NNT : 0000AIXM0000

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
le 16 décembre 2024 par

Oscar Leonardo AVENDAÑO LEON

Structures innovantes au service de maladies tropicales négligées : amidoximes antileishmaniennes

Discipline
Sciences Chimiques

École doctorale
ED 250 – Sciences Chimiques de Marseille

Laboratoire/Partenaires de recherche
ICR CNRS UMR 7273

Composition du jury

Sylvie RADIX Université de Lyon 1	Rapportrice
Yves BLACHE Université de Toulon	Rapporteur
Pierre VERHAEGHE Université de Toulouse	Président du jury
Patrice VANELLE Aix-Marseille Université	Directeur de thèse
Christophe CURTI Aix-Marseille Université	Co-directeur de thèse

Affidavit

Je soussigné, Oscar Leonardo Avendaño Leon, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique du Prof. Christophe CURTI et du Prof. Patrice VANELLE, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect, à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université, relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 24 octobre 2024



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International.

Liste des publications et participation aux conférences

1) Liste des publications réalisées dans le cadre du projet de thèse :

I. O.L. Avendaño Leon, C. Curti, H. El-Kashef, Y. Kabri, S. Redon, P. Vanelle, 4-(5-Benzyl-3-((4-fluorophenyl)sulfonyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-2-nitrobenzamide, Molbank 2023 (**2023**) M1750. https://doi.org/10.3390/M1750.

II. O.L. Avendaño Leon, C. Curti, F.M. Santos Urbancg Moncorvo, Y. Kabri, S. Redon, E.C. Torres-Santos, R. Paoli-Lombardo, P. Vanelle, Diethyl (5-Benzyl-2-(4-(*N*′-hydroxycarbamimidoyl)phenyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-3-yl)phosphonate, Molbank 2023 (**2023**) M1736. https://doi.org/10.3390/M1736.

III. O.L. Avendaño Leon, F.M. Santos Urbancg Moncorvo, C. Curti, Y. Kabri, S. Redon, P. Vanelle, E.C. Torres-Santos, Hit-to-lead optimization of 4,5-dihydrofuran-3-sulfonyl scaffold against *Leishmania amazonensis*. Effect of an aliphatic moiety, European Journal of Medicinal Chemistry 280 (**2024**) 116935. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116935.

IV. F. Maia Santos Urbancg Moncorvo , O. L. Avendaño Leon, C. Curti, Y. Kabri, S. Redon, E.C. Torres-Santos and Patrice Vanelle. Enhancing Antileishmanial Activity of Amidoxime-Based Compounds Bearing a 4,5-Dihydrofuran Scaffold: *in vitro* Screening Against *Leishmania amazonensis*, Molecules (**2024**), *29*(22), 5469. https://doi.org/10.3390/molecules29225469.

2) Participation aux conférences et écoles d'été au cours de la période de thèse :

1. Poster. 10èmes Journées Franco-italiennes de la Chimie. Toulon - France, 2022.
2. Poster. WorldLeish-7, Congrès international sur la leishmaniose. Carthagène - Colombie, 2022.
3. Communication orale. Journée Scientifique de l'Institut de Chimie Radicalaire. Marseille - France, 2023.
4. Communication orale. GP_2A 31st Annual Medicinal Chemistry Conference. Marseille - France, 2023.
5. Communication orale. Journée "Jeudi scientifique", à l'IUT de Saint-Jérôme. Marseille - France, 2023.
6. Poster. Pharma-industrie. Marseille - France, 2023.
7. Poster. RCOM-11. Marseille - France, 2024.

Résumé

Ce travail de thèse, portant sur la découverte de nouveaux candidats médicaments contre la leishmaniose chez l'homme a pour objectif de poursuivre les analyses de pharmacomodulation sur des composés Hits précédemment identifiés au sein du laboratoire LPCR. Ces molécules, caractérisées par un noyau hétérocyclique 4,5-dihydrofurane et le groupement amidoxime, sont des structures originales. Afin de guider cette étape d'optimisation, divers critères ont été pris en compte : la possibilité d'administration par voie orale, l'utilisation de méthodes de synthèse les plus simples possibles, la recherche d'un meilleur profil activité-toxicité. Du fait du manque d'informations sur le mécanisme d'action ou la cible spécifique de ces molécules, les modifications structurelles proposées ont adopté une approche basée sur le ligand (*Ligand-Based Drug Design*). Des réactions de cyclisation radicalaire oxydative médiées par l'acétate de manganèse ont permis d'accéder à de nouveaux composés 4,5-dihydrofurane substitués en position 3 principalement par des dérivés carboxyliques de type amide ou ester. Le criblage phénotypique *in vitro* a été effectué avec le soutien de l'Institut Oswaldo Cruz au Brésil, mesurant l'activité contre une souche de *Leishmania amazonensis* promastigote, ainsi que pour les molécules les plus prometteuses, la toxicité dans des cellules de macrophages murins et l'activité contre la forme amastigote intracellulaire. Ce travail a permis d'identifier des composés avec des index de sélectivité très favorables.

Mots clés : Amidoxime, *Leishmania*, Pharmacomodulation, 2,3-dihydrofurane, acétate de manganèse.

Abstract

This thesis, focused on discovering new drug candidates against human leishmaniasis, aimed to continue the pharmacomodulation analyses of Hit compounds previously identified at the LPCR laboratory. These molecules, characterized by a 4,5-dihydrofurane heterocyclic scaffold bearing an amidoxime group, are original structures. Various criteria were considered to guide this Hit-to-Lead project: the possibility of oral administration, the use of the simplest possible synthesis methods, and the pursuit of a better activity-toxicity profile. Due to the lack of information on the mechanism of action or specific target of these molecules, the proposed structural modifications adopted a Ligand-Based Drug Design approach. Oxidative radical cyclisation reactions mediated by manganese acetate allowed access to new 4,5-dihydrofurane compounds, substituted at position 3 by carboxylic derivatives, such as amides or esters. The *in vitro* phenotypic screening was carried out with the support of the Oswaldo Cruz Institute in Brazil, measuring activity against *Leishmania amazonensis* promastigote strains, as well as, among the molecules selected with the best activity, toxicity in murine macrophage cells and activity against the intracellular amastigote form was performed.

Keywords: Amidoxime, *Leishmania*, Pharmacomodulation, 2,3-dihydrofuran, manganese acetate.

Remerciements

Au terme de ce travail de thèse au Laboratoire de Pharmaco-Chimie Radicalaire de Marseille, je tiens à remercier toutes les personnes ayant participé et/ou m'ayant soutenu de près ou de loin durant ce travail de thèse. Je tiens tout d'abord à remercier les différents membres du jury, toute ma gratitude pour l'intérêt porté à mon travail. Je remercie également tous les membres de la « grande famille LPCR » d'Aix-Marseille Université.

Aux Professeurs Patrice VANELLE et Christophe CURTI.
Exprimer ma gratitude pour avoir accepté de diriger ma thèse, pour votre bienveillance, votre attention et pour m'avoir transmis la rigueur scientifique essentielle à la recherche.

J'adresse mes sincères remerciements au Professeur Pierre VERHAEGHE, de l'Université de Toulouse, pour l'honneur qu'il me fait en siégeant dans ce jury de thèse. Je remercie également le Docteur Sylvie RADIX, de l'Université Lyon 1, en sa qualité de rapporteuse. De même, j'exprime ma gratitude au Professeur Yves BLACHE, de l'Université de Toulon, pour avoir accepté, en sa qualité de rapporteur, d'évaluer ce manuscrit de thèse. La qualité de vos commentaires et de vos contributions a été précieuse et enrichissante, me permettant d'améliorer la clarté de ce travail.

Aux Dr Youssef KABRI et Dr Sébastien REDON, pour votre encadrement au jour le jour à la paillasse et pour votre amitié.

Au Dr Omar KHOUMERI, pour votre amitié et votre créativité.

Au Dr Romain PAOLI-LOMBARDO, pour votre amitié, soutien et la discussion politique sur la Leishmaniose.

Au Dr Nicolas PRIMAS, pour sa bonne humeur permanente, amabilité, et ses remarques pertinentes sur mon travail lors des séminaires de laboratoire.

Je remercie nos partenaires du FIOCRUZ. Au Dr Eduardo Caio TORRES-SANTOS et Fabiana MAIA SANTOS URBANCG MONCORVO, pour avoir réalisé les tests biologiques.

Au Dr Vincent REMUSAT, pour votre soutien, pour la gestion du service de RMN et pour votre implication dans le bon fonctionnement du laboratoire LPCR.

Je remercie chaleureusement Françoise ARECCHI, pour sa douceur, son soutien constant et la confiance qu'elle m'a accordée.

Je remercie également les Docteurs Julie BROGGI, Fanny MATHIAS, Manon ROCHE, Karine BARRAL, Cédric SPITZ, Marc MONTANA, Caroline CASTERA-DUCROS, Armand GELLIS, ainsi que les Professeurs Thierry TERME, Maxime D. CROZE et Pascal RATHELOT pour leur professionnalisme et leur sympathie tout au long de ce projet.

Je souhaite également remercier tous les doctorants, anciens doctorants et stagiaires que j'ai eu le plaisir de rencontrer et de côtoyer au laboratoire. Monsieur Aurélien CLOET merci pour la gentilesse ; A Alexandre BENECH, Inès JACQUET, Safeh KHEMIRI et Saïd AIT TALEB, en leur adressant mes meilleurs vœux pour leurs thèses et la suite de leur carrière.

Je remercie tout particulièrement à Docteur Nadhrata ASSANI, avec qui j'ai eu le plaisir de partager de conversations agréables sur les différences et les similitudes de nos cultures.

Je remercie tout particulièrement Inès JACQUET, qui n'a pas hésité à m'apporter son aide ainsi que de bonnes tasses de café. Merci pour tes nombreuses qualités humaines et professionnelles.

Aux personnes ayant participé à ce travail, de façon directe ou indirecte.

Au Ministère des Sciences de la République de la Colombie, pour le soutien financier.

A ma famille
A Bibiana CARDOZO, pour avoir toujours été présente. Ma source d'inspiration scientifique et humaine. La pharmacométricienne la plus brillante que je connaisse.

A mes parents, Maria Lucidey Leon et Noel Tangarife Arango, merci d'avoir été d'un soutien sans faille. Dans un monde où l'immédiateté prédomine, vous m'avez inculqué la valeur du travail constant, acharné et discipliné.

A Sarita, Dilan, Martin, Lina et Lourdes, les enfants, ainsi qu'à Karen, Fabio, William et Brian, mes frères et ma sœur, ce travail vous est également dédié.

A Juan Carlos Páez, enseignant au Libano Tolima, ce travail vous est également dédié.

A ma famille Française-Péruvienne-Mexicaine :
Anne, Vincent, Catherine, Laura, Andrea, merci.

A mes amies
Je remercie également tous les membres de la « grande famille LPCR »
Je souhaite aussi remercier tous les doctorants, ex-doctorants et stagiaires que j'ai eu le plaisir de rencontrer et côtoyer au laboratoire.

Table des abréviations

AcOH : Acide acétique
AMCPB : Acide métachloroperbenzoïque
AMM(e) : Autorisation de mise sur le marché
AMM(t) : Administration de masse de médicament
ASIR : Age-standardized incidence rate (Taux d'incidence standardisé sur l'âge)
ASMR : Age-standardized mortality rate (Taux de mortalité standardisé par âge)
AVCI : Années de vie corrigées de l'incapacité
CDC : Centers for Disease Control and Prevention
CC_{50} : Concentration cytotoxique pour 50 % des cellules
CI_{50} : Concentration inhibant la croissance de 50 % des parasites
CYP450 : Cytochrome P450
DALYs : Disability-adjusted life years - Les années de vie corrigées de l'incapacité
DCM : Dichlorométhane
DME : Diméthoxyéthane
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DNDi : Drugs for Neglected Diseases initiative
EMA : European Medicines Agency (agence européenne des médicaments)
EtOH : Éthanol
FAD : Flavine adénine dinucléotide
FMN : Flavine mononucléotide
IS : Index de sélectivité
LC : Leishmaniose cutanée
LC-MS : Liquid chromatography-mass spectrometry (chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse)
LCD : Leishmaniose cutanée diffuse
LCM : Leishmaniose cutanéo-muqueuse
LCPKA : Leishmaniose cutanée post kala-azar
LV : Leishmaniose viscérale
MO : Micro-ondes
MTN : Maladie tropicale négligée
MITVE : Maladie infectieuse à transmission vectorielle émergente
MZN : Maladie zoonotique négligée
NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NECT : Nifurtimox-eflornithine combination therapy
NTD : Neglected tropical disease
ODD : Objectifs de développement durable
OMS : Organisation mondiale de la santé
Rdt : Rendement
RSA : Relations structure-activité
S_N2 : Substitution nucléophile de type 2
S_NAr : Substitution nucléophile sur aromatique
SSP : Soins de Santé Primaires

TA : Température ambiante
TDR : Training Tropical Diseases
TPP : Target Product Profile
USD : United States dollar
WHO : World Health Organization
VNS : Vicarious nucleophilic substitution

Table des matières

Affidavit **3**
Introduction **13**
1. La leishmaniose, un défi de Santé Publique **15**
1.1. Les Maladies Tropicales Négligées 15
1.1.1. Contexte sanitaire 15
1.1.2. Contexte politique 24
1.1.3. Réflexions autour du mot « négligé » 27
1.1.4. Capacités des Agences sanitaires 40
1.1.5. Maladies infectieuses émergentes à transmission vectorielle 44
1.2. Les Leishmanioses 46
1.2.1. Introduction 46
1.2.2. Surveillance épidémiologique mondiale 50
1.2.3. Taxonomie et morphologie du parasite 54
1.2.4. Changements structurels promastigote-amastigote 57
1.2.5. Cycle de vie et vecteurs 60
1.2.6. Réponse immunitaire et réponse clinique 62
1.2.7. Le diagnostic 68
1.2.8. Traitements et recherche pharmacothérapeutique 72
1.2.9. La découverte de nouveaux médicaments contre la Leishmaniose 90
1.2.10. Travaux Collaboratifs et Renforcement des Capacités de Recherche 103
1.3. Conclusion générale du chapitre 105
2. Objectif et méthodologie **106**
2.1. Considérations générales sur le projet 106
2.1.1. Voie d'administration envisagée 106
2.1.2. Cibles Potentielles 107
2.1.3. Pharmacocinétique dans la recherche des nouveaux médicaments 108
2.1.4. Énantiomères 109
2.1.5. Espèce de *Leishmania* ciblée 110
2.1.6. Amidoximes antileishmaniennes 110
2.1.7. Chimie 112
2.2. Stratégies spécifiques au projet 115
2.2.1. Objectif spécifique 115
2.2.2. L'approche de la méthode de recherche 116
2.2.3. Biologie 116
3. Résultats et discussions **118**
3.1. Effet du groupement phosphonate 118
3.2. Optimisation de la méthode de synthèse du groupement amidoxime 119
3.3. Pharmacomodulation : série aliphatique 120
3.4. Pharmacomodulation : série aromatique 121
3.5. Pharmacomodulation : série complémentaire, effet de l'hétéroatome azote en différentes positions et effet du groupement nitro. 122
3.6. Série supplémentaire demandée par l'équipe partenaire. 125

3.7. Conclusion du chapitre 127
3.8. Travaux complémentaires 128
4. Conclusion générale 129
4.1. Perspectives 131
5. Partie expérimentale 135
6. Annexes 154

Introduction

Après l'obtention de mon diplôme de pharmacien en Colombie, en 2011, j'ai travaillé dans le domaine de la santé publique et de la pharmacovigilance. J'ai ainsi commencé ma carrière professionnelle à la dernière étape du cycle de vie d'un médicament,[1] la phase IV, lorsque le médicament est commercialisé et que des actions de suivi pour d'éventuelles effets indésirables sont demandées. Cela m'a mis en contact étroit avec des personnes directement ou indirectement touchées par une maladie parasitaire très particulière : la leishmaniose.

Le processus de surveillance mis en place par la pharmacovigilance s'est révélé complexe, notamment en raison des difficultés liées à l'utilisation injectable[2] des médicaments utilisés en dehors du milieu hospitalier.[3] Cependant, cette expérience m'a conduit à me poser une question : pourquoi ne pas envisager des options thérapeutiques plus confortables[4] pour soigner les patients atteints de leishmaniose ? Aujourd'hui, alors que je rédige ce rapport, j'ai une perspective nouvelle : créer des nouvelles molécules thérapeutiques, avec les nombreuses contraintes inhérentes à la conception et au développement de nouveaux médicaments.

La recherche de nouvelles options thérapeutiques contre la leishmaniose nécessite une collaboration étroite entre les acteurs publics et privés pour répondre aux défis financiers, scientifiques et politiques. Bien que l'objectif principal de ce travail de recherche soit axé sur la pharmacochimie, ciblant spécifiquement cette parasitose, une première partie du manuscrit traitera succinctement du contexte politique, global et complexe, lié à cette maladie.

Classée parmi les maladies tropicales négligées[5] (MTN) par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la leishmaniose est généralement associée aux populations vulnérables vivant dans des pays marqués par des contextes politiques, économiques et sociaux complexes. Cependant, certains commentaires dans le chapitre 1.1.2 remettent en question ce contexte. Cette maladie représente un défi global pour les zones épidémiologiquement affectées et constitue un risque émergent considérable, motivant ainsi les efforts internationaux[6] visant à réduire son impact à l'échelle mondiale.

[1] Le cycle de vie des médicaments commence généralement par une étape de découverte et de développement préclinique, suivie par les phases de développement clinique (Phases I, II et III). Après l'obtention des autorisations de mise sur le marché par les autorités réglementaires, le processus se poursuit avec la commercialisation et le suivi post-commercialisation, incluant les programmes de pharmacovigilance. - N. Bere, How are medicines evaluated at the EMA. From laboratory to patient: the journey of a medicine assessed by EMA. (2020). https://www.ema.europa.eu/en/about-us/what-we-do/authorisation-medicines/how-ema-evaluates-medicines-human-use (Consulté le 04/04/2024).

[2] La pharmacothérapie de la leishmaniose est centrée essentiellement sur des médicaments injectables.

[3] Dans le cadre des programmes d'accès aux services de soins de la Colombie, les médicaments antileishmaniens sont fréquemment utilisés de manière ambulatoire vu la condition clinique et sociale du patient.

[4] Confortable. Même si ce mot ne représente pas un concept pharmaceutique ou chimique, il est selon mon expérience le mot qui transmet une idée ou notion globale de commodité souhaitée dans le contexte des prestations de services des soins-médicines-patients.

[5] Assemblée Mondiale de la Santé. WHA73(33) (2020) - Feuille de route pour les maladies tropicales négliges 2021-2030. WHA70.16 (2017) – Approche intégrée de la lutte contre les maladies à transmission vectorielle. WHA66.12 (2013) – Maladies tropicales négligées.

[6] Assemblée générale des Nations unies. A/RES/70/1 (2015). Transformer notre monde : le Programme de développement durable à l'horizon 2030.

Dans les pays à faible revenu, les patients atteints de cette maladie ont un besoin essentiel de médicaments présentant un meilleur rapport coût-efficacité. Malgré la disponibilité de certaines thérapies, l'accès aux soins efficaces reste limité. De plus, la compréhension encore limitée de la physiopathologie de la leishmaniose, l'absence de vaccin chez l'homme et les mécanismes de résistance aux traitements existants développés par le parasite posent des défis majeurs.

D'ailleurs, bien que des mesures préventives telles que le contrôle du vecteur,[7] l'installation de barrières physiques protectrices et la gestion des réservoirs animaux aient contribué à limiter l'épidémiologie de la maladie dans les zones tropicales et subtropicales, le changement climatique augmente les risques de propagation du parasite dans des régions jusqu'alors non endémiques.

Enfin, bien que la leishmaniose, sous ses trois principales formes cliniques, n'ait pas un poids[8] (la charge de la maladie) comparable à d'autres maladies telles que le paludisme ou le VIH, son impact est considérable sur la qualitéde vie[9] des personnes affectées[10] que ce soit au niveau physique, psychologique et/ou social. Intégrer ce contexte global dans la recherche est essentiel pour élaborer des stratégies collaboratives et multidisciplinaires efficaces. J'ai l'honneur de présenter ce manuscrit qui expose mes travaux de recherche effectués dans le cadre de ma thèse en pharmacochimie, dans le but de contribuer à la recherche de nouvelles options thérapeutiques contre cette maladie.

Ce travail de recherche vise aussi à mieux cerner le contexte politique des maladies tropicales négligées (MTN) et les défis posés en matière de financement de la recherche. Ces difficultés ne découlent pas uniquement du désintérêt de l'industrie pharmaceutique ; elles résultent également d'un ensemble complexe de rapports de force et de relations géopolitiques étendues et souvent intangibles. Parmi les MTN, la leishmaniose semble aussi avoir une place non négligeable sur le plan militaire et dans les conflits de territoires, dépassant ainsi les frontières de la santé publique.

[7] D. Claborn, The biology and control of leishmaniasis vectors, J Global Infect Dis 2 (2010) 127. https://doi.org/10.4103/0974-777X.62866.

[8] [1] P.J. Hotez, M. Alvarado, M.-G. Basáñez, I. Bolliger, R. Bourne, M. Boussinesq, S.J. Brooker, A.S. Brown, G. Buckle, C.M. Budke, H. Carabin, L.E. Coffeng, E.M. Fèvre, T. Fürst, Y.A. Halasa, R. Jasrasaria, N.E. Johns, J. Keiser, C.H. King, R. Lozano, M.E. Murdoch, S. O'Hanlon, S.D.S. Pion, R.L. Pullan, K.D. Ramaiah, T. Roberts, D.S. Shepard, J.L. Smith, W.A. Stolk, E.A. Undurraga, J. Utzinger, M. Wang, C.J.L. Murray, M. Naghavi, The Global Burden of Disease Study 2010: Interpretation and Implications for the Neglected Tropical Diseases, PLoS Negl Trop Dis 8 (2014) e2865. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002865. [2] Global, regional, and national burden of 12 mental disorders in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019, The Lancet Psychiatry 9 (2022) 137–150. https://doi.org/10.1016/S2215-0366(21)00395-3. [1] O. Dutta, A. Prasanth, A. Kumari, K. Akanksha, F. Deeba, N. Salam, Burden of dengue, leishmaniasis and lymphatic filariasis in India and its states from 1990–2019: Analysis from the Global Burden of Disease study (GBD 2019), PLoS ONE 18 (2023) e0292723. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0292723.

[9] B. Pal, K. Murti, N.A. Siddiqui, P. Das, C.S. Lal, R. Babu, M.K. Rastogi, K. Pandey, Assessment of quality of life in patients with post kala-azar dermal leishmaniasis, Health Qual Life Outcomes 15 (2017) 148. https://doi.org/10.1186/s12955-017-0720-y.

[10] M.A. Al-Kamel, Stigmata in cutaneous leishmaniasis: Historical and new evidence-based concepts, Our Dermatol Online 8 (2017) 81–90. https://doi.org/10.7241/ourd.20171.21.

1. La leishmaniose, un défi de Santé Publique

1.1. Les Maladies Tropicales Négligées

1.1.1. Contexte sanitaire

Ce chapitre introductif aborde les maladies tropicales négligées (MTN) en soulignant deux principaux aspects. Premièrement, la leishmaniose est reconnue comme une MTN par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).[11] Deuxièmement, il existe un programme universel pour le développement durable et les MTN y apparaissent comme prioritaires en 2030.[12]

Encadré 1. Leishmaniose, MTN et objectif de développement durable ODD

MTN[13]	Etiologie	Observation
Ulcère de Buruli	Bactérienne	
Maladie de Chagas	Parasitaire	
Dengue	Virale	‡
Chikungunya	Virale	
Dracunculose	Parasitaire	
Echinococcose	Parasitaire	
Trématodoses d'origine alimentaire	Parasitaire	
Trypanosomiase humaine africaine	Parasitaire	
Leishmaniose	**Parasitaire**	Rés. - OMS A60/10[14] ‡
Lèpre	Bactérienne	
Filariose lymphatique	Parasitaire	
Onchocercose	Parasitaire	
Rage	Virale	‡
Schistosomiase	Parasitaire	
Géohelminthiases	Parasitaire	‡
Taeniasis et cysticercose	Parasitaire	
Trachome	Bactérienne	
Pian	Bactérienne	
Mycétome, chromoblastomycose et autres mycoses profondes	Fongique	2016-2017*
Gale et autres ectoparasitoses	Parasitaire	2017*
Envenimation par morsure de serpent	Neurotoxines	2017*
Noma	Non spécifiques	2023[15] *

Stratégie	Au moins une maladie tropicale négligée a été éliminée dans 47 pays.
ODD – Cible 3.3	D'ici à 2030, mettre fin à l'épidémie de SIDA, à la tuberculose, au paludisme et aux maladies tropicales négligées et combattre l'hépatite, les maladies transmises par l'eau et autres maladies transmissibles
Indicateur 3.3.5 (A/RES/71/313)	Nombre de personnes pour lesquelles des interventions contre les maladies tropicales négligées sont nécessaires.

* La procédure formelle d'ajout de nouvelles maladies à la liste des maladies tropicales négligées a été établie par le STAG-NTD en 2016.

Conditions pathologiques qui
1. affectent de manière disproportionnée les populations vivant dans la pauvreté ; et provoquent une morbidité et une mortalité importantes – y compris la stigmatisation et la discrimination – dans ces populations, justifiant une réponse mondiale.
2. affectent principalement les populations vivant dans les zones tropicales et subtropicales.
3. peuvent être immédiatement contrôlées, éliminées ou éradiquées à grande échelle en appliquant une ou plusieurs des cinq stratégies de santé publique adoptées par le Département de contrôle des MTN, et/ou
4. sont relativement négligées par la recherche – c'est-à-dire que l'allocation des ressources n'est pas proportionnelle à l'ampleur du problème – lorsqu'il s'agit de développer de nouveaux diagnostics, médicaments et autres outils de contrôle.

‡ La leishmaniose viscérale, la dengue, la rage et les géohelminthiases sont reconnues par toutes les agences régionales de l'OMS : Bureau régional de la région du Pacifique occidental (WPRO) ; Bureau régional de l'Asie du Sud-Est (SEARO) ; Bureau régional de l'Europe (EURO) ; Bureau régional de la Méditerranée orientale (EMRO) ; Bureau régional des Amériques (AMRO) ; Bureau régional de l'Afrique (AFRO).

[11] Neglected tropical diseases, World Health Organization (n.d.). https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases (Consulté le 22/03/2024).
[12] 17 Objectifs pour transformer notre monde. Les objectifs de développement durable 2030, Nations Unies (n.d.). https://www.un.org/sustainabledevelopment/fr/ (Consulté le 22/03/2024).
[13] Control of Neglected Tropical Diseases. The NTD road map: together towards 2030, World Health Organization (n.d.). https://www.who.int/teams/control-of-neglected-tropical-diseases/overview (Consulté le 04/02/2024).
[14] Résolution A60/10, 22 mars 2007 – Lutte contre la leishmaniose. Soixantième assemblée mondiale de la santé. https://apps.who.int/gb/f/index.html (Consulté le 08/03/2024).
[15] Il s'agit de la dernière pathologie officiellement reconnue comme MTN par l'OMS. La résolution officielle pour sa reconnaissance est attendue en 2024. https://www.who.int/fr/news/item/15-12-2023-who-officially-recognizes-noma-as-a-neglected-tropical-disease (Consulté le 08/04/2024).

L'OMS classe les MTN comme un ensemble de maladies étroitement liées à la pauvreté, principalement endémiques - mais pas exclusivement, ni de manière homogène[16] - dans les zones tropicales et subtropicales,[17] affectant environ 1,7 milliard de personnes. Ces maladies sont souvent associées à diverses comorbidités, y compris des troubles de la santé mentale.[18] En 2023, la République Démocratique du Congo a révélé des niveaux élevés de dépression et d'anxiété parmi les personnes affectées par les MTN, soulignant le besoin urgent d'intégrer les soins de santé mentale dans les programmes de gestion des MTN.[19] En Inde, la même année, une intervention de soutien par les pairs a démontré des améliorations dans le bien-être mental et la réduction du phénomène de stigmatisation parmi les personnes souffrant de lèpre ou de filariose lymphatique.[20]

Entre 1990 et 2019, les MTN ont en moyenne eu un taux d'incidence standardisé selon l'âge de 754 pour 100 000 [age-standardized incidence rate (ASIR)], un taux de mortalité standardisé selon l'âge de 1 pour 100 000 [age-standardized mortality rate (ASMR)] et un taux d'années de vie ajustées sur l'incapacité (DALY) standardisé selon l'âge de 170 pour 100 000 [acronyme anglais, le DALY (pour Disability-Adjusted Life Year)]. Une augmentation globale du ASIR, mais une diminution du DALY ont été notées durant cette période. Les tendances varient selon la région et l'indice socio-démographique, avec une affectation plus importante en Afrique sub-saharienne et en Amérique latine. Les groupes vulnérables identifiés étaient les enfants et les personnes âgées, avec des femmes présentant un ASIR plus élevé mais avec une mortalité et des taux de DALY inférieurs à ceux des hommes.[21]

Les MTN étaient historiquement répandues dans les communautés des pays à faible revenu, mais deviennent aussi présentes dans les pays à revenu intermédiaire supérieur, dont plusieurs en Europe. Une augmentation du nombre de cas de MTN en Italie,[22] est rapportée en raison de la migration, des voyages internationaux et du changement climatique.

Les efforts visant le contrôle des MTN impliquent une combinaison de stratégies telles que l'administration massive de médicaments, la lutte antivectorielle,[23] l'amélioration de

[16] [1] S. Sasidharan, P. Saudagar, Leishmaniasis: where are we and where are we heading?, Parasitol Res 120 (2021) 1541–1554. https://doi.org/10.1007/s00436-021-07139-2. [2] A. Mavridou, O. Pappa, O. Papatzitze, C. Dioli, A.M. Kefala, P. Drossos, A. Beloukas, Exotic Tourist Destinations and Transmission of Infections by Swimming Pools and Hot Springs—A Literature Review, IJERPH 15 (2018) 2730. https://doi.org/10.3390/ijerph15122730.

[17] D. Engels, X.-N. Zhou, Neglected tropical diseases: an effective global response to local poverty-related disease priorities, Infect Dis Poverty 9 (2020) 10. https://doi.org/10.1186/s40249-020-0630-9.

[18] E. Litt, M.C. Baker, D. Molyneux, Neglected tropical diseases and mental health: a perspective on comorbidity, Trends in Parasitology 28 (2012) 195–201. https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.03.001.

[19] M.L. Seekles, J.K. Kadima, Y. Ding, C.B. Bulambo, J.J. Kim, J.K. Kukola, P.O.L. Omumbu, R.M. Mulamba, M. Nganda, S.M. Ngenyibungi, F.L. Ngondu, L.P. Sabuni, L. Dean, Mental health, stigma and the quality of life of people affected by neglected tropical diseases of the skin in Kasai Province, Democratic Republic of the Congo: a sex-disaggregated analysis, International Health 15 (2023) iii28–iii36. https://doi.org/10.1093/inthealth/ihad084.

[20] A. Agarwal, P.K. Nayak, W.H. Van Brakel, R. Van Wijk, A. Jain, H. Broekkamp, M.M. Mol, C.P. Mishra, Impact of basic psychological support on stigma and mental well-being of people with disabilities due to leprosy and lymphatic filariasis: a proof-of-concept study, International Health 15 (2023) iii59–iii69. https://doi.org/10.1093/inthealth/ihad096.

[21] Y. Lin, K. Fang, Y. Zheng, H. Wang, J. Wu, Global burden and trends of neglected tropical diseases from 1990 to 2019, Journal of Travel Medicine 29 (2022) taac031. https://doi.org/10.1093/jtm/taac031.

[22] A. Casulli, S. Antinori, A. Bartoloni, S. D'Amelio, A.F. Gabrielli, G. Gazzoli, L. Rinaldi, F. Bruschi, IN-NTD network, Neglected Tropical Diseases in Italy: introducing IN-NTD, the Italian network for NTDs, Parasitology. (2023) 1–7. https://doi.org/10.1017/S0031182023000422.

[23] P.A. Bates, J. Depaquit, E.A. Galati, S. Kamhawi, M. Maroli, M.A. McDowell, A. Picado, P.D. Ready, O.D. Salomón, J.J. Shaw, Y.M. Traub-Csekö, A. Warburg, Recent advances in phlebotomine sand fly research related to leishmaniasis control, Parasites Vectors 8 (2015) 131. https://doi.org/10.1186/s13071-015-0712-x.

l'assainissement des eaux usées, l'éducation sanitaire et un meilleur accès aux services de santé.[24] Le terme MTN a été souvent associé aux discours politiques sur le développement. En 2007, lors de la réunion mondiale des partenaires sur les MTN à Genève, Margaret Chan,[25] alors directrice de l'OMS, a souligné la relation entre ces maladies et la pauvreté, tout en faisant un lien entre santé et développement : « *Les maladies tropicales négligées expriment ce lien entre santé et développement de manière explicite, presque visuelle – une manière plus convaincante que les seules statistiques* ». D'autre part, bien que s'inscrivant principalement dans le cadre de discours sanitaires autour d'une problématique de santé publique, ces rencontres sont restées fortement dépendantes des circonstances économiques et politiques. Dans la même réunion, le célèbre footballeur, Samuel Eto'o, a partagé un message lié à la maladie du sommeil dans sa région natale en soulignant son intention de soutenir les initiatives sur cette pathologie. On voit bien le niveau émotionnel attaché à ces maladies, une situation qui est très attractive pour le monde politique compte tenu de son impact social et la possibilité de mise en œuvre d'interventions à faible coût.[26]

Nous nous sommes posé la question de définir plus précisément ce qu'est une MTN. Cependant, une recherche dans les bases des données Web of Science, Scopus et PubMed sur le terme « neglected tropical disease » révèle qu'il n'existe pas de définition académique ou médicale différente de celle validée par consensus à l'OMS, à connotation plutôt politique.[27]

Selon le consensus général validé par l'OMS :

> *Les MTN constituent un groupe diversifié de maladies présentant des caractéristiques distinctes que l'on retrouve principalement parmi les populations les plus pauvres du monde. Les 17‡ maladies ciblées par l'OMS partagent une approche commune sur les populations les plus laissées pour compte par le développement : elles symbolisent la pauvreté. La plupart de ceux qui souffrent d'une de ces maladies à un moment donné se retrouvent également dans la pauvreté, conduisent à une situation à la fois intolérable et inacceptable avec l'obligation de vivre avec un handicap permanent.* [28]

(‡En 2012, 17 MTN étaient recensés. Le chiffre a évolué à 21 aujourd'hui selon l'encadré 1. La dengue et le chikungunya sont rassemblés dans une seule catégorie par l'OMS.)

---

[24] S.A. Hudu, A.O. Jimoh, K.A. Adeshina, E.G. Otalike, A. Tahir, A.A. Hegazy, An insight into the Success, Challenges, and Future perspectives of eliminating Neglected tropical disease, Scientific African 24 (2024) e02165. https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2024.e02165.

[25] World Health Organization (WHO), Report of the global partners' meeting on neglected tropical diseases - A turning point 2007 - WHO/CDS/NTD/2007.4, 2007. https://www.who.int/publications/i/item/WHO-CDS-NTD-2007.4.

[26] P.J. Hotez, A. Fenwick, L. Savioli, D.H. Molyneux, Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases, The Lancet 373 (2009) 1570–1575. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60233-6.

[27] [1] Z. Ma, K. Augustijn, I. De Esch, B. Bossink, Public-private partnerships influencing the initiation and duration of clinical trials for neglected tropical diseases, PLoS Negl Trop Dis 17 (2023) e0011760. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011760. [2] J.-B. Falisse, A. Mpanya, Clinical trials as disease control? The political economy of sleeping sickness in the Democratic Republic of the Congo (1996–2016), Social Science & Medicine 299 (2022) 114882. https://doi.org/10.1016/j.socscimed.2022.114882. [3] C. Nieto-Sanchez, D.M. Hatley, M.J. Grijalva, K. Peeters Grietens, B.R. Bates, Communication in Neglected Tropical Diseases' elimination: A scoping review and call for action, PLoS Negl Trop Dis 16 (2022) e0009774. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009774. [4] T. Elphick-Pooley, D. Engels, Uniting to Combat NTDs, World NTD Day 2022 and a new Kigali Declaration to galvanise commitment to end neglected tropical diseases, Infect Dis Poverty 11 (2022) 2, s40249-021-00932–2. https://doi.org/10.1186/s40249-021-00932-2. [5] N. Aya Pastrana, D. Beran, C. Somerville, O. Heller, J.C. Correia, L.S. Suggs, The process of building the priority of neglected tropical diseases: A global policy analysis, PLoS Negl Trop Dis 14 (2020) e0008498. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008498. [6] M. Parker, K. Polman, T. Allen, Neglected tropical diseases in biosocial perspective, J. Biosoc. Sci. 48 (2016) S1–S15. https://doi.org/10.1017/S0021932016000274. [7] A. Cashwell, A. Tantri, A. Schmidt, G. Simon, N. Mistry, BRICS in the response to neglected tropical diseases, Bull. World Health Organ. 92 (2014) 461–462. https://doi.org/10.2471/BLT.13.132555. [8] Y. Jackson, N. Stephenson, Neglected tropical disease and emerging infectious disease: An analysis of the history, promise and constraints of two worldviews, Global Public Health 9 (2014) 995–1007. https://doi.org/10.1080/17441692.2014.941297.

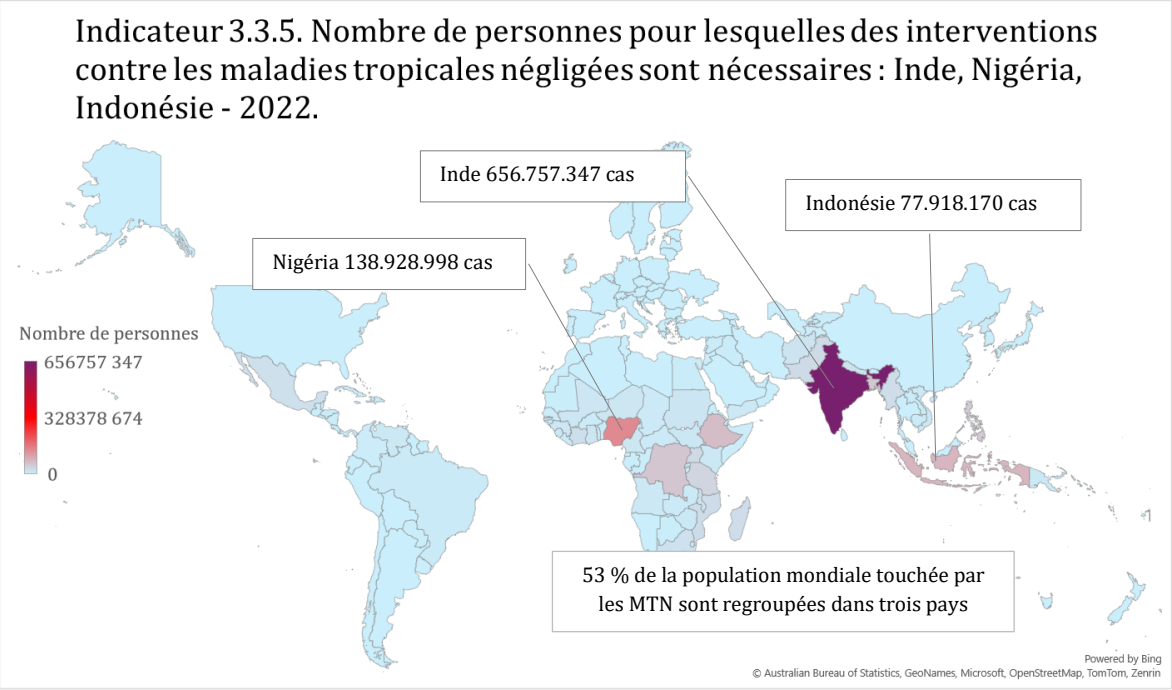
[28] Résolution WHA66.12 mai 2013 Rapport A66/20. Feuille de route WHO/HTM/NTD/2012.1 sur les Maladies Tropicales Négligées de la Soixante-Sixième Assemblée mondiale de l'OMS.

De mon point de vue, une autre définition avec une vision de santé publique,[29] serait plus appropriée :

> *Les MTN représentent un ensemble de maladies infectieuses traitables mais malheureusement reléguées au second plan en raison des priorités divergentes des programmes de santé publique des systèmes de santé nationaux. Cette pénalisation (marginalisation) est une conséquence des critères économiques de la santé et des méthodologies utilisées pour évaluer et choisir les interventions. Il est nécessaire d'ajuster ces méthodologies pour qu'elles ne reposent pas uniquement sur le fardeau de la maladie, afin de mieux les prendre en charge.*

Les cartes suivantes montrent la répartition des patients pour lesquels une intervention pour une MTN est nécessaire selon l'indicateur 3.3.5 des objectifs du développement durable -ODD.[30] L'indicateur est donné en termes de nombre de personnes, avec 1,6 milliard[31] de personnes (équivalent à environ sept fois le nombre de cas de paludisme à l'échelle mondiale avec 249 millions en 2022[32]) réparties dans 195 pays selon l'OMS en 2022.[33]

a) L'Inde, le Nigéria et l'Indonésie représentent 53 % de la population totale touchée par les MTN (40 %, 9 % et 4 % respectivement).



