à l'action inhibitrice du diazoxide sur l'insulino-sécrétion *in vivo* et *in vitro*. — Chez le chien dépancréaté ce produit potentialise les effets de l'insuline.

Experimentelle Untersuchungen an einem neuen, besonders wirksamen, blutzuckersenkenden Sulfonamid, dem HB 419 oder Glibenclamid. I. Wirkung auf die B-Zelle und die Insulinsekretion

Zusammenfassung. Das Glibenclamid oder HB 419 ist ein neuer blutzuckersenkender Sulfonylharnstoff von besonders hoher Wirksamkeit. Beim normalen Hund zeigt er bei intravenöser Verabreichung im Wachzustand eine 240 oder 440 mal stärkere Wirkung als Tolbutamid, je nachdem ob die Dosen nach Gewicht oder Mol berechnet wurden. Nach totaler Pankreatektomie ließ sich diese Wirkung beim Hund nicht mehr nachweisen. HB 419 stimuliert die Insulinsekretion. Beim anästhesierten Hund führt die intravenöse Gabe des Präparates *in vivo* zu einem Anstieg der Insulinspiegel in der vena pancreatico-duodenalis über 7 Std., welche die Dauer des Experiments darstellen. Bei oraler Verabreichung von 2 mg/kg hält die Erhöhung der peripheren Insulinämie noch 24 Std. nach der Zufuhr des Medikaments an. Auch bei Tieren im Wachzustand war diese Erhöhung der Insulinspiegel in der vena pancreatico-duodenalis mit Hilfe eines in dieses Gefäß eingebrachten Dauerkatheters festzustellen. Daß es sich dabei um eine direkte Steigerung der Insulinsekretion handelt, konnte am isolierten perfundierten Rattenpankreas *in vitro* nachgewiesen werden. Das Präparat übt ferner *in vitro* und *in vivo* eine antagonistische Wirkung auf die Hemmung der Insulinsekretion durch Diazoxid aus. Beim pankreatektomierten Hund verstärkt es den Insulineffekt.

Key-words: Insulin-secretion *in vivo* and *in vitro*, hypoglycaemic sulphonamide, oral antidiabetic substances, glibenclamide, tolbutamide, insulin secretion stimulator.

Le N-{4-(β-<2-méthoxy-5-chlor-benzamido>-éthyl)-benzène-sulfonyl}-N'-cyclohexyl-urée ou Glibenclamide ou HB 419 est un nouveau sulfamide hypoglycémiant extrêmement actif. Il est le résultat de l'étude de nombreuses structures chimiques qui ont été expérimentées par divers laboratoires Universitaires ou Industriels pharmaceutiques depuis la découverte de l'action et du mécanisme d'action de ces substances (1942—1946) [10, 6, 7, 8, 9].

* Le HB 419 ou glibenclamide portait initialement le nom de glybenzocyclamide. La dénomination commune internationale qui vient d'être définitivement adoptée est Glibenclamide.

Le HB 419 a fait l'objet d'une note préliminaire essentiellement descriptive chimique et relativement réduite en ce qui concerne l'étude pharmacologique [2] et de notes fragmentaires issues de deux laboratoires [11, 15, 16, 17].

Le but de cette publication est de rassembler les travaux qui ont été effectués par notre groupe de travail.

Etant donné que la démonstration de l'action et du mécanisme d'action de cette substance fait appel à divers types d'expériences, dans chaque partie de cette publication seront exposées les conditions expérimentales ainsi que les résultats qui auront été obtenus.

1. *Expériences effectuées chez le chien normal, afin de mettre en évidence et de déterminer l'action du HB 419 sur la glycémie, le produit étant administré par voie intra-veineuse*

Nous avons opéré sur le chien éveillé de sexe mâle ou femelle, de poids compris entre 12 et 16 kg. Tous les animaux avaient reçu leur dernier repas 18 h avant le début de l'expérience.

Les prises de sang étaient effectuées avant et après l'administration de la substance par ponction des veines céphaliques.

La détermination du taux du glucose dans le sang a été réalisée à l'aide de l'Auto-Analyseur Technicon, méthode au ferricyanure de potassium sur sang hémolysé [1]. Chaque expérience avait une durée de 24 h. 38 expériences ont été effectuées. Le produit était administré par injection dans la veine saphène. Sa solubilisation était facilitée par l'addition d'une quantité adéquate de NaOH 1N et par un léger chauffage.

Dans la figure 1 nous avons représenté les résultats obtenus lorsque des doses croissantes de HB 419 (0.01

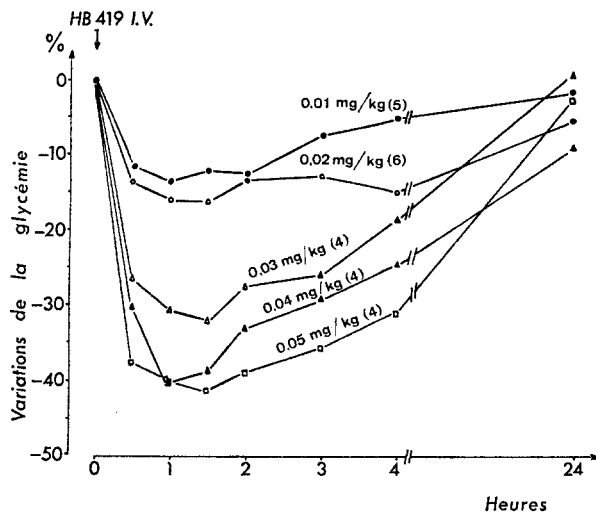


Fig. 1. Action sur la glycémie du chien normal éveillé de doses croissantes de HB 419 administrées par voie intra-veineuse. Chaque point représente la moyenne des valeurs déterminées chez plusieurs chiens. Le nombre d'animaux utilisés pour l'établissement de chaque courbe est indiqué entre parenthèses

mg/kg — 0.02 mg/kg — 0.03 mg/kg — 0.04 mg/kg — 0.05 mg/kg) ont été administrées. Chaque point représente la moyenne des valeurs déterminées sur plusieurs chiens. Le nombre d'animaux utilisés pour l'établissement de chaque courbe est indiqué entre parenthèses. D'autres doses ont été utilisées; leurs effets ont encadré les effets de celles qui viennent d'être précisées.

On constate que l'effet hypoglycémiant de la substance se manifeste rapidement et d'une manière profonde. Il est pratiquement maximum en 1 h. Cet effet est d'autant plus intense que la dose administrée s'accroît. On constate que l'effet hypoglycémiant peut se prolonger pendant environ 24 h. Des doses très

importantes de HB 419 ont provoqué dans certains cas des manifestations hypoglycémiques.

La *dose-limite d'activité* (dose qui abaisse la glycémie d'environ 10%) se situe à 0.01 mg/kg i.v.