[29] [1] N.S. George, S.C. David, M. Nabiryo, B.A. Sunday, O.F. Olanrewaju, Y. Yangaza, D.O. Shomuyiwa, Addressing neglected tropical diseases in Africa: a health equity perspective, Glob Health Res Policy 8 (2023) 30. https://doi.org/10.1186/s41256-023-00314-1. [2] A. Mitra, A. Mawson, Neglected Tropical Diseases: Epidemiology and Global Burden, TropicalMed 2 (2017) 36. https://doi.org/10.3390/tropicalmed2030036.

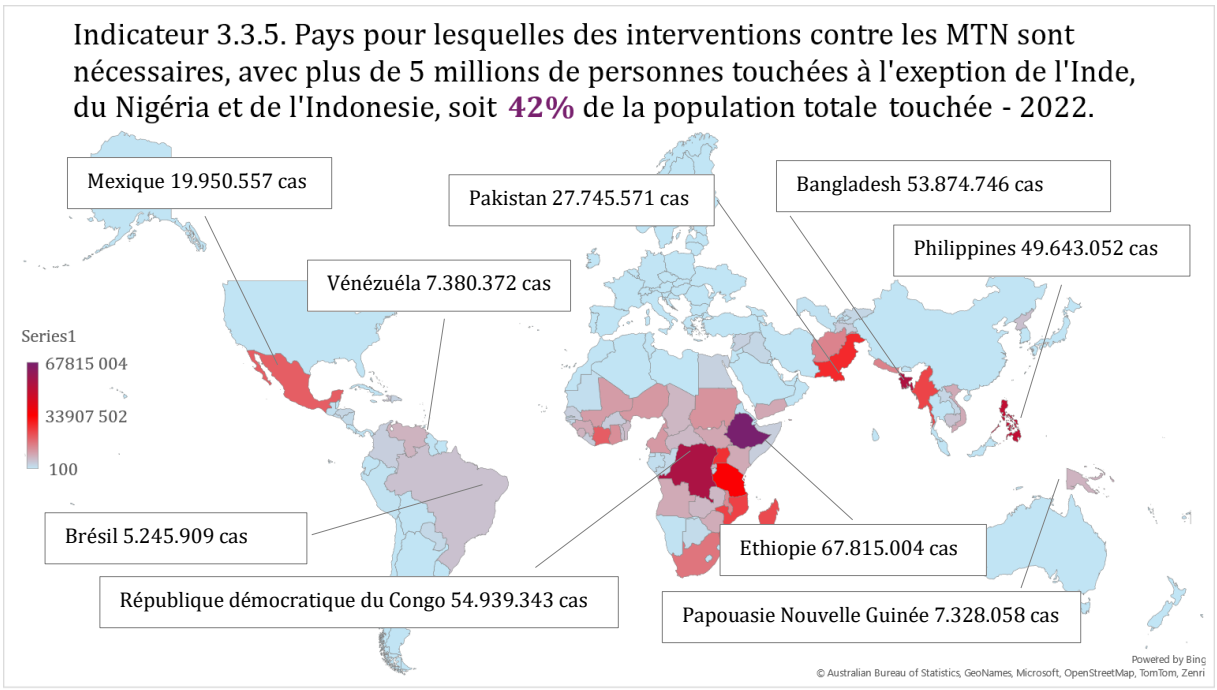
[30] Données mises à jour jusqu'en 2022 et tirées directement de la base de données des Nations Unies, ce qui correspond à 195 nations dans le monde : https://unstats.un.org/sdgs/dataportal/database > Data Series 3.3.5, dernière période 2022.

[31] World Health Organization (WHO), Indicators: Reported number of people requiring interventions against NTDs. https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/reported-number-of-people-requiring-interventions-against-ntds (Consulté le 04/02/2024).

[32] World Health Organization (WHO), Le rapport annuel de l'OMS sur le paludisme met en évidence la menace croissante que fait peser le changement climatique. https://www.who.int/fr/news/item/30-11-2023-who-s-annual-malaria-report-spotlights-the-growing-threat-of-climate-change. (Consulté le 04/02/2024).

[33] Il faut prendre en compte que ce sont des estimations vu le manque de clarté des chiffres de territoires comme la Palestine ou le Kosovo ; de même, il n'est pas clair si les données de Taiwan ont été intégrées à celles de la Chine.

b) Pour 42 % de la population totale touchée, la distribution des maladies tropicales négligées (MTN) est étendue dans presque tous les continents, se concentrant principalement en Afrique Sub-Saharienne.



c) Les 5 % restants de la population touchée par des MTN sont distribuées de façon très variable dans 130 pays situés sur tous les continents.

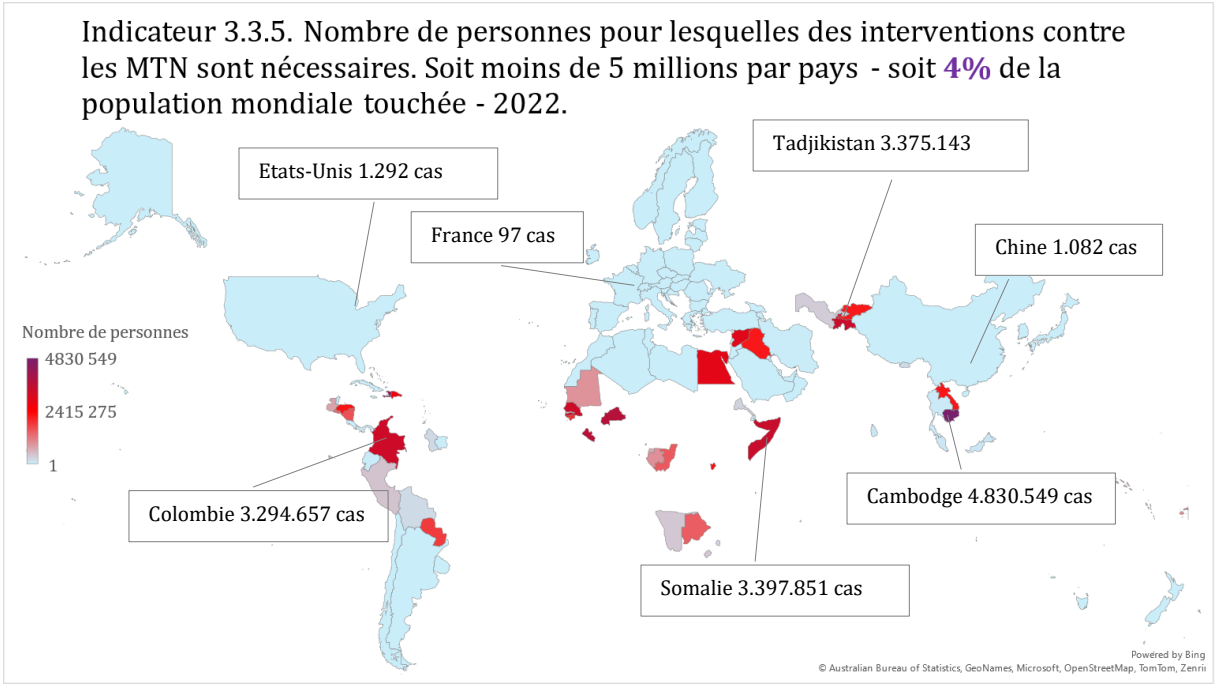


Figure 1. Répartition du nombre de personnes nécessitant une intervention pour au moins une MTN, selon l'indicateur 3.3.5 des objectifs du développement durable des Nations Unies.

Ces données mettent en évidence que l'Inde et le Nigéria dépassent largement le reste des nations. Ces deux pays représentent 49 % (soit 795 millions) des patients. En ajoutant l'Indonésie, nous avons 53 % (soit 873 millions) (Figure 1, a).

43 pays représentent 42 % de personnes nécessitant une assistance, soit un total de 786 millions de patients, localisés principalement en Afrique Sub-Saharienne, Éthiopie et République démocratique du Congo. En Amérique, le Mexique et le Vénézuéla sont encore plus touchés que le Brésil, et dans les pays d'Asie, on compte l'Afghanistan, le Pakistan, le Bangladesh, les Philippines et le Myanmar (Figure 1, b).

On observe également que 130 pays rassemblent un total de 69 millions de personnes, représentant 4 % de la population cible. Ces pays ont un nombre de cas très variable comme la France avec 97 cas, la Colombie avec 3 millions des cas ou le Cambodge avec 4 millions de cas (Figure 1, c). 24 pays ne signalent aucune personne devant être traitée pour une MTN, et 28 pays dénombrent entre 1 et 10 personnes touchées.

Ces maladies hétérogènes, causées par des bactéries, des virus, des protozoaires et des helminthes affectent de manière disproportionnée les pays disposant de systèmes de santé affaiblis, générant un taux élevé de morbidité et mortalité parmi les populations socialement vulnérables.[34]

Pour les 21 groupes de MTN, une trentaine de principes actifs sont utilisés en chimiothérapie (albendazole, amphotéricine B, amoxicilline, antimoine pentavalent, azithromycine, benznidazole, benzathine benzylpénicilline, benzoate de benzyle, clarithromycine, clofazimine, dapsone, citrate de diéthylcarbamazine, éflornithine, fexinidazole, ivermectine, itraconazole, malathion, mébendazole, mélarsoprol, métronidazole, miltéfosine, niclosamide, nifurtimox, paromomycine, pentamidine, perméthrine, praziquantel, rifampicine, suramine, triclabendazole, terbinafine).

Dans de nombreux cas, la méthode de traitement repose sur une administration de masse de médicaments[35] (AMMt) selon une stratégie de chimioprévention recommandée par l'OMS. C'est le cas de l'ivermectine qui a permis d'éliminer l'onchocercose dans plusieurs pays du continent américain, comme la Colombie[36] en 2013, l'Equateur, le Guatémala et le Mexique. Pour la filariose lymphatique en Afrique et en Asie, un traitement est possible en utilisant une association de médicaments entre l'ivermectine, l'albendazole et le citrate de diéthylcarbamazine (Tableau 1).

[34] K.M.P. Pinheiro, B.G.S. Guinati, N.S. Moreira, W.K.T. Coltro, Low-Cost Microfluidic Systems for Detection of Neglected Tropical Diseases, Annual Rev. Anal. Chem. 16 (2023) 117–138. https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-091522-024759.

[35] K. Karthikeyan, Mass drug administration in neglected tropical diseases: beyond elimination, The Lancet Global Health 11 (2023) e813–e814. https://doi.org/10.1016/S2214-109X(23)00213-9.

[36] R.S. Nicholls, S. Duque, L.A. Olaya, M.C. López, S.B. Sánchez, A.L. Morales, G.I. Palma, Elimination of onchocerciasis from Colombia: first proof of concept of river blindness elimination in the world, Parasites Vectors 11 (2018) 237. https://doi.org/10.1186/s13071-018-2821-9.

Tableau 1. Approche pharmacothérapeutique et non pharmacothérapeutique pour traiter les MTN répertoriées par l'OMS.[37]

MTN[38]	*Traitement pharmacologique*	*Observation*
Ulcère de Buruli ‡	Rifampicine /clarithromycine	
Maladie de Chagas ¥	Benznidazole / nifurtimox	
Dengue / Chikungunya ¥	Pas de traitement antiviral spécifique. Prévenir l'infection en évitant le vecteur.	L'aspirine et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) à éviter
Dracunculose ¥	Aucun médicament n'est disponible pour prévenir ou guérir cette maladie parasitaire.	Relativement facile à éliminer et ou éradiquer avec des mesures sanitaires
Echinococcose ¥	Chirurgie / albendazole / mébendazole (benzimidazoles)	1-6 mois
Trématodoses d'origine alimentaire ¥	Praziquantel / triclabendazole	
Trypanosomiase humaine africaine ‡ ¥	Fexinidazole / pentamidine / nifurtimox–eflornithine / suramine / mélarsoprol	
Leishmaniose ‡ ¥	Antimoine pentavalent / amphotéricine B / pentamidine / miltéfosine / paromomycine	La plupart des médicaments sont injectables
Lèpre ‡	Rifampicine / dapsone / clofazimine	
Filariose lymphatique *	Albendazole* / ivermectine* / diéthylcarbamazine[39] citrate (triple thérapie[40])	Chaque année pendant au moins 4 à 6 ans avec une couverture efficace de la population
Onchocercose *	Ivermectine*	Au moins une fois par an pendant 10 à 15 ans
Rage ¥	Vaccin chez l'homme et chiens	La vaccination des chiens est la stratégie avec un excellent rapport coût-efficacité
Schistosomiase *	Praziquantel*	Traitement efficace, sûr et peu coûteux
Géohelminthiases *	Albendazole* / mebendazole / Ivermectine	Benzimidazoles faciles à administrer par du personnel non médical
Taeniasis et cysticercose ¥	Praziquantel, Niclosamide, Albendazole	Traitement de soutien avec des corticostéroïdes et/ou des médicaments antiépileptiques, ou chirurgie
Trachome *	Azithromycine*	Propreté du visage, et amélioration de l'environnement, un meilleur accès à l'eau
Pian *	Azithromycine* / Benzathine pénicilline	
Mycétome ‡, *chromoblastomycose et autres mycoses profondes*	Combinaison d'antibiotiques, d'antifongiques et de chirurgie. Itraconazole or terbinafine (sporotrichose / chromoblastomycose)	Pour le mycétome fongique, les amputations sont courantes.
Gale et autres ectoparasitoses *	Perméthrine, malathion, benzyl benzoate, Ivermectine*	Les traitements ne tuent pas les œufs du parasite
Envenimation par morsure de serpent ¥	Antivenins de serpent	
Noma	Amoxicilline / métronidazole	
*Stratégie pharmacothérapeutique : * administration de masse de médicaments (AMM) ; ‡ Dépistage et traitement des cas. Approche non pharmacothérapeutique : ¥ eau potable, éducation sanitaire, lutte anti-vectorielle ou autres actions sanitaires.*		
Non pharmacothérapeutique	Administration de masse de médicaments	Pharmacothérapie + Sanitaire

Dans d'autres situations, en l'absence de médicament, l'approche ne repose que sur des mesures sanitaires portant sur l'hygiène, l'accès à l'eau potable et un soutien alimentaire. C'est ainsi que la dracunculose a été éliminée dans divers pays d'Afrique et d'Asie (Encadré 2).

[37] C. Bodimeade, M. Marks, D. Mabey, Neglected tropical diseases: elimination and eradication, Clinical Medicine 19 (2019) 157–160. https://doi.org/10.7861/clinmedicine.19-2-157.

[38] Control of Neglected Tropical Diseases. The NTD road map: together towards 2030, World Health Organization (n.d.). https://www.who.int/teams/control-of-neglected-tropical-diseases/overview (Consulté le 04/02/2024).

[39] S. Townson, B. Ramirez, F. Fakorede, M.-A. Mouries, S. Nwaka, Challenges in drug discovery for novel antifilarials, Expert Opinion on Drug Discovery 2 (2007) S63–S73. https://doi.org/10.1517/17460441.2.S1.S63.

[40] [1] M.T. Abuelazm, B. Abdelazeem, H. Badr, M. Gamal, M. Ashraf, S. Abd-elsalam, Efficacy and safety of triple therapy versus dual therapy for lymphatic filariasis: A systematic review and meta-analysis, Tropical Med Int Health 27 (2022) 226–235. https://doi.org/10.1111/tmi.13727. [2] M. Hardy, J. Samuela, M. Kama, M. Tuicakau, L. Romani, M.J. Whitfeld, C.L. King, G.J. Weil, A.C. Grobler, L.J. Robinson, J.M. Kaldor, A.C. Steer, The safety of combined triple drug therapy with ivermectin, diethylcarbamazine and albendazole in the neglected tropical diseases co-endemic setting of Fiji: A cluster randomised trial, PLoS Negl Trop Dis 14 (2020) e0008106. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008106.

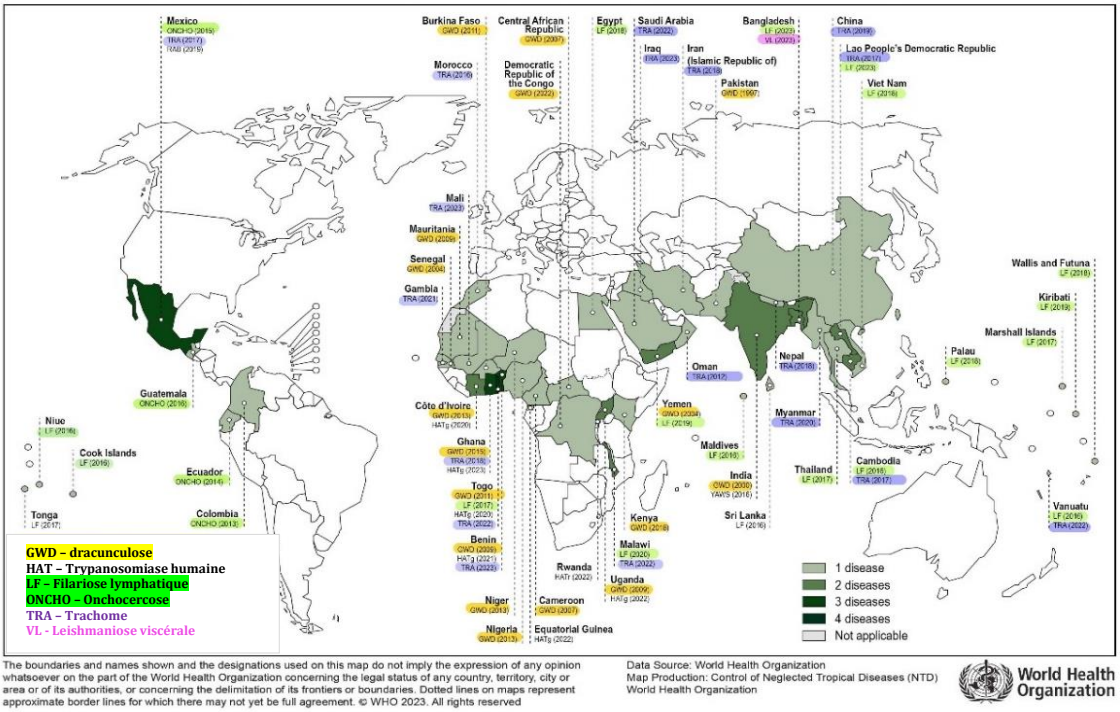
Encadré 2. Définitions[41] du contrôle, de l'élimination et de l'éradication des MTN et objectifs à 2030[42].

Eradication	Réduction permanente à zéro de l'incidence mondiale d'infection, grâce à des efforts délibérés, sans risque de réintroduction.	**Certifié par l'OMS.**	Pian et Dracunculose
Elimination, problème de santé publique	Terme lié à la fois à l'infection et à la maladie, défini par la réalisation d'objectifs mesurables fixés par l'OMS ; une fois atteints, une action continue est nécessaire pour maintenir les objectifs et/ou pour interrompre de manière anticipée la transmission.	**Validé par l'OMS.**	Rage, Trachome, Maladie de Chagas, Trypanosomiase humaine africaine (rhodesiense), Leishmaniose viscérale, Schistosomiase, Géohelminthiases et Filariose lymphatique
Élimination, interruption de la transmission	Réduction à zéro de l'incidence de l'infection, dans une zone géographique définie, avec un risque minimal de réintroduction, grâce à des efforts délibérés ; une action continue pour empêcher le rétablissement de la transmission peut être nécessaire.	**Verifié par l'OMS.**	Lèpre, Trypanosomiase humaine africaine (*gambiensi*) et Onchocercose
Contrôle	Réduction de l'incidence, de la prévalence, de la morbidité et/ou de la mortalité de la maladie à un niveau localement acceptable grâce à des efforts délibérés ; des interventions continues sont nécessaires pour maintenir la réduction.	**Aucune action nécessaire par l'OMS.**	Ulcère de Buruli, Dengue, Mycétome, chromoblastomycose et autres mycoses profondes, Leishmaniose cutanée, Echinococcose, Taeniasis et cysticercose, Trématodoses d'origine alimentaire, Gale et autres ectoparasitoses et Envenimation par morsure de serpent

Dans l'Encadré 2, les stratégies de contrôle, d'élimination et d'éradication des MTN sont résumées. Pour certaines d'entre elles, l'objectif d'éradication ou d'élimination n'est pas atteint. Ce terme d'élimination n'est pas bien défini mais peut être considéré au sens large comme signifiant une réduction de la prévalence et/ou de l'incidence d'une maladie à un niveau tel qu'elle ne contribue plus de manière significative à la morbidité (ou à la mortalité) au niveau de la population. La proximité des termes utilisés contribue à créer une confusion dans l'esprit des décideurs politiques.

[41] [1] C.M. Wolfe, A. Barry, A. Campos, B. Farham, D. Achu, E. Juma, A. Kalu, B. Impouma, Control, elimination, and eradication efforts for neglected tropical diseases in the World Health Organization African region over the last 30 years: A scoping review, International Journal of Infectious Diseases 141 (2024) 106943. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2024.01.010. [2] World Health Organization, WHO/HTM/NTD/2016.6; Generic framework for control, elimination and eradication of neglected tropical diseases– 2016 .

[42] K. Forbes, M.-G. Basáñez, T.D. Hollingsworth, R.M. Anderson, Introduction to the special issue: challenges and opportunities in the fight against neglected tropical diseases: a decade from the London Declaration on NTDs, Phil. Trans. R. Soc. B 378 (2023) 20220272. https://doi.org/10.1098/rstb.2022.0272.



Approche / exemple	
Mesures sanitaires sans pharmacothérapie	Dracunculose
L'administration de masse de médicaments[43]	Onchocercose et Filariose lymphatique
Combinaison des deux approches	Trachome
	Leishmaniose viscérale[44] : Le Bangladesh est devenu le premier pays au monde à être officiellement reconnu pour avoir éliminé la leishmaniose viscérale, en tant que problème de santé publique. **Validé** par l'OMS après que le Bangladesh a signalé moins de 1 cas pour 10.000 habitants au cours des 3 années consécutives précédentes. En 2022, le Bangladesh n'a signalé que 47 cas de kala-azar, et la région OMS de l'Asie du Sud-Est a signalé 1.069 cas.

Figure 2. 50 pays répertoriés par l'OMS ayant éliminé au moins une MTN au 1er novembre 2023.

Ce risque est aggravé par l'absence d'une définition standard. Les objectifs pour chaque maladie ont également tendance à évoluer au fil du temps en passant d'objectifs moins ambitieux (élimination) à des objectifs plus ambitieux (éradication). Dans d'autres cas, une combinaison des deux dernières approches a été utilisée : la pharmacothérapie associée à des mesures sanitaires.[45] Pour le trachome[46] par exemple, l'utilisation d'azithromycine[47] (avec le risque de générer des

[43] J.P. Webster, D.H. Molyneux, P.J. Hotez, A. Fenwick, The contribution of mass drug administration to global health: past, present and future, Phil. Trans. R. Soc. B 369 (2014) 20130434. https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0434.

[44] [1] N. Nagi, Bangladesh eliminates visceral leishmaniasis, The Lancet Microbe (2024) S2666524724000284. https://doi.org/10.1016/S2666-5247(24)00028-4. [2] World Health Organization (WHO), Bangladesh achieves historic milestone by eliminating kala-azar as a public health problem, (2023). https://www.who.int/news/item/31-10-2023-bangladesh-achieves-historic-milestone-by-eliminating-kala-azar-as-a-public-health-problem. (Consulté le 22/03/2024).

[45] J. Coleman, Eight countries eliminated a neglected tropical disease in 2022, Nature (2023) d41586-023-00286–9. https://doi.org/10.1038/d41586-023-00286-9.

[46] J. Adams, S.H. Kim, A.W. Solomon, Where should we offer mass drug administration for trachoma?, Medical Journal of Australia 217 (2022) 522–523. https://doi.org/10.5694/mja2.51752.

[47] S.M. Gatimu, R.W. Kimani, Does mass drug administration of azithromycin reduce child mortality?, The Lancet Global Health 9 (2021) e1485–e1486. https://doi.org/10.1016/S2214-109X(21)00417-4.

résistances[48]) associée à des mesures sanitaires[49] et d'hygiène oculaire ont permis d'éliminer la maladie dans de nombreux pays en Asie et en Afrique (Figure 2).

1.1.2. Contexte politique

Chaque pays, *via* sa stratégie de santé publique, doit pouvoir adapter son système de santé aux exigences de son territoire. Il semble nécessaire d'améliorer ou de renforcer les capacités des agences nationales de santé, en envisageant par exemple des alternatives aux dispositions de l'article 58 du règlement européen n° 726/2004 et/ou d'explorer des alternatives différentes à celle de la fabrication industrielle de médicaments à grande échelle. Une option serait de développer des moyens permettant de formuler des préparations galéniques qui ne nécessitent pas d'autorisation de mise sur le marché (AMM). L'article 58 mentionné ci-dessous, permet de valider l'utilisation de nouveaux médicaments hors du territoire européen, tout en respectant les normes européennes. Pourquoi alors ne pas développer les capacités des Agences de santé des pays qui ont besoin de ces médicaments ?

- *Article 58 - Règlement (CE) N° 726/2004 du Parlement Européen Et du Conseil : 1. L'Agence peut rendre un avis scientifique, dans le cadre de la coopération avec l'Organisation mondiale de la santé, afin d'évaluer certains médicaments à usage humain destinés à être mis exclusivement sur les marchés hors de la Communauté. À cette fin, une demande est soumise à l'Agence conformément à l'article 6. Le comité des médicaments à usage humain peut, après avoir consulté l'Organisation mondiale de la santé, formuler un avis scientifique conformément aux articles 6 à 9. L'article 10 ne s'applique pas. 2. Ledit comité arrête une procédure particulière pour la mise en œuvre du paragraphe 1 et pour donner des avis scientifiques.*
- *L'Agence Européenne des Médicaments recommande l'approbation du fexinidazole, le premier traitement entièrement par voie orale de la maladie du sommeil, dans le cadre de la procédure qui régit les demandes visées à l'article 58 du règlement européen.*[50]

Etymologiquement, le terme MTN est sous-jacent à une construction historique post-coloniale.[51] Au cours des XXe et XXIe siècles, ce terme s'est politiquement consolidé à l'aide de divers événements internationaux où il a été placé au cœur des discussions. Il a été ainsi largement utilisé lors des rencontres à Berlin,[52] mais également dans les assemblées de l'OMS et les programmes TDR[53] (Training in Tropical Diseases), dans les objectifs de développement durable, ainsi que dans

[48] R. Kahn, N. Eyal, S.O. Sow, M. Lipsitch, Mass drug administration of azithromycin: an analysis, Clinical Microbiology and Infection 29 (2023) 326–331. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2022.10.022.

[49] K.M. Sullivan, E.M. Harding-Esch, A.P. Keil, M.C. Freeman, W.E. Batcho, A.A. Bio Issifou, V. Bucumi, A.L. Bella, E. Epee, S. Bobo Barkesa, F. Seife Gebretsadik, S. Sanha, K.M. Kalua, M.P. Masika, A.O. Minnih, M. Abdala, M.E. Massangaie, A. Amza, B. Kadri, B. Nassirou, C.D. Mpyet, N. Olobio, M.D. Badiane, B.E. Elshafie, G. Baayenda, G.E. Kabona, O. Kaitaba, A. Simon, T.Q. Al-Khateeb, C. Mwale, A. Bakhtiari, D. Westreich, A.W. Solomon, E.W. Gower, Exploring water, sanitation, and hygiene coverage targets for reaching and sustaining trachoma elimination: G-computation analysis, PLoS Negl Trop Dis 17 (2023) e0011103. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011103.

[50] Drugs for Neglected Diseases Initiative - DNDi, Le fexinidazole sera un atout pour les efforts déployés à l'échelle internationale en vue d'éliminer la maladie du sommeil, une maladie tropicale négligée, mortelle et endémique en Afrique, (n.d.). https://dndi.org/press-releases-translations/2018/ema-recommande-approbation-fexinidazole-premier-traitement-entierement-oral-maladie-du-sommeil/.

[51] [1] S. Chowdhury, MEDICINE AND COLONIAL PATENT LAW IN INDIA: A Study of Patent Medicines and the Indian Patents and Designs Act, 1911 in Early- Twentieth-Century India, Journal of the History of Medicine and Allied Sciences 75 (2020) 408–428. https://doi.org/10.1093/jhmas/jraa027. [2] G. Lachenal, Le médicament qui devait sauver l'Afrique: un scandale pharmaceutique aux colonies, La Découverte, Paris, 2014, p 57-73. [3] D. Greenwood, Antimicrobial drugs: chronicle of a twentieth century medical triumph, Oxford university press, New York, 2008.

[52] [1] World Health Organization (WHO), Strategic and technical meeting on intensified control of neglected tropical diseases : a renewed effort to combat entrenched communicable diseases of the poor : report of an international workshop, Berlin, 18-20 April 2005, (Consulté le 17/02/2024). https://www.who.int/publications/i/item/WHO-CDS-NTD-2006.1 [2] Intensified control of neglected diseases: report of an international workshop, Berlin, 10–12 December 2003, World Health Organization (n.d.). https://www.who.int/publications/i/item/WHO-CDS-CPE-CEE-2004.45, (Consulté le 17/02/2024).

[53] Programme spécial de recherche et de formation concernant les maladies tropicales (TDR), Rapport du deuxième comité examinateur extérieur, 11ème session du conseil conjoint de coordination, Genève, 27-29 juin 1988. TDR/JCB(11)/88.6 p. 66-67.

des déclarations importantes telles que la Déclaration de Londres et la Déclaration de Kigali,[54] cette dernière datant de 2022 (Tableau 2).

Tableau 2. Evénements de l'OMS liées à la création et développement du terme MTN.

1948	1990	2005	2007	2012	2015	2022
Création de l'OMS en 1948, dépend directement du Conseil économique et social des Nations unies [1] Contrôle des maladies à transmission vectorielle - insecticides [2]						
	La leishmaniose, un problème majeur de santé publique [3] Rapport 793 sur le contrôle de la leishmaniose [4]					
		Atelier international à Berlin : nouvelle approche pour le contrôle des MTN [5]				
			Création du département contre les MTN à l'OMS Réunion à Genève : engagement de la lutte contre les MTN [6] WHA60.13 sur le contrôle de la leishmaniose + A60/10 [7]			
				Premier rapport de l'OMS sur les MTN, 2010 [8] Déclaration de Londres, 2012 : contrôler, éliminer ou éradiquer les MTN **Maladies tropicales négligées -** Programme OMS [9]		
					Programme de développement durable - 2030 [10]	
						Déclaration de Kigali, 2022, sur les MTN[55]

[1] source Histoire de l'OMS https://www.who.int/about/history
[2] WHA1.12-1948 ; WHA2.18 comités d'experts en insecticides
[3] WHA43_R18 ; Recherche sur les maladies tropicales, 1990 (le terme négligé n'utilisait pas).
[4] WHO_TRS_793 ; Série de rapports techniques de l'OMS, 793, 1990 (Comité d'experts de l'OMS sur la leishmaniose)
[5] WHO/CDS/CPE/CEE/2004.45 et WHO/CDS/NTD/2006.1
[6] WHO/CDS/NTD/2007.4 ; WHO/CDS/NTD/2007.3 Rapport de la réunion mondiale des partenaires sur les MTN.
[7] WHA60.13, contrôle de la leishmaniose + WHA A60/10 lutte contre la leishmaniose : rapport du secrétariat 22 mars 2007
[8] WHO/HTM/NTD/2010.1, Agir pour réduire l'impact mondial des maladies tropicales négligées
[9] WHO/HTM/NTD/2012.1 ; EB132/19 ; 23 novembre, 2012. OMS, Conseil exécutif.
[10] A/RES/70/1. Soixante-dixième session : Le programme de développement durable à l'horizon 2030.

Sources : Assemblées de l'organisation mondiale de la santé. Disponibles en version numérique : https://apps.who.int/gb/index.html (anglais) ; https://apps.who.int/gb/f/index.html (française)

Le terme MTN est souvent associé à un discours politique pour le développement. On pourrait même dire que le mot « négligé » ne répond pas à une réalité pré-linguistique existante, mais crée ces réalités,[56] en répondant davantage à une logique de discours médical post-colonial,[57] marqué par des relations politiques et militaires complexes et historiques (encadré 3).

Au XIXe siècle, au lieu de MTN, le terme « médecine tropicale »[58] était alors utilisé. L'ouverture des écoles de *médecine tropicale* à Bruxelles en 1906, à Liverpool en 1899 et à Hambourg l'année suivante, le montre. Une notion de médecine par la géographie[59] voit ainsi le jour (entre le tropique du Cancer et du Capricorne) mais aussi la médecine du sud (traditionnelle) et la médecine du nord (occidentale).[60]

[54] The Kigali Summit on Malaria and NTDs. Over $US 4 billion in funding committed at major global summit by governments, private sector and international organisations 23 June 2022, (n.d.). https://unitingtocombatntds.org/en/the-kigali-declaration/ (Consulté le 28/03/ 2024). [2] F. Mutapi, Une nouvelle feuille de route pour les maladies tropicales négligées, Nat Africa (2022) d44148-022-00126–4. https://doi.org/10.1038/d44148-022-00126-4.

[55] T. Elphick-Pooley, D. Engels, Uniting to Combat NTDs, World NTD Day 2022 and a new Kigali Declaration to galvanise commitment to end neglected tropical diseases, Infect Dis Poverty 11 (2022) 2, s40249-021-00932–2. https://doi.org/10.1186/s40249-021-00932-2.

[56] A. Escobar, Encountering development: the making and unmaking of the third world, Princeton University Press, Princeton, N.J, 2012.

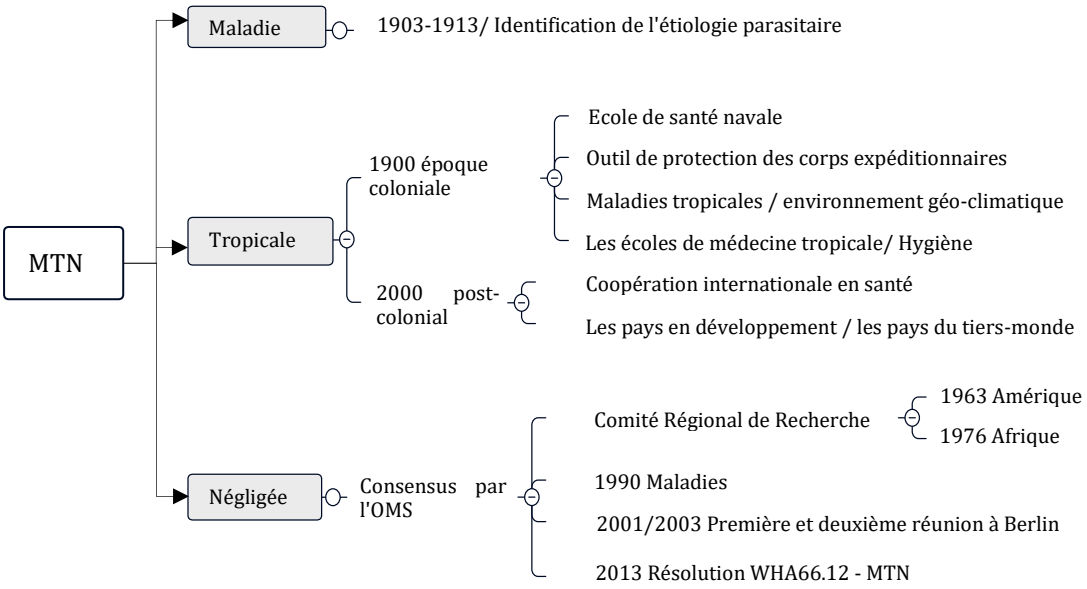
[57] R. Bivins, Coming "Home" to (post)Colonial Medicine: Treating Tropical Bodies in Post-War Britain, Social History of Medicine 26 (2013) 1–20. https://doi.org/10.1093/shm/hks058.

[58] I. Amara, The emergence of tropical medicine in Portugal: the School of Tropical Medicine and the Colonial Hospital of Lisbon (1902-1935), Dynamis 28 (2008) 301–328.

[59] P. Rupali, Introduction to Tropical Medicine, Infectious Disease Clinics of North America 33 (2019) 1–15. https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.011.

[60] C. Asongwe, Traditional Medicine, Disease Control and Human Welfare in Colonial Southern Cameroons, Saudi J. Humanities Soc. Sci. 6 (2021) 26–36. https://doi.org/10.36348/sjhss.2021.v06i01.005.

Encadré 3. Relations conceptuelles entre le terme MTN et le colonialisme



Les progrès scientifiques dans le cadre de la maladie tropicale et les traitements tels que ceux dérivés de l'antimoine ont été générés dans le contexte militaire de l'époque coloniale, ainsi que les directives actuelles pour la lutte contre les MTN proposées et validées par des puissances mondiales.

Le terme MTN englobe non seulement des considérations médicales et scientifiques mais aussi historiques et socio-économiques.

Patrick Manson,[61] souvent reconnu comme fondateur de la médecine tropicale (avec une conceptualisation selon Louis Pasteur et Robert Koch[62]) et pionnier dans la découverte des infections à transmission vectorielle, a débuté comme clinicien en Extrême-Orient durant la période coloniale de l'Empire britannique en Asie. Les premiers travaux de synthèse des dérivés de l'antimoine[63] ont eu lieu à l'époque coloniale par Philalethes Kuhn[64] (1870-1937), un médecin militaire. Les premiers travaux d'identification des souches du parasite par des pathologistes, le général Sir William Boog Leishman et le major Charles Donovan,[65] ont eu lieu lors d'expéditions militaires. La médecine tropicale n'était pas une réponse aux « problèmes de santé du nouveau monde » mais un moyen de protéger les expéditions militaires.

Cette lutte contre les MTN, bien qu'inscrite principalement dans le cadre des discours sanitaires des professionnels de la santé[66] et des chercheurs autour de problèmes de santé

[61] K.K. To, K.-Y. Yuen, In memory of Patrick Manson, founding father of tropical medicine and the discovery of vector-borne infections, Emerging Microbes & Infections 1 (2012) 1–7. https://doi.org/10.1038/emi.2012.32.

[62] J.-L. Casanova, L. Abel, The Genetic Theory of Infectious Diseases: A Brief History and Selected Illustrations, Annu. Rev. Genom. Hum. Genet. 14 (2013) 215–243. https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091212-153448.

[63] F. Frézard, C. Demicheli, K.C. Kato, P.G. Reis, E.H. Lizarazo-Jaimes, Chemistry of antimony-based drugs in biological systems and studies of their mechanism of action, Reviews in Inorganic Chemistry 33 (2013) 1–12. https://doi.org/10.1515/revic-2012-0006.

[64] G. Lachenal, Médecine, comparaisons et échanges inter-impériaux dans le mandat camerounais : une histoire croisée franco-allemande de la mission Jamot, Canadian Bulletin of Medical History 30 (2013) 23–45. https://doi.org/10.3138/cbmh.30.2.23.

[65] D. Steverding, The history of leishmaniasis, Parasites Vectors 10 (2017) 82. https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5.

[66] Climate change and vector-borne neglected tropical diseases: Positioning pharmacy practice to drive awareness, prevention and management, International Pharmaceutical Federation Home (n.d.). https://www.fip.org/ (Consulté le 22/03/2024).

publique, reste fortement dépendante des circonstances économiques et politiques, expliquant la création (ou l'arrêt) de programmes ou d'initiatives. En conséquence, la partie suivante cherchera à réfléchir sur le thème « négligé » au sein du concept de « Maladie tropicale négligée ».

1.1.3. Réflexions autour du mot « négligé »

Est-il judicieux de s'interroger sur la pertinence du terme MTN ?[67] La lutte contre les Maladies Tropicales Négligées (MTN), s'explique aujourd'hui car elles sont justement négligées. Néanmoins, le terme « maladies négligées » devient un aphorisme, une sorte de vérité fondamentale, admis dans le contexte scientifique et politique, avec lequel on peut construire une justification logique pour la recherche. Je voudrais cependant proposer une réflexion, structurée en trois parties, centrée principalement sur le contexte de la leishmaniose :

1. L'ambiguïté du terme *négligé* : malgré l'existence des programmes de recherche tout au long du XXe siècle pour contrôler des maladies infectieuses, l'utilisation du terme négligé est **ambiguë** dans les contextes de la santé publique et de la politique. En espagnol « desatendida » serait la traduction littéraire mais il porte aussi la signification « oublié » ou même « abandonné ».
2. L'**euphémisme** du mot *négligé* : le fait que certaines personnes ne bénéficient pas de la couverture sanitaire universelle dans les systèmes de santé est une conséquence du modèle de santé néolibéral après 1990. Cela reflète les échecs de ce modèle de santé globale.
3. Le contexte de **l'industrie pharmaceutique** : avec leur vocation lucrative, il faut reconnaitre la juste valeur de l'industrie sans lui imputer des responsabilités qui ne sont pas les siennes, les responsabilités publiques. Pourquoi l'industrie devrait être responsable de son manque d'intérêt pour certaines maladies non rentables ? Son modèle est aligné sur les dynamiques du marché mondial et les contraintes liées aux actionnaires.

1. Ambiguïté : La recherche autour des MTN comme la leishmaniose ne peut pas être séparée des efforts faits dans le cadre de la lutte contre les maladies infectieuses[68] et non seulement avec les maladies à transmission vectorielle,[69] ou alimentaire[70] comme dans la maladie de Chagas. Dans ce contexte, il manque des précisions linguistiques pour utiliser ce mot. Négligé selon qui ou par rapport à qui ? :

- *Négligé* à cause des défis scientifiques qui demeurent ?
- *Négligé* à cause des aspect géopolitiques ?
- *Négligé* à cause des aspects épidémiologiques ?
- *Négligé* à cause des aspects liées aux marchés non lucratifs ?
- *Négligé* à cause des aspects sociaux ?