La *dose-seuil* (dose qui, chez 50 p. 100 des animaux, abaisse la glycémie de 5 à 10%) est aux environs de 0.005 mg/kg i.v.

2. *Comparaison des effets du HB 419 et du tolbutamide sur la glycémie du chien normal, dans les mêmes conditions expérimentales*

C'est dans les mêmes conditions expérimentales que celles décrites ci-dessus pour l'étude du HB 419 que nous avons étudié les effets du tolbutamide (1-butyl-3-paratolyl-sulfonylurée).

Vingt expériences ont été effectuées sur le chien mâle ou femelle, ayant reçu leur dernier repas 18 h avant le début de l'expérience.

Les doses utilisées ont été soit égales, soit supérieures, soit inférieures à celles qui ont été exprimées

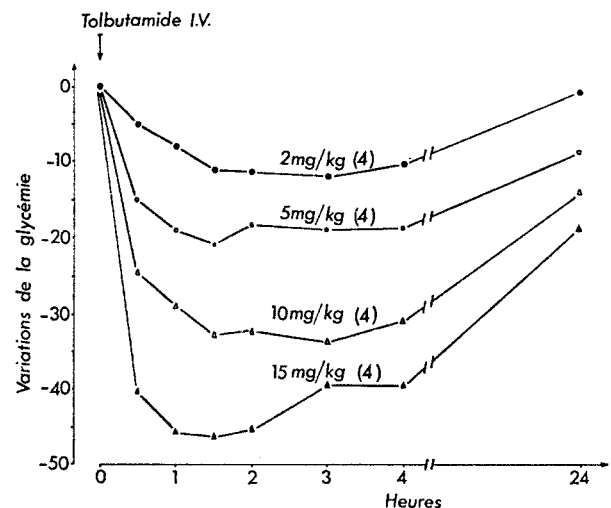


Fig. 2. Action sur la glycémie du chien normal éveillé de doses croissantes de tolbutamide administrées par voie intra-veineuse. Chaque point représente la moyenne des valeurs déterminées chez plusieurs chiens. Le nombre d'animaux utilisés pour l'établissement de chaque courbe est indiqué entre parenthèses

sur la figure 2. Sur cette figure ont été représentées les actions sur la glycémie de doses dont les effets sont comparables à ceux du HB 419. Chaque point représente la moyenne des valeurs déterminées chez plusieurs chiens. Le nombre d'animaux utilisés pour l'établissement de chaque courbe est indiqué entre parenthèses.

On remarquera que les doses de tolbutamide qui ont été injectées par voie intra-veineuse (2 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg) sont supérieures à celles injectées lors des essais effectués à l'aide du HB 419. La *dose-limite* de tolbutamide est de 2 mg/kg i.v. La *dose-seuil* de tolbutamide est environ de 1 mg/kg i.v.

La figure 3 représente l'étude comparative du HB 419 et du tolbutamide quant à leur action hypoglycémiant chez le chien normal éveillé, après injection intra-veineuse de chacun des produits. En ab-

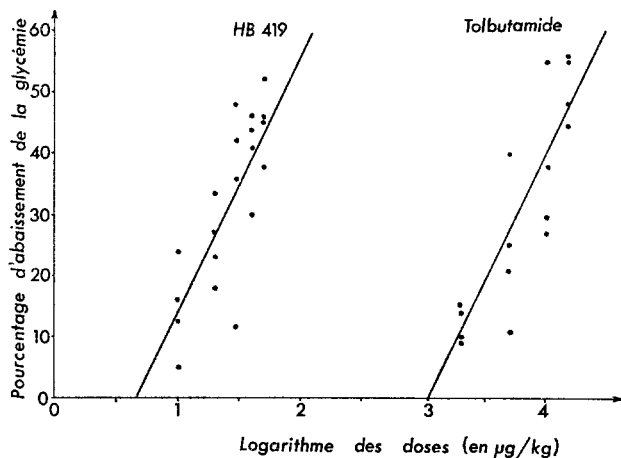


Fig. 3. Etude comparative du HB 419 et du tolbutamide quant à leur intensité d'action hypoglycémiant chez le chien normal éveillé après administration intra-veineuse. En abscisses sont portés les logarithmes des doses (exprimées en $\mu\text{g}/\text{kg}$), et en ordonnées les pourcentages d'abaissement de la glycémie. Chaque point représente l'abaissement glycémique maximum obtenu chez chaque animal après administration d'une dose

scisses sont portés les logarithmes des doses (celles-ci étant exprimées en $\mu\text{g}/\text{kg}$) et en ordonnées les pourcentages d'abaissement de la glycémie. Chaque point représente l'abaissement glycémique maximum obtenu chez chaque animal après administration d'une dose.

Pour le tolbutamide, quatre doses ont été utilisées (2 mg, 5 mg, 10 mg, et 15 mg par kilo) et quatre animaux par dose.

Pour le HB 419, cinq doses (0.01 mg, 0.02 mg, 0.03 mg, 0.04 mg et 0.05 mg par kilo) et quatre animaux par dose.

La comparaison des deux drogues a été menée par la méthode des droites de régression parallèles (parallel line assay) [3]. L'analyse des résultats permet les conclusions suivantes: Les pentes des deux droites ne sont pas significativement différentes ($F_{1-32} < 1$). Le logarithme de la puissance relative du HB 419 par rapport au tolbutamide (mesuré par la distance horizontale des deux droites de régression) est $M \pm s_M = 2.380 \pm 0.0714$ ce qui correspond à une puissance relative du HB 419 par rapport au tolbutamide de 240 avec les limites suivantes pour l'intervalle de confiance 95% : 169 et 337.

Dans les conditions expérimentales où nous avons opéré, le HB 419 se montre donc en moyenne 240 fois plus actif que le tolbutamide, lorsque les doses sont évaluées en poids. Lorsque les doses sont exprimées en moles, l'activité du HB 419 est en moyenne égale à 440 fois celle du tolbutamide.

3. Action du HB 419 sur la glycémie du chien éveillé lorsque le produit est administré «per os»

Il était important de savoir si le produit était résorbé par le tube digestif et si, de ce fait, l'action hypoglycémiant de la substance pouvait se manifester après administration *per os*.

Les expériences ont été réalisées sur 10 chiens éveillés ayant reçu leur dernier repas 18 h auparavant. La quantité de produit HB 419 correspondant aux doses choisies était mise en cachets et placée dans la gueule de l'animal qui la déglutissait. Les doses utilisées ont été de 0.2 mg/kg (4 chiens) et de 2 mg/kg (6 chiens).