[67] [1] A. Shahvisi, Tropicality and abjection: What do we really mean by "Neglected Tropical Diseases"?, Developing World Bioethics 19 (2019) 224–234. https://doi.org/10.1111/dewb.12223. [2] The Lancet Regional Health – Western Pacific, To end the neglect of neglected tropical diseases, The Lancet Regional Health - Western Pacific 18 (2022) 100388. https://doi.org/10.1016/j.lanwpc.2022.100388. [3] J.K. Aronson, When I use a word . . . .Devising bioscience definitions, BMJ (2023) p768. https://doi.org/10.1136/bmj.p768.

[68] A. Yajima, Z. Lin, A.J. Mohamed, A.P. Dash, S. Rijal, Finishing the task of eliminating neglected tropical diseases (NTDs) in WHO South-East Asia Region: promises kept, challenges, and the way forward, The Lancet Regional Health - Southeast Asia 18 (2023) 100302. https://doi.org/10.1016/j.lansea.2023.100302.

[69] F. Rodhain, Le parasite, le moustique, l'homme... et les autres: essai sur l'éco-épidémiologie des maladies à vecteurs, Éditions Docis, Paris, 2015, p : 306-320.

[70] N.L. Beatty, C. Arango-Ferreira, L. Gual-Gonzalez, S. Zuluaga, M.S. Nolan, O. Cantillo-Barraza, Oral Chagas Disease in Colombia—Confirmed and Suspected Routes of Transmission, TropicalMed 9 (2024) 14. https://doi.org/10.3390/tropicalmed9010014. F



Figure 3. Liste des travaux directs ou indirects réalisés par l'OMS dans le cadre de la lutte contre les MTN.

Concernant les actions menées au XXe siècle, la Figure 3 illustre les travaux déployés par l'OMS dans la lutte contre les MTN. L'année même de sa création, en 1948, une résolution a été élaborée pour le contrôle des vecteurs des pathogènes ; vers 1940, la découverte de l'insecticide dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) a constitué une avancée majeure.[71] L'OMS a, depuis, maintenu une activité permanente[72] autour des différentes approches[73] de lutte contre les maladies infectieuses, y compris celles qui sont aujourd'hui considérées comme négligées. Un des sujets les plus étudiés concerne les insectes vecteurs et plus particulièrement, l'espèce mâle du vecteur *Culex* spp.[74] Concernant l'approche thérapeutique, le père du célèbre Stephen Hawking, le

[71] J.A. Rozendaal, Vector control: methods for use by individuals and communities, World Health Organization, Geneva, 1997.

[72] T. Gyorkos, R. Nicholls, A. Montresor, A. Luciañez, M. Casapia, K. St-Denis, B. Blouin, S. Joseph, Eliminating morbidity caused by neglected tropical diseases by 2030, Revista Panamericana de Salud Pública 47 (2023) 1. https://doi.org/10.26633/RPSP.2023.16.

[73] Y. Epelboin, S.C. Chaney, A. Guidez, N. Habchi-Hanriot, S. Talaga, L. Wang, I. Dusfour, Successes and failures of sixty years of vector control in French Guiana: what is the next step?, Mem. Inst. Oswaldo Cruz 113 (2018). https://doi.org/10.1590/0074-02760170398.

[74] [1] C. Brizzee, K. Mysore, T.M. Njoroge, S. McConnell, J. Crawford, M. Duman-Scheel, Generation of a Culex Male Mosquito Sex-Separation RNAi Yeast Strain Using Cas-CLOVER and Super PiggyBac Engineering in Saccharomyces cerevisiae, Fermentation 9 (2023) 999. https://doi.org/10.3390/fermentation9120999. [2] M.L. Aardema, S.K. Olatunji, D.M. Fonseca, The Enigmatic Culex pipiens (Diptera: Culicidae) Species Complex: Phylogenetic Challenges and Opportunities From a Notoriously Tricky Mosquito Group, Annals of the Entomological Society of America 115 (2022) 95–104. https://doi.org/10.1093/aesa/saab038. [3] E. Nchoutpouen, A. Talipouo, B. Djiappi-Tchamen, L. Djamouko-Djonkam, E. Kopya, C.S. Ngadjeu, P. Doumbe-Belisse, P. Awono-Ambene, S. Kekeunou, C.S. Wondji, C. Antonio-Nkondjio, Culex species diversity, susceptibility to insecticides and role as potential vector of Lymphatic filariasis in the city of Yaoundé, Cameroon, PLoS Negl Trop Dis 13 (2019) e0007229. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007229.

Dr Frank Hawking, entre 1939 et 1973, a été le pionnier du développement du diéthylcarbamazine (DEC), qui constitue aujourd'hui la base de la chimiothérapie préventive de la filariose.[75]

Le terme *négligé* peut même remonter bien avant la déclaration de Londres ou les ateliers de Berlin. Dans les années 1970 et 1980, Kenneth Warren, chercheur en parasitologie et directeur des sciences de la santé à la Fondation Rockefeller a initié le programme des grandes maladies négligées de l'humanité (*The Great Neglected Diseases of Mankind Program (GND)*), offrant dix ans de financements pour étudier les maladies parasitaires et autres maladies principalement tropicales. Avec son adjoint, Kerr White, à l'Université Johns Hopkins, ils ont créé le Réseau international d'épidémiologie clinique, aujourd'hui INCLEN,[76] pour renforcer les facultés de médecine, d'abord en épidémiologie, puis également en sciences économiques et sociales de la santé, nécessaires pour gérer les ressources sanitaires limitées dans les pays en développement.[77]

Depuis 2004,[78] le terme « MTN » est couramment utilisé dans les publications scientifiques (Figure 4) et employé notamment dans les discours à l'OMS. Avec ce terme, se regroupent des maladies qui partagent trois caractéristiques principales : être liées à la pauvreté,[79] être oubliées par l'industrie pharmaceutique,[80] et dont l'élimination est considérée comme une stratégie de développement. Le nombre de publications sur le terme MTN, a augmenté à partir de 2005 après les rencontres de Berlin.

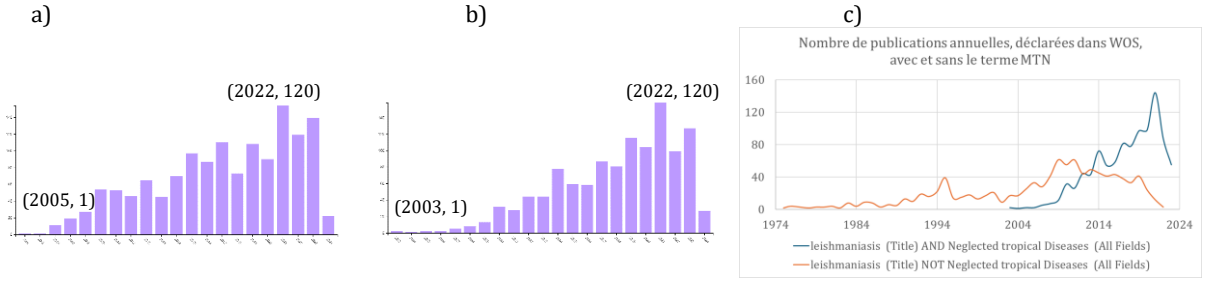


Figure 4. Nombre de publications scientifiques dans Web Of Science™ ; a) avec le terme « neglected tropical disease - All fields ». b) «leishmaniasis - Title » AND « neglected tropical disease - all fields ». c) «leishmaniasis - Title » NOT « neglected tropical disease - all fields ».

Une recherche des tendances générales des publications scientifiques dans la base de données Web Of Science™ montre que dans le contexte de la leishmaniose, les publications qui portent la

[75] D. Molyneux, The Theory of Everything and a neglected tropical disease: a Hawking legacy, The Lancet 385 (2015) 1069–1070. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60301-4.

[76] INCLEN Trust International. Est une organisation de recherche « à but non lucratif » qui mène des études collaboratives et multidisciplinaires sur la santé mondiale. https://inclentrust.org/inclen/introduction/ (Consulté le 17/02/2024).

[77] G. Weisz, Kenneth Warren and the Great Neglected Diseases of Mankind Programme: The Transformation of Geographical Medicine in the US and Beyond by Conrad Keating, Bulletin of the History of Medicine 92 (2018) 402–403. https://doi.org/10.1353/bhm.2018.0049.

[78] D.H. Molyneux, M.N. Malecela, Neglected Tropical Diseases and the Millennium Development Goals-why the "other diseases" matter: reality versus rhetoric, Parasites Vectors 4 (2011) 234. https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-234.

[79] A.R. Magalhães, C.T. Codeço, J.-C. Svenning, L.E. Escobar, P. Van De Vuurst, T. Gonçalves-Souza, Neglected tropical diseases risk correlates with poverty and early ecosystem destruction, Infect Dis Poverty 12 (2023) 32. https://doi.org/10.1186/s40249-023-01084-1.

[80] H. Ferpozzi, Public-Private Partnerships and the Landscape of Neglected Tropical Disease Research: The Shifting Logic and Spaces of Knowledge Production, Minerva 61 (2023) 607–629. https://doi.org/10.1007/s11024-023-09496-x.

mention MTN se concentrent principalement sur deux disciplines, « la parasitologie » et « les maladies infectieuses ». Aucun changement n'est à noter concernant la recherche pour de nouveaux médicaments (Tableau 3).

L'OMS a récemment rencontré un succès notable au Bangladesh dans la lutte contre la leishmaniose viscérale (LV), en devenant le premier pays au monde à l'avoir éliminé officiellement en tant que problème de santé publique.[81] En Inde,[82] les progrès réalisés dans la réduction des cas sont également remarquables, les deux nations ayant signalé moins d'un cas pour un million d'habitants en 2022, niveau de prévalence similaire à celui enregistré par la Colombie et la Chine avec une approche basée sur des programmes de contrôle. Le Soudan du Sud, le Brésil et l'Irak ont également montré des tendances significatives à la baisse de la LV, ces pays représentant la majorité des cas rapportés de 2005 à 2022.

Tableau 3. Nombre de publications dans Web Of Science™: a) avec les termes : Leishmaniasis (title) AND Neglected Tropical Disease (Abstract) ; b) Leishmaniasis (title) NOT Neglected Tropical Disease.

Leishmaniose **ET** MTN	1.174 publications, entre 2003-2004	Leishmaniose **NON** MTN	1.563 publications, entre 1975-2004
Médecine tropicale	730	Médecine tropicale	1.210
Parasitologie	656	Environnement public	957
Maladies infectieuses	637	Parasitologie	338
Environnement public	151	Maladies infectieuses	173
Pharmacologie Pharmacie	80	Immunobiologie	70
Microbiologie	65	Microbiologie	58
Immunobiologie	61	Médecine générale	41
Biochimie	40	Pharmacologie Pharmacie	32
Chimie thérapeutique *	**34**	Dermatologie	31
Médecine expérimentale	30	Multidisciplinaire	24
Multidisciplinaire	25	Vétérinaire	22
Médecine générale	22	Médecine expérimentale	19
Vétérinaire	17	**Chimie médicale***	**18**

2. Euphémisme :[83] La mondialisation néolibérale des années 1990[84] a aggravé les inégalités extrêmes dans certains pays, notamment dans les régions les moins développées du monde, ce qui peut expliquer le faible progrès enregistré en matière de santé.[85] Souligner *les échecs dans le modèle de santé pour le développement*[86] dans le cadre de la mondialisation serait plus utile que de les cacher avec la notion « *négligée* ». Les MTN ne sont pas "négligées" par hasard ou par nature,

[81] World Health Organization (WHO), Bangladesh achieves historic milestone by eliminating kala-azar as a public health problem, (n.d.). https://www.who.int/news/item/31-10-2023-bangladesh-achieves-historic-milestone-by-eliminating-kala-azar-as-a-public-health-problem. (Consulté le 08/03/2024).

[82] A. Chandra, S.D. Sreeganga, N. Rath, A. Ramaprasad, Healthcare Policies to Eliminate Neglected Tropical Diseases (NTDs) in India: A Roadmap, IJERPH 20 (2023) 6842. https://doi.org/10.3390/ijerph20196842.

[83] [1] L.R. Burns, M.V. Pauly, Transformation of the Health Care Industry: Curb Your Enthusiasm?, Milbank Quarterly 96 (2018) 57–109. https://doi.org/10.1111/1468-0009.12312. [2] S.H. Zuvekas, J.W. Cohen, Fee-For-Service, While Much Maligned, Remains The Dominant Payment Method For Physician Visits, Health Affairs 35 (2016) 411–414. https://doi.org/10.1377/hlthaff.2015.1291.

[84] L.B.D. Göttems, M.D.L.R. Mollo, Neoliberalism in Latin America: effects on health system reforms, Rev. Saúde Pública 54 (2020) 74. https://doi.org/10.11606/s1518-8787.2020054001806.

[85] D. Sanders, W. De Ceukelaire, B. Hutton, Health Policies and Health Care in the Context of Neoliberal Globalisation, in: W. De Ceukelaire, B. Hutton (Eds.), The Struggle for Health, 2nd ed., Oxford University PressOxford, 2023: pp. 154–188. https://doi.org/10.1093/oso/9780192858450.003.0005.

[86] L. Gautier, P.-M. David, "Health for all" and the challenges for pharmaceutical policies: A critical interpretive synthesis over 40 years, Social Sciences & Humanities Open 5 (2022) 100255. https://doi.org/10.1016/j.ssaho.2022.100255.

mais plutôt à cause de choix systémiques et de critères de priorisation dans les systèmes de santé,[87] priorités qui reflètent des inégalités économiques et sociales profondes.

Cette situation invite à s'interroger avec un esprit critique sur l'interaction entre technocrates et politiciens : [88] soit la population *négligée* est une conséquence inconsciente des échecs de ce modèle néolibéral dont personne ne veut prendre la responsabilité, soit c'est le résultat des dérives de la corruption dans les régions touchées par ces maladies.[89] Quelle que soit l'option, la notion de *maladie négligée* est un euphémisme.[90] En ce sens, la pandémie de Covid[91] peut être vue comme un indicateur d'échec de ce système néolibéral, où, en raison de la magnitude de la crise sanitaire, même les grandes puissances mondiales ont connu des problèmes de gouvernance, de souveraineté et d'autonomie pour faire face à cette situation.[92]

Le septième rapport externe[93] du Programme mondial de recherche et de formation sur les maladies tropicales (TDR - Training in Tropical Disease) remet en question la convenance du terme « MTN » au sein du Programme TDR. Malgré un large consensus sur son utilisation, ce terme est désormais considéré comme désuet et dépassé dans le contexte actuel. Selon ce rapport, le TDR lui-même utilise rarement le terme MTN dans ses communications, bien qu'il soit intégré dans le nom officiel du programme. La stratégie du TDR ne met pas véritablement l'accent sur des maladies spécifiques, mais plutôt sur les populations vulnérables. Le terme MTN est devenu en réalité une marque.[94]

D'un autre côté, remettre en question la pertinence du terme MTN va au-delà des considérations linguistiques ; il faut également apprécier sa réelle efficacité[95] pour réduire l'impact de ces maladies. Dans le contexte des discours politiques, il existe une diversité d'intérêts autres que la santé ; la dénomination MTN peut alors servir à créer une nouvelle catégorie[96] de maladies et par la suite à focaliser l'attention, diriger des ressources et rationaliser la

[87] A. Minter, L. Pellis, G.F. Medley, T.D. Hollingsworth, What Can Modeling Tell Us About Sustainable End Points for Neglected Tropical Diseases?, Clinical Infectious Diseases 72 (2021) S129–S133. https://doi.org/10.1093/cid/ciab188.

[88] C. Ewig, Reform and Electoral Competition: Convergence Toward Equity in Latin American Health Sectors, Comparative Political Studies 49 (2016) 184–218. https://doi.org/10.1177/0010414015600467.

[89] United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), A Prescription for Health - Assessing and Managing Corruption Risks in Public Health System Organizations; 2023.

[90] A. Herbert, The Role of Euphemisms in Healthcare Communication, Journal of Healthcare Communications 01 (2016). https://doi.org/10.4172/2472-1654.100014.

[91] L. Jones, S. Hameiri, Explaining the failure of global health governance during COVID-19, International Affairs 98 (2022) 2057–2076. https://doi.org/10.1093/ia/iiac231.

[92] M. Sparke, O.D. Williams, Neoliberal disease: COVID-19, co-pathogenesis and global health insecurities, Environ Plan A 54 (2022) 15–32. https://doi.org/10.1177/0308518X211048905.

[93] R. Drew, F. Gaillardin, Seventh External Review of the UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). Final Report, (2022). https://tdr.who.int/about-us.

[94] [1] D.H. Molyneux, A. Asamoa-Bah, A. Fenwick, L. Savioli, P. Hotez, The history of the neglected tropical disease movement, Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 115 (2021) 169–175. https://doi.org/10.1093/trstmh/trab015. [2] D.H. Molyneux, The "Neglected Tropical Diseases": now a brand identity; responsibilities, context and promise, Parasites Vectors 5 (2012) 23, 1756-3305-5–23. https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-23.

[95] M.E. Woode, J.A.M. Khan, R. Thomson, L.W. Niessen, Equity and efficiency in the scaled-up implementation of integrated neglected tropical disease control: the health economics protocol of the COUNTDOWN multicountry observational study in Ghana, Cameroon and Liberia, BMJ Open 8 (2018) e020113. https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-020113.

[96] S. Vanderslott, Neglected Tropical Diseases: Creating a New Disease Grouping, (2020). https://doi.org/10.13140/RG.2.2.20009.34404.

gouvernance. Dans l'optique politique, cela peut aussi devenir un outil de négociation.[97] Ainsi, le terme MTN devient paradoxal quand les interventions de santé publique dépendent des intérêts politiques.[98] Les contraintes économiques sont aussi une affaire de la sphère politique, soulevant des questions telles que : quelles sont les maladies que l'on doit prioriser, celles existantes ou celles émergentes ? Faut-il allouer l'argent aux ressources publiques pour résoudre des problèmes qui touchent l'ensemble de la population ou aux soins de santé des populations vulnérables ? Dans ce contexte, la notion « négligée » est alors une conséquence des méthodes et des critères de ciblage[99] en santé publique, (Tableau 4).

Tableau 4. Méthodes de ciblage en santé publique pour prioriser les personnes vulnérables.

Mécanisme de ciblage	Ce qui est ciblé	Qui est le groupe cible	Méthode de ciblage	Critères d'évaluation
Allocation des ressources	Dépenses publiques de santé	Personnes pauvres. Personnes ayant de plus grands besoins de santé.	Géographique	Égalisation (pondérée) de dépenses *per capita*
Fourniture de soins de santé primaire en zones rurales (SSP)	Dépenses en SSP (généralement installations)	Personnes pauvres.	Large. Géographique.	Couverture
Engager des ONG pour fournir SSP en milieu rural	Services de santé sous contrat	Personnes vivant dans les zones rurales.	Géographique	Utilisation des services et dépenses de santé dans les milieux socio-économiques défavorisés.
Exonérations de frais d'utilisation	Exonérations de paiement pour les prestations	Personnes pauvres. Groupes démographiques. Personnes avec des conditions spécifiques.	Directe. Catégorique.	Couverture Coût par bénéficiaire. Coût par habitant.
Fonds d'égalité	Dispenses de paiement pour les prestations	Personnes pauvres.	Directe.	Couverture Coût par bénéficiaire Coût par habitant
Transferts monétaires	Espèces	Personnes pauvres.	Géographique, ou Géographique + directe	Couverture
Marketing social des dispositifs médicaux	Produits de santé publique subventionnés	Les groupes les plus vulnérables	Auto-sélection Caractéristique	Couverture

De plus, dans un contexte politique complexe, le processus décisionnel en santé publique l'est aussi au sein des systèmes de santé. [100] Les décisions suivent souvent une méthodologie axée sur le concept du poids[101] de la maladie comme indicateur[102] principal. Cet indicateur présente un inconvénient important, car il montre des tendances de prévalence ou d'incidence en forme de vagues, avec une alternance de périodes de réduction et d'augmentation des cas. Ainsi, une hausse

[97] L. McDougall, Power and Politics in the Global Health Landscape: Beliefs, Competition and Negotiation Among Global Advocacy Coalitions in the Policy-Making Process, Int J Health Policy Manag 5 (2016) 309–320. https://doi.org/10.15171/ijhpm.2016.03.

[98] M. Parker, T. Allen, De-Politicizing Parasites: Reflections on Attempts to Control the Control of Neglected Tropical Diseases, Medical Anthropology 33 (2014) 223–239. https://doi.org/10.1080/01459740.2013.831414.

[99] [1] Hanson, K; Worrall, E; Wiseman, V; (2007) Targeting services towards the poor: A review of targeting mechanisms and their effectiveness. In: Bennett, S; Gilson, L; Mills, A, (eds.) Health, economic development and household poverty: from understanding to action. Routledge, London. https://researchonline.lshtm.ac.uk/id/eprint/125778. [2] J.H. Ellwanger, A.B.G.D. Veiga, V.D.L. Kaminski, J.M. Valverde-Villegas, A.W.Q.D. Freitas, J.A.B. Chies, Control and prevention of infectious diseases from a One Health perspective, Genet. Mol. Biol. 44 (2021) e20200256. https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2020-0256.

[100] M.V.G. Lacerda, F.F.A. Val, W.M. Monteiro, Dilemma in the Brazilian Tropical Medicine: 'Is speed more important than direction?,' An. Acad. Bras. Ciênc. 91 (2019) e20190132. https://doi.org/10.1590/0001-3765201920190132.

[101] H. Alatif, Burden and Trends of Leishmaniasis over the last one Decade Across the Globe: Trend Analysis of WHO Regions, Integr J Med Sci (2021). https://doi.org/10.15342/ijms.2021.295.

[102] A. Semahegn, T. Manyazewal, E. Getachew, B. Fekadu, E. Assefa, M. Kassa, G. Davey, M. Hopkins, M. Araya, T. Woldehanna, C. Hanlon, A. Fekadu, Burden of neglected tropical diseases and access to medicine and diagnostics in Ethiopia: a scoping review, Syst Rev 12 (2023) 140. https://doi.org/10.1186/s13643-023-02302-5.

des cas peut survenir après un affaiblissement des actions de contrôle, suivi par des tendances à la baisse (Figure 5).

Ainsi, choisir les bons indicateurs devient un défi,[103] et le poids de la maladie ne doit pas être pris comme le critère principal de priorisation ou de décision. Des pays comme le Pakistan et la Syrie présentent des pics épidémiologiques environ tous les 2 ans, l'Egypte et le Costa Rica presque tous les trois ans. L'absence ou l'inadéquation des programmes de santé publique peuvent entraîner une augmentation rapide de l'incidence de la maladie, comme en témoigne le Sri Lanka. Dans ce pays, la leishmaniose est devenue un problème de santé publique majeur en seulement 15 ans depuis le premier cas signalé en 1992, avec des chiffres de 8447 cas au total entre 2009 et 2016.[104]

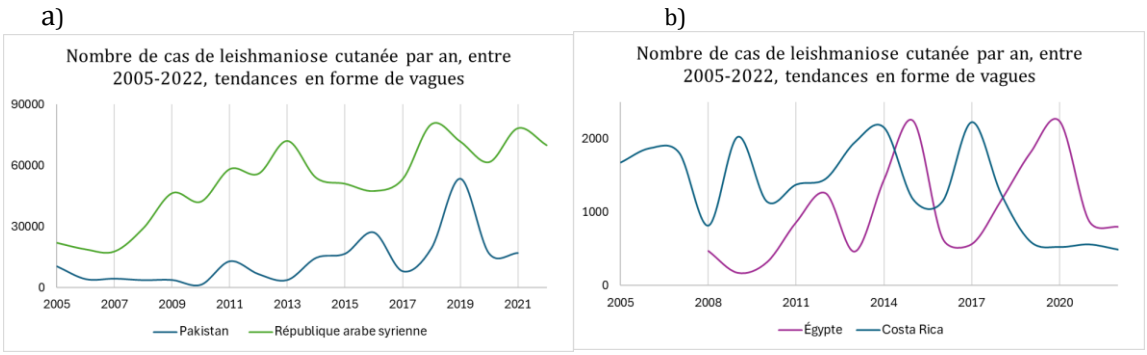


Figure 5. Nombre de cas de leishmaniose cutanée par an, entre 2005-2022, tendances en forme de vagues pour le Pakistan et la Syrie (a, grande échelle) ; l'Egypte et le Costa Rica (b, petite échelle).

Divers exemples peuvent être mentionnés dans le cadre des programmes de contrôle des maladies infectieuses mis en œuvre avant le modèle de santé globale de 1990. Par exemple, les programmes de santé publique en Corée du Sud[105] ou en Amérique latine[106] pour combattre les maladies parasitaires et les zoonoses l'ont été avec un succès relatif bien avant que le terme MTN ne soit popularisé. Cela montre qu'il est crucial de distinguer les critères de financement et de contrôle des systèmes de santé touchant cette population « négligée ».[107]

Cette réflexion[108] souligne l'importance des termes à utiliser en santé. Un vocabulaire avec une connotation stigmatisante[109] peut avoir de graves conséquences, tant pour les communautés touchées que pour les pays concernés. Cette discussion soulève donc l'importance de reconsidérer

[103] M. Bamorovat, I. Sharifi, A. Khosravi, M.R. Aflatoonian, S. Agha Kuchak Afshari, E. Salarkia, F. Sharifi, B. Aflatoonian, F. Gharachorloo, A. Khamesipour, M. Mohebali, O. Zamani, M.R. Shirzadi, M.M. Gouya, Global Dilemma and Needs Assessment Toward Achieving Sustainable Development Goals in Controlling Leishmaniasis, J Epidemiol Glob Health (2024). https://doi.org/10.1007/s44197-024-00190-z.

[104] T. Wijerathna, N. Gunathilaka, Morphological identification keys for adults of sand flies (Diptera: Psychodidae) in Sri Lanka, Parasites Vectors 13 (2020) 450. https://doi.org/10.1186/s13071-020-04305-w.

[105] M.-H. Choi, J.-R. Yu, S.-T. Hong, Who Neglects Neglected Tropical Diseases? - Korean Perspective, J Korean Med Sci 30 (2015) S122. https://doi.org/10.3346/jkms.2015.30.S2.S122.

[106] Á.N. Agudelo-Suárez, L.C. Villamil-Jiménez, Políticas de zoonosis en Colombia: del Código Sanitario a la salud ambiental, Rev. Salud Pública 20 (2018) 34–44. https://doi.org/10.15446/rsap.v20n1.72816.

[107] Y.L. López, C. González, B.N. Gallego, A.L. Moreno, Rectoría de la vigilancia en salud pública en el sistema de seguridad social en salud de Colombia: estudio de casos, Biomedica 29 (2009) 567. https://doi.org/10.7705/biomedica.v29i4.134.

[108] L. Dean, R. Tolhurst, G. Nallo, K. Kollie, A. Bettee, S. Theobald, A health-systems journey towards more people-centred care: lessons from neglected tropical disease programme integration in Liberia, Health Res Policy Sys 21 (2023) 29. https://doi.org/10.1186/s12961-023-00975-x.

[109] A. P. Goddu, K.J. O'Conor, S. Lanzkron, M.O. Saheed, S. Saha, M.E. Peek, C. Haywood, M.C. Beach, Do Words Matter? Stigmatizing Language and the Transmission of Bias in the Medical Record, J GEN INTERN MED 33 (2018) 685–691. https://doi.org/10.1007/s11606-017-4289-2.

la manière dont nous classifions et abordons ces maladies au sein de la communauté internationale en regardant le contexte sanitaire[110] des systèmes de santé.[111]

3. L'industrie pharmaceutique : Pour conclure cette réflexion, deux idées principales restent à souligner : 1) L'absence d'une industrie pharmaceutique publique. Il est utopique de s'imaginer pouvoir transférer à l'industrie pharmaceutique « privée » une responsabilité de marchés non lucratifs (MTN). De façon pragmatique, on ne peut pas espérer de la philanthropie[112] pour résoudre le problème ; 2) Du point de vue de la santé publique, *le médicament* n'est pas toujours la stratégie la plus efficace pour répondre à un problème de santé. C'est le cas de la dracunculose,[113] classée comme MTN, dont l'élimination a été menée avec succès sans un traitement pharmacologique spécifique.

Reconnaître la juste valeur de l'industrie, mais sans lui accorder une valeur supérieure à ce qu'elle est, pourrait aider à comprendre que la vocation de l'industrie pharmaceutique n'est pas de promouvoir la santé publique ni de garantir des valeurs comme celle de l'égalité d'accès des soins pour tous. Cette industrie est un acteur dans le système de santé, avec un but lucratif, qui offre la possibilité de disposer d'options thérapeutiques en masse.[114]

Cette réflexion n'a pas pour but d'identifier des groupes de « gentils philanthropes » et de « méchants capitalistes » ; il s'agit plutôt de décrire une interaction complexe de pouvoirs entre de nombreux acteurs avec de fortes répercussions sur une population non prioritaire. Conceptuellement, Michel Foucault[115] le décrirait avec le terme de biopouvoir et de biopolitique. Ainsi, le terme « négligé » peut se révéler stigmatisant[116] pour une population quand la responsabilité de la prise en charge de la santé devient une affaire privée et non publique. La vie des personnes ne peut pas dépendre des intérêts des industriels pharmaceutiques.[117]

En ce qui concerne la relation entre la santé publique et le médicament, la notion de manque d'intérêt de l'industrie pour les MNT pose un problème conceptuel, qu'il faut relier au phénomène de *sur-médicalisation.*[118] Même avec le développement de nouvelles options thérapeutiques, nous

---

[110] J.P. Ehrenberg, S.K. Ault, Neglected diseases of neglected populations: Thinking to reshape the determinants of health in Latin America and the Caribbean, BMC Public Health 5 (2005) 119. https://doi.org/10.1186/1471-2458-5-119.

[111] J. Clarkson, J. Dean, J. Ward, A. Komashie, T. Bashford, A systems approach to healthcare: from thinking to -practice, Future Healthc J 5 (2018) 151–155. https://doi.org/10.7861/futurehosp.5-3-151.

[112] [1] C. Butler, Philanthrocapitalism: Promoting Global Health but Failing Planetary Health, Challenges 10 (2019) 24. https://doi.org/10.3390/challe10010024. [2] A.-E. Birn, Philanthrocapitalism, past and present: The Rockefeller Foundation, the Gates Foundation, and the setting(s) of the international/global health agenda, HYP 12 (2014). https://doi.org/10.5779/hypothesis.v12i1.229.

[113] World Health Organization (WHO), Dracunculiasis (Guinea-worm disease) - the global health observatory. https://ourworldindata.org/guinea-worm-path-eradication (Consulté le 15/03/2024)

[114] J.M. Fuller, E. Barenfeld, I. Ekman, Why do patients struggle with their medicines?—A phenomenological hermeneutical study of how patients experience medicines in their everyday lives, PLoS ONE 16 (2021) e0255478. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255478.

[115] T. Atuk, Pathopolitics: Pathologies and Biopolitics of PrEP, Front. Sociol. 5 (2020) 53. https://doi.org/10.3389/fsoc.2020.00053.

[116] K. Hofstraat, W.H. Van Brakel, Social stigma towards neglected tropical diseases: a systematic review, Int. Health 8 (2016) i53–i70. https://doi.org/10.1093/inthealth/ihv071.

[117] P.D. Jorgensen, Pharmaceuticals, Political Money, and Public Policy: A Theoretical and Empirical Agenda, J. Law. Med. Ethics 41 (2013) 561–570. https://doi.org/10.1111/jlme.12065.

[118] J.M. Spiegel, S. Dharamsi, K.M. Wasan, A. Yassi, B. Singer, P.J. Hotez, C. Hanson, D.A.P. Bundy, Which New Approaches to Tackling Neglected Tropical Diseases Show Promise?, PLoS Med 7 (2010) e1000255. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000255.

ne pouvons pas être absolument sûrs de résoudre les problèmes des MTN. Les médicaments représentant une valeur sociale symbolique[119] même si leur efficience[120] n'est pas toujours requise (Efficacité[121] ≠ effectivité[122] ≠ efficience[123]).

1.1.3.1. Réflexion politique sur la leishmaniose en Colombie

Mon expérience en Colombie, notamment au sein du programme de pharmacovigilance du Département de Cundinamarca, m'a permis de considérer la leishmaniose[124] comme un ensemble d'interactions complexes, relevant des défis plus politiques que sanitaires. Voici quelques aspects du modèle de santé colombien, le contexte politique avec ses conséquences militaires, la représentation sociale du médicament et les capacités de l'Agence sanitaire de sécurité des médicaments.

En termes sanitaires : le système de santé colombien a été largement influencé par le contexte économique de 1990,[125] lorsque la Colombie a rejoint officiellement les accords internationaux du marché mondial. Le discours pour le développement avec la mondialisation a été assorti de la promesse de la mise en place d'un modèle de santé novateur. Le Président de la Colombie César Gaviria est entré dans l'histoire comme celui qui a favorisé la privatisation du système de santé Colombien.[126] Vers les années 1990, deux changements généraux se sont produits dans le modèle de santé colombien : d'abord la participation du secteur privé[127] a été autorisée selon les règles du marché mondial, et d'autre part, les capacités de production de médicaments ont été réduites, à l'image de la production locale de traitements contre les morsures de serpent qui ont été interrompues (il faudra attendre 2005 pour que l'État colombien réussisse à rétablir la production du sérum au sein de son laboratoire public).[128]

[119] P.M. Lantz, D.S. Goldberg, S.E. Gollust, The Perils of Medicalization for Population Health and Health Equity, Milbank Quarterly 101 (2023) 61–82. https://doi.org/10.1111/1468-0009.12619.

[120] S. Garattini, Are me-too drugs justified?, J Nephrol 10 (1997) 283–294.

[121] J.P. Caesar Delos Trinos, D. Ng-Nguyen, L.E. Coffeng, C.E.F. Dyer, N. Clarke, R. Traub, K. Halton, V. Wiseman, C. Watts, S.V. Nery, Cost and cost-effectiveness analysis of mass drug administration compared to school-based targeted preventive chemotherapy for hookworm control in Dak Lak province, Vietnam, The Lancet Regional Health - Western Pacific 41 (2023) 100913. https://doi.org/10.1016/j.lanwpc.2023.100913.

[122] J.K. Aronson, A.R. Green, Me-too pharmaceutical products: History, definitions, examples, and relevance to drug shortages and essential medicines lists, Brit J Clinical Pharma 86 (2020) 2114–2122. https://doi.org/10.1111/bcp.14327.

[123] A.S. De Nadai, J.L. Etherton, Beyond Efficacy and Effectiveness: Clinical Efficiency Is Necessary for Dissemination, J Cogn Psychother 35 (2021) 221–231. https://doi.org/10.1891/JCPSY-D-20-00034.

[124] J.D. Ramírez, C. Hernández, C.M. León, M.S. Ayala, C. Flórez, C. González, Taxonomy, diversity, temporal and geographical distribution of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: A retrospective study, Sci Rep 6 (2016) 28266. https://doi.org/10.1038/srep28266.

[125] A.L. Ruano, D. Rodríguez, P.G. Rossi, D. Maceira, Understanding inequities in health and health systems in Latin America and the Caribbean: a thematic series, Int J Equity Health 20 (2021) 94, s12939-021-01426–1. https://doi.org/10.1186/s12939-021-01426-1.

[126] [1] R. Atun, L.O.M. De Andrade, G. Almeida, D. Cotlear, T. Dmytraczenko, P. Frenz, P. Garcia, O. Gómez-Dantés, F.M. Knaul, C. Muntaner, J.B. De Paula, F. Rígoli, P.C.-F. Serrate, A. Wagstaff, Health-system reform and universal health coverage in Latin America, The Lancet 385 (2015) 1230–1247. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61646-9. [2] [1] F. Ruiz Gómez, T. Zapata Jaramillo, L. Garavito Beltrán, Colombian health care system: results on equity for five health dimensions, 2003 - 2008, Rev Panam Salud Publica 33 (2013) 107–115. https://doi.org/10.1590/S1020-49892013000200005.

[127] N. Homedes, A. Ugalde, Why neoliberal health reforms have failed in Latin America, Health Policy 71 (2005) 83–96. https://doi.org/10.1016/j.healthpol.2004.01.011.

[128] [1] H.W. Fan, M.A. Natal Vigilato, J.C. Augusto Pompei, J.M. Gutiérrez, en representación de la Red de Laboratorios Públicos Productores de Antivenenos de América Latina (RELAPA). (Los autores de la RELAPA y sus afiliaciones se mencionan al final del manuscrito.), Situación de los laboratorios públicos productores de antivenenos en América Latina, Revista Panamericana de Salud Pública 43 (2019) 1. https://doi.org/10.26633/RPSP.2019.92. S. [2] Tabares Vélez, L.M. Preciado, L.J. Vargas Muñoz, C.A. Madrid Bracamonte, A. Zuluaga, J. Gómez Robles, C. Renjifo-Ibañez, S. Estrada-Gómez, Standard Quality Characteristics and Efficacy of a New Third-Generation Antivenom Developed in Colombia Covering Micrurus spp. Venoms, Toxins 16 (2024) 183. https://doi.org/10.3390/toxins16040183. [3] S. Estrada-Gómez, L.J. Vargas-Muñoz, L.F. Higuita-Gutiérrez, Epidemiology of Snake Bites Linked with the Antivenoms Production in Colombia 2008–2020: Produced Vials Do Not Meet the Needs, DHPS Volume 14 (2022) 171–184. https://doi.org/10.2147/DHPS.S367757.

Dans le contexte colombien, la couverture par le système de santé a évolué de 22 % en 1995 jusqu'à 95 % en 2023 au bénéfice des citoyens socialement vulnérables (les chômeurs, les pauvres, la population avec des économies informelles[129] et la population migrante vénézuélienne[130]). Cependant, le problème principal de ce modèle de santé[131] est de se concentrer dans les principales villes,[132] avec un faible développement du modèle de Soins de Santé Primaire (SSP) dans les territoires plus éloignés.[133] Ce modèle est centré davantage sur l'intervention que sur la prévention.

La Colombie expérimente actuellement un changement du modèle de santé [134] pour renforcer la SSP, dans le cadre du programme du premier président de gauche dans l'histoire de ce pays. Politiquement ce programme pourrait s'appuyer sur une réussite soviétique.[135] La notion de SSP a été proposée et validée par l'OMS pendant la guerre froide, dans un territoire soviétique en 1978, selon la déclaration d'Alma-Ata,[136] aujourd'hui le Kazakhstan.

A cette époque en Colombie, les guérillas d'idéologie politique marxiste-léniniste (FARC, ELN, M-19) étaient en conflit avec l'Armée colombienne. Il était alors politiquement inconcevable que toute idée communiste[137] soit bien accueillie dans un pays avec une politique proche de celle des Etats-Unis.

Héctor Abad Gómez,[138] médecin, essayiste, défenseur des droits de l'homme et spécialiste de la santé publique colombienne, a activement milité pour la promotion de la santé publique en Colombie. Cette démarche lui a valu des réactions hostiles de la part des sphères politiques conservatrices du pays, qui le percevaient souvent comme un communiste. À son époque, les idéaux du Dr Abad concernant les déterminants sociaux de la santé et les soins de santé primaires, étaient étroitement liés aux postulats de la déclaration d'Alma-Ata. Finalement, assassiné en 1987, le Dr Abad est devenu un symbole du développement de l'École colombienne de santé publique.

Aujourd'hui le modèle SSP a été réintroduit avec la déclaration d'Astana (qui renforce les principes d'équité). Dans le contexte colombien, même si un modèle de SSP peut paraître

[129] S.M. Lemley, S. Castro-Diaz, L. Cubillos, F. Suárez-Obando, W.C. Torrey, J.M. Uribe-Restrepo, M. Williams, L.A. Marsch, C. Gómez-Restrepo, Health-related quality of life and health literacy among adult primary care patients with subsidized or contributive health insurance in Colombia, Rev Colomb Psiquiatr (Engl Ed) 50 Suppl 1 (2021) 22–29. https://doi.org/10.1016/j.rcpeng.2021.06.005.

[130] Rapport annuel du ministère de la Santé – Colombie. Réalisations du ministère de la Santé et de la Protection Sociale en 2023. https://www.minsalud.gov.co/Paginas/Logros-del-Ministerio-de-Salud-y-Protecci%C3%B3n-Social-en-2023.aspx (Consulté le 04/04/2024).

[131] P.C. Webster, Health in Colombia: a system in crisis, CMAJ 184 (2012) E289-290. https://doi.org/10.1503/cmaj.109-4124.

[132] E. Lamprea, J. García, Closing the Gap Between Formal and Material Health Care Coverage in Colombia, Health Hum Rights 18 (2016) 49–65.

[133] P.A. Mosquera, J. Hernández, R. Vega, J. Martínez, R. Labonte, D. Sanders, M.S. Sebastián, Primary health care contribution to improve health outcomes in Bogota-Colombia: a longitudinal ecological analysis, BMC Fam Pract 13 (2012) 84. https://doi.org/10.1186/1471-2296-13-84.

[134] L. Taylor, Colombia's government fractures under weight of radical health reform, BMJ (2023) p1315. https://doi.org/10.1136/bmj.p1315.

[135] A.-E. Birn, N. Krementsov, "Socialising" primary care? The Soviet Union, WHO and the 1978 Alma-Ata Conference, BMJ Glob Health 3 (2018) e000992. https://doi.org/10.1136/bmjgh-2018-000992.

[136] G. Almeida, O. Artaza, N. Donoso, R. Fábrega, La atención primaria de salud en la Región de las Américas a 40 años de la Declaración de Alma-Ata, Rev Panam Salud Publica 42 (2018). https://doi.org/10.26633/RPSP.2018.104.

[137] F. Fleck, Consensus during the Cold War: back to Alma-Ata, Bull World Health Organ 86 (2008) 745–746. https://doi.org/10.2471/blt.08.031008.

[138] R. Guerrero-Velasco, G. Apráez-Ippolito, Héctor Abad-Gómez (1921-1987): médico, educador y defensor de los derechos humanos, Gaceta Sanitaria 35 (2021) 495–498. https://doi.org/10.1016/j.gaceta.2020.02.003.

nécessaire, le phénomène politique peut engendrer un contrepoids,[139] rendant son application difficile. Il ne s'agit pas seulement de pauvreté ou d'être une maladie « négligée » par l'industrie pharmaceutique :[140] les MTN pourraient être mieux contrôlées si elles ne tombaient pas dans les intérêts des forces complexes.

Le contexte politique avec ses conséquences militaires : Les patients touchés par la leishmaniose peuvent venir de différents horizons, pas uniquement d'un point de vue géographique. La Colombie, malgré ses nombreux territoires ruraux, montagneux et forestiers, a une population majoritairement concentrée dans des zones urbaines. Cette concentration urbaine est, en partie, une conséquence du déplacement des populations, résultat des conflits entre quatre groupes de militaires, un légal (l'Armée nationale) et trois illégaux (guérillas, mercenaires et narcotrafiquants). Ces groupes de militaires et également la population canine mise en service sur le plan militaire,[141] présents dans toute la région tropicale et rurale, sont touchés[142] par la leishmaniose de la même façon que le reste des citoyens et animaux domestiques. Socialement, ce contexte amène à catégoriser ou discriminer les patients en trois groupes : les militaires de l'Armée Nationale, les paramilitaires des groupes illégaux[143] et les citoyens. La leishmaniose est donc devenue *une maladie de guerre,*[144] notion renforcée avec les expériences malheureuses de la population civile prise en otage.[145]

Les patients non affiliés à un groupe armé subissent une discrimination[146] préétablie ; avant d'être considérés comme patients, ils sont présumés membres de ces groupes illégaux. Le processus d'accès aux services de soins, dans ce contexte, devient relativement limité par exemple avec un diagnostic difficile. Cette discrimination sociale mène vers un scénario de stigmatisation. Le contexte de la leishmaniose en Colombie est donc extrêmement complexe et dépasse le domaine de la santé publique en raison de son lien fort avec le conflit militaire interne. Elle va

[139] Reuters, Colombian senate committee rejects Petro government health reform, (n.d.). https://www.reuters.com/world/americas/colombian-senate-committee-rejects-petro-government-health-reform-2024-04-03/ (Consulté le 04/04/2024).

[140] [1] F. Frézard, C. Demicheli, R. Ribeiro, Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs, Molecules 14 (2009) 2317–2336. https://doi.org/10.3390/molecules14072317. [2] V.A. Francesconi, F. Francesconi, R. Ramasawmy, G.A.S. Romero, M.D.G.C. Alecrim, Failure of fluconazole in treating cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania guyanensis in the Brazilian Amazon: An open, nonrandomized phase 2 trial, PLoS Negl Trop Dis 12 (2018) e0006225. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006225.

[141] R. Nogueira De Brito, S. Tanner, J.V. Runk, J. Hoyos, Looking through the lens of social science approaches: A scoping review of leishmaniases and Chagas disease research, Acta Tropica 249 (2024) 107059. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.107059.

[142] J.A.I. Rodríguez, S.N.I. Rodríguez, M.J. Olivera, Leishmaniasis in the Colombian post-conflict era: a descriptive study from 2004 to 2019, Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 54 (2021) e0612-2020. https://doi.org/10.1590/0037-8682-0612-2020.

[143] L. Pinto García, Disentangling war and disease in post-conflict Colombia beyond technoscientific peacemaking, Tapuya: Latin American Science, Technology and Society 2 (2019) 94–111. https://doi.org/10.1080/25729861.2018.1532779.

[144] [1] C.A. Acevedo-Montoya, R.A. Ruiz-Lurduy, N.E. Montoya-Tangarife, M.A. Guerra-Barrios, Prácticas y saberes de excombatientes de las FARC-EP sobre el tratamiento de la leishmaniasis cutánea., Rev Hum Med 22 (2022). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-81202022000300524&lng=es&nrm=iso. [2] I. Berry, L. Berrang-Ford, Leishmaniasis, conflict, and political terror: A spatio-temporal analysis, Social Science & Medicine 167 (2016) 140–149. https://doi.org/10.1016/j.socscimed.2016.04.038.

[145] [1] Lina Beatriz Pinto-García. MARAÑA Leishmaniasis and the Pharmaceuticalization of War in Colombia. A dissertation submitted to the Faculty of Graduate Studies in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy Graduate program in Science & Technology Studies York University Toronto, Ontario April 2020. [2] Processus de témoignage et accords pour la paix en Colombie. Salle de la responsabilité et la détermination des faits et de la conduite. Juridiction Spéciale Pour la Paix. Réponse et observations à l'ordonnance 019 du 26 janvier 2021 des anciens membres du secrétariat des FARC-EP, figurant dans le dossier 001 « Prise d'otages et autres privations graves de liberté » Avril 2021

[146] « La lèpre de la jungle, la maladie de la guerre, la maladie des kidnappés, la maladie de la guérilla, la maladie subversive » dans : Milena Carolina Rubiano Bran. La enfermedad subversiva: prácticas de guerra biológica en el conflicto armado colombiano y formas de cuidado afectivo en las FARC-EP. Tesis de grado. Departamento de Ciencia Política, Universidad de los Andes. (2021)

également au-delà de la notion de « maladie de pauvreté » telle qu'elle est habituellement évoquée.[147]

La représentation sociale du médicament : Les traitements pharmacologiques pour la leishmaniose en Colombie ne sont pas payés par les patients individuellement, mais pris en charge par l'Etat à l'aide d'un fonds stratégique :[148]

- Les groupes illégaux veulent profiter de cette protection, ce qui engendre des actes de violence pour se procurer ces traitements, soit par des vols de médicaments du système de santé publique, ou par l'introduction de contrefaçons[149] *via* les frontières avec le Pérou, l'Équateur, le Vénézuéla et surtout le Brésil.
- De plus, l'accès aux médicaments par des voies juridiques (et non médicales) avec un mécanisme nommé « *tutelle* » est un défi supplémentaire. Les citoyens peuvent déposer une « tutelle » devant les tribunaux pour exiger la prise en charge de soins de santé et ensuite avoir accès aux médicaments[150] dont les antileishmaniens. Le médicament peut être aussi acquis par le biais du marché noir.

Tableau 5. Succès et défis dans la lutte contre la leishmaniose en Colombie.

Réussites	Défis
La Leishmaniose est une maladie prioritaire établie par la loi, avec une surveillance épidémiologique continue.	Les dispositions établies par la loi ne sont pas aisément mises en place dans les territoires éloignés des centre villes.
Une maladie avec une charge ou un poids relativement contrôlé.	Le système de surveillance peut avoir des sous-enregistrements de cas.
Capacité du système du santé pour acheter les médicaments. Les patients ne doivent payer aucun frais.	Les achats de l'État dépendent d'accords avec l'organisation panaméricaine de la santé et les fabricants, compromettant un approvisionnement permanent qui n'est pas nécessairement adapté aux besoins épidémiologiques, et entraînant des surcoûts ou des pertes de produits dûs aux dates de péremption proches.
Différentes institutions publiques concernées : Le Ministère de la Santé (réglementation légale et achat des médicaments avec l'OPS). L'Institut National de surveillance épidémiologique (suivi des cas). L'armée Nationale (contrôles militaires des groupes illégaux).	L'accès aux médicaments dépend d'une validation médicale et militaire préalable. La distribution est fortement contrôlée (monopolisée) par l'Etat. Pas de distribution privée.
32 Agences Sanitaires régionales (implémentation sur le terrain des consignes nationales), avec budgets pour les programmes de lutte contre certaines maladies zoonotiques, dont la leishmaniose.	Faible capacité à évaluer l'efficacité de l'utilisation des ressources, et risques potentiels de corruption.
Système de Santé qui doit offrir la prise en charge thérapeutique.	Réticence des patients pour les traitements médicaux, en raison soit de la difficulté d'accès, ou de la stigmatisation dérivée du conflit militaire, ou encore les croyances ethnobotaniques ou populaires.
Médicaments disponibles dans les 32 agences territoriales de santé	Faible observance pour garantir un traitement complet ; sous-dosage (exprès pour dérouter les médicaments vers le marché noir).

Dans ce contexte, la leishmaniose est loin d'être strictement « négligée » ou touchant strictement les plus pauvres, et représente un défi complexe pour garantir l'accès équitable aux

[147] J. Alvar, S. Yactayo, C. Bern, Leishmaniasis and poverty, Trends in Parasitology 22 (2006) 552–557. https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.09.004.

[148] C. Vlassoff, N. Giron, M.J. Vera Soto, A.N.S. Maia-Elkhoury, A. Lal, L.G. Castellanos, G. Almeida, C. Lim, Ensuring access to essential health products: Lessons from Colombia's leishmaniasis control and elimination initiative, PLoS Negl Trop Dis 17 (2023) e0011752. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011752.

[149] [1] Milena Carolina Rubiano Bran. Mosquita, parásito y mamífero: la agencia del holobioma leishmania en el conflicto armado colombiano. Trabajo de grado de para optar al título de Maestra en Filosofía por la Universidad de los Andes. Departamento de Filosofía, Facultad de Ciencias Sociales Bogotá, Agosto de 2023. [2] L. P. Garcia. Addressing two rural health problems at once: A syndemic approach to malaria and cutaneous leishmaniasis in post-conflict Colombia. Institute for Science, Innovation & Society (InSIS), University of Oxford. (2023)

[150] A.E. Yamin, O. Parra-Vera, How Do Courts Set Health Policy? The Case of the Colombian Constitutional Court, PLoS Med 6 (2009) e1000032. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000032.

soins de santé, y compris pour ceux qui opèrent en dehors du cadre légal. Par conséquent, la leishmaniose en Colombie peut être décrite comme une balance entre la réussite des actions mises en place et les défis encore présents (tableau 5).

Afin de de surmonter ces défis, il est nécessaire d'améliorer les processus spécifiques suivants : accélérer le diagnostic de la maladie, renforcer les capacités de distribution et d'administration des médicaments, réaliser des études d'efficacité, déstigmatiser les personnes pour réduire ou éviter les échecs thérapeutiques ou le manque d'observance. Ceci, sans compter les défis techniques liés à la gestion des médicaments et accessoires (seringues, aiguilles, solutions pour administration parentérale, compresses) sans lesquels les médicaments ne peuvent être administrés en toute sécurité. De plus, la disponibilité de personnel qualifié pour ces tâches, comme des infirmiers formés, est cruciale. La distribution aussi par le marché privé pourrait être plus réglementée. Les prix élevés dans le marché noir stimulent le détournement du médicament : pour pouvoir être revendues, des doses sont ajustées pour économiser des unités pharmaceutiques. Les défis techniques propres aux médicaments incluent aussi leur stockage, avec un respect de la chaîne du froid si nécessaire et l'achat de médicaments avec une date d'expiration suffisamment longue pour éviter les péremptions avant utilisation.

Les capacités de l'Agence sanitaire de sécurité des médicaments : Le rôle et la puissance relative de l'Agence sanitaire locale INVIMA (équivalent de l'ANSM française) pour donner une autorisation de mise sur le marché devraient être renforcés. Les exigences en matière de réglementation depuis les années 1990 s'alignent souvent sur les critères de la FDA.[151] Cette dépendance, combinée à la lenteur des processus administratifs, a compliqué la production et la disponibilité des médicaments. Ceci soulève la question de savoir si les difficultés rencontrées sont dues à des problèmes d'approvisionnement, ou bien dues à un échec de marché (relatives aux MTN) ou à des défaillances des politiques de santé publique, exacerbées par des normes réglementaires mal adaptées aux spécificités locales.[152] Ce problème dépasse donc la simple sphère de l'industrie pharmaceutique pour toucher également à l'efficacité des agences de régulation.

L'interruption de production locale observée avec les antidotes contre les morsures de serpents a été un exemple de cette problématique. De 1997 à 2017, diverses solutions administratives ont été proposées, en Colombie, pour contourner ces obstacles, telles que l'autorisation accélérée de commercialisation, ou des mécanismes judiciaires pour permettre l'utilisation de médicaments non officiellement approuvés sur le territoire national.

[151] S. Mukherjee, The United States Food and Drug Administration (FDA) regulatory response to combat neglected tropical diseases (NTDs): A review, PLoS Negl Trop Dis 17 (2023) e0011010. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011010.

[152] P. Trouiller, E. Torreele, P. Olliaro, N. White, S. Foster, D. Wirth, B. Pécoul, Drugs for neglected diseases: a failure of the market and a public health failure?, Tropical Med Int Health 6 (2001) 945–951. https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2001.00803.x.

1.1.4. Capacités des Agences sanitaires

Comment le processus de recherche et développement de nouveaux médicaments antileishmaniens peut-il être efficacement transposé en clinique ?[153]

Malgré l'existence de guides permettant le bon usage des médicaments, l'OMS ne peut pas fournir les traitements nécessaires pour toutes les MTN dans tous les territoires. Le rôle des autorités nationales est donc crucial pour garantir l'accès à ces traitements, même sans l'approbation traditionnelle des Agences sanitaires, à condition que leur efficacité et leur sécurité soient validées. La construction de cadres juridiques adaptés[154] aux MTN et le renforcement des fonctions réglementaires deviennent un aspect important.

Comme déjà mentionné précédemment, l'utilisation de l'article 58 (Règlement N° 726/2004 du Parlement Européen et du Conseil du 31 mars 2004) peut être envisagée comme une option de coopération pour l'autorisation de nouveaux traitements mais n'est pas la solution. Les Agences de santé locales pourraient développer leurs propres mesures et leurs propres mécanismes d'autorisation accélérés.[155]

La mise en œuvre de programmes de pharmacovigilance[156] adaptés aux MTN pourrait jouer un rôle clé. Donner une valeur ajoutée au concept *d'événement indésirable* ou de *problème lié aux médicaments*, permettrait à l'Agence sanitaire de jouer un rôle plus important dans l'évaluation de la sécurité des produits, mais aussi dans celle dérivée de l'absence de traitement. Cela pourrait donner des solutions pour déployer des études cliniques adaptées aux territoires.[157] L'approche conceptuelle du *problème lié aux médicaments* pourrait alors entraîner la recherche d'une nouvelle option thérapeutique en regardant la réduction de la souffrance des patients pendant le traitement et pas seulement la gestion des données des effets indésirables (Tableau 6).

Une autre approche intéressante pour les Agences sanitaires vis-à-vis des MTN est le repositionnement.[158] Cette stratégie consiste à utiliser des médicaments déjà commercialisés ou dont le développement a été interrompu faute d'efficacité, pour traiter une maladie différente. La découverte et le développement de médicaments *de novo* constituent une approche longue et

[153] H.N. Corman, C.W. McNamara, M.A. Bakowski, Drug Discovery for Cutaneous Leishmaniasis: A Review of Developments in the Past 15 Years, Microorganisms 11 (2023) 2845. https://doi.org/10.3390/microorganisms11122845.

[154] K.M. Pfarr, A.K. Krome, I. Al-Obaidi, H. Batchelor, M. Vaillant, A. Hoerauf, N.O. Opoku, A.C. Kuesel, The pipeline for drugs for control and elimination of neglected tropical diseases: 2. Oral anti-infective drugs and drug combinations for off-label use, Parasites Vectors. 16 (2023) 394. https://doi.org/10.1186/s13071-023-05909-8.

[155] D.T. Michaeli, T. Michaeli, S. Albers, T. Boch, J.C. Michaeli, Special FDA designations for drug development: orphan, fast track, accelerated approval, priority review, and breakthrough therapy, Eur J Health Econ (2023). https://doi.org/10.1007/s10198-023-01639-x.

[156] E. Rocca, S. Copeland, I. Ralph Edwards, Pharmacovigilance as Scientific Discovery: An Argument for Trans-Disciplinarity, Drug Saf 42 (2019) 1115–1124. https://doi.org/10.1007/s40264-019-00826-1.

[157] [1] T.P.C. Dorlo, T.A. Eggelte, G.J. Schoone, P.J. De Vries, J.H. Beijnen, A Poor-Quality Generic Drug for the Treatment of Visceral Leishmaniasis: A Case Report and Appeal, PLoS Negl Trop Dis 6 (2012) e1544. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001544. [2] E.D.

[158] [1] M. Laura Sbaraglini, M. Cristina Vanrell, C. Leticia Bellera, G. Benaim, C. Carrillo, A. Talevi, P. Silvia Romano, Neglected Tropical Protozoan Diseases: Drug Repositioning as a Rational Option, CTMC 16 (2016) 2201–2222. https://doi.org/10.2174/1568026616666160216154309. [2] A. Momeni, M. Aminjavaheri, M. Omidghaemi, Treatment of cutaneous leishmaniasis with ketoconazole cream, Journal of Dermatological Treatment 14 (2003) 26–29. https://doi.org/10.1080/09546630305552.

coûteuse, mais, le repositionnement peut être une approche accélérée. L'activité antiprotozoaire observée de médicaments approuvés et tenant une AMM pour le paludisme, la trypanosomiase humaine africaine, la leishmaniose et la maladie de Chagas, peut être un point de départ vers le repositionnement.[159]

Tableau 6. Pharmacovigilance ; définitions selon des Agences sanitaires de différents pays.

	France[160]	**R. D. Congo**[161]	**Colombie**[162]
Pharmacovigilance (PV)	La PV a pour objet la surveillance, l'évaluation, *la* ***prévention*** *et la gestion du* ***risque*** *d'effet indésirable* résultant de l'utilisation des médicaments et produits mentionnés aux articles L. 5121-1 et R. 5121-150 du CSP, résultant de l'utilisation dans le cadre de leur autorisation/enregistrement, ou hors de ce cadre ou bien lors d'une exposition professionnelle.	Science et activités relatives à la détection, évaluation, compréhension *et* **prévention** *des effets indésirables* médicamenteux et de tout autre problème lié à **l'utilisation** des médicaments et autres produits de santé.	OPS : Science et activités relatives à la détection, évaluation, compréhension *et* **prévention** *des effets indésirables* médicamenteux et de tout autre problème lié à **l'utilisation** des médicaments (Même en l'**absence** de traitement).
Effet indésirable	Réaction nocive et non voulue suspectée d'être due à un médicament survenant dans les conditions d'utilisation conforme ou non conforme aux termes de l'autorisation ou de l'enregistrement du médicament y compris en cas d'usage hors-AMM, de surdosage, de mésusage, d'abus, d'erreur médicamenteuse, d'interaction, lors d'une prise pendant la grossesse, l'allaitement et lors d'une exposition professionnelle.	Une réaction nocive et non voulue à un médicament ou autre produit de santé, se produisant aux posologies normalement utilisées chez l'homme pour la prophylaxie, le diagnostic ou le traitement d'une maladie ou pour le rétablissement, la rectification ou la modification d'une fonction physiologique, ou résultant d'un mésusage du médicament ou produit.	Réponse à un médicament qui est nocive et involontaire, et qui se produit aux doses normalement utilisées chez l'homme.

D'autre part, de nouveaux programmes visent à impliquer les sociétés pharmaceutiques en tirant parti des partenariats public-privé.[163] Introduit au début des années 2000, le concept de « One Health » souligne l'interdépendance entre la santé humaine, animale et environnementale. Ce principe, adopté par des institutions de l'Organisation des Nations Unies, vise à répondre aux défis posés par le changement climatique, la dégradation environnementale et la pression sur les ressources naturelles, exacerbant le risque de maladies infectieuses émergentes. Dans le cas de la leishmaniose, l'approche One Health est généralement adoptée étant donné que la transmission de la maladie repose sur des interactions écologiques complexes[164] hôtes-vecteurs[165] (exemple du paradoxe de Chypre, avec une absence de cas de leishmaniose humaine dans le sud de Chypre malgré une présence importante de *L. infantum* chez les chiens ; une hypothèse expliquerait cette observation, selon laquelle les populations locales de *P. tobbi,* le vecteur incriminé de *L. infantum* à Chypre, ne pourraient pas piquer l'homme). Dans cette perspective, l'innovation représente un

[159] M. Kaiser, P. Mäser, L.P. Tadoori, J.-R. Ioset, R. Brun, Antiprotozoal Activity Profiling of Approved Drugs: A Starting Point toward Drug Repositioning, PLoS ONE 10 (2015) e0135556. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135556.

[160] ANSM – Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé. France. Bonnes Pratiques de Pharmacovigilance, 2022.

[161] Ministère de la Santé Publique ; République Démocratique du Congo. Lignes Directrices sur la Pharmacovigilance, 2018. https://www.leganet.cd/Legislation/Droit%20economique/Reglementationproduits/AM.1250.008.28.09.2015.html

[162] Red PARF Documento Técnico No. 5. Buenas Prácticas de Farmacovigilancia para las Américas. Organización Panamericana de la Salud. 2011.

[163] S. Mukherjee, The United States Food and Drug Administration (FDA) regulatory response to combat neglected tropical diseases (NTDs): A review, PLoS Negl Trop Dis. 17 (2023) e0011010. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011010.

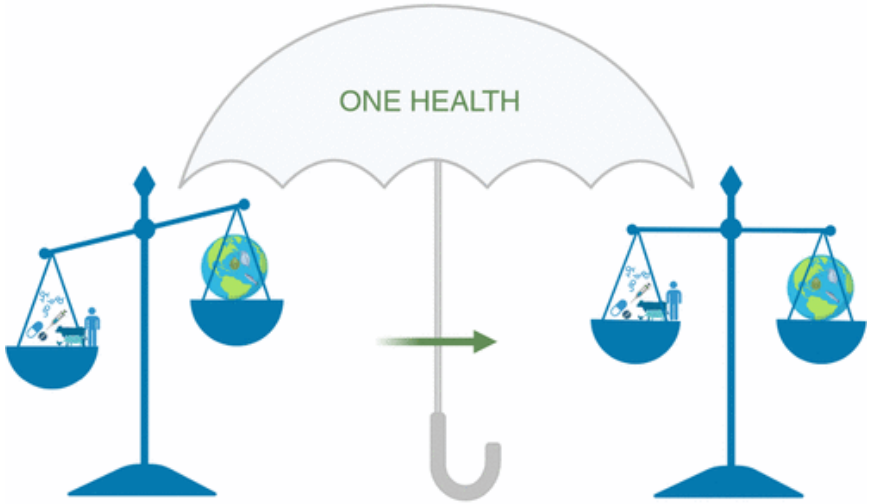
[164] L. Chitimia, C.I. Muñoz-García, D. Sánchez-Velasco, V. Lizana, L. Del Río, L. Murcia, R. Fisa, C. Riera, P. Giménez-Font, P. Jiménez-Montalbán, Á. Martínez-Ramírez, J.M. Meseguer-Meseguer, I. García-Bacete, M.A. Sánchez-Isarria, G. Sanchis-Monsonís, J.D. García-Martínez, V. Vicente, M. Segovia, E. Berriatua, Cryptic Leishmaniosis by Leishmania infantum, a feature of canines only? A study of natural infection in wild rabbits, humans and dogs in southeastern Spain, Veterinary Parasitology 181 (2011) 12–16. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.04.016.

[165] V. Ivović, K. Soteriadou, F. Pratlong, V. Christodoulou, A. Tsatsaris, F. Loucaides, B. Papadopoulos, J.P. Dedet, A. Mazeris, J. Moschandreas, M. Antoniou, I. Messaritakis, C. Haralambous, Leishmaniases and the Cyprus Paradox, The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 82 (2010) 441–448. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0282.

défi significatif en matière de diagnostic, mais aussi dans la gestion des données disponibles pour améliorer la rapidité des capacités de surveillance.[166]

Quelques réflexions concernant la notion "One Health" :

Ces dernières années, le concept de "One Health" a été intégré dans la recherche pharmaceutique (Figure 6). Bien que cette approche soit importante pour garantir un bénéfice écologique à long terme, elle introduit également des défis, en ajoutant des variables supplémentaires de complexité dans la recherche contre la leishmaniose, en tenant compte des interactions entre la santé humaine, animale et environnementale. Ce concept nécessite d'intégrer les risques environnementaux dès les premières étapes du développement des médicaments pour les maladies parasitaires transmises par des vecteurs. Les lacunes des évaluations des risques actuelles notamment des risques écologiques, en particulier en ce qui concerne les produits vétérinaires font aussi partie des éléments à prendre en compte.



- Évaluation des risques environnementaux à un stade précoce du processus de développement des médicaments
- Extrapolation de l'effet sur l'organisme entier à partir de l'effet sur l'environnement
- Atténuer les surprises écologiques

Figure 6. Représentation du concept « One Health » adapté de Ilbeigi et al.[167]

Bien que les nouvelles tendances et concepts proposés soient des contributions importantes, je pense qu'il serait nécessaire d'évaluer leur pertinence. Ainsi, l'ajout de variables écologiques aux tout premiers stades de la recherche dans la lutte contre la leishmaniose pourraient être une source de complication.

[166] A. Hong, R.A. Zampieri, J.J. Shaw, L.M. Floeter-Winter, M.F. Laranjeira-Silva, One Health Approach to Leishmaniases: Understanding the Disease Dynamics through Diagnostic Tools, Pathogens 9 (2020) 809. https://doi.org/10.3390/pathogens9100809.

[167] K. Ilbeigi, C. Barata, J. Barbosa, M.G. Bertram, G. Caljon, M.P. Costi, A. Kroll, L. Margiotta-Casaluci, E.S.J. Thoré, M. Bundschuh, Assessing Environmental Risks during the Drug Development Process for Parasitic Vector-Borne Diseases: A Critical Reflection, ACS Infect. Dis. 10 (2024) 1026–1033. https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.4c00131.

Cela ne signifie pas que l'idée d'une recherche écologiquement durable soit rejetée, mais plutôt qu'il serait plus judicieux de concentrer les efforts écologiques sur d'autres secteurs qui ont un impact plus significatif sur le déséquilibre et les dommages environnementaux, comme l'utilisation de combustibles fossiles ou la consommation excessive de plastiques non biodégradables.

Néanmoins, les Agences sanitaires doivent assurer un équilibre face aux puissances globales qui proposent une coopération, à l'image des big-Pharma et big-Tech avec des questionnements dans les aspects éthiques et de possibles dérives liées aux conflits d'intérêts. Nous pouvons par exemple citer les potentielles relations entre Microsoft[168] et the Bill & Melinda Gates Foundation[169] qui subventionnent des programmes de recherche en chimie thérapeutique contre les MTN tels que le DND*i*,[170] le programme COR-NTD,[171] l'intiative Uniting to Combat NTD,[172] l'Institut chinois GHDDI,[173] le programme TDR,[174] l'AFD[175] et des événements comme la Déclaration de Londres sur les MTN.[176]

En considérant le cas de la leishmaniose, les médicaments conçus pour une administration orale[177] peuvent jouer un rôle important en réduisant le besoin d'hospitalisation et les coûts associés,[178] mais il n'est pas garanti que chaque pays puisse démontrer sa capacité de régulation et d'approbation. Dans le cas de la Colombie, par exemple, ce n'est que récemment que des aspects réglementaires sur la bioéquivalence des médicaments ont été établis. La capacité d'orienter les études cliniques sur le territoire[179] devient un aspect fondamental. La complexité et les difficultés liées à la conduite d'essais cliniques constituent un défi majeur, en raison des pénuries économiques, des croyances culturelles et des coutumes locales.[180] L'avancement des politiques de santé est nécessaire, non seulement pour le développement de nouvelles molécules, mais aussi pour l'obtention de données cliniques plus complètes sur les médicaments existants, notamment

[168] Novartis and Microsoft announce collaboration to transform medicine with artificial intelligence, 2019. https://www.novartis.com/news/media-releases/ (Consulté le 28/03/2024).

[169] Bill and Melinda Gates Foundation's. https://www.gatesfoundation.org/about (Consulté le 28/03/2024).

[170] DNDi donors. drugs for neglected diseases initiative, (n.d.). https://dndi.org/about/donors/our-grants/ (Consulté le 28/03/ 2023).

[171] Coalition for Operational Research on Neglected Tropical Diseases - COR-NTD. (COR-NTD), https://www.cor-ntd.org/ (Consulté le 28/03/2024).

[172] Uniting to Combat Neglected Tropical Diseases - Uniting to Combat NTDs was established following the signing of the London Declaration on Neglected Tropical Diseases (NTDs) in 2012, when a diverse group of stakeholders came together with one objective: beating NTDs. https://unitingtocombatntds.org/en/about-us/the-board/ (Consulté le 28/03/2024).

[173] The Global Health Drug Discovery Institute (GHDDI). http://ghddi.org/en/partner (Consulté le 28/03/2024).

[174] World Health Organization (WHO), UNICEF/UNDP/World Bank, Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, 2023TDR Strategy 2024-2029. Building l ocal research solutions to improve global health, (2023).

[175] Agence Française de Développement (AFD). Le Groupe Agence Française de Développement (AFD) (2023). https://www.afd.fr/en/actualites/communique-de-presse/gates-foundation-and-agence-francaise-de-developpement-partner-support-last-mile-polio-eradication-pakistan-and-build-more-climate-resilient-health-systems (Consulté le 28/03/2024).

[176] PLOS Neglected Tropical Diseases, PLOS (n.d.). https://journals.plos.org/plosntds/.

[177] [1] H.J.C. De Vries, H.D. Schallig, Cutaneous Leishmaniasis: A 2022 Updated Narrative Review into Diagnosis and Management Developments, Am J Clin Dermatol 23 (2022) 823–840. https://doi.org/10.1007/s40257-022-00726-8. [2] J. Alvar, M. Den Boer, D.A. Dagne, Towards the elimination of visceral leishmaniasis as a public health problem in east Africa: reflections on an enhanced control strategy and a call for action, The Lancet Global Health 9 (2021) e1763–e1769. https://doi.org/10.1016/S2214-109X(21)00392-2.

[178] [1] O.T. Oyeyemi, O. Ogundahunsi, M. Schunk, R.G. Fatem, L.M. Shollenberger, Neglected tropical disease (NTD) diagnostics: current development and operations to advance control, Pathogens and Global Health. (2023) 1–24. https://doi.org/10.1080/20477724.2023.2272095.

[179] [1] R.L. Tarleton, Avoiding Clinical Trial Failures in Neglected Tropical Diseases: The Example of Chagas Disease, Clinical Infectious Diseases 76 (2023) 1516–1520. https://doi.org/10.1093/cid/ciac884.

[180] E. N'Goran, N.A. David Aka, M. Ouattara, E. Huber, D. Bezuidenhout, E. Kourany-Lefoll, Challenges and Lessons From Conducting A Paediatric Clinical Trial in Sub-Saharan Africa: The Case of the Praziquantel Oral Dispersible Tablets Phase II Study in Côte d'Ivoire, in: Advances in Parasitology, Elsevier, 2019: pp. 75–89. https://doi.org/10.1016/bs.apar.2018.09.002.

en pharmacocinétique.[181] Actuellement, seul environ 20 % des traitements contre les MTN ont été soumis à une évaluation pharmacocinétique, soulignant le besoin crucial de compenser ces lacunes dans des études cliniques complémentaires.

En résumé, quels que soient les efforts politiques et les efforts collaboratifs dans le domaine de la recherche médicale, les Agences sanitaires pour la sécurité des médicaments doivent optimiser leurs capacités technologiques[182] en misant sur une innovation continue pour surmonter les obstacles engendrés par les rapports de force déséquilibrés avec les organisations privées.

1.1.5. Maladies infectieuses émergentes à transmission vectorielle

Le terme *maladies infectieuses à transmission vectorielle émergentes* (MITVE),[183] dont la leishmaniose fait partie, désigne des maladies infectieuses en expansion, transmises par des vecteurs, affectant de plus en plus les régions tempérées.[184] Ces vecteurs, souvent des insectes, sont porteurs de pathogènes (virus, bactéries ou parasites) transmissibles d'un hôte à un autre. Ces maladies suscitent une préoccupation croissante à l'échelle mondiale en raison de leur impact sur la santé publique et de la complexité de leur contrôle et prévention. Dans ce court chapitre, la leishmaniose n'est pas décrite comme une MTN, mais comme un MITVE, une maladie ayant une forte probabilité d'émergence dans de nouveaux territoires.[185]

La qualification de maladies *émergentes* désigne leur apparition parmi des populations ou dans des régions où elles étaient auparavant inconnues ; et avec le terme *réémergence* dans des zones où elles avaient été précédemment contrôlées ou éradiquées. Les changements écologiques, climatiques, les comportements humains, l'utilisation des terres et aussi les tremblements de terre[186] peuvent contribuer à l'émergence ou la réémergence de ces maladies.

Ces maladies, telles que la dengue, le virus Zika ou le chikungunya, sont causées par des pathogènes transmis par divers vecteurs. Les facteurs environnementaux, tels que les changements climatiques, influencent grandement leur propagation en modifiant les habitats des vecteurs, permettant ainsi aux maladies de toucher de nouvelles zones géographiques.

[181] F.W. Ojara, A.N. Kawuma, C. Waitt, A systematic review on maternal-to-infant transfer of drugs through breast milk during the treatment of malaria, tuberculosis, and neglected tropical diseases, PLoS Negl Trop Dis. 17 (2023) e0011449. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011449.

[182] Mengarda, Ana C., Bruno Iles, João Paulo F. Longo, and Josué De Moraes. 'Recent Approaches in Nanocarrier-based Therapies for Neglected Tropical Diseases'. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* 15, no. 2 (March 2023): e1852. https://doi.org/10.1002/wnan.1852.

[183] European Centre for Disease Prevention and Control. https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/increasing-risk-mosquito-borne-diseases-eueea-following-spread-aedes-species

[184] D.M. Morens, G.K. Folkers, A.S. Fauci, The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases, Nature 430 (2004) 242–249. https://doi.org/10.1038/nature02759.

[185] E. Berriatua, C. Maia, C. Conceição, Y. Özbel, S. Töz, G. Baneth, P. Pérez-Cutillas, M. Ortuño, C. Muñoz, Z. Jumakanova, A. Pereira, R. Rocha, B. Monge-Maillo, E. Gasimov, Y. Van Der Stede, G. Torres, C.M. Gossner, Leishmaniases in the European Union and Neighboring Countries, Emerg. Infect. Dis. 27 (2021). https://doi.org/10.3201/eid2706.210239.

[186] F. Yıldız Zeyrek, S. Yakut, M. Korkmaz, Vector-borne parasitic infections after the earthquake, Microbiol. Aust. 44 (2023) 197–201. https://doi.org/10.1071/MA23058.

La mondialisation[187] facilite également le transport rapide des vecteurs et des agents pathogènes à travers les continents par le biais des voyages internationaux[188] et du commerce, augmentant le risque d'introduction de maladies dans des régions jusqu'alors non touchées. Par exemple, le moustique *Aedes aegypti*, principal vecteur de la dengue, du virus Zika et du chikungunya, est désormais présent dans de nombreuses régions du monde grâce à la distribution globale des pneus usagés, lieu privilégié de reproduction du vecteur, et d'autres objets qui facilitent leur dissémination.

L'urbanisation rapide contribue également à l'émergence de ces maladies. Les zones urbaines denses fournissent un habitat idéal pour les moustiques vecteurs, en particulier là où l'accès à l'eau potable est insuffisant et où les eaux stagnantes permettent aux moustiques de se reproduire. Par ailleurs, l'interaction entre les humains et les animaux sauvages dans les zones périurbaines augmente les risques de dissémination.

La gestion des maladies à transmission vectorielle est complexe et nécessite une approche comprenant la surveillance épidémiologique, le contrôle des vecteurs, l'éducation sanitaire et des campagnes de santé publique pour informer les populations sur les moyens de protection individuelle et communautaire. Le contrôle des vecteurs inclut l'utilisation d'insecticides, le développement de nouvelles technologies telles que la modification génétique des moustiques ou l'utilisation de larvicides biologiques et la gestion environnementale pour éliminer leurs habitats de reproduction.

Le développement et la distribution de vaccins représentent également une stratégie essentielle pour prévenir certaines de ces maladies. Le vaccin contre la dengue est déjà en usage dans certains pays, et des recherches sont en cours pour développer des vaccins contre le virus Zika et le chikungunya. Cependant, les défis restent importants, notamment en termes d'efficacité du vaccin, de coût, d'acceptation par les communautés locales et de logistique de distribution.

En outre, les efforts internationaux doivent être coordonnés pour lutter efficacement contre ces maladies. Les organisations internationales, comme l'OMS, jouent un rôle crucial dans la coordination des réponses, l'établissement de directives pour la surveillance et le contrôle, et le soutien aux pays en développement afin de renforcer leurs systèmes de santé.

En conclusion, les maladies à transmission vectorielles émergentes présentent les mêmes défis que ceux associés aux MTN sans y associer les idées de pauvreté et d'oubli, contribuant à diminuer la ségrégation négative des personnes, défi majeur pour la santé globale. Des investissements en

[187] B. Chala, F. Hamde, Emerging and Re-emerging Vector-Borne Infectious Diseases and the Challenges for Control: A Review, Front. Public Health 9 (2021) 715759. https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.715759.

[188] P.J. Hotez, Southern Europe's Coming Plagues: Vector-Borne Neglected Tropical Diseases, PLoS Negl Trop Dis 10 (2016) e0004243. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004243.

recherche et développement et une application rigoureuse des mesures de santé publique pour réduire leur impact sont cependant nécessaires. La compréhension et l'adaptation aux dynamiques écologiques, sociales et économiques sont aussi essentielles pour prévenir et contrôler ces maladies infectieuses.

1.2. Les Leishmanioses

1.2.1. Introduction

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires complexes transmises à l'homme par les piqûres de phlébotomes femelles infectés. Elles se manifestent sous différentes formes cliniques, les plus courantes étant la leishmaniose cutanée et la leishmaniose viscérale. En tant que maladies à transmission vectorielle, elles sont influencées par divers facteurs géographiques[189] et sont devenues endémiques dans de nouveaux territoires, comme aux États-Unis depuis 2000, notamment au Texas et dans le sud-est de l'Oklahoma.[190] Ces maladies peuvent également réémerger dans des régions où elles avaient été précédemment contrôlées, ce qui en fait une maladie ré-émergente.[191]

En termes historiques, l'identification des leishmanioses comme maladies parasitaires a été décrite au milieu du XIXe et XXe siècle, en lien avec l'expansion coloniale.[192] L'identification des agents pathogènes est attribuée aux chercheurs William Boog Leishman[193] et Charles Donovan,[194] conduisant à la dénomination de l'agent étiologique *Leishmania donovani*. Dans la littérature, la découverte de cette maladie est souvent attribuée à ces personnalités, de nombreuses contributions ont été nécessaires, particulièrement au XIXe siècle, où la notion de maladie infectieuse n'était pas encore établie. La compréhension actuelle de la maladie est le résultat d'un ensemble d'apports significatifs, notamment ceux des chercheurs brésiliens tels que Carlos Chagas,[195] Gaspar Vianna[196] et Oswaldo Cruz, qui ont joués un rôle crucial dans la recherche de l'agent étiologique. Aujourd'hui, l'institut brésilien le plus renommé dans le domaine de la recherche sur les maladies infectieuses porte le nom d'Oswaldo Cruz.[197]

[189] C.B. McCarthy, L.A. Diambra, R.V. Rivera Pomar, Metagenomic Analysis of Taxa Associated with Lutzomyia longipalpis, Vector of Visceral Leishmaniasis, Using an Unbiased High-Throughput Approach, PLoS Negl Trop Dis 5 (2011) e1304. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001304.

[190] J.M. Curtin, N.E. Aronson, Leishmaniasis in the United States: Emerging Issues in a Region of Low Endemicity, Microorganisms 9 (2021) 578. https://doi.org/10.3390/microorganisms9030578.

[191] R.W. Ashford, The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses, International Journal for Parasitology 30 (2000) 1269–1281. https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00136-3.

[192] J.-P. Dedet, Les leishmanioses, Ellipses, Paris, 1999, p : 13-19.

[193] H.M. Vincent, William Boog Leishman: parasitologist and politician, Parasitology 144 (2017) 1582–1589. https://doi.org/10.1017/S0031182016001657.

[194] O'Connor, C. (2019). From Cork to Calcutta to Liverpool: Colonel Charles Donovan (1863-1951), the Irish doctor who unravelled the mystery of leishmaniasis in India. British journal of dermatology (1951). (181). p.178 - 178

[195] Á. Moncayo, Carlos Chagas: Biographical sketch, Acta Tropica 115 (2010) 1–4. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.10.022.

[196] J.E.H. Pittella, The remarkable pioneering contribution of Gaspar Vianna to the study of the neuropathology of Chagas disease, Arq. Neuro-Psiquiatr. 76 (2018) 853–856. https://doi.org/10.1590/0004-282x20180137.

[197] Visit to the Oswaldo Cruz Institute, Hist. Cienc. Saude-Manguinhos 5 (1999) 710–715. https://doi.org/10.1590/S0104-59701999000100009.

Cette découverte étiologique a remis en évidence la diversité des agents pathogènes liées à des manifestations cliniques diverses selon l'espèce : *L. tropica* liée principalement à la forme cutanée de transmission anthroponotique*; L. major* avec la forme cutanée de transmission zoonotique ou bien *L. infantum* associée à la forme viscérale. C'est pourquoi aujourd'hui la maladie de la leishmaniose est souvent décrite au pluriel, *les leishmanioses*, vu la diversité et les différences entres les souches parasitaires et leurs manifestations cliniques[198] (Tableau 7).