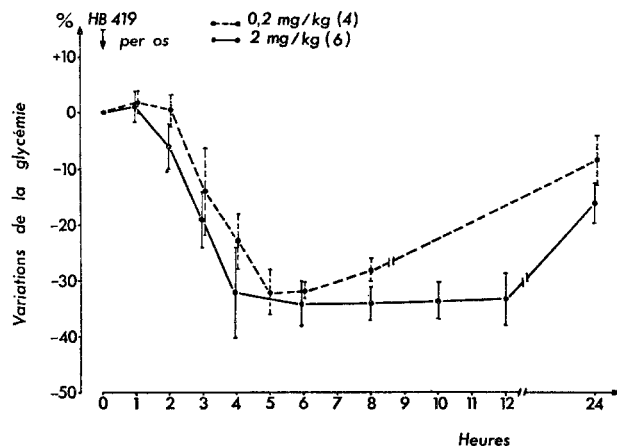


Fig 4. Action sur la glycémie du chien normal éveillé du HB 419 administré *per os* à la dose de 0.2 mg/kg (4 chiens) et de 2 mg/kg (6 chiens). Chaque point représente la moyenne des valeurs déterminées et porte indication de l'erreur standard de la moyenne

Comme le montrent, sur la figure 4, les courbes obtenues en faisant la moyenne des valeurs déterminées, l'action hypoglycémiant se manifeste après un temps de latence qui est de 2 h environ. Cette action se prolonge pendant plus de 24 h, même lorsque le produit est administré à la dose la plus faible.

La durée de l'hypoglycémie maxima est la plus prolongée avec la dose la plus forte.

Il est donc certain que la substance est absorbée par «voie digestive» et qu'elle manifeste, administrée par cette voie, son action hypoglycémiant.

4. Absence d'action du HB 419 sur la glycémie du chien totalement dépancréaté

Il était important de savoir si l'action hypoglycémiant du produit était due à la mise en jeu du même mécanisme que celui mis en évidence pour d'autres sulfamides hypoglycémiant, c'est-à-dire, à la stimulation des cellules bêta des îlots de Langerhans et, en conséquence, à la libération d'insuline.

Pour en avoir la démonstration, nous avons opéré sur le chien totalement dépancréaté, par comparaison avec le chien normal. Les animaux normaux avaient reçu leur dernier repas 18 heures avant. Les animaux

dépancréatés avaient subi l'ablation du pancréas 24 h avant et étaient à jeun depuis 40 h. Les deux groupes d'animaux étaient anesthésiés à l'aide de mébubarbital (Nembutal) à la dose de 30 mg/kg par voie intraveineuse. La glycémie était enregistrée «en continu» à l'aide de l'Auto-Analyseur Technicon. Le sang était prélevé dans la veine fémorale.

La figure 5 représente les résultats obtenus chez 3 chiens dépancréatés et 7 chiens normaux. Les doses de HB 419 administrées ont été dans les deux cas de 0.5 mg/kg i.v. Chaque courbe a été établie en faisant la moyenne des valeurs obtenues (le nombre correspondant d'animaux est indiqué entre parenthèses).

On constate que le HB 419 administré à des doses représentant 50 fois la dose-limite n'a aucune action sur la glycémie du chien privé de pancréas. Il en est de même lorsque des doses de 2 ou 5 mg/kg/i.v. qui sont égales à 200 ou 500 fois la dose-limite, ont été administrées.

Il est intéressant de remarquer que ces animaux totalement dépancréatés étaient porteurs de leur foie.

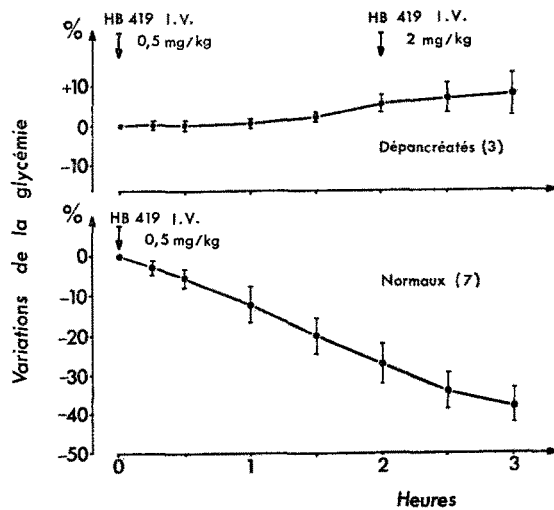


Fig. 5. Absence d'action du HB 419 (0.5 mg/kg et 2 mg/kg par voie intra-veineuse) sur la glycémie du chien totalement dépancréaté. Comparaison avec l'action chez le chien normal. Les variations de la glycémie ont été évaluées en pourcentages par rapport aux valeurs glycémiques au temps zéro. Celles-ci étaient en moyenne de 1 g/l chez les chiens normaux et de 2.97 g/l chez les chiens totalement dépancréatés. Chaque point représente la moyenne des valeurs et porte indication de l'erreur standard de la moyenne

Ceci permet de penser qu'en l'absence de pancréas, le sulfamide HB 419 ne semble pas modifier sensiblement la glycogénolyse ou la glycogénoformation hépatique.

Il se confirme donc que l'action hypoglycémiant du HB 419 ne se manifeste pas si l'organisme a été privé totalement de tissu pancréatique. Ce fait suggérerait fortement que le produit agissait vraisemblablement en stimulant la sécrétion d'insuline. C'est ce que nous avons démontré d'une manière directe au cours de notre expérimentation ultérieure.

5. Action insulino-sécrétrice du HB 419, chez le chien anesthésié, le produit étant administré par voie intraveineuse et l'insulinémie étant dosée dans le sang veineux pancréatico-duodénal

Nous avons opéré sur des chiens de 14 à 18 kg qui avaient reçu leur dernier repas 18 h avant l'expérience. Les animaux étaient anesthésiés à l'aide de Nembutal intraveineux à la dose de 30 mg/kg. La glycémie était dosée d'une manière continue pendant toute la durée de l'expérience en branchant un Auto-Analyseur Technicon sur une collatérale de la veine fémorale. La pression artérielle fémorale était enregistrée à l'aide d'un manomètre à mercure. Les prélèvements de sang pour le dosage de l'insuline étaient effectués dans la veine pancréatico-duodénale. Pour y parvenir, cette veine était sectionnée près de son abouchement dans la veine porte et une canule en forme de T introduite entre les deux segments. Par la branche libre du T il était alors possible de prélever du sang afin d'y doser l'insuline par la méthode radioimmunologique B de

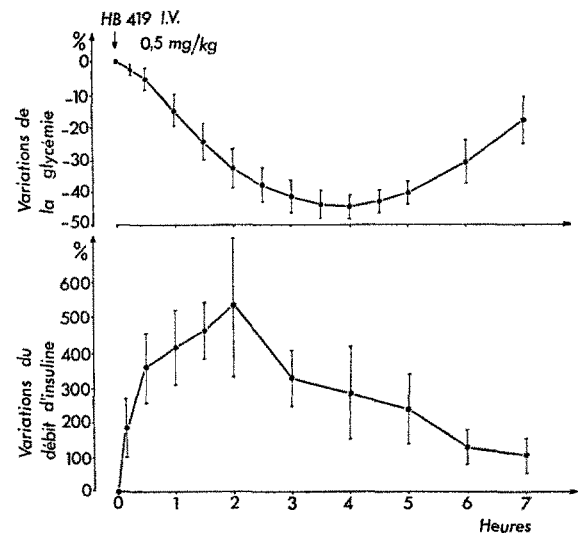


Fig. 6. Variations de la glycémie et du débit en insuline du sang veineux pancréatico-duodénal chez 5 chiens anesthésiés ayant reçu par voie intra-veineuse 0.5 mg/kg de HB 419. Les variations sont estimées en pourcentages par rapport à la valeur au temps zéro. Chaque point représente la moyenne des valeurs et porte indication de l'erreur standard de la moyenne

HALES et RANDLE [5]. En outre, les variations du débit sanguin, dans cette même veine, étaient soigneusement contrôlées.