Tableau 7. Spécificités entre les souches du parasite, le vecteur et la forme de la maladie. *Phlebotomus* (P), *Lutzomyia* (L). ‡ Historiquement associé à l'ancien monde ; ¥ Historiquement associé au nouveau monde ; * actuellement identifié dans les deux mondes.[199]

Forme	***Transmission chez l'homme***	***Hôte***	***Vecteur***	***Parasite***
Cutanée	Zoonotique ++	*Psammomys obesus*[200]	*P. papatassi* (anthropophilique + endophilique)	*L. major*‡
Cutanée	Zoonotique +	*Procavia capensis*	*P. sergenti* (exophilique)	*L. tropica*‡
Cutanée	Anthroponotique++	L'homme	*P. sergenti* (endophilique)	*L. tropica*‡
Viscérale	Anthroponotique[201]	L'homme (En Asie du Sud et en Afrique de l'Est)	*P. argentipes*[202]	*L. donovani*‡
Viscérale	Zoonotique[203]	Le chien ++ (Région méditerranéenne et en Amérique centrale et du Sud). L'homme ±	P. *perniciosus* (Méditerranée)[204] *L. longipalpis* (Amérique) [205]	*L. infantum*‡*
L. canine[206]	-	Divers	*L. longipalpis ; Oligodontomyia isopsi*	*L. infantum*‡*
Muco-cutanée Viscérale	Zoonotique ++	Le chien (Amérique centrale et du Sud).[207]	*L. flaviscutellata*	*L. amazonensis*¥

Concernant les traitements, l'utilisation des composés dérivés de l'antimoine occupe une place particulièrement importante depuis 60 ans.[208] Ces molécules étaient initialement connues pour leurs propriétés émétiques. À l'époque, grâce aux collaborations scientifiques internationales,[209]

[198] S. Ghosh, S. Nath, K. Roy, S. Karmakar, C. Pal, Leishmaniasis: Tissue Tropism in Relation to the Species Diversity, in: B. Mukherjee, A. Bhattacharya, R. Mukhopadhyay, B.G.A. Aguiar (Eds.), Pathobiology of Parasitic Protozoa: Dynamics and Dimensions, Springer Nature Singapore, Singapore, 2023: pp. 133–153. https://doi.org/10.1007/978-981-19-8225-5_7.

[199] L.A. Delgado-Noguera, C.E. Hernández-Pereira, A.C. Castillo-Castañeda, L.H. Patiño, S. Castañeda, G. Herrera, E. Mogollón, M. Muñoz, A. Duran, D. Loyo, M. Pacheco, L. Arena, G. Isquiel, L. Yepez, B. Colmenarez, M. Caviedes, Y. Mendez, S. Herrera, J.D. Ramírez, A.E. Paniz-Mondolfi, Diversity and geographical distribution of Leishmania species and the emergence of Leishmania (Leishmania) infantum and L. (Viannia) panamensis in Central-Western Venezuela, Acta Tropica 242 (2023) 106901. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.106901.

[200] M. Sirak-Wizeman, R. Faiman, A. Al-Jawabreh, A. Warburg, Control of phlebotomine sandflies in confined spaces using diffusible repellents and insecticides, Medical Vet Entomology 22 (2008) 405–412. https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2008.00762.x

[201] [1] P. Yadav, M. Azam, V. Ramesh, R. Singh, Unusual Observations in Leishmaniasis—An Overview, Pathogens 12 (2023) 297. https://doi.org/10.3390/pathogens12020297. [2] J. Alvar, S.L. Croft, P. Kaye, A. Khamesipour, S. Sundar, S.G. Reed, Case study for a vaccine against leishmaniasis, Vaccine 31 (2013) B244–B249. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.11.080.

[202] M.M. Cameron, A. Acosta-Serrano, C. Bern, M. Boelaert, M. Den Boer, S. Burza, L.A.C. Chapman, A. Chaskopoulou, M. Coleman, O. Courtenay, S. Croft, P. Das, E. Dilger, G. Foster, R. Garlapati, L. Haines, A. Harris, J. Hemingway, T.D. Hollingsworth, S. Jervis, G. Medley, M. Miles, M. Paine, A. Picado, R. Poché, P. Ready, M. Rogers, M. Rowland, S. Sundar, S.J. De Vlas, D. Weetman, Understanding the transmission dynamics of Leishmania donovani to provide robust evidence for interventions to eliminate visceral leishmaniasis in Bihar, India, Parasites Vect. 9 (2016) 25. https://doi.org/10.1186/s13071-016-1309-8.

[203] M.S. Duthie, A. Lison, O. Courtenay, Advances toward Diagnostic Tools for Managing Zoonotic Visceral Leishmaniasis, Trends in Parasitology 34 (2018) 881–890. https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.07.012.

[204] I. Chelbi, K. Maghraoui, S. Zhioua, S. Cherni, I. Labidi, A. Satoskar, J.G.C. Hamilton, E. Zhioua, Enhanced attraction of sand fly vectors of Leishmania infantum to dogs infected with zoonotic visceral leishmaniasis, PLoS Negl Trop Dis 15 (2021) e0009647. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009647.

[205] R.G. Schaut, M. Robles-Murguia, R. Juelsgaard, K.J. Esch, L.C. Bartholomay, M. Ramalho-Ortigao, C.A. Petersen, Vectorborne Transmission of Leishmania infantum from Hounds, United States, Emerg. Infect. Dis. 21 (2015) 2209–2212. https://doi.org/10.3201/eid2112.141167.

[206] [1] F. Dantas-Torres, Canine leishmaniasis in the Americas: etiology, distribution, and clinical and zoonotic importance, Parasites Vectors 17 (2024) 198. https://doi.org/10.1186/s13071-024-06282-w. [2] J.V. Cruz-Chan, J. Valenzuela, E. Dumonteil, Leishmaniasis in the Americas, in: C. Franco-Paredes, J.I. Santos-Preciado (Eds.), Neglected Tropical Diseases - Latin America and the Caribbean, Springer Vienna, Vienna, 2015: pp. 113–128. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1422-3_6.

[207] T.F. Silva, F. Tomiotto-Pellissier, A.K.S. Pasquali, F. Pinto-Ferreira, W.R. Pavanelli, I. Conchon-Costa, I.T. Navarro, E.T. Caldart, Phenotypical and genotypical differences among Leishmania (Leishmania) amazonensis isolates that caused different clinical frames in humans and dogs: A systematic review, Acta Tropica 221 (2021) 106018. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106018.

[208] A.K. Haldar, P. Sen, S. Roy, Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: Current Status and Future Directions, Molecular Biology International 2011 (2011) 1–23. https://doi.org/10.4061/2011/571242.

[209] M. Bamorovat, I. Sharifi, S. Agha Kuchak Afshari, P. Ghasemi Nejad Almani, Mutual Role of Patients and the Healthcare System in the Control of Cutaneous Leishmaniasis, Transboundary and Emerging Diseases 2023 (2023) 1–15. https://doi.org/10.1155/2023/7814940.

la recherche a permis d'identifier des composés actifs contre la leishmaniose à base d'antimoine.[210] Ces travaux ont conduit à l'identification de dérivés moins toxiques, [211] passant de Sb^{3+} à Sb^{5+}. De plus, de nombreux substances, tels que le gluconate, ont été explorés, et plus récemment, des formulations innovantes comme les liposomes[212] ont été testées. Les dérivés d'antimoine, malgré des limitations (en termes d'abondance de la matière première de Sb et aussi le prix final du produit), ont permis la réduction de la mortalité de la forme viscérale et l'amélioration des conditions de vie des patients atteints de la forme cutanée. Ce traitement a été adopté internationalement et est encore utilisé aujourd'hui. Cependant, son utilisation est limitée en raison des effets indésirables graves, de l'émergence de résistances et du mode d'administration par injection.[213]

De nos jours, les axes de recherches scientifiques sont centrés sur l'identification des vecteurs,[214] les enjeux de sa gestion en termes de santé publique,[215] l'identification des stratégies alternatives de contrôle, y compris le développement de vaccins,[216] ainsi que la création de nouveaux médicaments.[217] Les principaux axes de recherche sont :

- L'environnement et le vecteur : la leishmaniose est fortement influencée par l'environnement de ses vecteurs et l'équilibre « hôtes réservoirs », ce qui conditionne sa distribution géographique et ses foyers d'infection. Les facteurs environnementaux spécifiques jouent un rôle crucial dans la propagation de la maladie.[218] Le concept « *une seule santé* » (one-health approach) est devenu plus répandu.[219]
- La modélisation de la distribution des vecteurs : des études utilisent des données satellitaires pour modéliser la distribution des vecteurs et prédire les zones à risque, permettant la mise en place de stratégies de prévention ciblées.[220]
- Le développement de vaccins : la recherche de vaccins a aussi sa place, notamment grâce à l'utilisation de protéines purifiées, de vaccins à ADN, et de stratégies visant à immuniser contre la salive de l'insecte vecteur. Chez l'homme, ces efforts n'ont pas

[210] A. Periferakis, A. Caruntu, A.-T. Periferakis, A.-E. Scheau, I.A. Badarau, C. Caruntu, C. Scheau, Availability, Toxicology and Medical Significance of Antimony, IJERPH 19 (2022) 4669. https://doi.org/10.3390/ijerph19084669.

[211] F. Daraban Bocaneti, L.M. Ivanescu, L. Miron, O.I. Tanase, M.A. Dascalu, An Overview on Leishmaniasis in Romania: Diagnosis and Therapeutics, TropicalMed 7 (2022) 334. https://doi.org/10.3390/tropicalmed7110334.

[212] L.D. Coelho, M.M.D. Souza, G.D. Cassali, R.A. Silva, M.J.N. Paiva, A.L.B. Barros, E.M. Teixeira, J.N. Silveira, P.M.Z. Coelho, M.M.G. Aguiar, M.C. Oliveira, Emetic Tartar-Loaded Liposomes as a New Strategy for Leishmaniasis Treatment, Pharmaceutics 15 (2023) 904. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030904.

[213] R.K. Madusanka, N.D. Karunaweera, H. Silva, A. Selvapandiyan, Antimony resistance and gene expression in Leishmania : spotlight on molecular and proteomic aspects, Parasitology 151 (2024) 1–14. https://doi.org/10.1017/S0031182023001129.

[214] N. Hartemink, S.O. Vanwambeke, H. Heesterbeek, D. Rogers, D. Morley, B. Pesson, C. Davies, S. Mahamdallie, P. Ready, Integrated Mapping of Establishment Risk for Emerging Vector-Borne Infections: A Case Study of Canine Leishmaniasis in Southwest France, PLoS ONE 6 (2011) e20817. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020817.

[215] C.J.S. Machado, E.G. Silva, R.M. Vilani, O uso de um instrumento de política de saúde pública controverso: a eutanásia de cães contaminados por leishmaniose no Brasil, Saude Soc. 25 (2016) 247–258. https://doi.org/10.1590/S0104-12902016146918.

[216] P. Launois, F. Tacchini-Cottier, M.-P. Kieny, Cutaneous leishmaniasis: progress towards a vaccine, Expert Review of Vaccines 7 (2008) 1277–1287. https://doi.org/10.1586/14760584.7.8.1277.

[217] S.L. Croft, K. Seifert, V. Yardley, Current scenario of drug development for leishmaniasis, Indian J Med Res 123 (2006) 399–410.

[218] P.D. Ready, Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents, Annu. Rev. Entomol. 58 (2013) 227–250. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153557.

[219] [1] W.W. Diriba, E.Z. Gebremedhin, Assessment of knowledge, attitude, and practices towards canine visceral leishmaniasis based on the one health concept in Weliso and Ejaji Towns, Oromia, Ethiopia, Sci Rep 13 (2023) 20765. https://doi.org/10.1038/s41598-023-47340-0. [2] L. Ilarraz Massia, J.V. Charão Germain, J. Birnie Farias, F.P. Basso, D. Da Cruz Payão Pellegrini, Aplicativo de vigilância e monitoramento de leishmaniose visceral canina (PampaCare LVC) – uma abordagem Saúde Única em Uruguaiana (RS), Visa Em Debate 11 (2023) 1. https://doi.org/10.22239/2317-269x.02186. [3] Organisation Mondiale de la Santé. Une seule Santé, principaux faits. https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/one-health (Consulté le 05/05/2024).

[220] A.A. Hanafi-Bojd, Y. Rassi, M.R. Yaghoobi-Ershadi, A.A. Haghdoost, A.A. Akhavan, Z. Charrahy, A. Karimi, Predicted Distribution of Visceral Leishmaniasis Vectors (Diptera: Psychodidae; Phlebotominae) in Iran: A Niche Model Study, Zoonoses and Public Health 62 (2015) 644–654. https://doi.org/10.1111/zph.12202.

encore permis d'obtenir un vaccin efficace.[221] Des vaccins canins ont été développés avec une efficacité modérée.[222]

- L'effet des comorbidités : la co-infection leishmaniose-VIH est particulièrement problématique car le parasite peut profiter des systèmes immunitaires affaiblis.[223]
- L'hôte : l'état nutritionnel[224] de l'hôte peut influencer significativement la susceptibilité à l'infection, la gravité de la maladie ou bien la capacité de transmission. D'où l'importance de considérer les aspects nutritionnels dans les stratégies de gestion de la leishmaniose.[225]
- Des nouveaux traitements : pour combler la résistance aux traitements classiques, principalement pour les médicaments antimoniés, ainsi que les défis liés au diagnostic précoce et rapide.[226]

En l'absence de vaccins humains, les approches de contrôle de la maladie sont basées principalement sur l'interruption de la transmission, soit par l'usage d'insecticides comme le DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) et de pyréthrinoïdes, soit par l'élimination des réservoirs (en Chine et Colombie, par exemple, avec l'élimination des chiens infectés).[227] En Europe, la leishmaniose est principalement une préoccupation vétérinaire, notamment dans les régions méditerranéennes et de l'Est, où 25 % des chiens sont infectés.[228] Cependant, des méthodes alternatives à l'élimination ont également été testées, par exemple des colliers pour chiens avec des substances répulsives comme la deltaméthrine.[229] Aujourd'hui, ces méthodes sont remises en question en raison de leurs implications environnementales et culturelles.[230] Entre 1967-1972, des projets de lutte anti-vectorielle ont permis de comprendre l'importance des vecteurs diptères, spécifiques aux agents étiologiques. Un des cas les plus étudiés est celui de *Culex fatigans* ou *Culex quinquefasciatus*, utilisé pour empêcher la reproduction de souches de vecteurs.[231]

En ce qui concerne la chimiothérapie, l'activité biologique de l'antimoine n'a pas été la seule option thérapeutique étudiée.[232] Les médicaments disponibles aujourd'hui sont le produit de

[221] A. Khamesipour, Therapeutic vaccines for leishmaniasis, Expert Opinion on Biological Therapy 14 (2014) 1641–1649. https://doi.org/10.1517/14712598.2014.945415.

[222] [1] J.C. Leite, A.A.M. Gonçalves, D.S. De Oliveira, L.A. Resende, D.F.V. Boas, H.S. Ribeiro, D.F.S. Pereira, A.V. Da Silva, R.M.D.S. Mariano, P.C.C. Reis, E.N. Nakasone, J.C. França-Silva, A.S. Galdino, P.R.D.O. Paes, M.M. Melo, E.S. Dias, M.A. Chávez-Fumagalli, D. Da Silveira-Lemos, W.O. Dutra, R.C. Giunchetti, Transmission-Blocking Vaccines for Canine Visceral Leishmaniasis: New Progress and Yet New Challenges, Vaccines 11 (2023) 1565. https://doi.org/10.3390/vaccines11101565. [1] M. Morales-Yuste, J. Martín-Sánchez, V. Corpas-Lopez, Canine Leishmaniasis: Update on Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention, Veterinary Sciences 9 (2022) 387. https://doi.org/10.3390/vetsci9080387.

[223] J. Lindoso, C. Moreira, M. Cunha, I.T. Queiroz, Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: current perspectives, HIV Volume 10 (2018) 193–201. https://doi.org/10.2147/HIV.S143929.

[224] A. Borlase, J.M. Prada, T. Crellen, Modelling morbidity for neglected tropical diseases: the long and winding road from cumulative exposure to long-term pathology, Phil. Trans. R. Soc. B 378 (2023) 20220279. https://doi.org/10.1098/rstb.2022.0279.

[225] A. Sakthianandeswaren, S.J. Foote, E. Handman, The role of host genetics in leishmaniasis, Trends in Parasitology 25 (2009) 383–391. https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.05.004.

[226] J.Q. Reimão, D.P. Pita Pedro, A.C. Coelho, The preclinical discovery and development of oral miltefosine for the treatment of visceral leishmaniasis: a case history, Expert Opinion on Drug Discovery 15 (2020) 647–658. https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1743674.

[227] F. Bruschi, L. Gradoni, eds., The leishmaniases: old neglected tropical diseases, Springer, Cham, 2018.

[228] R. Velez, C. Ballart, E. Domenech, A. Abras, A. Fernández-Arévalo, S.A. Gómez, S. Tebar, C. Muñoz, J. Cairó, M. Gállego, Seroprevalence of canine Leishmania infantum infection in the Mediterranean region and identification of risk factors: The example of North-Eastern and Pyrenean areas of Spain, Preventive Veterinary Medicine 162 (2019) 67–75. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.10.015.

[229] G.L. Werneck, F.B. Figueiredo, M.D.S.P.E. Cruz, Impact of 4% Deltamethrin-Impregnated Dog Collars on the Incidence of Human Visceral Leishmaniasis: A Community Intervention Trial in Brazil, Pathogens 13 (2024) 135. https://doi.org/10.3390/pathogens13020135.

[230] R.S. Desowitz, G. Roy, Kala-azar: chroniques indiennes d'une épidémie, Science infuse, Paris, 2000.

[231] A. Nebbak, L. Almeras, P. Parola, I. Bitam, Mosquito Vectors (Diptera: Culicidae) and Mosquito-Borne Diseases in North Africa, Insects 13 (2022) 962. https://doi.org/10.3390/insects13100962.

[232] [1] N.P. Paul, A.E. Galván, K. Yoshinaga-Sakurai, B.P. Rosen, M. Yoshinaga, Arsenic in medicine: past, present and future, Biometals 36 (2023) 283–301. https://doi.org/10.1007/s10534-022-00371-y. [2] M.R. Perry, S. Wyllie, V.K. Prajapati, J. Feldmann, S. Sundar, M. Boelaert, A.H. Fairlamb, Visceral

différentes « trajectoires »[233] de développement.[234] L'armée américaine qui poursuit ainsi des recherches sur *Leishmania*, à l'institut Walter Reed, se focalise sur *L. tropica* endémique au Moyen-Orient, et *L. donovani*. The *WRAIR's Leishmania Diagnostics Laboratory* (LDL) créé en 1978 et certifié en 2001 par le CP - College of American Pathologists (CAP), s'est intéressé aux épidémies croissantes de leishmaniose au cours des opérations irakiennes.[235]

Ainsi, après 1930, on observe une phase d'innovation intense autour de la leishmaniose. Après la Seconde Guerre mondiale, l'industrie pharmaceutique des pays alliés, notamment le Royaume-Uni et la France, commercialise les deux médicaments de première ligne pour le traitement des leishmanioses : l'antimoniate de méglumine (Glucantime®) et le stibogluconate de sodium (Pentostam®) :[236]

1913 : préparations à base d'antimoine, innovation par l'usage, Brésil, Gaspar Vianna.
1920 : Stibenyl, innovation par la chimie, Allemagne, von Heyden.
1920 : Ureastibosan, innovation par la chimie, India, Brahmachari.
1920 : Pentamidine.[237]
1924 : Stibosan, innovation par la chimie, Allemagne, von Heyden.
1928 : Neostibosan, innovation par la chimie, Allemagne, Bayer.
1937 : Solustibosan, innovation par la chimie, Allemagne, Bayer.
1946 : Pentostam ®, innovation par la chimie, Royaume Unis, Wellcome Chemical Research Laboratory.
1948 : Glucantime ®, innovation par la chimie, France, Spécia.
1997 : AmBisome ®, innovation galénique, aux Etats-Unis.[238]
2002 : Miltéfosine.[239]

1.2.2. Surveillance épidémiologique mondiale

Les leishmanioses sont des maladies dues à une famille de parasites protozoaires du genre *Leishmania* (Trypanosomatidae)[240] principalement distribuées dans les régions tropicales et subtropicales du monde.[241] Elles sont transmises à l'hôte mammifère, dont l'Homme, par piqûre d'insectes hématophages femelles infestés, principalement du genre *Phlébotome* (l'ancien monde - *Old World Sandflies*) ou *Lutzomyia* (le nouveau monde - *New World Sandflies*). Différents

Leishmaniasis and Arsenic: An Ancient Poison Contributing to Antimonial Treatment Failure in the Indian Subcontinent?, PLoS Negl Trop Dis 5 (2011) e1227. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001227.

[233] [1] J.-P. Gaudillière, Introduction: drug trajectories, Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences 36 (2005) 603–611. https://doi.org/10.1016/j.shpsc.2005.09.005. [2] [1] J.-P. Gaudillière, Introduction: drug trajectories, Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences 36 (2005) 603–611. https://doi.org/10.1016/j.shpsc.2005.09.005.

[234] [1] F.F. De Araujo, I. Lakhal-Naouar, N. Koles, S. Raiciulescu, R. Mody, N. Aronson, Potential Biomarkers for Asymptomatic Visceral Leishmaniasis among Iraq-Deployed U.S. Military Personnel, Pathogens 12 (2023) 705. https://doi.org/10.3390/pathogens12050705. [2] J.R. Kenner, N.E. Aronson, P.M. Benson, The United States military and leishmaniasis. Dermatologic Clinics 17 (1999) 77–92. https://doi.org/10.1016/S0733-8635(05)70071-1.

[235] Laboratoire WRAIR's ; Walter Reed Institute of Research - Leishmania Diagnostics Laboratory (LDL) (https://wrair.health.mil/Collaborate/Leishmania-Diagnostics-Laboratory

[236] S. Sundar, J. Chakravarty, An update on pharmacotherapy for leishmaniasis, Expert Opinion on Pharmacotherapy 16 (2015) 237–252. https://doi.org/10.1517/14656566.2015.973850.

[237] B. Zhang, Y. Jin, L. Zhang, H. Wang, X. Wang, Ninety Years of Pentamidine: The Development and Applications ofPentamidine and its Analogs, CMC 29 (2022) 4602–4609. https://doi.org/10.2174/0929867329666220314121446.

[238] J. Tang, S. Srinivasan, W. Yuan, R. Ming, Y. Liu, Z. Dai, C.O. Noble, M.E. Hayes, N. Zheng, W. Jiang, F.C. Szoka, A. Schwendeman, Development of a flow-through USP 4 apparatus drug release assay for the evaluation of amphotericin B liposome, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 134 (2019) 107–116. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.11.010.

[239] H. Sindermann, J. Engel, Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis, Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 100 (2006) S17–S20. https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2006.02.010.

[240] Weltgesundheitsorganisation, ed., Control of the leishmaniases: report of a WHO expert committee, Geneva, 1990.

[241] [1] M. Akhoundi, K. Kuhls, A. Cannet, J. Votýpka, P. Marty, P. Delaunay, D. Sereno, A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies, PLoS Negl Trop Dis 10 (2016) e0004349. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349. [2] The PLOS Neglected Tropical Diseases Staff, Correction: A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies, PLoS Negl Trop Dis 10 (2016) e0004770. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004770.

réservoirs sont retrouvés selon la localisation géographique (principalement des animaux domestiques dont le chien en zone urbaine, mais aussi d'autres canidés, des rongeurs, des marsupiaux ou des damans). La transmission peut être considérée comme zoonotique par transmission des animaux infectés aux humains, mais aussi anthroponotique, par passage d'humain à humain.[242]

Bien que normalement spécifique d'une zone géographique (maladie des zones tropicales), la transmission est sensible aux conditions climatiques (humidité et température). Ceci pourrait expliquer la distribution hétérogène à l'intérieur des pays (par exemple, en Colombie où les régions les plus touchées sont principalement dans la cordillère des Andes[243]) et entre pays voisins (Colombie vs Vénézuéla ou Kenya vs Ethiopie) (Figure 7).

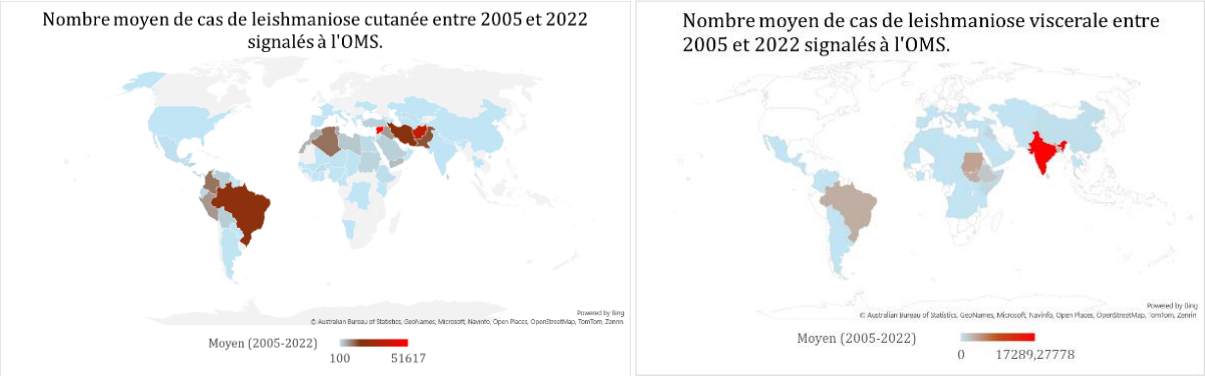


Figure 7. Distribution géographique du nombre moyen de cas de leishmaniose entre 2005-2022.

Les variations de température, des volumes de précipitations et d'humidité, influencent également les vecteurs et les réservoirs. Dans certaines régions andines de Colombie, principalement dans les zones de culture du café situées entre 1 200 et 1 800 mètres d'altitude, où les températures varient entre 17 et 23 °C et les précipitations atteignent jusqu'à 2.000 millimètres par an, de nouvelles zones potentielles de colonisation pour le vecteur commencent à être identifiées.[244]

[242] A. Kushwaha, B. Scorza, O.P. Singh, E. Rowton, P. Lawyer, S. Sundar, C. Petersen, Domestic Mammals as Reservoirs for Leishmania donovani on the Indian Subcontinent: Possibility and Consequences on Elimination, Preprints, 2020. https://doi.org/10.22541/au.160941740.00061915/v1.

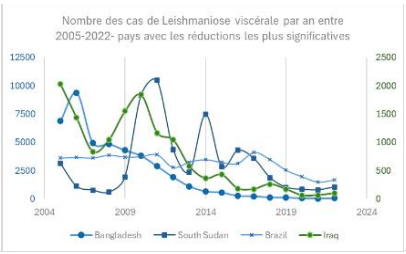
[243] J.D. Ramírez, C. Hernández, C.M. León, M.S. Ayala, C. Flórez, C. González, Taxonomy, diversity, temporal and geographical distribution of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: A retrospective study, Sci Rep 6 (2016) 28266. https://doi.org/10.1038/srep28266.

[244] J. Salgado-Almario, C.A. Hernández, C.E. Ovalle, Geographical distribution of Leishmania species in Colombia, 1985-2017, Biomedica 39 (2019) 278–290. https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4312.

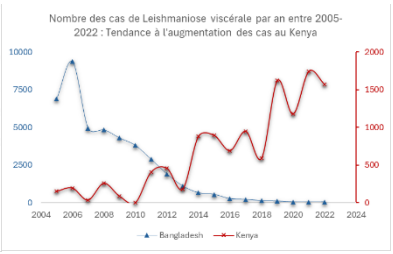
a)



b)



c)



d)

Pays	*Diminution (Pente -)*	*Pays*	*Augmentation (Pente +)*
Inde	-2598,21	*Kenya*	92,30
Bangladesh	-466,94	*Érythrée*	26,63
Soudan du sud	-107,89	*Yémen*	26,24
Irak	-106,62	*Tchad*	20,71
Brésil	-105,95	*Somalie*	8,18
Népal	-84,82	*Ouzbékistan*	2,86
Ethiopie	-59,83	*Libye*	2,04
Soudan	-40,97	*Azerbaïdjan*	1,70
Chine	-12,56	*Syrie*	1,49
Géorgie	-10,93	*Djibouti*	1,02

e)



Figure 8. Pays avec une réduction des cas de leishmaniose viscérale entre la période 2005-2022. a) Comparaison Inde-Bangladesh ; b) Principaux pays avec des réductions significatives du nombre de cas ; c) Augmentation des cas signalés au Kenya ; d) Calcul de la pente des données de suivi OMS ; e) Comparaison de l'évolution des cas en Colombie et en Chine.

Concernant les suivis épidémiologiques des leishmanioses cutanée et viscérale, il est nécessaire de réfléchir au concept d'endémicité. La classification d'une maladie comme endémique ne reflète pas toujours l'impact en termes de charge de morbidité, fréquemment utilisée en santé publique. Bien que divers territoires puissent être désignés comme des zones endémiques, cette classification ne signifie pas que la maladie affecte tous les territoires avec la même intensité. En Europe, des pays comme la France, l'Espagne et l'Italie sont considérés comme des zones endémiques[245] pour la leishmaniose viscérale (LV) et la leishmaniose cutanée (LC), mais les tendances d'augmentation des cas y sont très faibles. De plus, l'absence d'études épidémiologiques récentes peut empêcher l'adaptation des programmes de lutte à chaque territoire. C'est le cas du Kenya,[246] où les publications sur la présence de la leishmaniose ont cessé depuis 1994.

Suivi de la leishmaniose viscérale : Le suivi épidémiologique et le nombre de cas rapportés à l'OMS se font pour la leishmaniose, indépendamment de la souche spécifique du parasite. Dans la figure 8, nous soulignons le cas particulier de la leishmaniose viscérale. En 2023, le Bangladesh a été le premier pays déclaré par l'OMS où la leishmaniose viscérale a été éliminée.

L'Inde est le pays possédant la baisse la plus significative du nombre de cas de leishmaniose, avec une réduction annuelle d'environ 2 600 cas, surpassant le Bangladesh qui affiche une baisse d'environ 467 cas par an (Figure 8a). Dans cette même période de 2005 à 2022, 45 autres pays

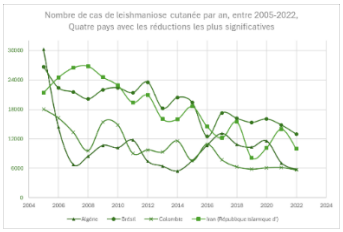
[245] https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/indicator-groups/indicator-group-details/GHO/leishmaniasis (Consulté le 04/03/2024)

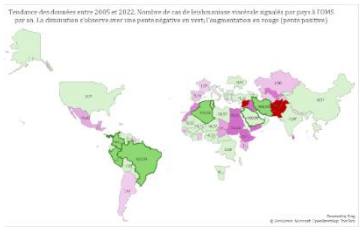
[246] G. Grifferty, H. Shirley, K. O'Brien, J.L. Hirsch, A.M. Orriols, K.L. Amechi, J. Lo, N. Chanda, S. El Hamzaoui, J. Kahn, S.V. Yap, K.E. Watson, C. Curran, A. Atef AbdelAlim, N. Bose, A.L. Cilfone, R. Wamai, The leishmaniases in Kenya: A scoping review, PLoS Negl Trop Dis 17 (2023) e0011358. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011358.

ont aussi montré une tendance à la baisse comme le Soudan du Sud (1058 cas/an, soit 1 cas pour 10.000 personnes), le Brésil (1684 cas/an, soit 1 cas pour 100.000 personnes) et l'Irak (96 cas/an, soit 2 pour 1 million de personnes) (Figure 8b).

Parallèlement, on peut constater aussi une augmentation des cas de LV dans des pays tels que le Kenya, l'Érythrée, le Yémen, le Tchad et la Somalie (Figure 8c), probablement en raison de l'absence de programme national ou régional de santé publique, ou en raison de la priorisation d'autres programmes, comme récemment pour le Covid.[247]

a) b) c)





Pays	*Diminution (Pente -)*	*Pays*	*Augmentation (Pente +)*
Iran	-988,06	Syrie	3137,68
Colombie	-642,40	Afghanistan	1687,50
Brésil	-633,84	Pakistan	1530,97
Algérie	-440,86	Irak	772,49
Pérou	-231,64	Yémen	201,47
Arabie Saoudite	-189,99	Soudan	192,29
Tunisie	-162,91	Sri Lanka	166,29
Panama	-109,30	Éthiopie	107,07
Costa Rica	-61,89	Espagne	5,26
Nicaragua	-51,39	France	1,07

Figure 9. a) Pays avec une réduction des cas de leishmaniose cutanée entre la période 2005-2022 ; b) Principaux pays avec une tendance croissante (violet et rouge).

Enfin, le travail réalisé par d'autres pays comme la Colombie ou la Chine (Figure 8e), centré sur des stratégies de contrôle, peut passer un peu inaperçu. Gardons en mémoire que réduire la charge de la maladie ne doit pas conduire à l'arrêt des programmes de santé publique, mais conduire à maintenir les efforts de contrôle. Selon les données de 2022, le Bangladesh a rapporté 47 cas de LV (3 pour 10 millions de personnes), l'Inde 777 cas (6 pour 10 millions de personnes), la Colombie 10 cas (2 pour 10 millions de personnes) et la Chine 239 cas (2 pour 10 millions de personnes). Autrement dit, en 2023, le Bangladesh a atteint, grâce à un programme d'élimination, le même niveau épidémiologique que la Colombie (niveau atteint grâce à des programmes de contrôle).

Suivi de la leishmaniose cutanée : concernant la LC, un comportement endémique différent est noté avec 39 pays, dont l'Algérie, le Brésil, la Colombie et l'Iran, qui ont signalé une diminution importante des cas (Figure 9a). En même temps, on constate aussi des tendances à la hausse (Figure 9b), principalement en Syrie, en Afghanistan, au Pakistan[248] et en Irak (Figure 9c). Ces augmentations sont liées au phénomène de changement climatique,[249] ainsi qu'aux conditions sanitaires et à la gestion des vecteurs ou des hôtes insuffisamment contrôlés.[250] D'autres raisons

[247] [1] A. Mewara, R. Gudisa, B.K. Padhi, P. Kumar, R. Sah, A.J. Rodriguez-Morales, Visceral leishmaniasis outbreak in Kenya—a setback to the elimination efforts, New Microbes and New Infections 49–50 (2022) 101060. https://doi.org/10.1016/j.nmni.2022.101060. [2] J. Alvar, M. Den Boer, D.A. Dagne, Towards the elimination of visceral leishmaniasis as a public health problem in east Africa: reflections on an enhanced control strategy and a call for action, The Lancet Global Health 9 (2021) e1763–e1769. https://doi.org/10.1016/S2214-109X(21)00392-2.

[248] W. Ullah, A. Khan, S. Niaz, M.A. Al-Garadi, N. Nasreen, A.A. Swelum, M. Ben Said, Epidemiological survey, molecular profiling and phylogenetic analysis of cutaneous leishmaniasis in Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan, Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 118 (2024) 273–286. https://doi.org/10.1093/trstmh/trad086.

[249] W.M. De Souza, S.C. Weaver, Effects of climate change and human activities on vector-borne diseases, Nat Rev Microbiol (2024). https://doi.org/10.1038/s41579-024-01026-0.

[250] B. Kayani, S. Sadiq, H.B. Rashid, N. Ahmed, A. Mahmood, M.S. Khaliq, R. Maqsood, H. Rashid, S. Hasan, M.H. Mushtaq, U.-R. Zia, M. Chaudhry, Cutaneous Leishmaniasis in Pakistan: a neglected disease needing one health strategy, BMC Infect Dis 21 (2021) 622. https://doi.org/10.1186/s12879-021-06327-w.

plus complexes contribuent aussi, telles que l'instabilité politique,[251] les guerres,[252] l'absence de système de santé publique efficace, le déplacement de réfugiés[253] de zones hautement endémiques et les obstacles culturels et socio-économiques.[254]

1.2.3. Taxonomie et morphologie du parasite

La figure 10 détaille la taxonomie de *Leishmania*. Les parasites *Leishmania* appartiennent au phylum Euglenozoa. [255] Ce phylum comprend divers eucaryotes unicellulaires flagellés regroupés en plusieurs classes dont celle des *Kinetoplastea*.[256]

Les organismes faisant partie de cette classe sont caractérisés par la présence d'un flagelle, d'une mitochondrie unique de grande taille et d'un kinétoplaste. Ce dernier est composé d'une quantité importante d'ADN mitochondrial facilement observable en microscopie.[257]

L'ordre *Trypanosomatida* est divisé en 11 genres dont le genre *Leishmania.* Il y a environ une trentaine d'espèces, dont la plupart ont la capacité de parasiter les humains. Ces espèces sont réparties en quatre sous-genres, avec deux principaux : le sous-genre *Leishmania*, et le sous-genre *Viannia*.

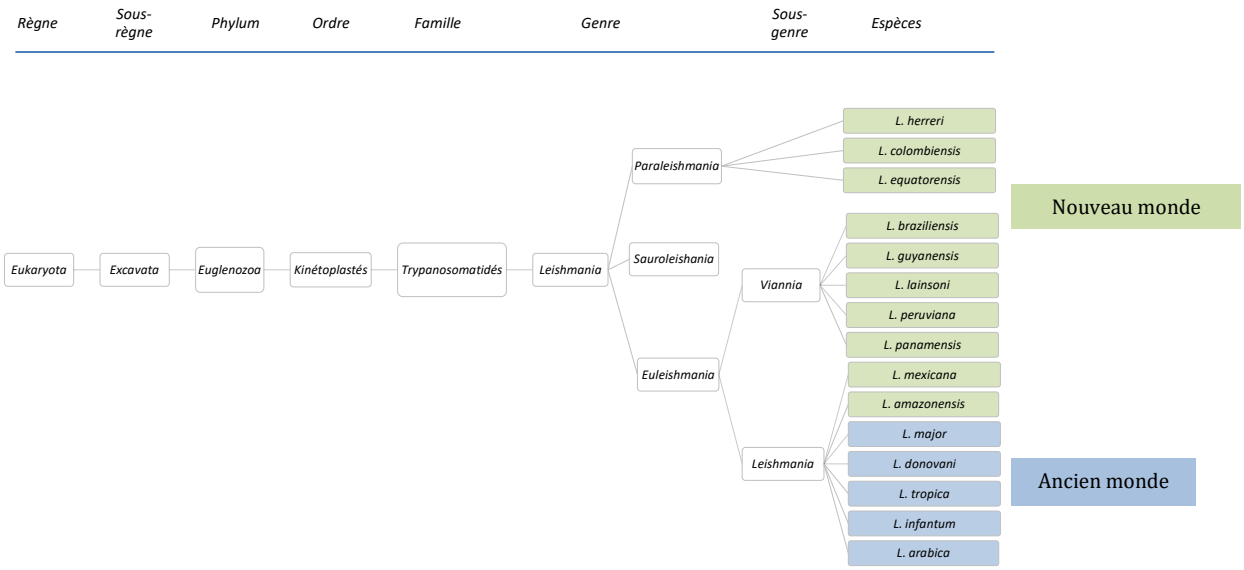


Figure 10. Taxonomie du *Leishmania* spp.

[251] Z. Ullah, F. Samad, R. Bano, S. Arif, S. Zamir, N. Aziz, H. Khan, Characterizing cutaneous leishmaniasis in a conflict-affected region: a study from North Waziristan, Pakistan, Turkish Journal of Medical Sciences 53 (2023) 1767–1775. https://doi.org/10.55730/1300-0144.5746.

[252] W.S. Al-Salem, D.M. Pigott, K. Subramaniam, L.R. Haines, L. Kelly-Hope, D.H. Molyneux, S.I. Hay, A. Acosta-Serrano, Cutaneous Leishmaniasis and Conflict in Syria, Emerg. Infect. Dis. 22 (2016) 931–933. https://doi.org/10.3201/eid2205.160042.

[253] N.A. Bizri, W. Alam, M. Khoury, U. Musharrafieh, N. Ghosn, A. Berri, A.R. Bizri, The Association Between the Syrian Crisis and Cutaneous Leishmaniasis in Lebanon, Acta Parasit. 66 (2021) 1240–1245. https://doi.org/10.1007/s11686-021-00395-3.

[254] M. Fakhar, S.A. Rasooli, E.S. Banimostafavi, M. Soleymani, Atypical manifestations of cutaneous leishmaniasis in a boy from Afghanistan, Clinical Case Reports 10 (2022) e05738. https://doi.org/10.1002/ccr3.5738.

[255] I.L. Maurício, Leishmania Taxonomy, in: F. Bruschi, L. Gradoni (Eds.), The Leishmaniases: Old Neglected Tropical Diseases, Springer International Publishing, Cham, 2018: pp. 15–30. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72386-0_2.

[256] A. Valigurová, I. Kolářová, Unrevealing the Mystery of Latent Leishmaniasis: What Cells Can Host Leishmania?, Pathogens 12 (2023) 246. https://doi.org/10.3390/pathogens12020246.

[257] J.C. Solana, C. Chicharro, E. García, B. Aguado, J. Moreno, J.M. Requena, Assembly of a Large Collection of Maxicircle Sequences and Their Usefulness for Leishmania Taxonomy and Strain Typing, Genes 13 (2022) 1070. https://doi.org/10.3390/genes13061070.