Huit expériences ont été effectuées; cinq se sont prolongées pendant 7 h et trois pendant 3 h. Les doses de HB 419 qui ont été utilisées étaient de 0.5 mg/kg i.v.

La figure 6 représente dans sa partie supérieure les modifications de la glycémie et dans sa partie inférieure les variations du débit en insuline du plasma veineux pancréatico-duodénal. Chaque point de la courbe représente la moyenne des valeurs obtenues et porte indication de l'erreur standard de la moyenne.

On peut constater que le HB 419 stimule la sécrétion d'insuline endogène et augmente de 500 à 600 p. 100 la sécrétion insulémique de base, estimée à la sortie du pancréas dans la veine pancréatico-duodénale. Cette stimulation quasi immédiate, s'accroît pendant deux heures, atteint un maximum puis s'atténue progressivement; 7 h après l'injection, le débit d'insuline est encore double de la sécrétion initiale enregistrée avant l'injection intra-veineuse du produit.

6. Action insulino-sécrétrice du HB 419, chez le chien éveillé, le produit étant administré «per os» et l'insulinémie étant dosée dans le sang d'une veine périphérique

Les expériences effectuées ont été au nombre de cinq.

Les animaux ont reçu leur dernier repas 18 heures avant l'administration du produit *per os*, à la dose de 2 mg/kg. La glycémie ainsi que l'insulinémie ont été dosées sur le sang périphérique prélevé dans la veine jugulaire. Les courbes exprimées dans la figure 7

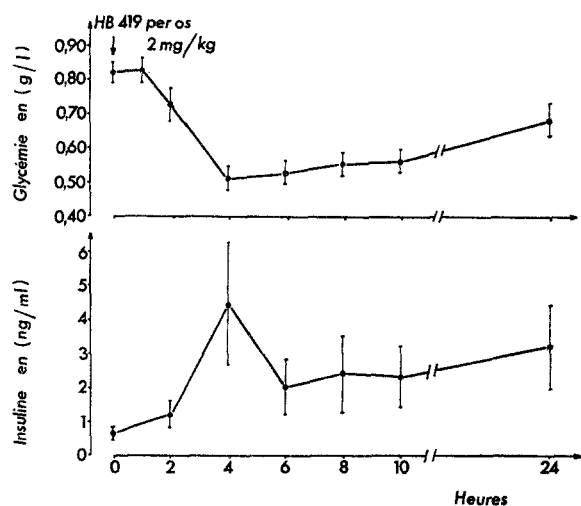


Fig. 7. Glycémie et insulinémie dans le sang veineux périphérique chez 5 chiens normaux éveillés, après administration de HB 419 *per os* (2 mg/kg). Chaque point représente la moyenne des valeurs et porte indication de l'erreur standard de la moyenne. La concentration d'insuline plasmatique est évaluée en ng/ml. Selon l'équivalence d'activité biologique donnée par GLIEMANN (4): 1 ng d'insuline de chien correspond en moyenne à 23 μ U

donnent les résultats que nous avons obtenus. Chaque point de la courbe représente la moyenne des valeurs obtenues et porte indication de l'erreur standard de la moyenne.

On peut constater que l'administration du produit *per os* est suivie de l'augmentation de la sécrétion d'insuline qui s'élève en 4 h jusqu'à un maximum qui atteint en moyenne 7 fois la sécrétion de départ. Après cette vague d'insulino-sécrétion le rythme décroît; cependant entre 6 et 24 h après l'injection, le débit d'insuline demeure compris entre 3 et 5 fois le débit sécrétoire initial.

Cette expérience démontre donc que l'administration de HB 419 *per os* déclenche une insulino-sécrétion abondante décelable dans la veine périphérique qui se prolonge pendant 24 h environ dans les circonstances expérimentales où nous nous sommes placés.

7. Effets de doses faibles de HB 419, représentant 5 fois la dose-limite, sur la glycémie et l'insulinémie dosées dans la veine pancréatico-duodénale du chien éveillé

Dans ces expériences, l'animal était préparé la veille. Sous anesthésie au mébubarbital (Nembutal) et aseptiquement, un cathéter en polyéthylène était placé dans la veine pancréatico-duodénale. Ensuite ce cathéter était amené hors de la cavité abdominale puis cheminait dans le tissu cellulaire sous-cutané jusqu'à sa sortie de l'organisme qui était située entre les deux omoplates.

L'animal était ensuite placé dans une cage spéciale où il se réveillait, pouvait se déplacer et avoir une vie

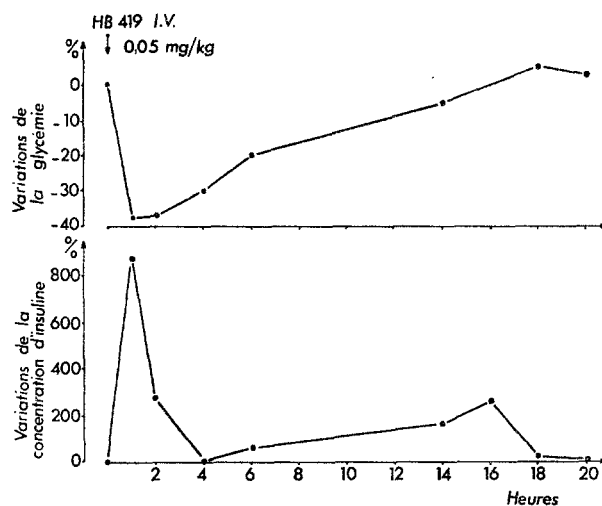


Fig. 8. Sur ce graphique sont représentées les variations de la glycémie et de la concentration d'insuline du sang veineux pancréatico-duodénal après injection intra-veineuse de 0.05 mg/kg de HB 419, chez un chien normal éveillé ayant un cathéter à demeure dans la veine pancréatico-duodénale. Les variations sont estimées en pourcentages par rapport à la valeur au temps zéro

quasi normale. Il demeurait cependant en relation, grâce à un dispositif spécial construit dans le laboratoire, avec les appareils d'analyse en continu. Les expériences, au nombre de quatre, ont été faites chez des animaux privés de nourriture depuis 48 h. Elles ont permis de démontrer que le HB 419 administré par voie intra-veineuse à la dose de 0.05 mg/kg est un puissant agent insulino-sécréteur dont les effets se prolongent entre 16 et 18 h dans les conditions précitées ci-dessus, c'est-à-dire les conditions de jeûne prolongé. La figure 8 représente les résultats d'une de ces expériences.