Leishmania est un parasite dimorphique, avec deux formes cellulaires identifiées, les formes amastigote et promastigote (Figure 11). Les diverses morphologies cellulaires sont adaptées à l'hôte ou au vecteur. La cellule de *Leishmania* est essentiellement constituée de modules tels que le flagelle, le corps basal et une unité Golgi-flagellaire, poche en forme de cou.[258] Ces unités modulaires caractéristiques, positionnées les unes par rapport aux autres selon les différentes morphologies cellulaires observées[259] ont été traditionnellement utilisées pour définir les formes cellulaires observées (forme cellulaire, longueur du flagelle, position kinétoplaste/noyau).[260]

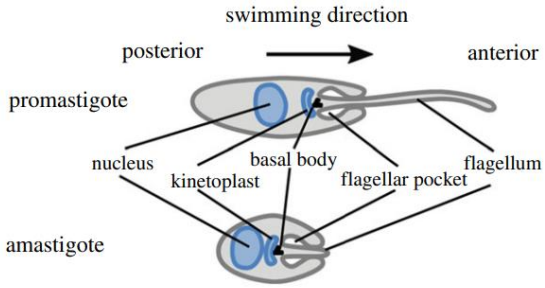


Figure 11. Morphologie générale des deux formes du parasite *Leishmania*.[261]

Dans le code QR, la direction de la motilité flagellaire peut être observée dans les vidéos 5 et 6 de Findlay et al. Ils ont démontré que la différenciation, des promastigotes au stade procyclique vers les métacycliques s'accompagne de changements dans le comportement de trajectoires de nage, une motilité flagellaire optimisée favorisant l'absorption par les cellules immunitaires humaines.[262]

Chez le vecteur, les promastigotes se trouvent dans le tube digestif (Figure 12). Ils présentent une forme allongée, mesurant entre 10 et 25 µm de long. Un noyau central est visible par coloration au May Grunwald Giemsa. Le kinétoplaste est en position antérieure, et le flagelle libre s'étend depuis l'extrémité antérieure, conférant ainsi une capacité de mobilité.

[258] E.O. Ogbadoyi, D.R. Robinson, K. Gull, A High-Order Trans -Membrane Structural Linkage Is Responsible for Mitochondrial Genome Positioning and Segregation by Flagellar Basal Bodies in Trypanosomes, MBoC 14 (2003) 1769–1779. https://doi.org/10.1091/mbc.e02-08-0525.

[259] J.D. Sunter, K. Gull, The Flagellum Attachment Zone: 'The Cellular Ruler' of Trypanosome Morphology, Trends in Parasitology 32 (2016) 309–324. https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.12.010.

[260] P. Hayes, V. Varga, S. Olego-Fernandez, J. Sunter, M.L. Ginger, K. Gull, Modulation of a cytoskeletal calpain-like protein induces major transitions in trypanosome morphology, Journal of Cell Biology 206 (2014) 377–384. https://doi.org/10.1083/jcb.201312067.

[261] J. Sunter, K. Gull, Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding, Open Biol. 7 (2017) 170165. https://doi.org/10.1098/rsob.170165.

[262] R.C. Findlay, M. Osman, K.A. Spence, P.M. Kaye, P.B. Walrad, L.G. Wilson, High-speed, three-dimensional imaging reveals chemotactic behaviour specific to human-infective Leishmania parasites, eLife 10 (2021) e65051. https://doi.org/10.7554/eLife.65051.

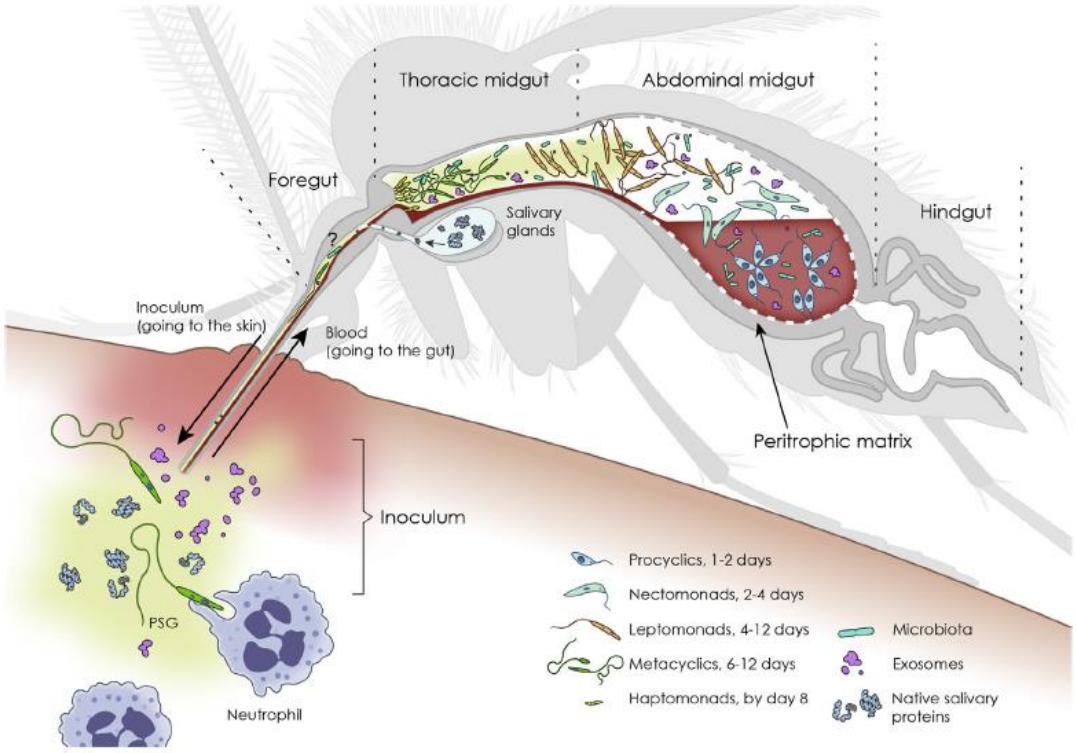


Figure 12. Transformation du parasite *Leishmania* dans le tube digestif d'un vecteur.[263]

Chez l'hôte, une fonction possible du flagelle est d'avoir un rôle sensoriel. Par le biais de son flagelle, *Leishmania* pourrait potentiellement évaluer la "santé" de son macrophage hôte, ou bien identifier des métabolites clés pour son adaptation si le macrophage est considéré comme "sain".

La forme amastigote est une forme intracellulaire chez l'hôte (dont l'homme). C'est le résultat d'un processus de différentiation cellulaire à partir du promastigote. De forme ovoïde, mesurant environ 2 à 5 µm, les amastigotes possèdent un flagelle considérablement réduit (la description classique parle d'absence de flagelle). Ils ont un noyau arrondi, avec un kinétoplaste en forme de bâtonnet contenant l'ADN mitochondrial (Figure 12).

À l'avant du noyau, se trouve le kinétoplaste, masse d'ADN directement connectée au corps basal à partir duquel s'étend le flagelle.[264] À la base du flagelle, se trouve une invagination de la membrane cellulaire formant une structure en forme de vase appelée « poche flagellaire » ; celle-ci est importante chez ces parasites car c'est le seul site d'endocytose et d'exocytose. Elle constitue donc une interface critique entre le parasite et son environnement hôte.[265]

[263] T.D. Serafim, R. Dey, H.L. Nakhasi, J.G. Valenzuela, S. Kamhawi, Unique Features of Vector-Transmitted Leishmaniasis and Their Relevance to Disease Transmission and Control, in: Arthropod Vector: Controller of Disease Transmission, Volume 2, Elsevier, 2017: pp. 91–114. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805360-7.00006-X.

[264] S. Lacomble, S. Vaughan, C. Gadelha, M.K. Morphew, M.K. Shaw, J.R. McIntosh, K. Gull, Three-dimensional cellular architecture of the flagellar pocket and associated cytoskeleton in trypanosomes revealed by electron microscope tomography, Journal of Cell Science 122 (2009) 1081–1090. https://doi.org/10.1242/jcs.045740.

[265] R.J. Wheeler, J.D. Sunter, K. Gull, Flagellar pocket restructuring through the Leishmania life cycle involves a discrete flagellum attachment zone, Journal of Cell Science (2016) jcs.183152. https://doi.org/10.1242/jcs.183152.

Néanmoins, l'architecture cellulaire de base est conservée entre les deux formes cellulaires de *Leishmania*, définie par des microtubules réticulés. Ce réseau persiste tout au long du cycle cellulaire, où la division cellulaire repose sur l'insertion et l'élongation des microtubules dans le réseau existant.

1.2.4. Changements structurels promastigote-amastigote

Les principales différences entre les deux formes sont directement liées à la survie du parasite. La forme promastigote allongée et flagellée permet le déplacement dans le labre-épipharynx (trompe) du vecteur. En revanche, la forme amastigote, avec un corps cellulaire sphérique, minimise le rapport surface/volume cellulaire et réduit donc l'exposition à l'environnement hostile de la réponse immunitaire de la cellule hôte.[266]

Au cours de la différenciation en forme amastigote, le changement dans le flagelle se caractérise plus précisément par la transformation d'un axonème 9 + 2 (dans le long flagelle mobile) vers un arrangement d'axonèmes 9 + 0 (appelé aussi 9v, correspondant à un court flagelle non mobile), qui se fait dans le corps pro-basal du parasite. La présence continue du flagelle chez les amastigotes suggère qu'il a une fonction importante pour le parasite au sein du macrophage (Figure 13).[267]

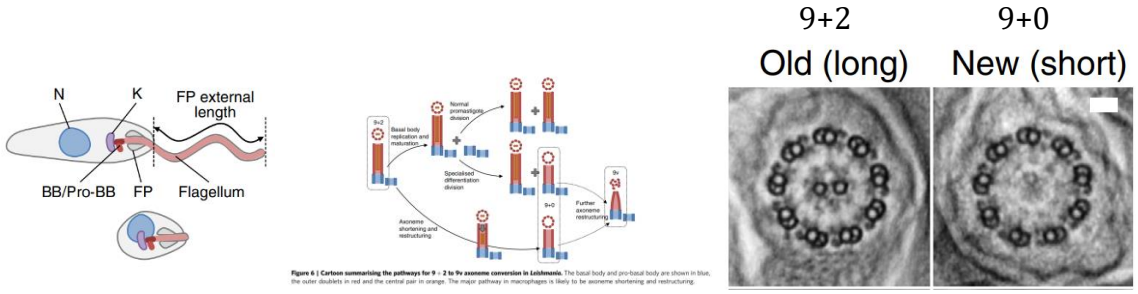


Figure 13. Principales différences entre les deux formes : amastigote et promastigote.[268]

Une restructuration dans la poche flagellaire a lieu, associée à des changements dans la localisation des protéines de la zone d'attache du flagelle. Dans le passage de la forme promastigote vers la forme amastigote, ce réarrangement est possible par la fermeture de la poche, de sorte qu'il n'y ait pas d'espace observable entre le flagelle et la membrane de la poche flagellaire.[269]

[266] [1] J.-C. Antoine, E. Prina, T. Lang, N. Courret, The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour Leishmania in murine macrophages, Trends in Microbiology 6 (1998) 392–401. https://doi.org/10.1016/S0966-842X(98)01324-9. [2] J.C. Antoine, E. Prina, C. Jouanne, P. Bongrand, Parasitophorous vacuoles of Leishmania amazonensis-infected macrophages maintain an acidic pH, Infect Immun 58 (1990) 779–787. https://doi.org/10.1128/iai.58.3.779-787.1990.

[267] M. Glyn, K. Gull, Flagellum retraction and axoneme depolymerisation during the transformation of flagellates to amoebae inPhysarum, Protoplasma 158 (1990) 130–141. https://doi.org/10.1007/BF01323125.

[268] R.J. Wheeler, E. Gluenz, K. Gull, Basal body multipotency and axonemal remodelling are two pathways to a 9+0 flagellum, Nat Commun 6 (2015) 8964. https://doi.org/10.1038/ncomms9964.

[269] R.J. Wheeler, J.D. Sunter, K. Gull, Flagellar pocket restructuring through the Leishmania life cycle involves a discrete flagellum attachment zone, Journal of Cell Science (2016) jcs.183152. https://doi.org/10.1242/jcs.183152.

Cette fermeture de la poche flagellaire est probablement aussi un moyen de protection du parasite face à l'environnement acide et aux protéases de la vacuole parasitophore.[270] Dans la différenciation de la forme amastigote vers la forme promastigote, la région de la poche flagellaire devient plus ouverte, reflétant une inversion du processus.

Même si le processus de différenciation est probablement aussi influencé par une combinaison de changements de température et de pH dans la vacuole du parasitophore,[271] il est peu probable que la température soit un facteur suffisant. En effet, dans la différenciation de la forme amastigote vers la forme promastigote, la présence de déclencheurs chimiques spécifiques peut être nécessaire pour garantir que cette différenciation se produise uniquement chez le vecteur et non chez l'hôte. De plus, le macrophage peut être exposé à une gamme de températures variées lorsqu'il circule dans le corps humain (27 °C chez le phlébotome vs 37 °C chez l'Homme).[272]

Le processus de différenciation est lié au type de vacuole parasitophore. Il existe deux types de vacuoles parasitophores qui se développent dans les macrophages infectés, en corrélation avec chaque espèce de *Leishmania* (la vacuole parasitophore étant modifiée selon les exigences spécifiques de chaque espèce). Des espèces telles que *L. major* produisent de petites vacuoles parasitophores bien ajustées et qui entourent normalement un seul parasite (vacuoles de type I), tandis que l'infection par *L. amazonensis* produit de grandes vacuoles parasitophores qui contiennent plusieurs amastigotes (vacuoles de type II).[273]

Cette différence de taille peut avoir des implications sur la pathologie causée par les différentes espèces de *Leishmania* (*L. tropica* provoque la leishmaniose cutanée et *L. donovani* la leishmaniose viscérale), même si cette adaptation morphologique ne semble pas suffisante pour expliquer la pathologie de la maladie. Dans l'ensemble, même si les différences entre la forme promastigote et la forme amastigote ont une implication évidente pour les relations hôte/vecteur, la similitude globale de la morphologie des amastigotes entre les différentes espèces suggère qu'il n'existe aucune relation simple entre la morphologie et la pathologie de la maladie.[274]

---

[270] [1] M. Samanovic, M.P. Molina-Portela, A.-D.C. Chessler, B.A. Burleigh, J. Raper, Trypanosome Lytic Factor, an Antimicrobial High-Density Lipoprotein, Ameliorates Leishmania Infection, PLoS Pathog 5 (2009) e1000276. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000276. [2] A.P.R. Gadelha, N.L. Cunha-e-Silva, W. De Souza, Assembly of the Leishmania amazonensis flagellum during cell differentiation, Journal of Structural Biology 184 (2013) 280–292. https://doi.org/10.1016/j.jsb.2013.09.006.

[271] A. Bee, F.J. Culley, I.S. Alkhalife, K.B. Bodman-Smith, J.G. Raynes, P.A. Bates, Transformation of Leishmania mexicana metacyclic promastigotes to amastigote-like forms mediated by binding of human C-reactive protein, Parasitology 122 (2001) 521–529. https://doi.org/10.1017/S0031182001007612.

[272] [1] M. Engstler, M. Boshart, Cold shock and regulation of surface protein trafficking convey sensitization to inducers of stage differentiation in Trypanosoma brucei, Genes Dev. 18 (2004) 2798–2811. https://doi.org/10.1101/gad.323404. [2] O. Billker, V. Lindo, M. Panico, A.E. Etienne, T. Paxton, A. Dell, M. Rogers, R.E. Sinden, H.R. Morris, Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito, Nature 392 (1998) 289–292. https://doi.org/10.1038/32667.

[273] F. Real, R.A. Mortara, M. Rabinovitch, Fusion between Leishmania amazonensis and Leishmania major Parasitophorous Vacuoles: Live Imaging of Coinfected Macrophages, PLoS Negl Trop Dis 4 (2010) e905. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000905.

[274] K.-P. Chang, D. Dwyer, Leishmania Donovani. Hamster macrophage interactions in vitro: cell entry, intracellular survival, and multiplication of amastigotes, The Journal of Experimental Medicine 147 (1978) 515–530. https://doi.org/10.1084/jem.147.2.515.

L'effet combiné du pH et de la température sur la différenciation :

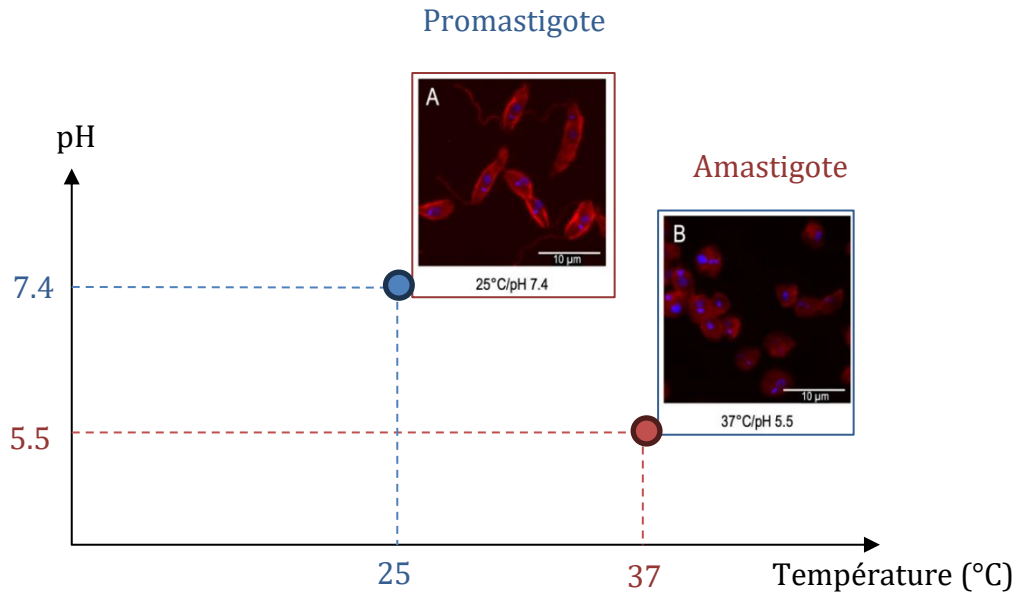


Figure 14. L'effet combiné du pH et de la température dans la différentiation cellulaire.[275]

La température et le pH, jouent un rôle important dans le déclenchement de la différenciation des promastigotes en amastigotes et inversement (Figure 14). La combinaison d'une élévation de température et d'une diminution du pH facilite l'établissement de cultures axéniques stables de type amastigote. Pour certaines espèces de *Leishmania*, l'élévation de la température semble être un signal majeur dans l'induction des changements morphologiques en amastigotes, tels que *L. mexicana*.[276] (les amastigotes dérivés de lésions de *L. mexicana* peuvent se multiplier dans des conditions axéniques en les cultivant à un pH de 5,5 et à une température de 32 °C). L'élévation de la température seule est moins efficace pour induire la différenciation des espèces de *Leishmania* de l'Ancien Monde que pour celles du Nouveau Monde. Une combinaison de température (37 °C) et de pH (5,5) peut également être utilisée pour établir une culture axénique d'amastigotes de l'espèce *L. donovani*, responsable de la leishmaniose viscérale. L'avantage des cultures axéniques est qu'elle réduit l'utilisation d'animaux de laboratoire, et qu'elle fournit un grand nombre d'amastigotes. Cependant, les amastigotes axéniques sont critiqués parce qu'ils ne sont pas équivalents aux amastigotes dérivés des lésions, probablement parce que le processus *in vitro* ne reflète pas ce qui se passe dans les macrophages.[277] Les études comparant les sources d'amastigotes, naturelles et *in vitro*, restent limitées.[278]

[275] [1] J. Clos, J. Grünebast, M. Holm, Promastigote-to-Amastigote Conversion in Leishmania spp.-A Molecular View, Pathogens 11 (2022) 1052. https://doi.org/10.3390/pathogens11091052. [2] D. Zilberstein, M. Shapira, THE ROLE OF pH AND TEMPERATURE IN THE DEVELOPMENT OF LEISHMANIA PARASITES, Annu. Rev. Microbiol. 48 (1994) 449–470. https://doi.org/10.1146/annurev.mi.48.100194.002313.

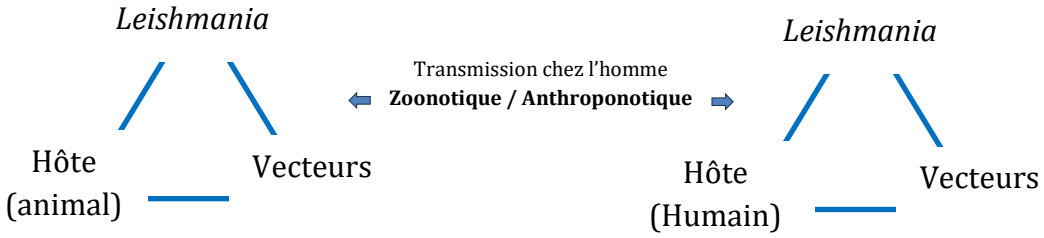
[276] P.A. Bates, C.D. Robertson, L. Tetley, G.H. Coombs, Axenic cultivation and characterization of Leishmania mexicana amastigote-like forms, Parasitology 105 (1992) 193–202. https://doi.org/10.1017/S0031182000074102.

[277] P. Pescher, T. Blisnick, P. Bastin, G.F. Späth, Quantitative proteome profiling informs on phenotypic traits that adapt Leishmania donovani for axenic and intracellular proliferation: L. donovani proteome profiling, Cellular Microbiology 13 (2011) 978–991. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01593.x.

[278] L. Pacakova, K. Harant, P. Volf, T. Lestinova, Three types of Leishmania mexicana amastigotes: Proteome comparison by quantitative proteomic analysis, Front. Cell. Infect. Microbiol. 12 (2022) 1022448. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1022448.

1.2.5. Cycle de vie et vecteurs

Le cycle de vie du *Leishmania* spp. implique une relation étroite d'une triade avec des hôtes et des vecteurs. Ainsi, dans ce cycle, une transmission anthroponotique ou zoonotique est considérée dès que l'hôte est un humain ou un autre mammifère.



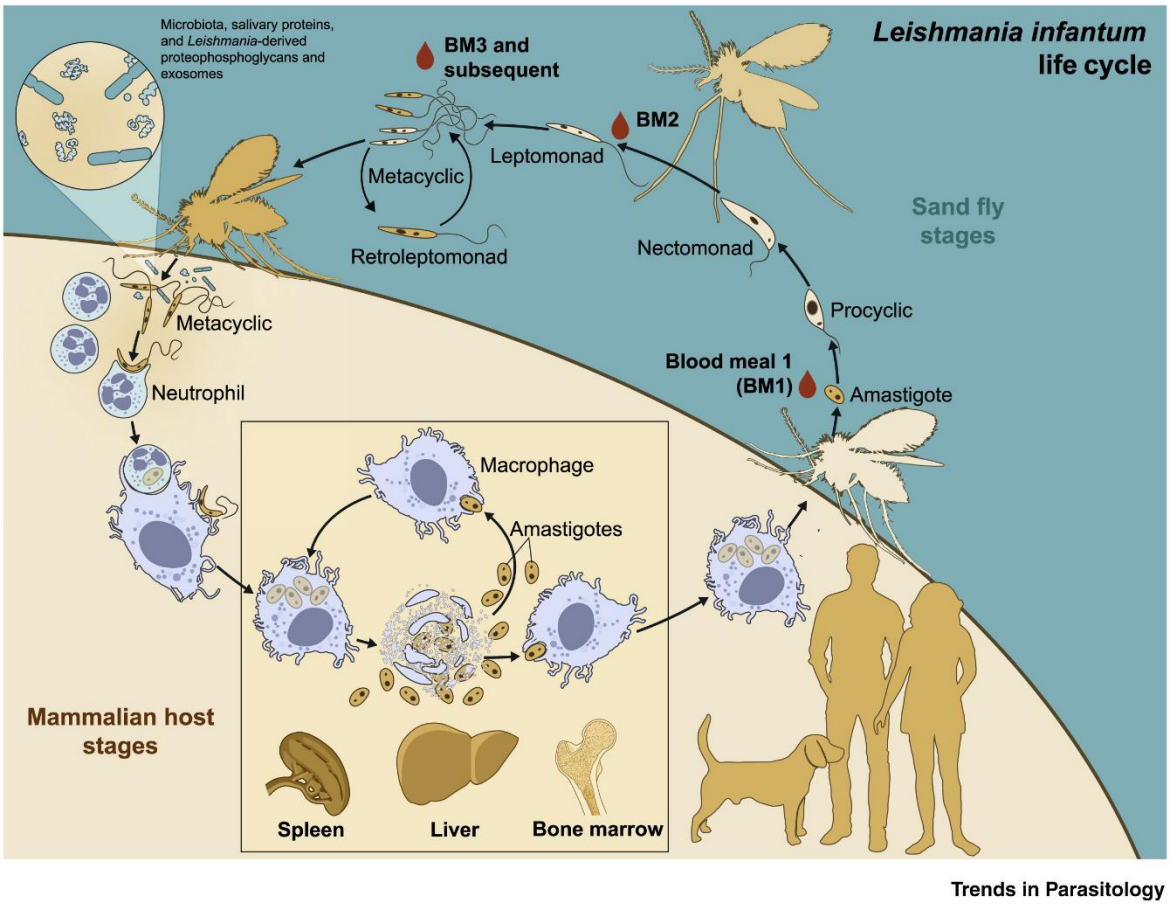


Figure 15. Schéma général du cycle de vie du *Leishmania.*[279]

Lors d'un repas sanguin, un phlébotome infecté par *Leishmania* injecte des promastigotes métacycliques (Figure 15). Les dommages causés par le phlébotome entraînent le recrutement de macrophages au site de la piqûre.[280] Les promastigotes métacycliques sont des cellules très

[279] T.D. Serafim, E. Iniguez, F. Oliveira, Leishmania infantum, Trends in Parasitology 36 (2020) 80–81. https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.10.006.

[280] [1] J.P. De Menezes, E.M. Saraiva, B. Da Rocha-Azevedo, The site of the bite: Leishmania interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis, Parasites Vectors 9 (2016) 264. https://doi.org/10.1186/s13071-016-1540-3. [2] G. Arango Duque, A. Descoteaux, Leishmania survival in the macrophage: where the ends justify the means, Current Opinion in Microbiology 26 (2015) 32–40. https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.04.007. [3] M.D. Almeida, V. Vilhena, A. Barral, M. Barral-Netto, Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review, Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98 (2003) 861–870. https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000700001.

mobiles, et *Leishmania* est capable de migrer à travers une matrice de collagène.[281] Il est donc possible que la phagocytose de *Leishmania* se produise loin du site de la piqûre. De plus, le spectre de la maladie causée par *Leishmania*, de cutanée à viscérale, reflète la capacité du parasite à envahir l'hôte au-delà du site de la piqûre, directement ou *via* le mouvement du macrophage infecté. Il existe des rapports contradictoires dans la littérature concernant l'interaction entre *Leishmania* et le macrophage, certains suggérant qu'elle se produit *via* le flagelle en premier, mais d'autres montrant qu'elle se produit principalement *via* le corps cellulaire ou les deux extrémités.[282] Cependant, quelle que soit l'orientation de *Leishmania* lors de l'endocytose, le parasite intracellulaire se retrouve avec son flagelle pointant vers la périphérie du macrophage. Le mouvement continu du flagelle à l'intérieur du macrophage entraîne des dommages à la membrane plasmique et une perte d'intégrité, ce qui favorise l'exocytose lysosomale pouvant modifier la composition de la vacuole parasitophore, augmentant ainsi les chances que le parasite infecte avec succès le macrophage.[283]

La transmission du protozoaire *Leishmania* se fait par certains insectes de la sous-famille *Phlebotominae, Lutzomya* et *Phlebotomus*. Par exemple, les membres du sous-genre *Phlebotomus* transmettent *L. major*, tandis que *L. tropica* est principalement véhiculée par les espèces de *Paraphlebotomus*. Les vecteurs de la LV dans les régions méditerranéennes et est-africaine appartiennent au sous-genre *Larroussius*, tandis que les espèces de *Synphlebotomus* jouent un rôle similaire en Afrique de l'Est. Peu d'espèces du sous-genre *Euphlebotomus* sont impliquées, à part *Ph. argentipes*, vecteur principal de LV en Inde.

La déforestation en Amazonie a contribué à rendre la LV endémique, avec *Lutzomyia* et *Nyssomyia* comme vecteurs principaux. Vers les basses terres sub-Andines, *Pintomyia* et *Lutzomyia* transmettent la LV et la LC. En Colombie, *P. evansi* surpasse *L. longipalpis* comme vecteur de LV dans les forêts tropicales sèches. En Amérique Centrale, les genres *Lutzomyia*, *Nyssomyia*, et *Psychodopygus* sont dominants. Le sous-genre *Bichromomyia*, largement distribué en Amérique centrale et du Sud, et ses espèces (*B. nociva, B. olmeca, B. flaviscutellata*) sont liés à la transmission de *L. mexicana* et *L. amazonensis*.

[281] D.B. Petropolis, J.C.F. Rodrigues, N.B. Viana, B. Pontes, C.F.A. Pereira, F.C. Silva-Filho, Leishmania amazonensis promastigotes in 3D Collagen I culture: an in vitro physiological environment for the study of extracellular matrix and host cell interactions, PeerJ 2 (2014) e317. https://doi.org/10.7717/peerj.317.

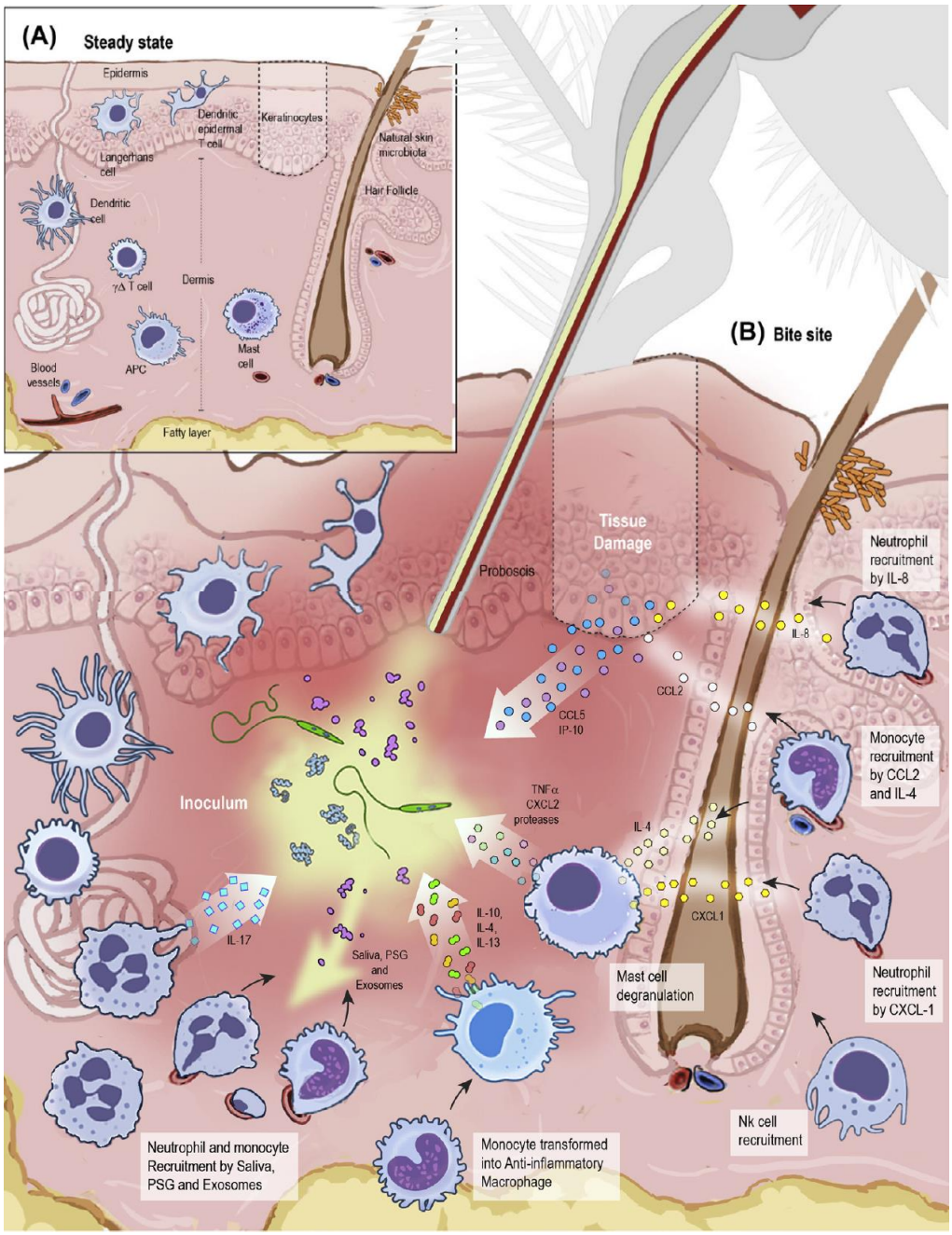
[282] [1] N. Courret, C. Fréhel, N. Gouhier, M. Pouchelet, E. Prina, P. Roux, J.-C. Antoine, Biogenesis of Leishmania -harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites, Journal of Cell Science 115 (2002) 2303–2316. https://doi.org/10.1242/jcs.115.11.2303. [2] M.G. Rittig, K. Schröppel, K.-H. Seack, U. Sander, E.-N. N'Diaye, I. Maridonneau-Parini, W. Solbach, C. Bogdan, Coiling Phagocytosis of Trypanosomatids and Fungal Cells, Infect Immun 66 (1998) 4331–4339. https://doi.org/10.1128/IAI.66.9.4331-4339.1998.

[283] C.-L. Forestier, C. Machu, C. Loussert, P. Pescher, G.F. Späth, Imaging Host Cell-Leishmania Interaction Dynamics Implicates Parasite Motility, Lysosome Recruitment, and Host Cell Wounding in the Infection Process, Cell Host & Microbe 9 (2011) 319–330. https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.03.011.

1.2.6. Réponse immunitaire et réponse clinique

La réponse immunitaire chez l'homme contre *Leishmania* est un processus complexe, déterminée par un équilibre entre les réponses Th1 et Th2, ainsi que la capacité du parasite à échapper à la réponse innée et la modulation de la réponse adaptative.[284]

Fig. 16-1.



[284] P.M. Nogueira, A. De Menezes-Neto, V.M. Borges, A. Descoteaux, A.C. Torrecilhas, P. Xander, O.-Y. Revach, N. Regev-Rudzki, R.P. Soares, Immunomodulatory Properties of Leishmania Extracellular Vesicles During Host-Parasite Interaction: Differential Activation of TLRs and NF-κB Translocation by Dermotropic and Viscerotropic Species, Front. Cell. Infect. Microbiol. 10 (2020) 380. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00380.

Fig. 16-2.

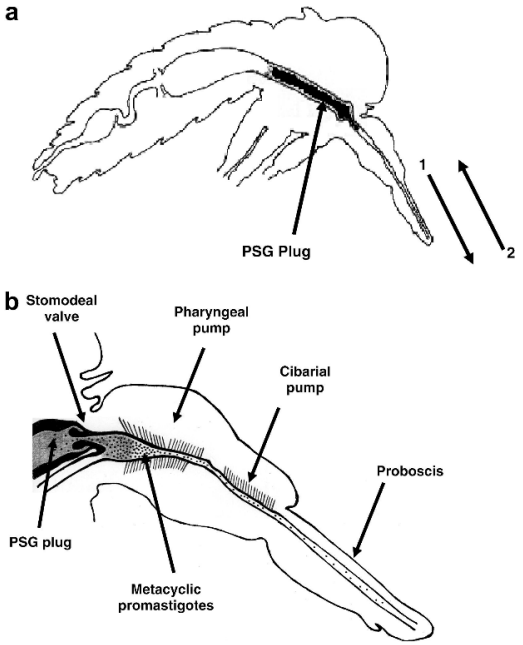


Figure 16. Réponse immunologique de l'inoculum infectieux après une piqûre de phlébotome infecté.[285] Fig.16-1 : réponse immunologique après une piqûre infectée. Fig.16-2 : la position de sécrétion du PSG dans l'intestin moyen antérieur et l'intestin antérieur.

Dans la peau chez l'hôte, l'inoculum infectieux est complexe ; dans le site de la piqûre, différentes substances ont été identifiées (Figure 16). On voudrait en souligner trois :

- Le promastigote métacyclique,[286] forme infectieuse, adapté pour infecter l'hôte mammifère.
- Le gel sécrétoire PSG, constitué principalement des dérives de protéophosphoglycane,[287] une glycoprotéoglycane complexe composée d'une protéine centrale (protéoglycane) à laquelle sont attachées des chaînes de polysaccharides riches en phosphates (phosphoglycanes). Le gel PSG peut être impliqué dans les fonctions de conservation et de transport du parasite, facilitant l'inoculation lorsque le vecteur se nourrit du sang de l'hôte.
- Les exosomes :[288] petites vésicules extracellulaires, phospholipides et protéines, qui jouent un rôle crucial dans la modulation du système immunitaire de l'hôte et favorisant l'établissement de l'infection (Figure 17).[289]

[285] [1] P.A. Bates, Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies, International Journal for Parasitology 37 (2007) 1097–1106. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003. [2] T.D. Serafim, R. Dey, H.L. Nakhasi, J.G. Valenzuela, S. Kamhawi, Unique Features of Vector-Transmitted Leishmaniasis and Their Relevance to Disease Transmission and Control, in: Arthropod Vector: Controller of Disease Transmission, Volume 2, Elsevier, 2017: pp. 91–114. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805360-7.00006-X.

[286] [1] E. Giraud, O. Martin, L. Yakob, M. Rogers, Quantifying Leishmania Metacyclic Promastigotes from Individual Sandfly Bites Reveals the Efficiency of Vector Transmission, Commun Biol 2 (2019) 84. https://doi.org/10.1038/s42003-019-0323-8.

[287] M.E. Rogers, The Role of Leishmania Proteophosphoglycans in Sand Fly Transmission and Infection of the Mammalian Host, Front. Microbio. 3 (2012). https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00223.

[288] M. Abdeladhim, I. V. Coutinho-Abreu, S. Townsend, S. Pasos-Pinto, L. Sanchez, M. Rasouli, A. B. Guimaraes-Costa, H. Aslan, I.M.B. Francischetti, F. Oliveira, I. Becker, S. Kamhawi, J.M.C. Ribeiro, R.C. Jochim, J.G. Valenzuela, Molecular Diversity between Salivary Proteins from New World and Old World Sand Flies with Emphasis on Bichromomyia olmeca, the Sand Fly Vector of Leishmania mexicana in Mesoamerica, PLoS Negl Trop Dis 10 (2016) e0004771. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004771.

[289] C.R. Teixeira, M.J. Teixeira, R.B.B. Gomes, C.S. Santos, B.B. Andrade, I. Raffaele-Netto, J.S. Silva, A. Guglielmotti, J.C. Miranda, A. Barral, C. Brodskyn, M. Barral-Netto, Saliva from Lutzomyia longipalpis Induces CC Chemokine Ligand 2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression and Macrophage Recruitment, The Journal of Immunology 175 (2005) 8346–8353. https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.12.8346.

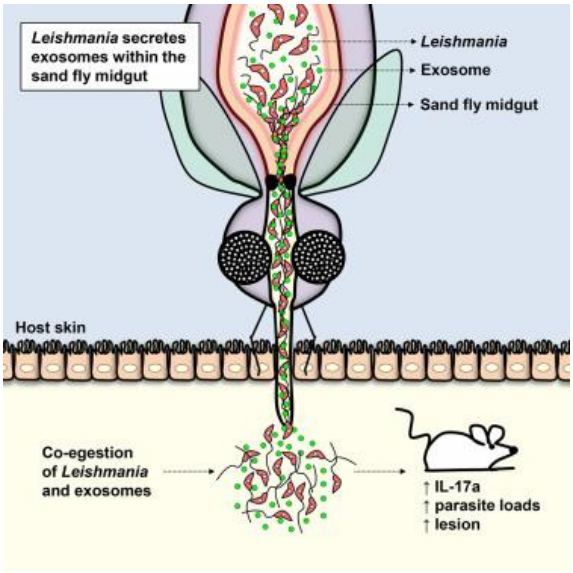


Figure 17. Sécrétion d'exosomes par le protozoaire parasite Leishmania.[290]

La capacité à maintenir un état infectieux chronique dépend fortement de sa capacité d'évasion immunitaire. Différentes stratégies d'évasion immunitaire utilisées par les espèces de *Leishmania* ont été décrits[291] (Figure 18) :

- Empêcher le développement des *complexes d'attaque membranaire C5-9*, ce qui inhibe la maturation du système du complément [292]
- Utiliser le lipophosphoglycane pour promouvoir les récepteurs d'entrée des macrophages tels que les récepteurs Fc et de phosphatidylsérine [293]
- Modifier la voie de signalisation TLR2/TLR4 pour arrêter la cascade de cytokines [294]
- Empêcher la fusion des phagosomes et des lysosomes dans les macrophages
- Interrompre la pompe V-ATPase pour contrôler le pH à l'intérieur du phagosome [295]
- Utiliser des transporteurs de fer spécialisés pour fournir du fer au parasite
- Réduire l'expression de B7 et de CD40 en tant qu'aspects critiques de la réponse antiparasitaire des lymphocytes T
- Inhiber les signaux d'activation des cytokines dans les macrophages *via* la voie JAK/STAT
- Modifier les niveaux d'expression des cytokines et des chimiokines

[290] V.D. Atayde, H. Aslan, S. Townsend, K. Hassani, S. Kamhawi, M. Olivier, Exosome Secretion by the Parasitic Protozoan Leishmania within the Sand Fly Midgut, Cell Reports 13 (2015) 957–967. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.058.