8. Action potentialisatrice du HB 419 sur les effets hypoglycémiantes propres de l'insuline, le phénomène étant étudié chez le chien dépancréaté

On sait que les sulfamides hypoglycémiantes antérieurement décrits sont capables de potentialiser les effets hypoglycémiantes propres de l'insuline injectée. Ce phénomène a été démontré en opérant sur le chien totalement dépancréaté afin de dissocier ce mécanisme de l'action essentielle insulino-sécrétrice des sulfamides qui s'exerce directement sur les îlots de Langerhans du pancréas.

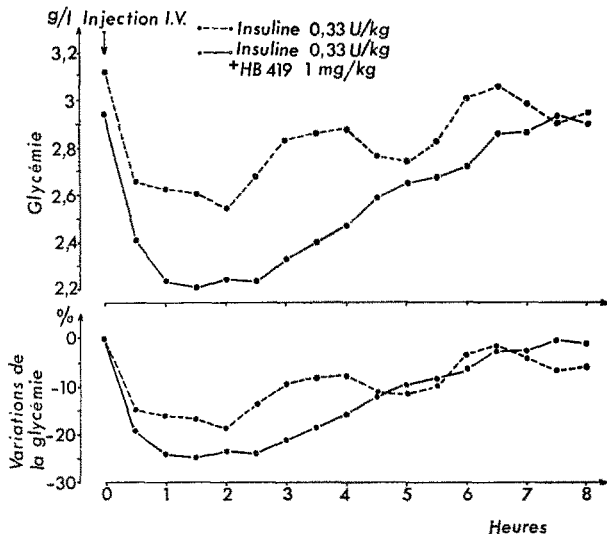


Fig. 9. Ce graphique représente, chez le chien totalement dépancréaté, d'une part les effets de l'injection intraveineuse d'une dose témoin d'insuline (0,33 U/kg) et d'autre part les effets de cette même dose associée à une dose de 1 mg/kg de HB 419, les deux expériences étant réalisées sur le même animal. Chaque courbe a été établie en prenant la moyenne des valeurs obtenues au cours de quatre expériences

Dans un premier temps chaque animal était soumis à l'injection d'une dose-test d'insuline (0,33 u/kg) administrée par voie intra-veineuse afin d'en déterminer l'action hypoglycémiant.

Vingt-quatre heures après, la même dose d'insuline était administrée dans les mêmes conditions, mais en plus, et aussitôt après, l'animal recevait du HB 419 à la dose de 1 mg/kg par voie intra-veineuse.

Les résultats sont consignés dans la figure 9. Ils démontrent clairement que le HB 419 potentialise dans le sens de la profondeur des effets, l'action hypoglycémiant propre de l'insuline.

Le HB 419 possède donc l'effet potentialisateur qui avait été reconnu aux sulfamides hypoglycémiantes précédemment étudiés [9 bis, 5 bis, 5 ter].

9. Effets du HB 419 sur la sécrétion d'insuline explorée à l'aide du pancréas isolé et perfusé du rat

La préparation de pancréas isolé et perfusé du rat, tout tissu gastro-intestinal ou splénique étant exclu, nous a permis d'explorer les effets directs du HB 419 sur le pancréas et en particulier sur les cellules bêta des îlots de Langerhans.

Dans la technique mise au point dans notre laboratoire, le pancréas est prélevé après anesthésie au nembutal (50 mg/kg) chez des rats Wistar mâles pesant de 300 à 350 g et nourris *ad libitum* jusqu'au moment de l'expérience.

Après laparotomie médiane, le pancréas est dans un premier temps opératoire, complètement libéré de tous les organes ou tissus voisins dans l'ordre suivant : exclusion de la rate, de l'estomac, de la graisse épiploïque, enfin du duodénum; dans chaque temps opératoire la ligature et la section des vaisseaux précèdent l'exclusion de l'organe correspondant. La portion pancréatique inférieure droite, qui s'étend de la partie inférieure du duodénum au jéjunum et qui n'est pas irriguée par le tronc coeliaque mais par une branche de l'artère mésentérique supérieure est alors exclue. Les vaisseaux mésentériques supérieurs sont sectionnés en bloc. Un fil est placé sous l'ensemble du pédicule hépatique; un autre sous la veine porte qui est ainsi isolée du reste du pédicule, ce qui permet de la repérer.

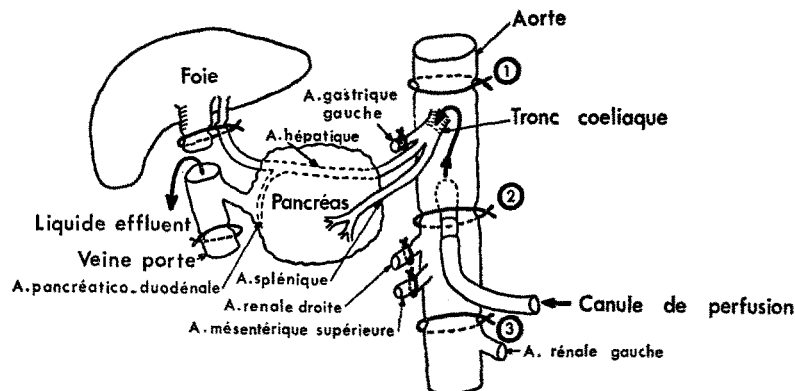


Fig. 10. Schéma de la préparation du pancréas isolé du rat

Quatre expériences ont été réalisées sur le chien dépancréaté depuis 15 jours et traité correctement par l'insuline de manière à maîtriser le diabète. La dernière injection d'insuline ordinaire était administrée 24 h avant le début des expériences proprement dites et le dernier repas 18 h avant.

L'aorte et ses collatérales sont ensuite préparées selon l'ordre suivant: Ligature et section de l'artère rénale droite. Mise en place d'un fil au-dessus du tronc coeliaque [1], d'un fil entre le tronc coeliaque et la mésentérique supérieure [2] et d'un autre au-dessus de la mésentérique supérieure [3] (Fig. 10).