[291] S. Sundar, J. Singh, V.K. Singh, N. Agrawal, R. Kumar, Current and emerging therapies for the treatment of leishmaniasis, Expert Opinion on Orphan Drugs 12 (2024) 19–32. https://doi.org/10.1080/21678707.2024.2335248.

[292] P. Ingale, R. Kabra, S. Singh, Structural sequence evolution and computational modeling approaches of the complement system in leishmaniasis, in: Advances in Protein Chemistry and Structural Biology, Elsevier, 2020: pp. 409–424. https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.12.004.

[293] M.B. Naeini, V. Bianconi, M. Pirro, A. Sahebkar, The role of phosphatidylserine recognition receptors in multiple biological functions, Cell Mol Biol Lett 25 (2020) 23. https://doi.org/10.1186/s11658-020-00214-z. [2] J.L.M. Wanderley, P.E. Thorpe, M.A. Barcinski, L. Soong, Phosphatidylserine exposure on the surface of L eishmania amazonensis amastigotes modulates in vivo infection and dendritic cell function, Parasite Immunology 35 (2013) 109–119. https://doi.org/10.1111/pim.12019.

[294] M.S. Faria, F.C.G. Reis, A.P.C.A. Lima, Toll-Like Receptors in Leishmania Infections: Guardians or Promoters?, Journal of Parasitology Research 2012 (2012) 1–12. https://doi.org/10.1155/2012/930257.

[295] J. Hong, C. Sanjoba, W. Fujii, J. Yamagishi, Y. Goto, Leishmania infection-induced multinucleated giant cell formation *via* upregulation of ATP6V0D2 expression, Front. Cell. Infect. Microbiol. 12 (2022) 953785. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.953785.

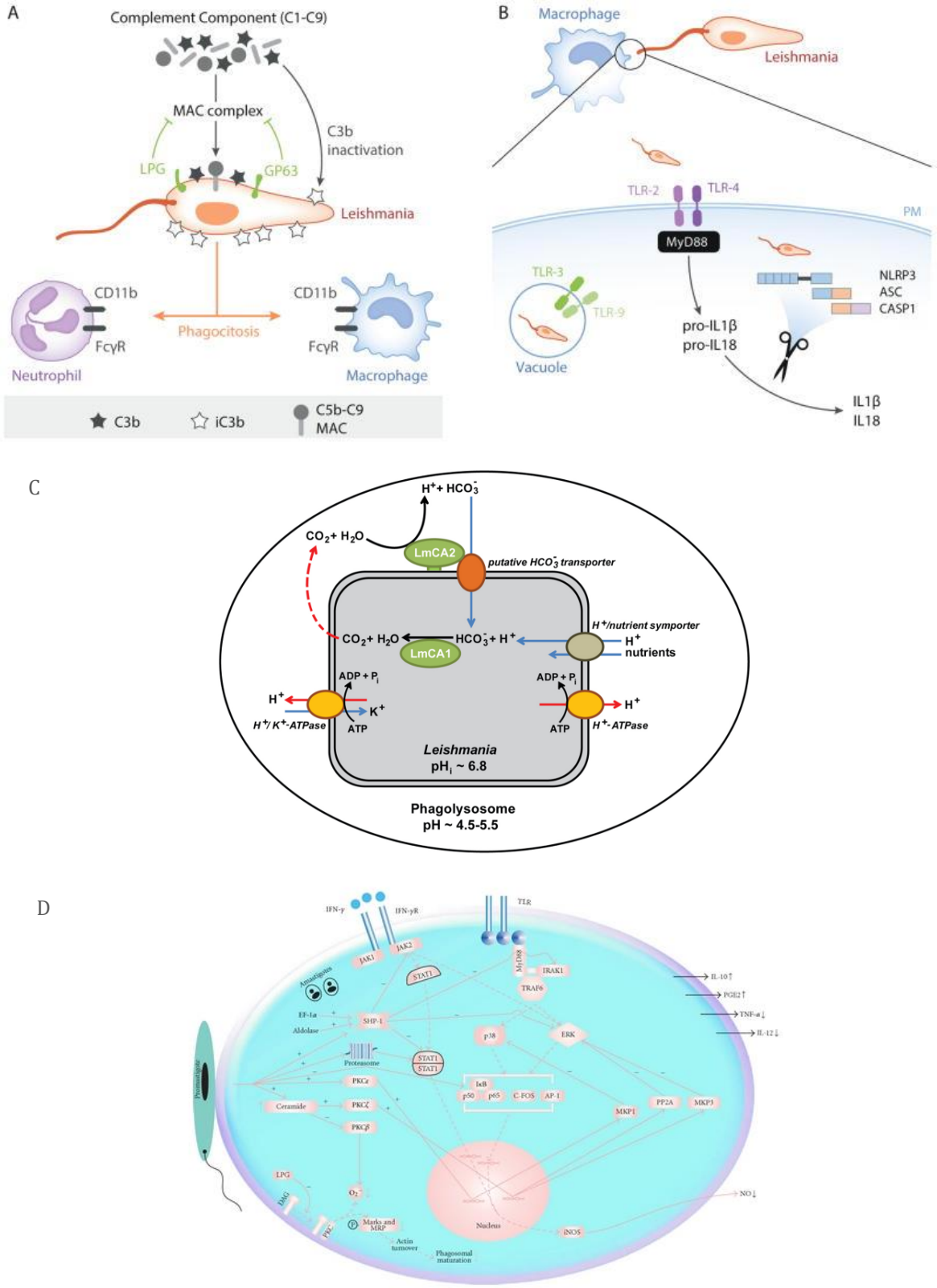


Figure 18. Réponses immunitaires innées contre les infections à *Leishmania* : a. systèmes *complexes d'attaque membranaire C5-9,* b. signalisation TLR2/TLR4,[296] c. régulation du pH intracellulaire,[297] d. voie JAK/STAT.[298]

[296] P. Gurung, T.-D. Kanneganti, Innate immunity against Leishmania infections: Innate immunity against Leishmania, Cellular Microbiology 17 (2015) 1286–1294. https://doi.org/10.1111/cmi.12484.

[297] D.S. Pal, M. Abbasi, D.K. Mondal, B.A. Varghese, R. Paul, S. Singh, R. Datta, Interplay between a cytosolic and a cell surface carbonic anhydrase in pH homeostasis and acid tolerance of Leishmania, Journal of Cell Science 130 (2017) 754–766. https://doi.org/10.1242/jcs.199422.

[298] Md. Shadab, N. Ali, Evasion of Host Defence by Leishmania donovani : Subversion of Signaling Pathways, Molecular Biology International 2011 (2011) 1–10. https://doi.org/10.4061/2011/343961.

Chacun de ses composants, peut modifier la nature et l'état d'activation des cellules immunitaires résidentes et migratrices sur les sites de piqûres infectés. La connaissance des événements qui régissent dans la phase cutanée précoce des infections à *Leishmania*, tant pour la LC que pour la LV, est essentielle pour comprendre l'initiation et l'établissement de la maladie, mais c'est l'un des domaines les moins explorés dans l'immunologie de *Leishmania*.

Nous décrivons ci-dessous, la manière dont la composition de la peau normale est affectée par la piqûre d'un phlébotome infecté :

La salive du vecteur module la réponse de l'hôte en injectant des molécules anticoagulantes, antiplaquettaires et vasodilatatrices. Le parasite interagit ensuite avec les récepteurs des phagocytes, le récepteur du troisième complément (CR3 - third complement receptor), déclenchant la phagocytose.[299]

Après l'internalisation des promastigotes dans les phagosomes, suivie de la fusion avec les lysosomes, les parasites se retrouvent confrontés à l'environnement hostile du phagolysosome, dans un milieu acidifié,[300] où le parasite démarre la différentiation vers sa forme amastigote.[301]

Cette différentiation est suivie par une étape de multiplication cellulaire par fission binaire,[302] où la réduction du rapport surface/volume pour les cellules amastigotes est une adaptation qui minimise l'exposition aux mécanismes défensifs de l'hôte, réduisant ainsi les risques de destruction parasitaire. Cette internalisation du parasite peut se produire *via* un mécanisme "cheval de Troie ", où *Leishmania* utilise les neutrophiles pour entrer silencieusement dans les macrophages sans déclencher de réponse immunitaire immédiate.

La réponse immunitaire humaine se divise en deux grandes phases : une réponse innée (cellulaire), qui constitue la première ligne de défense avec les macrophages, et une réponse adaptative (humorale), impliquant la production d'anticorps spécifiques et la mémoire immunitaire. La réponse adaptative fait intervenir les lymphocytes T CD4+, qui se différencient en sous-types Th1 ou Th2. Une réponse Th1 robuste favorise l'élimination du parasite, tandis qu'une réponse Th2 peut promouvoir la survie de *Leishmania*, aggravant la maladie.

[299] M.M. Geraldo, C.R. Costa, F.M.C. Barbosa, B.C. Vivanco, W.F.K.M. Gonzaga, R.R. Novaes E Brito, A.F. Popi, J.D. Lopes, P. Xander, In vivo and in vitro phagocytosis of Leishmania (Leishmania) amazonensis promastigotes by B-1 cells, Parasite Immunology 38 (2016) 365–376. https://doi.org/10.1111/pim.12324.

[300] A. Murugananthan, K.P. Amarasinghe, G.W. Rathnaweera, P.T. Amalraajan, R. Arulenthiran, Cytomorphological Variations of Leishman-Donovan Bodies Found in Cutaneous Leishmaniasis Patients in Sri Lanka, Infect Microb Dis 5 (2023) 93–100. https://doi.org/10.1097/IM9.0000000000000118.

[301] T. Holowka, T.M. Castilho, A.B. Garcia, T. Sun, D. McMahon-Pratt, R. Bucala, Leishmania -encoded orthologs of macrophage migration inhibitory factor regulate host immunity to promote parasite persistence, FASEB j. 30 (2016) 2249–2265. https://doi.org/10.1096/fj.201500189R.

[302] A. Yadav, V. Sharma, J. Pal, P. Gulati, M. Goel, U. Chandra, N. Bansal, S. Saha, DNA replication protein Cdc45 directly interacts with PCNA *via* its PIP box in Leishmania donovani and the Cdc45 PIP box is essential for cell survival, PLoS Pathog 16 (2020) e1008190. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008190.

Leishmania peut devenir résistant à la réponse immunitaire innée et exploiter les macrophages comme niches de réplication. Les neutrophiles, bien qu'essentiels pour les premières phases de l'infection, ne parviennent pas toujours à éliminer le parasite, facilitant ainsi sa propagation. Les macrophages peuvent adopter un profil M1 (pro-inflammatoire) ou M2b (immunorégulateur), influençant l'évolution de l'infection.

Dans la leishmaniose viscérale, les amastigotes se disséminent dans plusieurs organes, où ils persistent, même sans réinfection. La virulence de certaines espèces de *Leishmania* repose sur leur capacité à inhiber l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Cette capacité d'évasion rend le développement de vaccins efficaces difficile, bien que des vaccins vétérinaires soient déjà utilisés.

L'immunité innée repose sur la reconnaissance des parasites par les macrophages, qui produisent des cytokines pro- inflammatoires comme le TNF-α. Ces cytokines favorisent l'inflammation et recrutent d'autres cellules immunitaires. Cependant, une inflammation excessive peut entraîner des dommages tissulaires.

L'immunité adaptative se manifeste par l'activation des cellules T CD4+ et CD8+, qui produisent des cytokines favorisant la destruction des parasites. L'IFN-γ joue un rôle clé en activant les macrophages pour produire du NO, toxique pour *Leishmania*. La pathologie de la leishmaniose découle souvent d'un déséquilibre entre la réponse inflammatoire et la capacité de l'hôte à éliminer efficacement les parasites.[303]

La physiopathologie varie selon les formes cliniques. Ces parasites peuvent provoquer des infections allant de formes cutanées bénignes à des formes viscérales potentiellement mortelles. Dans de nombreux cas, l'infection reste asymptomatique, mais des amastigotes intracellulaires peuvent persister en état quiescent pendant des années, expliquant les leishmanioses opportunistes chez les patients immunodéprimés.

Lorsque la multiplication des parasites reste limitée aux macrophages et aux cellules dendritiques du site d'inoculation, les réactions cellulaires et les cytokines produites entraînent une lésion cutanée localisée. Cependant, les parasites peuvent se propager aux ganglions lymphatiques et diffuser vers d'autres zones cutanées, comme dans la leishmaniose cutanée diffuse, ou atteindre les muqueuses de la face, provoquant la leishmaniose cutanéomuqueuse. Dans les cas plus graves, les parasites se disséminent à travers le sang et la lymphe, provoquant la

[303] K. Tejle, M. Lindroth, K.-E. Magnusson, B. Rasmusson, Wild-type Leishmania donovani promastigotes block maturation, increase integrin expression and inhibit detachment of human monocyte-derived dendritic cells – the influence of phosphoglycans, FEMS Microbiology Letters 279 (2008) 92–102. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.01013.x.

leishmaniose viscérale, où les organes les plus touchés sont la rate (splénomégalie), le foie, les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse, entraînant une pancytopénie.

1.2.7. Le diagnostic

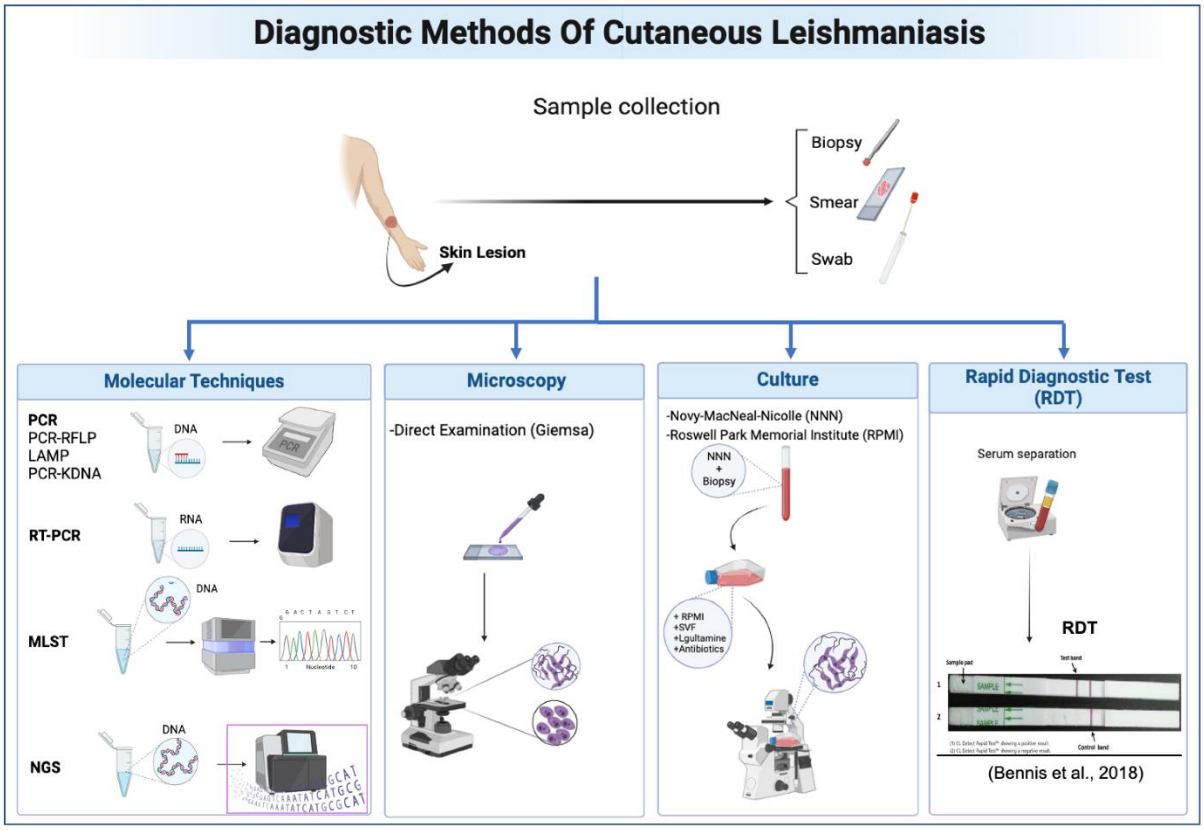


Figure 19. Méthodes de diagnostic de la leishmaniose cutanée.[304]

Le traitement de la leishmaniose était laissé à l'appréciation du médecin en charge du patient, qu'il s'agisse d'un médecin généraliste ou d'un spécialiste hospitalier. Les capacités de diagnostic sont importantes, car elles déterminent la probabilité d'un diagnostic rapide, précis et une prise en charge efficace.

L'identification précise de l'espèce de *Leishmania* responsable constitue une question souvent soulevée, bien que paradoxale. En pratique clinique, il n'est généralement pas nécessaire d'identifier l'espèce en cause. À partir des informations diagnostiques, il est possible de déterminer les meilleures stratégies de traitement, par exemple en déterminant la voie d'administration. Le choix de la voie d'administration est laissé à l'appréciation du médecin. En pratique, la voie intra-musculaire (IM) est privilégiée dans la plupart des cas, car les populations les plus à risque (migrants, orpailleurs en situation irrégulière) sont souvent réticentes à

[304] [1] I. Bennis, K. Verdonck, N. El Khalfaoui, M. Riyad, H. Fellah, J.-C. Dujardin, H. Sahibi, S. Bouhout, G. Van Der Auwera, M. Boelaert, Accuracy of a Rapid Diagnostic Test Based on Antigen Detection for the Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis in Patients with Suggestive Skin Lesions in Morocco, The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 99 (2018) 716–722. https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0066. [2] H. Talimi, K. Retmi, R. Fissoune, M. Lemrani, Artificial Intelligence in Cutaneous Leishmaniasis Diagnosis: Current Developments and Future Perspectives, Diagnostics 14 (2024) 963. https://doi.org/10.3390/diagnostics14090963.

l'hospitalisation et peu assidues aux soins. La voie IM permet un traitement court administré en ambulatoire. Aux États-Unis et au Canada, l'administration par voie IV est préférée, selon les recommandations de l'IDSA et de l'American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH), bien qu'il n'existe pas d'études justifiant clairement ce choix.

Le diagnostic de la leishmaniose repose principalement sur l'identification des parasites par des prélèvements biologiques, des méthodes immunologiques et la biologie moléculaire (Figure 19). Traditionnellement, il repose sur l'observation directe des amastigotes, réalisée dans des frottis ou des biopsies de lésions cutanées. Les méthodes sérologiques, telles que l'immunofluorescence indirecte (IFA) et le test d'agglutination directe (DAT), sont aussi employées pour diagnostiquer la leishmaniose viscérale. Des tests rapides utilisant l'antigène rk39 sont largement déployés dans les régions endémiques pour une détection rapide. Plus récemment, la PCR s'est imposée grâce à sa sensibilité élevée et sa capacité à identifier les espèces spécifiques de *Leishmania*.[305]

Dans les pays disposant de ressources suffisantes, la PCR doit être privilégiée pour un diagnostic rapide et une prise en charge thérapeutique précoce. L'avènement des techniques PCR et des tests de diagnostic rapide (TDR)[306] a grandement amélioré la prise en charge. Néanmoins, la sérologie demeure un outil non invasif et efficace, notamment chez les patients pédiatriques immunocompétents. Le choix des méthodes diagnostiques dépend du contexte épidémiologique et des ressources locales disponibles.[307]

La culture de parasites reste une méthode complémentaire utile pour confirmer le diagnostic, bien que son coût et sa disponibilité limitée en réduisent l'usage. Compte tenu de la symptomatologie aspécifique et de la faible prévalence de la maladie dans certaines régions, la leishmaniose viscérale reste difficile à diagnostiquer.

[305] I. Gow, N.C. Smith, D. Stark, J. Ellis, Laboratory diagnostics for human Leishmania infections: a polymerase chain reaction-focussed review of detection and identification methods, Parasites Vectors 15 (2022) 412. https://doi.org/10.1186/s13071-022-05524-z.

[306] M. Boelaert, K. Verdonck, J. Menten, T. Sunyoto, J. Van Griensven, F. Chappuis, S. Rijal, Rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients with suspected disease, Cochrane Database of Systematic Reviews 2014 (2014). https://doi.org/10.1002/14651858.CD009135.pub2.

[307] Y. Wu, X. Tian, N. Song, M. Huang, Z. Wu, S. Li, N.R. Waterfield, B. Zhan, L. Wang, G. Yang, Application of Quantitative PCR in the Diagnosis and Evaluating Treatment Efficacy of Leishmaniasis, Front. Cell. Infect. Microbiol. 10 (2020) 581639. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.581639.

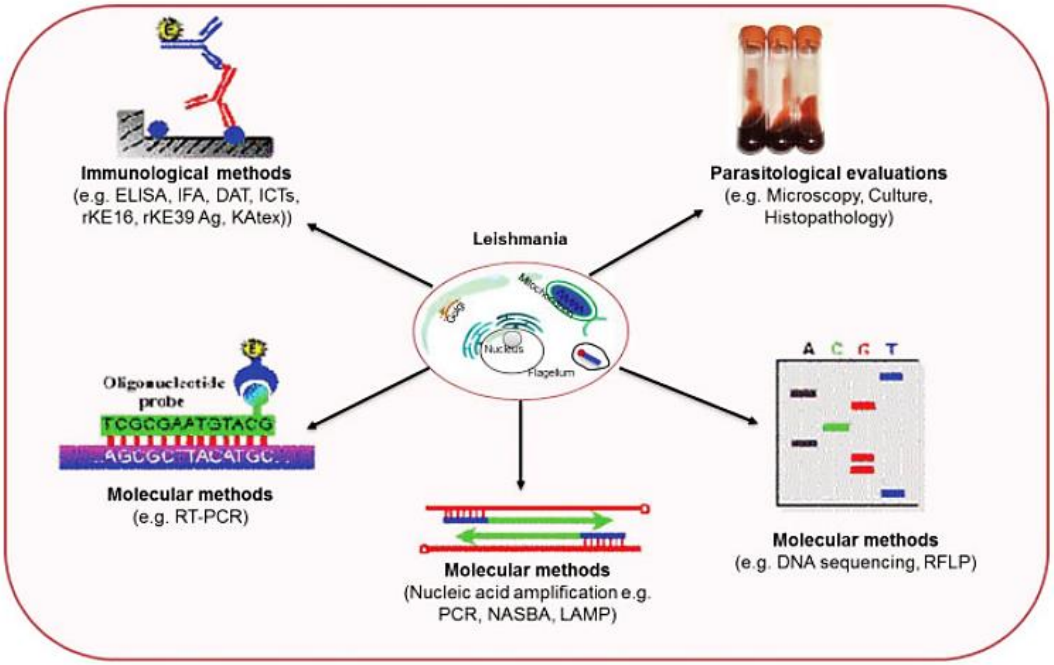


Figure 20. Méthodes de diagnostic de la leishmaniose viscérale.[308]

Le diagnostic de la leishmaniose viscérale est complexe en raison de symptômes aspécifiques souvent confondus avec d'autres pathologies telles que la leucémie aiguë, la cytopénie auto-immune, la neutropénie auto-immune ou encore le syndrome d'activation macrophagique (SAM). Les patients atteints de leishmaniose viscérale présentent généralement une anémie normocytaire, une thrombopénie, un syndrome inflammatoire biologique et une hypoalbuminémie, sans cholestase ni trouble ionique, et une fonction rénale normale.

Le délai entre l'hospitalisation et le diagnostic peut varier selon l'accès aux ressources médicales, souvent à cause d'une présentation clinique atypique dominée par une fièvre prolongée et un syndrome d'activation macrophagique. Des erreurs de prélèvement, comme des résultats négatifs en PCR de la moelle osseuse, sont fréquentes. L'accès limité à des tests diagnostiques performants constitue un obstacle majeur dans de nombreuses régions.

Les techniques immunologiques sont également largement utilisées pour le diagnostic de la leishmaniose viscérale (Figure 20), principalement à partir de prélèvements sanguins, moins invasifs que les ponctions de moelle. Elles détectent des anticorps spécifiques d'une grande valeur diagnostique. L'immunofluorescence indirecte (IFI), longtemps considérée comme référence, est

[308] A. Gupta, A. Singh, S. Srivastava, P. Shankar, S. Singh, Visceral Leishmaniasis in Children: Diagnosis, Treatment, and Prevention, J Pediatr Infect Dis 12 (2017) 214–221. https://doi.org/10.1055/s-0037-1603500.

de plus en plus remplacée par la technique immunoenzymatique (ELISA),[309] automatisable et capable de traiter de nombreux échantillons en série. Ces méthodes permettent un diagnostic efficace de la leishmaniose viscérale, bien que les faibles taux d'anticorps dans des régions de forte endémie ou l'immunodépression, notamment due au VIH, puissent conduire à des faux négatifs.

Dans ces cas, l'immunoempreinte ou Western Blot (WB)[310] joue un rôle clé pour confirmer le diagnostic d'infection à *L. infantum*, en détectant des bandes spécifiques de 12/14 et/ou 16 kDa. Cette technique montre une sensibilité supérieure à celle des tests sérologiques classiques, approchant 100 % chez les immunocompétents.

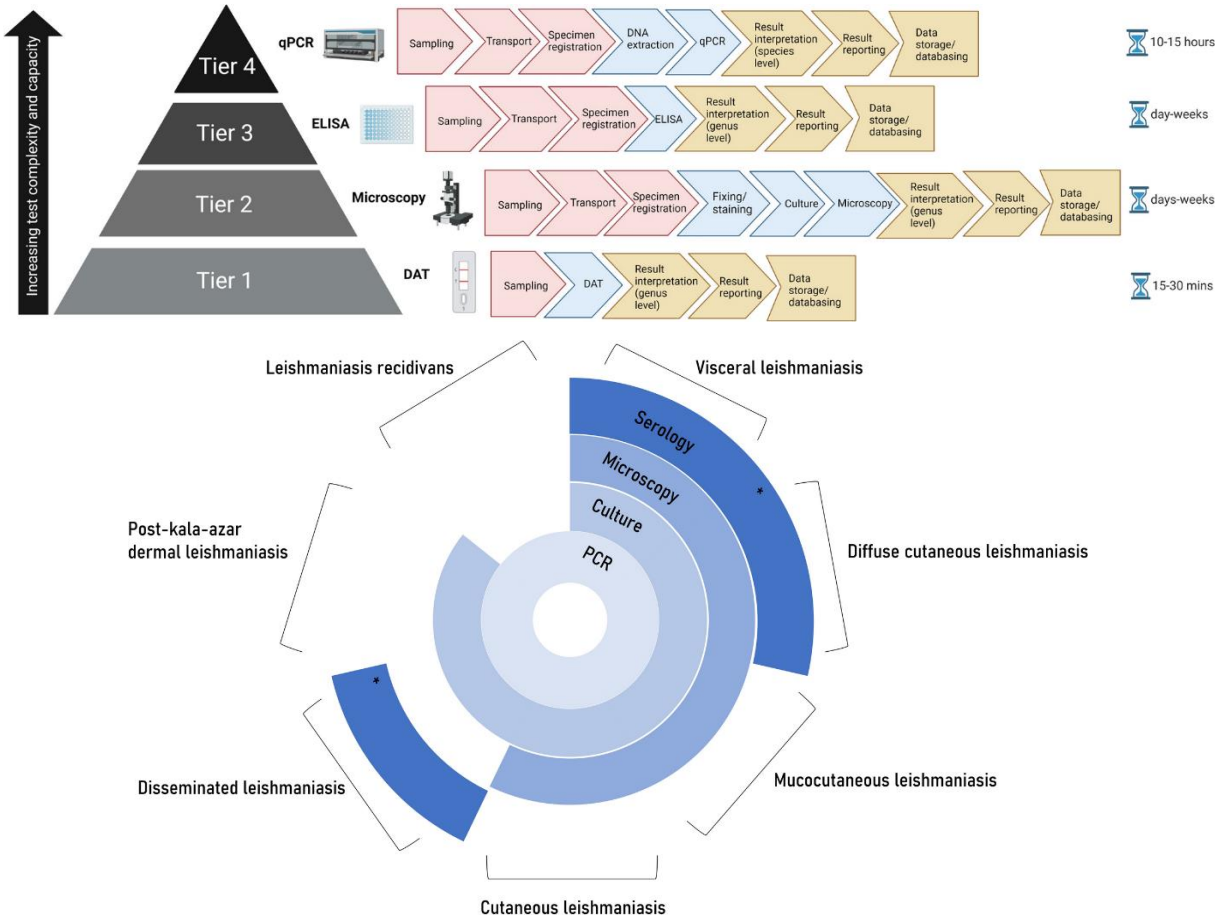


Figure 21. Méthodes de diagnostic en laboratoire des infections de *Leishmania.*[311]

La figure 21 présente les techniques de diagnostic recommandées pour les différentes formes cliniques de leishmaniose par différentes Agences de référence dont l'OMS. Pour la gestion des cas en clinique, les données relatives à l'espèce fournissent des informations importantes pour

[309] M.Z. Islam, M. Itoh, S.M. Shamsuzzaman, R. Mirza, F. Matin, I. Ahmed, A.K.M. Shamsuzzaman Choudhury, M.A. Hossain, X.-G. Qiu, N. Begam, M. Furuya, J.L. Leafasia, Y. Hashiguchi, E. Kimura, Diagnosis of Visceral Leishmaniasis by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Urine Samples, Clin Vaccine Immunol 9 (2002) 789–794. https://doi.org/10.1128/CDLI.9.4.789-794.2002.

[310] S. Heidari, J. Gharechahi, M. Mohebali, B. Akhoundi, S. Mirshahvaladi, B. Azarian, H. Hajjaran, Western Blot Analysis of Leishmania infantum Antigens in Sera of Patients with Visceral Leishmaniasis, Iran J Parasitol 14 (2019) 10–19.

[311] I. Gow, N.C. Smith, D. Stark, J. Ellis, Laboratory diagnostics for human Leishmania infections: a polymerase chain reaction-focussed review of detection and identification methods, Parasites Vectors 15 (2022) 412. https://doi.org/10.1186/s13071-022-05524-z.

l'établissement d'un pronostic et la prise de décisions thérapeutiques. La définition de l'espèce a également une importance en termes de politiques de santé publique. Par exemple, la lutte contre la leishmaniose cutanée au Pérou s'est avérée à suivre impérativement,[312] alors que la surveillance épidémiologique et les efforts d'élimination de la forme viscérale sont importants en Inde, au Népal et au Bangladesh.[313]

1.2.8. Traitements et recherche pharmacothérapeutique

Le traitement contre la leishmaniose repose principalement sur la chimiothérapie.[314] Bien que des progrès aient été réalisés dans le développement d'un vaccin, aucun vaccin utilisable chez l'homme n'est actuellement disponible sur le marché, conséquence de différents défis, tels que :[315]

- **Sécurité** : la stabilité des parasites atténués est un des principaux problèmes. Le risque que ces parasites puissent revenir à une forme virulente, que ce soit pendant la production ou après l'administration chez l'homme.
- **Efficacité** : Le développement d'une immunité robuste ou universelle contre les différentes formes de leishmaniose, qu'elle soit cutanée, viscérale ou muqueuse, est un autre défi, conséquence des réponses immunitaires variées.
- **Variabilité génétique des populations** : Les réponses immunitaires varient également d'une personne à l'autre selon la génétique et des comorbidités.
- **Durabilité de l'immunité** : garantir que la protection immunitaire fournie par le vaccin soit durable, idéalement tout au long de la vie, ou qu'elle nécessite un nombre minimal de rappels.

La chimiothérapie actuelle repose principalement sur six groupes,[316] disposant d'une autorisation de mise sur le marché (AMM), et une indication qui peut varier selon chaque pays. Le schéma thérapeutique est choisi selon la zone géographique, l'espèce du parasite impliqué, et dépend aussi de l'approvisionnement par l'OMS pour favoriser la disponibilité au moindre coût.[317]

i. Les antimoniés pentavalents.
ii. L'amphotéricine B.
iii. La miltéfosine.
iv. La pentamidine.
v. La paromomycine
vi. Les composés azolés.

[312] J. Arevalo, L. Ramirez, V. Adaui, M. Zimic, G. Tulliano, C. Miranda-Verástegui, M. Lazo, R. Loayza-Muro, S.D. Doncker, A. Maurer, F. Chappuis, J. Dujardin, and A. Llanos-Cuentas, Influence of Leishmania (Viannia) Species on the Response to Antimonial Treatment in Patients with American Tegumentary Leishmaniasis, J INFECT DIS 195 (2007) 1846–1851. https://doi.org/10.1086/518041.

[313] D. Mondal, S.P. Singh, N. Kumar, A. Joshi, S. Sundar, P. Das, H. Siddhivinayak, A. Kroeger, M. Boelaert, Visceral Leishmaniasis Elimination Programme in India, Bangladesh, and Nepal: Reshaping the Case Finding/Case Management Strategy, PLoS Negl Trop Dis 3 (2009) e355. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000355.

[314] eBioMedicine, Leishmania: an urgent need for new treatments, eBioMedicine 87 (2023) 104440. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2023.104440.

[315] A. Satoskar, R. Durvasula, eds., Pathogenesis of Leishmaniasis: New Developments in Research, Springer New York, New York, NY, 2014. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9108-8.

[316] [1] S. Sundar, J. Singh, V.K. Singh, N. Agrawal, R. Kumar, Current and emerging therapies for the treatment of leishmaniasis, Expert Opinion on Orphan Drugs 12 (2024) 19–32. https://doi.org/10.1080/21678707.2024.2335248. [2] L. Maes, R.A.I. Da Luz, P. Cos, V. Yardley, Classical Versus Novel Treatment Regimens, in: A. Ponte-Sucre, E. Diaz, M. Padrón-Nieves (Eds.), Drug Resistance in Leishmania Parasites, Springer Vienna, Vienna, 2013: pp. 301–319. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1125-3_15. [3] E. Moore, D. Lockwood, Treatment of visceral leishmaniasis, J Global Infect Dis 2 (**2010**) 151. https://doi.org/10.4103/0974-777X.62883.

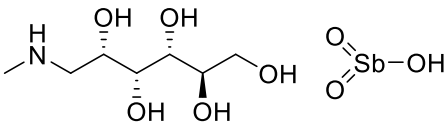
[317] The leishmaniases: old neglected tropical diseases, Springer Berlin Heidelberg, New York, NY, 2018.

I. Antimoniaux Pentavalents :

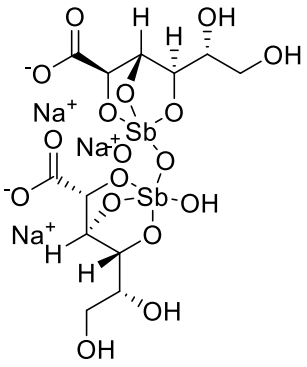
- **Mécanisme d'action** : Ces médicaments génèrent du stress oxydatif à l'intérieur du parasite et interfèrent avec ses systèmes de détoxification.
- **Résistance** : La résistance aux antimoniaux est liée à une diminution de l'absorption du médicament par le parasite, en raison de modifications des transporteurs, ainsi qu'à une détoxification améliorée par une production accrue de thiols.

Les antimoniés pentavalents ont été découverts comme agents antileishmaniens dans les années 1900 sous la forme de tartrate de potassium et d'antimoine(III). Actuellement, deux formes de complexes organo-antimoniaux sont disponibles : l'antimoniate de méglumine et le stibogluconate de sodium. L'antimoine agit par un mécanisme multi-cibles en inhibant la trypanothion réductase (une enzyme qui convertit le trypanothion en sa forme réduite), le trypanothion (un facteur de virulence du parasite) et la topoisomérase des nucléosides.[318]

Le stibogluconate de sodium (Pentostam®) et l'antimoniate de méglumine (Glucantime®) (Figure 22), ont longtemps été utilisés comme traitement de première ligne contre la leishmaniose viscérale, en Afrique et en Amérique latine respectivement. Bien qu'efficaces, ces composés sont associés à une toxicité élevée. De plus, des résistances significatives ont émergé dans plusieurs régions endémiques, notamment en Asie du Sud.



Antimoniate de méglumine



Stibogluconate de sodium

Figure 22. Structure des deux antimoniés pentavalents.

Leur administration s'effectue par voie intraveineuse ou intramusculaire, à une dose de 20 mg/kg/jour pendant 28 à 30 jours [319]. Les antimoniés pentavalents présentent de sévères effets indésirables, limitant leur utilisation : cardiotoxicité, néphrotoxicité ou hépatotoxicité [320]. Une

[318] V. Soni, S. Chandel, V. Pandey, S. Asati, P. Jain, A. Jain, R.K. Tekade, Novel Therapeutic Approaches for the Treatment of Leishmaniasis, in: Biomaterials and Bionanotechnology, Elsevier, 2019: pp. 263–300. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814427-5.00008-1.

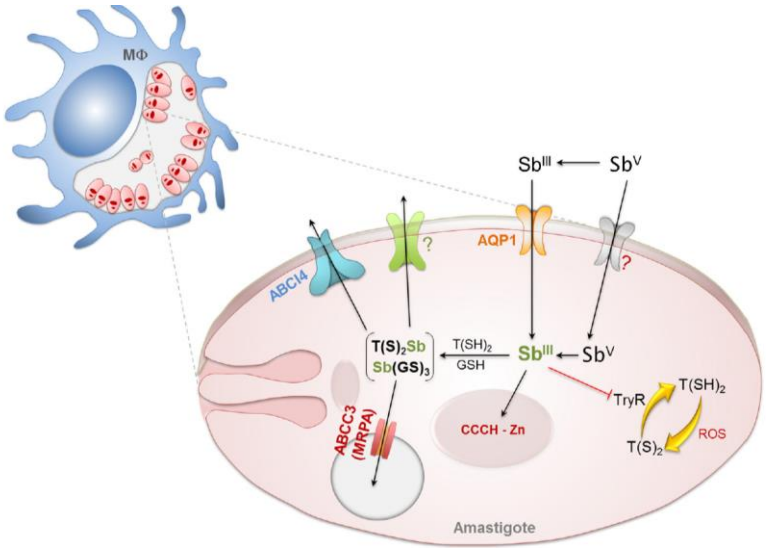
[319] S. Sundar, A. Singh, Recent developments and future prospects in the treatment of visceral leishmaniasis, Therapeutic Advances in Infection 3 (2016) 98–109. https://doi.org/10.1177/2049936116646063.

[320] S. Sundar, J. Chakravarty, An update on pharmacotherapy for leishmaniasis, Expert Opinion on Pharmacotherapy 16 (2015) 237–252. https://doi.org/10.1517/14656566.2015.973850.

surveillance étroite est ainsi nécessaire pendant l'hospitalisation et en ambulatoire. De plus, l'apparition de cas de résistances peut limiter leur emploi, comme c'est le cas en Inde.[321]

Le mécanisme d'action reste à être élucidé avec exactitude, mais des hypothèses ont été proposées dans la littérature. D'un côté, l'antimoine (V) pourrait être directement responsable de l'activité antileishmanienne, par altération de la voie métabolique des purines et inhibition de l'ADN topoisomérase de type I, empêchant la réplication et la transcription de l'ADN parasitaire. D'un autre côté, l'antimoine (V) pourrait également être réduit en antimoine (III), plus actif mais également plus toxique, qui inhiberait la trypanothione réductase, une enzyme spécifique du parasite permettant de combattre le stress oxydatif.[322]

a



b

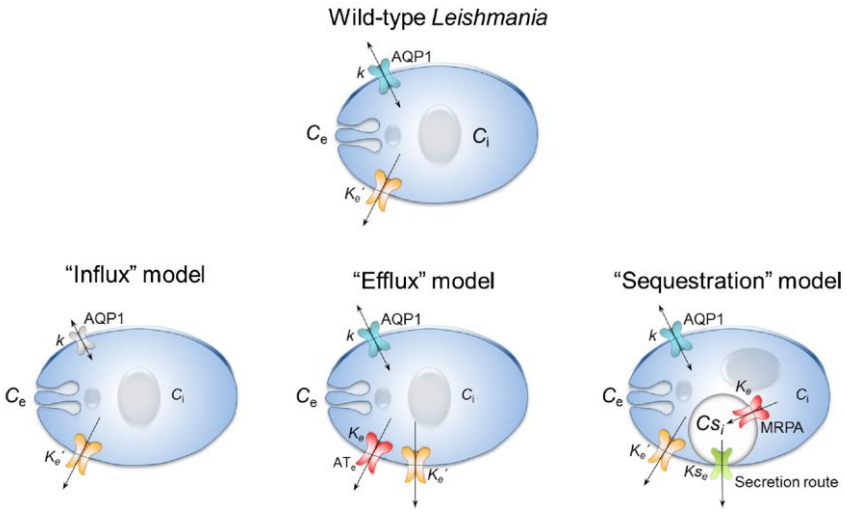


Figure 23. Mécanisme d'action (a) et résistance (b) décrit pour des antimoniés pentavalents. [323]

[321] S. Sundar, D.K. More, M.K. Singh, V.P. Singh, S. Sharma, A. Makharia, P.C.K. Kumar, H.W. Murray, Failure of Pentavalent Antimony in Visceral Leishmaniasis in India: Report from the Center of the Indian Epidemic, CLIN INFECT DIS 31 (2000) 1104–1107. https://doi.org/10.1086/318121.

[322] A.K. Haldar, P. Sen, S. Roy, Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: Current Status and Future Directions, Molecular Biology International 2011 (2011) 1–23. https://doi.org/10.4061/2011/571242.

[323] [1] F. Frézard, R. Monte-Neto, P.G. Reis, Antimony transport mechanisms in resistant leishmania parasites, Biophys Rev 6 (2014) 119–132. https://doi.org/10.1007/s12551-013-0134-y. [2] F. Frézard, C. Demicheli, R.R. Ribeiro, Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs, Molecules 14 (2009) 2317–2336. https://doi.org/10.3390/molecules14072317.