La deuxième partie de l'opération comprend les temps

suivants : ligature du fil situé au-dessus du tronc coeliaque [1], puis de celui situé au-dessous de la mésentérique supérieure [3]. Aussitôt la paroi de l'aorte est incisée et la canule débitant le liquide de perfusion est introduite rapidement dans le cul de sac aortique ainsi formé; la canule est

min et temps : zéro) correspondent à la période témoin et permettent de connaître la sécrétion de l'organe sous la concentration de glucose de 1.5 g/l. Une infusion de HB 419 est établie à partir du temps zéro,

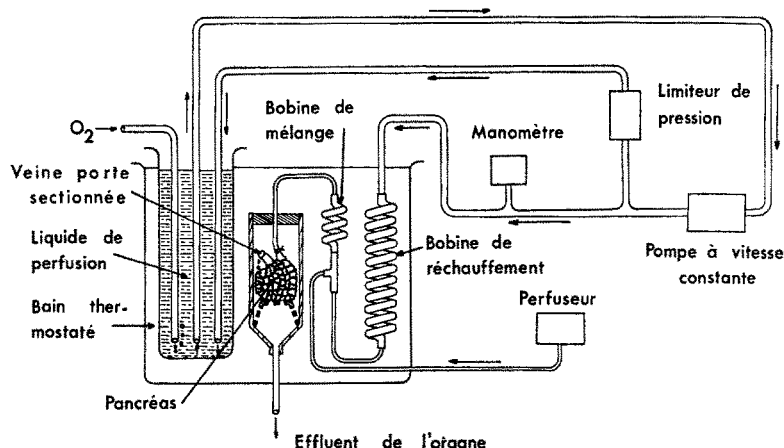


Fig. 11. Schéma du dispositif de perfusion du pancréas isolé du rat

rendue solidaire de l'aorte par le fil situé entre le tronc coeliaque et l'artère mésentérique supérieure [2].

Immédiatement après, la veine porte est totalement sectionnée et le pédicule hépatique est ensuite lié dans son ensemble; ainsi toute surpression liquidienne intra-pancréatique est-elle évitée. Le cul de sac aortique est alors libéré en sectionnant l'aorte au-delà des ligatures 1 et 3.

Il s'écoule environ 30 à 40 min entre la laparotomie et la mise en perfusion du pancréas. Nous devons insister sur le fait que jamais l'irrigation du pancréas soit par le sang de l'animal, soit par le liquide de perfusion n'est interrompue.

L'organe placé dans une cuve maintenue à 37°5 est perfusé par son système artériel, en circuit ouvert (Fig. 11). La circulation du liquide physiologique est assurée par une pompe à débit constant; la pression mesurée au manomètre est automatiquement régulée grâce à un limiteur de pression qui permet l'évacuation d'une partie du liquide perfusé par la pompe. La pression à l'entrée de l'organe est comprise entre 2 et 3.5 cm de mercure, compte-tenu de la chute de pression due à la résistance offerte par le circuit de perfusion entre le manomètre et l'organe. Le liquide effluent de l'organe s'écoule librement par la veine porte sectionnée, il est recueilli à la partie inférieure de la cuve qui contient le pancréas, le débit peut être ainsi à tout instant mesuré; il est dans nos expériences de l'ordre de 2 ml/min. Les substances dont on désire étudier les effets sur la sécrétion d'insuline sont infusées dans le liquide de perfusion à l'aide d'un perfuseur Braun.

Le liquide de perfusion est une solution tampon au bicarbonate dont la composition par litre est la suivante: NaCl: 7.28 g — KCl: 0.354 g — CaCl₂: 0.282 g — MgSO₄·7H₂O: 0.294 g — KH₂PO₄: 0.162 g — NaHCO₃: 1.54 g. Ce liquide est additionné d'albumine de boeuf purifiée (2 g/l) et de glucose (1.5 g/l). Un mélange d'oxygène (93%) et de gaz carbonique (7%) est mis à barboter dans le liquide à la pression atmosphérique. Le pH de la solution est \approx 7.2.

Dans toutes nos expériences il s'est écoulé une période de stabilisation de la préparation d'une durée de 30 minutes entre la mise en perfusion de l'organe et le premier prélèvement destiné au dosage de l'insuline. Un deuxième prélèvement était effectué à un intervalle de 15 min. Ces deux prélèvements (temps : — 15

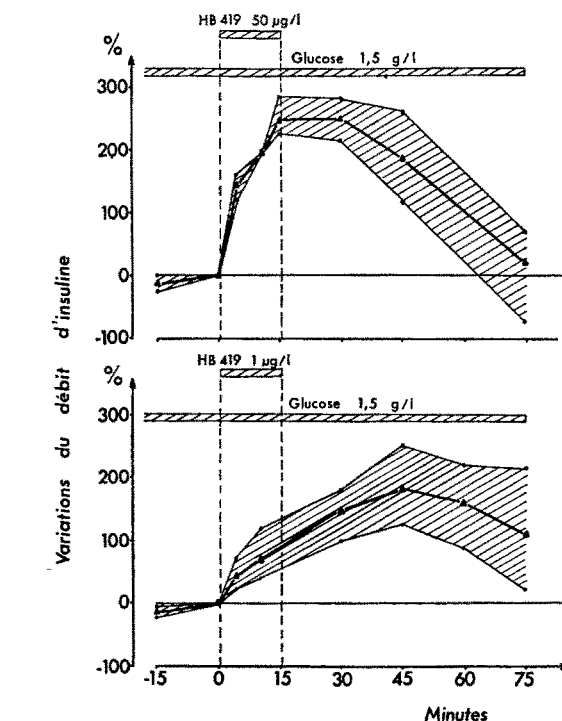


Fig. 12. Variations du débit d'insuline provoquées par le HB 419 sur le pancréas isolé et perfusé du rat. Le produit est introduit dans le liquide de perfusion aux concentrations de 50 µg/l ou de 1 µg/l, pendant 15 min à partir du temps 0. Les variations sont évaluées en pourcentages par rapport à la valeur au temps 0. La ligne ▲—▲ indique la valeur moyenne obtenue au cours de 4 expériences et la zone hachurée l'étendue des variations

pendant 15 min, et le débit d'insuline est alors mesuré à des intervalles de 5 min. Après arrêt de l'infusion de HB 419 des prélèvements sont encore effectués pendant 60 min.

L'insuline sécrétée était dosée dans le liquide efférent de la préparation par la méthode radioimmunologique B de Hales et Randle [5].

Vingt expériences ont été réalisées en utilisant des concentrations différentes de HB 419 s'échelonnant de 500 µg/l à 1 µg/l.

Sur la figure 12 on peut constater que l'addition de HB 419 à la concentration de 50 µg/l accroît d'une manière considérable (plus de 200%) la quantité d'insuline sécrétée. La faible concentration de 1 µg/l augmente encore le débit d'insuline d'environ 150%. Dans les expériences représentées, la sécrétion moyenne au temps zéro était de 48 ng/min pour la première série d'expériences et de 54 ng/min pour la deuxième. Point important, alors que l'addition de HB 419 au liquide de perfusion ne dure que 15 min, l'action insulino-sécrétoire se prolonge longtemps au-delà, pendant environ une heure. On remarquera que les effets insulino-sécrétoires de la concentration faible (1 µg/l) s'installent plus lentement que ceux provoqués par la concentration forte (50 µg/l); ils se prolongent cependant plus longtemps.

Les caractères de cette action insulino-sécrétoire du HB 419 sont donc différents de ceux du glucose *seul* sur cette préparation. Nous avons en effet pu montrer que les effets insulino-sécrétoires du glucose cessent dès que la perfusion de solution glucosée est arrêtée.

Nous avons pu montrer d'autre part qu'il existe une synergie potentialisatrice entre les effets du glucose et ceux du HB 419. Cela signifie que les effets combinés des deux substances sont supérieurs à l'addition des effets de chacune d'entre elles, prise isolément.

10. Antagonisme sur l'insulino-sécrétion entre les effets inhibiteurs du diazoxide et les effets stimulateurs du HB 419

L'antagonisme entre les effets insulino-sécrétoires du diazoxide et ceux du tolbutamide a été antérieurement démontré *in vivo* chez le chien anesthésié et *in vitro* sur le pancréas isolé et perfusé du rat [12, 13, 14].

Il était intéressant de savoir si le HB 419 possédait vis-à-vis du diazoxide un effet semblable à celui du tolbutamide et si cet effet pouvait être obtenu avec des doses moindres.

Nous avons opéré sur le chien anesthésié à l'aide de mébubarbital intra-veineux (30 mg/kg i.v.) et hépariné (5 mg/kg i.v.).

La figure 13 montre sur la glycémie (partie A) et sur l'insulinémie (partie B) les effets de la perfusion intraveineuse de diazoxide (1 mg/kg. min pendant 20 min) et ceux d'une perfusion identique de diazoxide (1 mg/kg. min pendant 20 min) suivie immédiatement par l'injection intraveineuse de HB 419 (0.5 mg/kg).

La glycémie a été dosée d'une manière continue à l'aide de l'auto-analyseur Technicon; un cathéter était introduit dans la veine fémorale par une de ses collatérales. Le débit d'insuline a été mesuré dans la veine pancréatico-duodénale.

On constate d'une manière nette sur la figure que l'administration de HB 419 stoppe immédiatement l'action hyperglycémiant du diazoxide ainsi que l'effet inhibiteur de cette substance sur l'insulino-sécrétion.

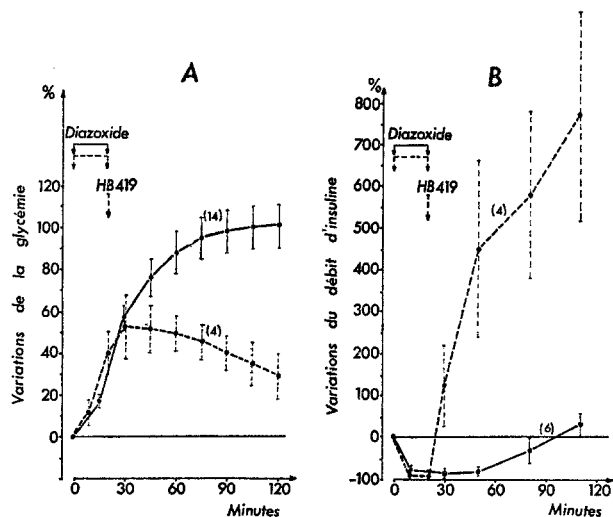


Fig. 13. Ce graphique représente chez des chiens anesthésiés l'action antagoniste du HB 419 vis-à-vis du diazoxide, sur la glycémie (A) et sur le débit d'insuline de la veine pancréatico-duodénale (B). Les variations provoquées sont estimées en pourcentage par rapport à la valeur au temps 0. Chaque point représente la moyenne des valeurs obtenues et porte indication de l'erreur standard de la moyenne, le nombre de chiens utilisés pour établir chaque courbe est indiqué entre parenthèses

Un groupe d'animaux ●—● a reçu uniquement du diazoxide par voie intra-veineuse à la dose de 1 mg/kg et par minute pendant 20 min, l'autre groupe ●---● a reçu à la fin de la perfusion de diazoxide, une injection intra-veineuse de HB 419 à la dose de 0.5 mg/kg

De même, nous avons recherché sur le pancréas isolé et perfusé du rat si l'effet inhibiteur du diazoxide sur l'insulino-sécrétion pouvait être supprimé par l'administration simultanée de HB 419. La figure 14 démontre qu'il en est bien ainsi.

Le HB 419 possède donc le même pouvoir que le tolbutamide de s'opposer aux effets inhibiteurs qu'exerce le diazoxide sur l'insulino-sécrétion.

Les conclusions que l'on peut tirer des expériences que nous avons entreprises sont les suivantes:

1. Le HB 419 est un sulfamide hypoglycémiant extrêmement actif, que le produit soit administré par voie intra-veineuse ou par voie orale.

Dans les conditions expérimentales où nous l'avons comparé au tolbutamide, il s'est avéré 240 fois plus actif que ce dernier lorsque les doses utilisées ont été exprimées en poids, et 440 fois plus actif lorsque les doses ont été exprimées en moles.

2. Le produit ne manifeste pas d'action hypoglycémiant chez l'animal totalement dépancréaté. Le pancréas est donc nécessaire à la manifestation de son action.

3. Nous avons démontré chez le chien anesthésié ou éveillé, que l'action du produit (que celui-ci soit administré par voie intra-veineuse ou par voie digestive) se traduit par une augmentation considérable de la

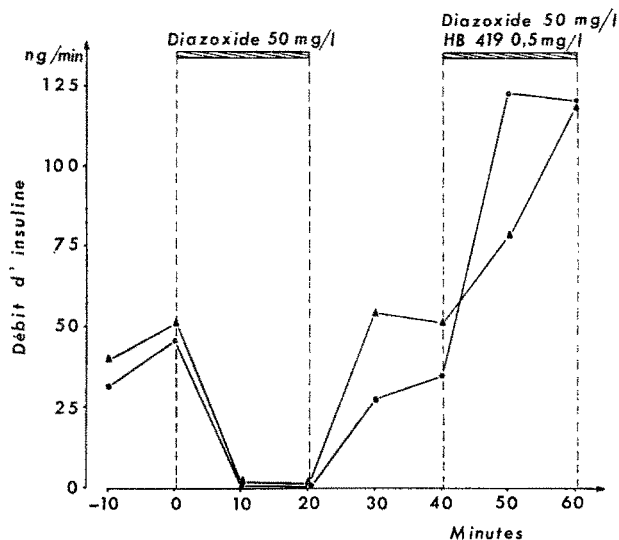


Fig. 14. Action antagoniste du HB 419 vis-à-vis de l'effet inhibiteur du diazoxide sur la sécrétion d'insuline par le pancréas isolé et perfusé du rat. Tout d'abord le diazoxide est introduit seul dans le liquide de perfusion puis il est introduit associé au HB 419

Sur le graphique sont représentés les résultats obtenus dans deux expériences

quantité d'insuline sécrétée par le pancréas. Cette action se prolonge pratiquement pendant 24 heures.

4. Le HB 419 potentialise chez le chien totalement dépancréaté les effets hypoglycémiant d'une dose-test d'insuline.

5. L'action directe du produit sur le pancréas a été démontrée sur le pancréas isolé et perfusé.

6. Le HB 419 s'oppose aux effets inhibiteurs du diazoxide sur l'insulino-sécrétion *in vivo* chez le chien et *in vitro* sur le pancréas isolé et perfusé du rat.

Le HB 419 possède donc les propriétés pharmacologiques et pharmacodynamiques des sulfamides hypoglycémiant antérieurement décrits.

Il manifeste la même action et le même mécanisme d'action que les autres sulfamides hypoglycémiant, mais à des doses qui sont infiniment moindres.

Cette activité à faible dose nous paraît être un des avantages essentiels de ce produit pour des traitements de longue durée dans lesquels il est important de réduire au maximum l'apport pondéral médicamenteux.

Bibliographie

1. ALRIC, R., M. M. MARIANI et A. LOUBATIÈRES: Importance de l'état des éléments figurés du sang et en particulier de celui des globules rouges sur les valeurs du

glucose sanguin mesurées par l'Auto-Analyseur Technicon. *Path. et Biol.* **13**, 506—511 (1965).

2. AUMÜLLER, V., A. BÄNDER, R. HEERDT, K. MUTH, W. PFAFF, F. H. SCHMIDT, H. WEBER u. R. WEYER: Ein neues hochwirksames orales Antidiabetikum. *Arzneimittel-Forsch.* **16**, 1640 (1966).

3. BLISS, C. I.: The statistics of bioassay, p. 482—524. Academic Press N. Y., 1952.

4. GLEEMANN, J.: Assay of insulin-like activity by the isolated fat cell method. I. Factors influencing the response to crystalline insulin. *Diabetologia* **3**, 382—388 (1967).

5. HALES, C. N., and P. J. RANDLE: Immuno-assay of insulin with insulin-antibody precipitate. *Biochem. J.* **88**, 137—146 (1963).

5 bis. HOUSSAY, B. A. et R. H. MIGLIORINI: Renforcement de l'action de l'insuline par les sulfamides hypoglycémiant. *C.R. Soc. Biol.*, séance du 2 août 1956, **150**, 1620—1621.

5 ter. — J. C. PENHOS, E. URGOITI, N. TEODOSIO, J. APELBAUM, and J. BOWKETT: The role of insulin in the action of the hypoglycemic sulfonyl compounds. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **71**, 25 (1957).

6. LOUBATIÈRES, A.: Analyse du mécanisme de l'action hypoglycémiant du p-amino-benzène-sulfamido-iso-propyl-thiodiazol (2254 R.P.). *C.R. Soc. Biol.* **138**, 766—767 (1944).

7. — Relations entre la structure moléculaire et l'activité hypoglycémiant des amino-benzène-sulfamido-alkylthiodiazols. *C.R. Soc. Biol.* **138**, 830—831 (1944).

8. — Etude physiologique et pharmacodynamique de certains dérivés sulfamidés hypoglycémiant. Com. 14^e réunion de l'Association des Physiologistes de langue française, Lyon, 21—22 mai 1946. *Arch. int. Physiol.* **54**, 174—177 (1946).

9. — Physiologie et pharmacodynamie de certains dérivés sulfamidés hypoglycémiant. Contribution à l'étude des substances synthétiques à tropisme endocrinien. Thèse Doctorat ès-Sciences Naturelles, Montpellier, 1^{er} juin 1946, no. 86, 93 pages, 16 figures, Causse, Graille et Castelnaud édit. (1946).

9 bis. — P. BOUYARD, C. FRUTEAU DE LACLOS, A. SASSINE et R. ALRIC: Renforcement et prolongation des effets de l'insuline par les sulfamidés hypoglycémiant et antidiabétiques. *C.R. Soc. Biol.*, séance du 9 juillet 1956, **150**, 1601—1603.

10. — L. GOLDSTEIN, J. METROPOLITANSKI et J. SCHAAP: Etude expérimentale chez le chien des accidents nerveux irréversibles consécutifs à l'hypoglycémie prolongée provoquée par le sulfa-iso-propyl-thiodiazol (V.K. 57 ou 2254 R.P.). Com. présentée les 28—30 octobre 1942 au 43^e Congrès des médecins aliénistes et neurologistes de France et des pays de langue française, p. 415. Montpellier: C.R., Masson édit., 1942.

11. —, et M. M. MARIANI: Etude pharmacologique et pharmacodynamique d'un sulfonylurée hypoglycémiant particulièrement actif, le glybenzcyclamide, *C.R. Acad. Sc.*, Paris **265**, série D, 643—645. 1967.

12. — — R. ALRIC et J. CHAPAL: Antagonistic mechanism of actions of tolbutamide and diazoxide on insulin secretion. In "Tolbutamide after ten years", p. 100—113, Brook-Lodge Symposium. *Excerpta med.* (1967).

13. — — — et A. PORTAL: Antagonisme entre le diazoxide et le tolbutamide sur l'insulino-sécrétion. Etude *in vitro* sur le pancréas isolé et perfusé du rat. *C.R. Soc. Biol.* **161**, 1755—1759 (1967).

14. — — G. RIBES et H. DE MALBOSC: Etude des effets antagonistes du diazoxide et du tolbutamide sur la glycémie et sur l'insulino-sécrétion du chien. *C.R. Soc. Biol.* **161**, 1751—1754 (1967).

15. — — J. CHAPAL: Action synergique entre glucose et sulfamides hypoglycémians sur l'insulino-sécrétion, C.R. Acad. Sc., Paris Série D, **267**, 123. 1968.
16. — — — G. Ribes et H. DE MALBOSC: Etude expérimentale du glybenzcyclamide (HB 419). Abstract n^o. 89. 4e réunion annuelle de l'Association Européenne pour l'Etude du Diabète. Louvain, 22—24 juillet 1968, p. 75.
17. SCHWARZ, H., J. AMMON, J.E. YEBOAH, H.E. HILDEBRANDT u. E.F. PFEIFFER: Förderung der Insulinsekretion in vitro durch ein neues, hochwirksames Antidiabetikum. *Diabetologia* **4**, 10—15 (1968).

Prof. Dr. A. LOUBATIÈRES
Institut de Biologie
Faculté de Médecine
Boulevard Henri IV
Montpellier, France