Comme l'illustre la figure 23, les cellules de *Leishmania* de type sauvage présentent un afflux passif de Sb(III) par l'intermédiaire de l'AQP1 et extrudent activement les conjugués Sb-thiol par l'intermédiaire d'une pompe de la membrane plasmique. De plus, trois modèles de transport sont possibles pour les cellules résistantes au Sb.

Selon le modèle « influx », l'efficacité du transport passif est réduite, en raison d'une faible expression, d'une suppression ou d'une mutation de l'AQP1. En raison de l'existence d'une extrusion active, un tel changement dans la voie d'entrée du Sb(III) est équivalent à une réduction intracellulaire de Sb.

Selon le modèle « efflux », la pompe d'efflux est surexprimée par rapport à la cellule de type sauvage ou exprime une autre pompe d'efflux supplémentaire, de sorte que la constante de vitesse de l'efflux actif devient supérieure à la constante de vitesse de l'influx.

Selon le modèle de « séquestration », la séquestration du Sb(III) se produit par l'intermédiaire du MRPA (*multidrug resistance associated protein A*) dans des vésicules intracellulaires et une voie de sécrétion est alors impliquée pour expliquer l'accumulation intracellulaire réduite. Dans ce modèle, on s'attend à ce que la constante de vitesse du transport par l'MRPA (Ke) soit supérieure à la constante de vitesse du transport passif (k) et à la constante de vitesse de l'efflux actif (Ke'). Cela implique que l'étape limitant la vitesse d'entrée du Sb(III) dans les cellules est le transport par AQP1, que le Sb(III) intracellulaire est principalement localisé dans les vésicules intracellulaires, et que le niveau d'accumulation du Sb à l'état stable dépend essentiellement du rapport entre la constante de vitesse de l'afflux et celle de la sécrétion (k/Kse).

II. L'amphotéricine B :

- **Mécanisme d'action** : L'amphotéricine B se lie aux stérols de la membrane du parasite, formant des pores et entraînant la mort cellulaire du parasite.
- **Résistance** : Bien que rare, la résistance clinique n'a pas été largement rapportée. Cependant, son utilisation est limitée par ses effets secondaires sévères, notamment la néphrotoxicité pour la forme classique, et son coût élevé pour la forme liposomale.

L'amphotéricine B (AmB) est un médicament antifongique polyénique qui a été isolé pour la première fois en 1953 à partir de *Streptomyces nodosus* au Vénézuéla.[324] Depuis sa découverte, l'utilisation de l'AmB pour traiter les infections fongiques systémiques et cutanées chez l'homme

[324] [1] A. Lemke, A.F. Kiderlen, O. Kayser, Amphotericin B, Appl Microbiol Biotechnol 68 (2005) 151–162. https://doi.org/10.1007/s00253-005-1955-9. [2] P. Caffrey, S. Lynch, E. Flood, S. Finnan, M. Oliynyk, Amphotericin biosynthesis in Streptomyces nodosus: deductions from analysis of polyketide synthase and late genes, Chemistry & Biology 8 (2001) 713–723. https://doi.org/10.1016/S1074-5521(01)00046-1.

a augmenté rapidement avec le développement du désoxycholate d'amphotéricine B[325] (Fungizone®). L'AmB agit en se liant à l'ergostérol de la membrane plasmique,[326] provoque la formation de pores permettant le passage d'ions, d'eau et de molécules de glucose à travers la bicouche lipidique. Ce mécanisme complet entraîne finalement la mort du parasite.[327] Cependant, l'utilisation de l'AmB est limitée pour un certain nombre de raisons, notamment sa faible solubilité, sa néphrotoxicité, son hépatotoxicité et son action hypokaliémiante.[328]

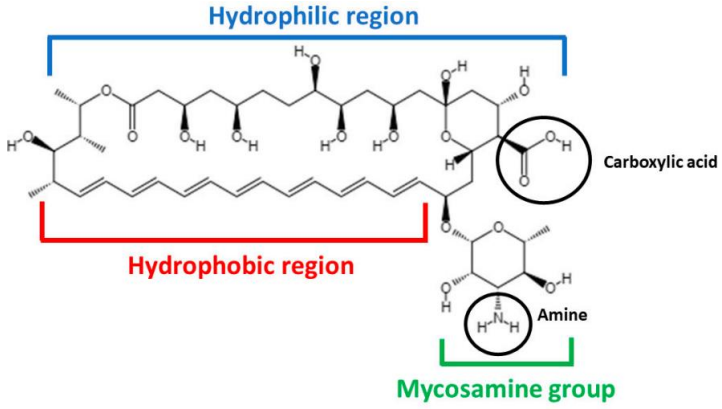


Figure 24. Structure chimique de l'amphotéricine B.[329]

La structure chimique de l'AmB peut être divisée en différents parties. Une partie hydrophile, composée de fonctions alcool et acide carboxylique, et une lipophile, composée d'un enchaînement de doubles liaisons conjuguées (Figure 24). Son administration par voie intraveineuse à une dose de 1 mg/kg/jour pendant 20 à 30 jours permet de guérir les leishmanioses viscérales à *L. donovani* et *L. infantum.* Néanmoins, la nécessité d'une administration par voie intraveineuse lente limite son utilisation (afin d'éviter des toxicités cardiaques et rénales parfois sévères),[330]

- **Formulation liposomale : AmBisome**

Dans les années 1990, des formulations d'AmB à base de lipides,[331] (Figure 25), ont été conçues afin de contourner le problème de toxicité (significativement la toxicité rénale), mais avec un coût

[325] S.H. Jung, D.H. Lim, S.H. Jung, J.E. Lee, K.-S. Jeong, H. Seong, B.C. Shin, Amphotericin B-entrapping lipid nanoparticles and their in vitro and in vivo characteristics, European Journal of Pharmaceutical Sciences 37 (2009) 313–320. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2009.02.021.

[326] H. Ramos, E. Valdivieso, M. Gamargo, F. Dagger, B.E. Cohen, Amphotericin B Kills Unicellular Leishmanias by Forming Aqueous Pores Permeable to Small Cations and Anions, Journal of Membrane Biology 152 (1996) 65–75. https://doi.org/10.1007/s002329900086.

[327] S. Sundar, A. Singh, Recent developments and future prospects in the treatment of visceral leishmaniasis, Therapeutic Advances in Infection 3 (2016) 98–109. https://doi.org/10.1177/2049936116646063.

[328] R. Fernández-García, E. De Pablo, M.P. Ballesteros, D.R. Serrano, Unmet clinical needs in the treatment of systemic fungal infections: The role of amphotericin B and drug targeting, International Journal of Pharmaceutics 525 (2017) 139–148. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.04.013.

[329] F. Frézard, M.M.G. Aguiar, L.A.M. Ferreira, G.S. Ramos, T.T. Santos, G.S.M. Borges, V.M.R. Vallejos, H.L.O. De Morais, Liposomal Amphotericin B for Treatment of Leishmaniasis: From the Identification of Critical Physicochemical Attributes to the Design of Effective Topical and Oral Formulations, Pharmaceutics 15 (2022) 99. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010099.

[330] G. Deray, Amphotericin B nephrotoxicity, Journal of Antimicrobial Chemotherapy 49 (2002) 37–41. https://doi.org/10.1093/jac/49.suppl_1.37.

[331] R. Herbrecht, S. Natarajan-Amé, Y. Nivoix, V. Letscher-Bru, The lipid formulations of amphotericin B, Expert Opinion on Pharmacotherapy 4 (2003) 1277–1287. https://doi.org/10.1517/14656566.4.8.1277.

de fabrication plus élevé[332] et une instabilité à la chaleur, imposant de respecter la chaîne du froid.[333]

AmBisome ® , Abelcet ® et Amphocil ® sont quelques exemples des produits commercialisés, présentant un spectre antifongique comparable et un meilleur profil de sécurité que la Fungizone®.[334] En particulier, l'AmBisome®, une forme liposomale dans laquelle l'AmB est étroitement retenu dans la bicouche lipidique du liposome, est intéressant parce que cette formulation d'AmB à base de lipides a une petite taille de particule et est moins facilement absorbée par les réticulocytes que d'autres formulations. Après administration, l'AmBisome maintient également une concentration élevée de médicament dans la circulation systémique pendant une longue période tout en préservant la structure liposomale. Par conséquent, l'AmBisome peut être considéré comme une formulation d'AmB de référence.[335] Ainsi, bien que cette forme soit indiquée en 1ère intention dans les pays développés, son utilisation dans les pays en développement reste conditionnée aux capacités de financement et de prise en charge.

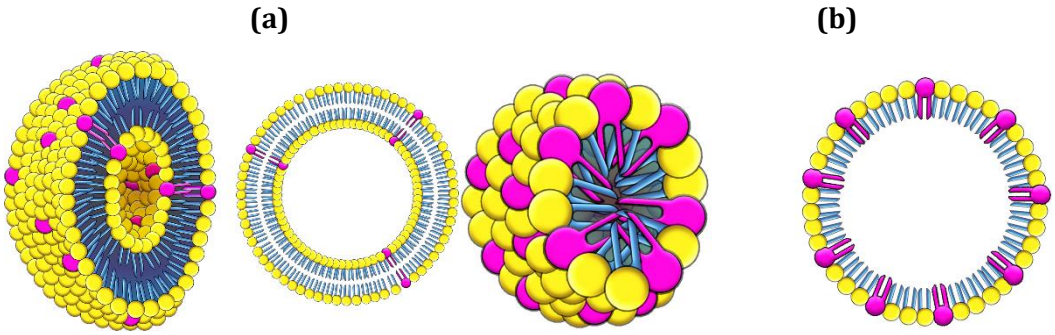


Figure 25. AmB. , Phospholipide (a) Liposome ; (b) deoxycholate [336]

Un potentiel inconvénient de ce produit est précisément son profil très attractif qui répond à de nombreuses lacunes des médicaments alternatifs : un large spectre d'activité avec un faible risque de résistance ; une pharmacocinétique prévisible avec une accumulation rapide au site de l'infection (y compris les biofilms) ; un faible risque d'interactions médicamenteuses ; et un faible risque de toxicités aiguë et chronique.[337] Tous ces avantages en font un médicament largement attractif, mais aussi une source d'automédication et de trafic dans certains pays. De plus, la surveillance de l'efficacité du traitement peut être limitée pour un usage trop répandu.

[332] V. Mosimann, A. Neumayr, D.H. Paris, J. Blum, Liposomal amphotericin B treatment of Old World cutaneous and mucosal leishmaniasis: A literature review, Acta Tropica 182 (2018) 246–250. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.03.016.

[333] M. Balasegaram, K. Ritmeijer, M.A. Lima, S. Burza, G. Ortiz Genovese, B. Milani, S. Gaspani, J. Potet, F. Chappuis, Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis, Expert Opinion on Emerging Drugs 17 (2012) 493–510. https://doi.org/10.1517/14728214.2012.748036.

[334] D. Serrano, M. Ballesteros, A. Schätzlein, J. Torrado, I. Uchegbu, Amphotericin B Formulations – The Possibility of Generic Competition, PNT 1 (2013) 250–258. https://doi.org/10.2174/22117385019991311181250 18.

[335] H. Taniguchi, Y. Ishimime, K. Minamihata, P. Santoso, T. Komada, H. Saputra, K. Uchida, M. Goto, T. Taira, N. Kamiya, Liposomal Amphotericin B Formulation Displaying Lipid-Modified Chitin-Binding Domains with Enhanced Antifungal Activity, Mol. Pharmaceutics 19 (2022) 3906–3914. https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.2c00388.

[336] Francelise B. Cavassin, J.L. Baú-Carneiro, R.R. Vilas-Boas, F.D. Queiroz-Telles, Sixty Years of Amphotericin-B: An Overview of the Main Antifungal Agent Used to Treat Invasive Fungal Infections, (2021) 126209 Bytes. https://doi.org/10.6084/m9.figshare.13325681.

[337] J. Maertens, L. Pagano, E. Azoulay, A. Warris, Liposomal amphotericin B—the present, Journal of Antimicrobial Chemotherapy 77 (2022) ii11–ii20. https://doi.org/10.1093/jac/dkac352.

Néanmoins il existe au niveau hospitalier des stratégies de bon usage, tel que le Programme d'optimisation de l'utilisation des antimicrobiens (PROA)[338] parrainé par l'OMS. Malgré un profil de sécurité très favorable, il n'existe aucune garantie qu'une combinaison de traitements soit à l'abri de l'apparition de résistance.[339] Un autre inconvénient de l'amphotéricine B liposomale est l'absence de formulation orale.

III. La miltéfosine

- **Mécanisme d'action** : La miltéfosine perturbe les lipides membranaires, entraînant l'apoptose du parasite.
- **Résistance** : La résistance est principalement due à une réduction de l'absorption du médicament, souvent causée par des mutations dans le transporteur de la miltéfosine (LdMT). La longue demi-vie du médicament contribue également au risque de résistance en raison d'une exposition prolongée à des doses sous-thérapeutiques.

La miltéfosine (MIL), également connue sous le nom d'hexadécylphosphocholine, est le seul médicament utilisé par voie orale contre la leishmaniose. La miltéfosine a été initialement utilisée comme médicament anticancéreux, mais elle est désormais prescrite par voie orale pour le traitement de la LC et LV. La dose recommandée de MIL est de 2,5 mg/kg/jour pendant quatre semaines. Des essais cliniques menés en Inde ont fait état d'un taux de guérison allant jusqu'à 98 % chez des patients atteints de LV.[340]

Cependant, malgré ses excellents résultats contre la leishmaniose, elle est associée à des effets gastro-intestinaux, notamment des nausées, vomissements et diarrhées. La tératogénicité interdit également son utilisation chez les femmes enceintes.[341] La miltéfosine agit par un mécanisme similaire à l'apoptose pour provoquer la mort cellulaire. Elle inhibe le métabolisme des phospholipides dans la membrane plasmique du parasite ou perturbe la membrane mitochondriale. Des cas de résistances ont aussi été recensés en Inde et au Népal avec des taux de rechute allant de 10 à 20 %.[342]

[338] [1] D. Pérez-Torres, L.M. Tamayo-Lomas, M. Domínguez-Gil González, R. Almendros-Muñoz, M.A. Sacristán-Salgado, E. González-González, J.Á. Berezo-García, C. Díaz-Rodríguez, I. Canas-Pérez, B. Lorenzo-Vidal, J.M. Eiros-Bouza, Antimicrobial stewardship program in an Intensive Care Unit: A retrospective observational analysis of the results 15 months after its implementation, Rev Esp Quimioter 36 (2023) 477–485. https://doi.org/10.37201/req/142.2022. [2] J. Ugalde-Espiñeira, J. Bilbao-Aguirregomezcorta, A.Z. Sanjuan-López, C. Floristán-Imízcoz, L. Elorduy-Otazua, M. Viciola-García, [A program for optimizing the use of antimicrobials (PROA): experience in a regional hospital], Rev Esp Quimioter 29 (2016) 183–189.

[339] B. Purkait, A. Kumar, N. Nandi, A.H. Sardar, S. Das, S. Kumar, K. Pandey, V. Ravidas, M. Kumar, T. De, D. Singh, P. Das, Mechanism of Amphotericin B Resistance in Clinical Isolates of Leishmania donovani, Antimicrob Agents Chemother 56 (2012) 1031–1041. https://doi.org/10.1128/AAC.00030-11.

[340] [1] F. Seyedi, I. Sharifi, A. Khosravi, E. Molaakbari, H. Tavakkoli, E. Salarkia, S. Bahraminejad, M. Bamorovat, S. Dabiri, Z. Salari, A. Kamali, G. Ren, Comparison of cytotoxicity of Miltefosine and its niosomal form on chick embryo model, Sci Rep 14 (2024) 2482. https://doi.org/10.1038/s41598-024-52620-4. [2] S. Sundar, T.K. Jha, C.P. Thakur, J. Engel, H. Sindermann, C. Fischer, K. Junge, A. Bryceson, J. Berman, Oral Miltefosine for Indian Visceral Leishmaniasis, N Engl J Med 347 (2002) 1739–1746. https://doi.org/10.1056/NEJMoa021556.

[341] O. Gupta, T. Pradhan, R. Bhatia, V. Monga, Recent advancements in anti-leishmanial research: Synthetic strategies and structural activity relationships, European Journal of Medicinal Chemistry 223 (2021) 113606. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113606.

[342] S. Rijal, B. Ostyn, S. Uranw, K. Rai, N.R. Bhattarai, T.P.C. Dorlo, J.H. Beijnen, M. Vanaerschot, S. Decuypere, S.S. Dhakal, M.L. Das, P. Karki, R. Singh, M. Boelaert, J.-C. Dujardin, Increasing Failure of Miltefosine in the Treatment of Kala-azar in Nepal and the Potential Role of Parasite Drug Resistance, Reinfection, or Noncompliance, Clinical Infectious Diseases 56 (2013) 1530–1538. https://doi.org/10.1093/cid/cit102.

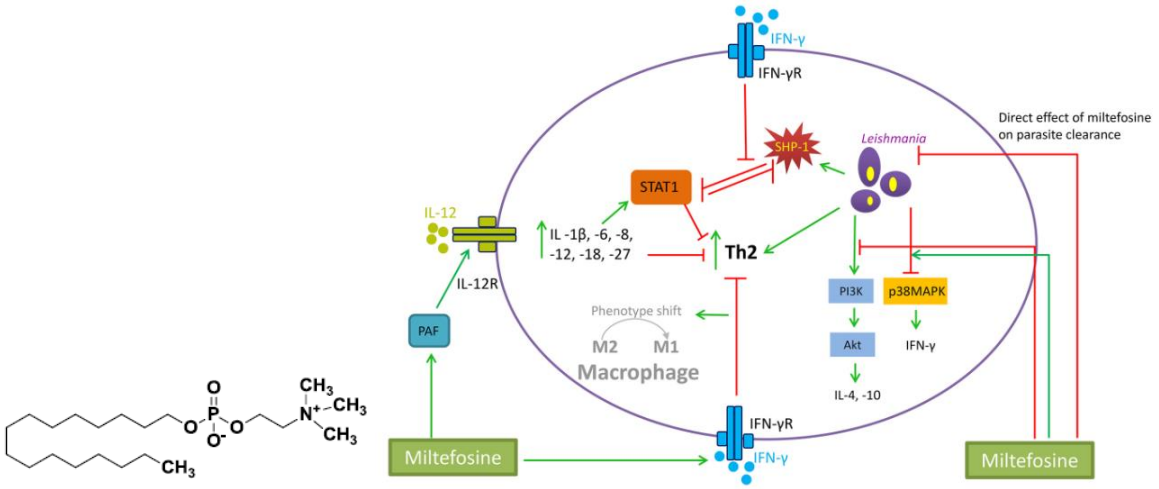


Figure 26. Structure de la miltéfosine et mécanisme d'action décrit pour la miltéfosine.[343] Les lignes rouges : effet inhibiteur, les flèches vertes : effet stimulant.

Plusieurs hypothèses concernant le mécanisme d'action de la miltéfosine ont été proposées.[344] Ces mécanismes comprennent la destruction directe des parasites *Leishmania* et plusieurs effets immunomodulateurs, qui s'exercent *via* (i) le récepteur du facteur d'agrégation plaquettaire (PAF), augmentant la production d'interleukine (IL)-12, (ii) l'augmentation du récepteur de l'interféron gamma (IFN-), qui à son tour réduit la production de cytokines de type 2 des cellules T-helper (Th) (telles que IL-4, -5, -10 et -13), (iii) l'activation de l'IFN-γR, en inversant l'inhibition par la sphingosine-1-phosphate (SPH-1) du transducteur et activateur de signaux de transcription 1 (STAT-1), qui est transloqué dans le noyau et participe à la stimulation de l'immunité cellulaire de l'hôte, (iv) l'activation de la protéine kinase activée par les mitogènes p38 (p38MAPK), qui est initialement inhibée par *Leishmania*, et (v) l'inhibition de la phosphorylation par la PI3 kinase de la protéine kinase B (Akt), qui est initialement stimulée par le parasite (Figure 26).

IV. Pentamidine

- **Mécanisme d'action** : La pentamidine perturbe la synthèse de l'ADN, de l'ARN et des protéines, interférant avec la fonction mitochondriale.
- **Résistance** : La résistance est liée à une réduction de l'absorption du médicament en raison de l'activité des transporteurs ABC, notamment le transporteur PRP1.

La pentamidine, une diamidine aromatique, est un médicament antileishmanien bien connu, qui a été synthétisé pour la première fois à la fin des années 1930.[345] Le médicament a d'abord été

[343] S. Palić, P. Bhairosing, J.H. Beijnen, T.P.C. Dorlo, Systematic Review of Host-Mediated Activity of Miltefosine in Leishmaniasis through Immunomodulation, Antimicrob Agents Chemother 63 (2019) e02507-18. https://doi.org/10.1128/AAC.02507-18.

[344] T.P.C. Dorlo, M. Balasegaram, J.H. Beijnen, P.J. De Vries, Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis, Journal of Antimicrobial Chemotherapy 67 (2012) 2576–2597. https://doi.org/10.1093/jac/dks275.

[345] M. Piccica, F. Lagi, A. Bartoloni, L. Zammarchi, Efficacy and safety of pentamidine isethionate for tegumentary and visceral human leishmaniasis: a systematic review, Journal of Travel Medicine 28 (2021) taab065. https://doi.org/10.1093/jtm/taab065.

utilisé pour le traitement de la leishmaniose viscérale dans les années 1950 ;[346] ensuite, il a été indiqué pour traiter la forme résistante de la leishmaniose cutanée à la fin des années 1970. Le médicament a été réévalué et commercialisé sous sa forme actuelle d'iséthionate en 1984,[347] Pentacarinat® (Figure 27).

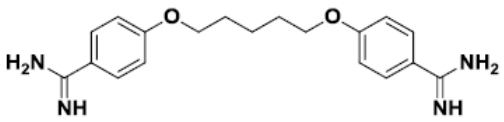


Figure 27. Structure de la pentamidine.

En raison des effets indésirables graves de la pentamidine,[348] tels que l'hypotension et l'hypoglycémie, ainsi qu'une toxicité cardiaque[349] et rénale,[350] ce médicament est recommandé dans les cas suivants : (i) leishmaniose résistante aux antimoniés ; (ii) lorsque les antimoniés sont contre-indiqués ; et (iii) lorsqu'une toxicité hépatique ou cardiaque grave survient au cours d'un traitement aux antimoniés.[351] Un flacon de Pentacarinat ® contient 300 mg de pentamidine diiséthionate (171 mg de pentamidine). La posologie d'un traitement par iséthionate de pentamidine IV peut être très variée en fonction des caractéristiques du patient, mais change principalement en fonction du poids, généralement entre 4 et 7 mg/kg, en dose unique ou plusieurs doses.[352]

Elle est active contre un certain nombre de micro-organismes, y compris les protozoaires (*Trypanosoma brucei, Leishmania* spp. et *Babesia* spp.) et les champignons (*Pneumocystis jirovecii*).[353]

Le mécanisme d'action de la pentamidine n'est pas encore bien établi (Figure 28). Dans la mitochondrie[354] du parasite, elle pourrait inhiber la thymidylate synthéthase ainsi que le transport de l'arginine,[355] ce qui aurait pour conséquence d'interférer dans la synthèse de

[346] A.N. Hazarika, Treatment of kala-azar with pentamidine isothionate; a study of 55 cases, Ind Med Gaz 84 (1949) 140–145.
[347] H. King, E.M. Lourie, W. Yorke, Studies in Chemotherapy: XIX.—Further Report on New Trypanocidal Substances, Annals of Tropical Medicine & Parasitology 32 (1938) 177–192. https://doi.org/10.1080/00034983.1938.11685024.
[348] E.J.S.K. Lai A Fat, M.A. Vrede, R.M. Soetosenojo, R.F.M. Lai A Fat, Pentamidine, the drug of choice for the treatment of cutaneous leishmaniasis in Surinam, Int J Dermatology 41 (2002) 796–800. https://doi.org/10.1046/j.1365-4362.2002.01633.x.
[349] J.S. Cordes, Z. Sun, D.B. Lloyd, J.A. Bradley, A.C. Opsahl, M.W. Tengowski, X. Chen, J. Zhou, Pentamidine reduces hERG expression to prolong the QT interval, British J Pharmacology 145 (2005) 15–23. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706140.
[350] Pentamidine and Renal Toxicity, N Engl J Med 313 (1985) 694–695. https://doi.org/10.1056/NEJM198509123131114.
[351] J.D. Berman, Human Leishmaniasis: Clinical, Diagnostic, and Chemotherapeutic Developments in the Last 10 Years, Clinical Infectious Diseases 24 (1997) 684–703. https://doi.org/10.1093/clind/24.4.684.
[352][1] M. Heleine, N. Elenga, F. Njuieyon, E. Martin, C. Piat, C. Pansart, P. Couppie, M. Hernandez, M. Demar, R. Blaizot, Using pentamidine to treat cutaneous leishmaniasis in children: a 10-year study in French Guiana, Clinical and Experimental Dermatology 48 (2023) 913–915. https://doi.org/10.1093/ced/llad146. [2] E.P.N. Gadelha, S. Talhari, J.A.D.O. Guerra, L.O. Neves, C. Talhari, B. Gontijo, R.M.D. Silva Junior, A.C. Talhari, Efficacy and safety of a single dose pentamidine (7mg/kg) for patients with cutaneous leishmaniasis caused by L. guyanensis: a pilot study, An. Bras. Dermatol. 90 (2015) 807–813. https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20153956.
[353] [M. Sands, M.A. Kron, R.B. Brown, Pentamidine: A Review, Clinical Infectious Diseases 7 (1985) 625–6344. https://doi.org/10.1093/clinids/7.5.625.
[354] A.I. Olías-Molero, C. De La Fuente, M. Cuquerella, J.J. Torrado, J.M. Alunda, Antileishmanial Drug Discovery and Development: Time to Reset the Model?, Microorganisms 9 (2021) 2500. https://doi.org/10.3390/microorganisms9122500.
[355] M. Basselin, F. Lawrence, M. Robert-Gero, Pentamidine uptake in Leishmania donovani and Leishmania amazonensis promastigotes and axenic amastigotes, Biochemical Journal 315 (1996) 631–634. https://doi.org/10.1042/bj3150631.

nombreux éléments indispensables à la survie du parasite. Des mécanismes de résistance, impliquant principalement une exclusion de ce médicament des mitochondries du parasite, ont été rapportés pour *L. mexicana*. La pentamidine reste dans le cytosol, où elle n'est plus susceptible d'être éliminée par des systèmes d'efflux actifs.[356]

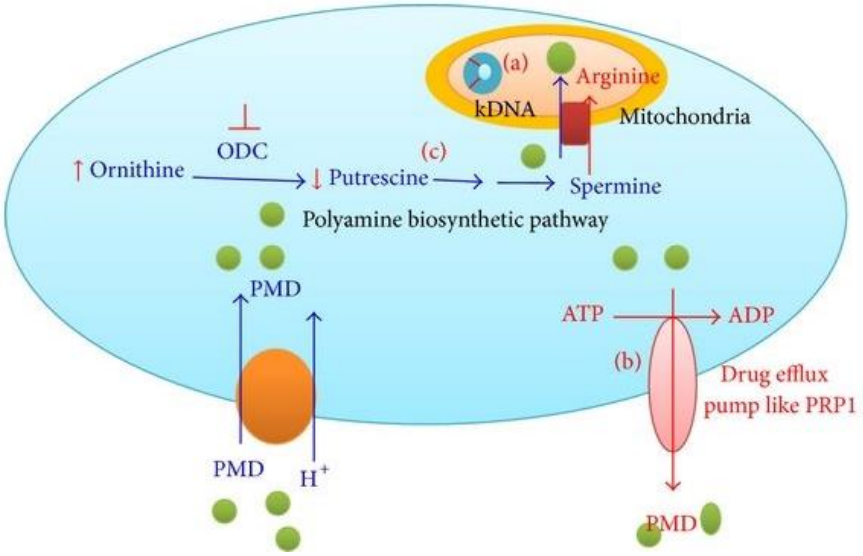


Figure 28. Mécanisme de résistance à la pentamidine chez *Leishmania*.[357]

- **Repositionnement de la pentamidine pour l'immunothérapie du cancer :**

La pentamidine peut favoriser l'activation des cellules T en bloquant l'interaction PD-1/PD-L1. L'administration *in vivo* de pentamidine a atténué la croissance tumorale et prolongé la survie des souris porteuses de tumeurs dans des modèles d'allogreffes de cellules tumorales murines humanisées PD-L1. L'analyse histologique des tissus tumoraux a montré une augmentation du nombre de lymphocytes infiltrant la tumeur dans les tissus provenant de souris traitées à la pentamidine.[358]

V. Paromomycine :

- **Mécanisme d'action** : La paromomycine inhibe la synthèse des protéines en se liant à l'ARN ribosomal, perturbant la fonction mitochondriale et provoquant la mort cellulaire.
- **Résistance** : Bien que peu fréquente en clinique, la résistance peut être induite expérimentalement et est liée à une accumulation réduite du médicament dans le parasite.

[356] [1] G. Kaur, B. Rajput, Comparative Analysis of the Omics Technologies Used to Study Antimonial, Amphotericin B, and Pentamidine Resistance in Leishmania, Journal of Parasitology Research 2014 (2014) 1–11. https://doi.org/10.1155/2014/726328. [2] M. Basselin, H. Denise, G.H. Coombs, M.P. Barrett, Resistance to Pentamidine in Leishmania mexicana Involves Exclusion of the Drug from the Mitochondrion, Antimicrob Agents Chemother 46 (2002) 3731–3738. https://doi.org/10.1128/AAC.46.12.3731-3738.2002.

[357] G. Kaur, B. Rajput, Comparative Analysis of the Omics Technologies Used to Study Antimonial, Amphotericin B, and Pentamidine Resistance in Leishmania, Journal of Parasitology Research 2014 (2014) 1–11. https://doi.org/10.1155/2014/726328.

[358] [1] T. Gu, X. Tian, Y. Wang, W. Yang, W. Li, M. Song, R. Zhao, M. Wang, Q. Gao, T. Li, C. Zhang, J.K. Kundu, K. Liu, Z. Dong, M.-H. Lee, Repurposing pentamidine for cancer immunotherapy by targeting the PD1/PD-L1 immune checkpoint, Front. Immunol. 14 (2023) 1145028. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1145028. [2] D.C. Bean, D.W. Wareham, Pentamidine: a drug to consider re-purposing in the targeted treatment of multi-drug resistant bacterial infections?, J. Lab. Precis. Med. 2 (2017) 49–49. https://doi.org/10.21037/jlpm.2017.06.18.

La paromomycine, un antibiotique aminoglycoside, est une molécule produite de manière naturelle par *Streptomyces rimosus* var. *paromomycinus*. [359] Cependant, il est également possible de l'obtenir par hémi-synthèse.[360]

Cet antibiotique à large spectre,[361] introduit en 2006, a été considéré comme un candidat prometteur pour le traitement de la leishmaniose. [362] Son efficacité a été largement démontrée dans la littérature. Avec un faible coût, sa durée d'administration plus courte et son bon profil de sécurité, la paromomycine a le potentiel d'être utilisée comme médicament de première ligne. [363]

L'efficacité de la paromomycine est comparable à celle de l'amphotéricine B, avec des effets indésirables graves significativement plus faibles. [364] Néanmoins, certains sont plus fréquents (l'élévation des enzymes hépatiques, la douleur au site d'injection).[365] Il convient de noter que la paromomycine d'un point de vue pharmaco-économique, présente un rapport coût-efficacité favorable.[366] Néanmoins, la paromomycine en monothérapie présente un risque de développement d'une résistance aux médicaments.[367] Par conséquent, l'utilisation en thérapie combinée[368] reste l'option recommandée. Le développement de formulations liposomales semble être une autre alternative à long terme.[369]

Pour traiter la leishmaniose cutanée et viscérale, des formulations topiques ont été proposés.[370] Une crème contenant 15 % de paromomycine dans de la paraffine blanche et 10 %

[359] G.S. El-Housseiny, A.A. Ibrahim, M.A. Yassien, K.M. Aboshanab, Production and statistical optimization of Paromomycin by Streptomyces rimosus NRRL 2455 in solid state fermentation, BMC Microbiol 21 (2021) 34. https://doi.org/10.1186/s12866-021-02093-6.

[360] A.A. Ibrahim, G.S. El-Housseiny, K.M. Aboshanab, M.A. Yassien, N.A. Hassouna, Paromomycin production from Streptomyces rimosus NRRL 2455: statistical optimization and new synergistic antibiotic combinations against multidrug resistant pathogens, BMC Microbiol 19 (2019) 18. https://doi.org/10.1186/s12866-019-1390-1.

[361] L.X. Liu, P.F. Weller, Antiparasitic Drugs, N Engl J Med 334 (1996) 1178–1184. https://doi.org/10.1056/NEJM199605023341808.

[362] F. Janvier, M. Morillon, P. Olliaro, [Visceral leishmaniasis: clinical sensitivity and resistance to various therapeutic agents], Med Trop (Mars) 68 (2008) 89–101.

[363] S. Sundar, J. Chakravarty, Paromomycin in the treatment of leishmaniasis, Expert Opinion on Investigational Drugs 17 (2008) 787–794. https://doi.org/10.1517/13543784.17.5.787.

[364] A.M. Musa, B. Younis, A. Fadlalla, C. Royce, M. Balasegaram, M. Wasunna, A. Hailu, T. Edwards, R. Omollo, M. Mudawi, G. Kokwaro, A. El-Hassan, E. Khalil, Paromomycin for the Treatment of Visceral Leishmaniasis in Sudan: A Randomized, Open-Label, Dose-Finding Study, PLoS Negl Trop Dis 4 (2010) e855. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000855.

[365] P.K. Sinha, T.K. Jha, C.P. Thakur, D. Nath, S. Mukherjee, A.K. Aditya, S. Sundar, Phase 4 pharmacovigilance trial of paromomycin injection for the treatment of visceral leishmaniasis in India, J Trop Med 2011 (2011) 645203. https://doi.org/10.1155/2011/645203.

[366] [1] P. Olliaro, S. Sundar, Anthropometrically derived dosing and drug costing calculations for treating visceral leishmaniasis in Bihar, India, Tropical Med Int Health 14 (2009) 88–92. https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2008.02195.x. [2] P. Olliaro, S. Darley, R. Laxminarayan, S. Sundar, Cost-effectiveness projections of single and combination therapies for visceral leishmaniasis in Bihar, India, Tropical Med Int Health 14 (2009) 918–925. https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2009.02306.x.

[367] G. Matlashewski, B. Arana, A. Kroeger, S. Battacharya, S. Sundar, P. Das, P.K. Sinha, S. Rijal, D. Mondal, D. Zilberstein, J. Alvar, Visceral leishmaniasis: elimination with existing interventions, The Lancet Infectious Diseases 11 (2011) 322–325. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70320-0.

[368] A. Banerjee, M. De, N. Ali, Combination Therapy with Paromomycin-Associated Stearylamine-Bearing Liposomes Cures Experimental Visceral Leishmaniasis through Th1-Biased Immunomodulation, Antimicrob Agents Chemother 55 (2011) 1661–1670. https://doi.org/10.1128/AAC.00524-10.

[369] A. Banerjee, M. De, N. Ali, Complete Cure of Experimental Visceral Leishmaniasis with Amphotericin B in Stearylamine-Bearing Cationic Liposomes Involves Down-Regulation of IL-10 and Favorable T Cell Responses, The Journal of Immunology 181 (2008) 1386–1398. https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.2.1386.

[370] A. Ben Salah, N. Ben Messaoud, E. Guedri, A. Zaatour, N. Ben Alaya, J. Bettaieb, A. Gharbi, N. Belhadj Hamida, A. Boukthir, S. Chlif, K. Abdelhamid, Z. El Ahmadi, H. Louzir, M. Mokni, G. Morizot, P. Buffet, P.L. Smith, K.M. Kopydlowski, M. Kreishman-Deitrick, K.S. Smith, C.J. Nielsen, D.R. Ullman, J.A. Norwood, G.D. Thorne, W.F. McCarthy, R.C. Adams, R.M. Rice, D. Tang, J. Berman, J. Ransom, A.J. Magill, M. Grogl, Topical Paromomycin with or without Gentamicin for Cutaneous Leishmaniasis, N Engl J Med 368 (2013) 524–532. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1202657.

d'urée a été proposée par l'OMS mais n'a pas été plus efficace que le véhicule témoin (placebo) contre l'infection par *L. major* en Iran[371] et en Tunisie.[372]

De plus, d'autres formulations ont été proposées pour être administrées directement au niveau des lésions. Elles contenaient 15% de paromomycine et 12% de chlorure de méthylbenzéthonium. Cette formulation, même si efficace, était limitée par son coût et l'irritation et l'intolérance sévères associées à l'utilisation du chlorure de méthylbenzéthonium et observées chez 75 % des patients.[373]

La dose de paromomycine nécessaire pour produire une réduction de 50% de la charge parasitaire dans des échantillons *in vitro* se situe généralement entre 1 et 40 µg par millilitre. [374] La paromomycine intramusculaire a guéri la leishmaniose viscérale chez 95 % des patients en Inde,[375] mais a donné de moins bons résultats chez les patients atteints de leishmaniose cutanée.[376]

La paromomycine, découverte dans les années 1950, se présente sous la forme de sulfate de paromomycine. Il s'agit d'un produit blanc et amorphe. La paromomycine est stable et soluble dans l'eau. Il a été rapporté que la paromomycine peut supporter une chaleur allant jusqu'à 120°C pendant 24 heures. Cependant, si elle est exposée à une chaleur de 130°C, on observe une dégradation et elle perd un tiers de son activité biologique.[377]

En ce qui concerne la pharmacocinétique et la pharmacodynamie, les actions antibactériennes *in vitro* et *in vivo* de la paromomycine sont élevées. Le médicament est aussi efficace que la néomycine. Cependant, la forme orale classique a une mauvaise absorption. Après administration orale, la quasi-totalité du médicament ne peut être absorbée efficacement, et est récupérable dans les selles ; il est donc utile pour le traitement des infections intestinales. En cas de traitement à long terme et à forte dose, il n'y a pas non plus d'absorption systémique de la paromomycine

[371] A. Asilian, T. Jalayer, J.A.G. Whitworth, R.L. Ghasemi, M. Nilforooshzadeh, P. Olliaro, A Randomized, Placebo-Controlled Trial of a Two-Week Regimen of Aminosidine (Paromomycin) Ointment for Treatment of Cutaneous Leishmaniasis in Iran, The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 53 (1995) 648–651. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1995.53.648.

[372] A.B. Salah, H. Zakraoui, A. Zaatour, A. Ftaiti, B. Zaafouri, A. Garraoui, P.L. Olliaro, K. Dellagi, R.B. Ismail, A Randomized, Placebo-Controlled Trial in Tunisia Treating Cutaneous Leishmaniasis with Paromomycin Ointment, The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 53 (1995) 162–166. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1995.53.162.

[373] [1] B.A. Arana, C.E. Mendoza, N.R. Rizzo, A. Kroeger, Randomized, controlled, double-blind trial of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with paromomycin plus methylbenzethonium chloride ointment in Guatemala., Am J Trop Med Hyg 65 (2001) 466–470. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2001.65.466. [2] A.D.M. Bryceson, A. Murphy, A.H. Moody, Treatment of 'Old World' cutaneous leishmaniasis with aminosidine ointment: results of an open study in London, Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 88 (1994) 226–228. https://doi.org/10.1016/0035-9203(94)90308-5.

[374] R.A. Neal, S. Allen, N. McCoy, P. Olliaro, S.L. Croft, The sensitivity of Leishmania species to aminosidine, J Antimicrob Chemother 35 (1995) 577–584. https://doi.org/10.1093/jac/35.5.577.

[375] S. Sundar, T.K. Jha, C.P. Thakur, P.K. Sinha, S.K. Bhattacharya, Injectable Paromomycin for Visceral Leishmaniasis in India, N Engl J Med 356 (2007) 2571–2581. https://doi.org/10.1056/NEJMoa066536.

[376] [1] A. Llanos-Cuentas, J. Echevarria, C. Seas, E. Chang, M. Cruz, E. Alvarez, E. Rosales, P. Campos, A. Bryceson, Parenteral aminosidine is not effective for Peruvian mucocutaneous leishmaniasis, Am J Trop Med Hyg 76 (2007) 1128–1131. [2] N.C. Hepburn, M.J. Tidman, J.A.A. Hunter, Aminosidine (paromomycin) versus sodium stibogluconate for the treatment of American cutaneous leishmaniasis, Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 88 (1994) 700–703. https://doi.org/10.1016/0035-9203(94)90237-2.

[377] W. Khan, N. Kumar, Characterization, thermal stability studies, and analytical method development of Paromomycin for formulation development, Drug Testing and Analysis 3 (2011) 363–372. https://doi.org/10.1002/dta.229.

orale.[378] Pour la forme injectable du médicament, l'étude pharmacocinétique a révélé que la concentration maximale de paromomycine peut être atteinte 2 heures après l'administration, et que le médicament est complètement éliminé dans les 24 heures.[379]

Son mécanisme d'action sur *L. donovani* n'est pas encore totalement compris, mais la paromomycine pourrait avoir des effets au niveau de la mitochondrie parasitaire[380] (Figure 29). Elle peut également perturber le potentiel de la membrane mitochondriale, entraînant une mort cellulaire de type apoptotique,[381] ainsi que sur la voie de synthèse des protéines.[382] Quelques cas récents de résistances à la paromomycine ont été observés. Ils seraient dûs à une diminution de la perméabilité de la membrane cellulaire qui limiterait l'entrée du principe actif dans le parasite.[383]

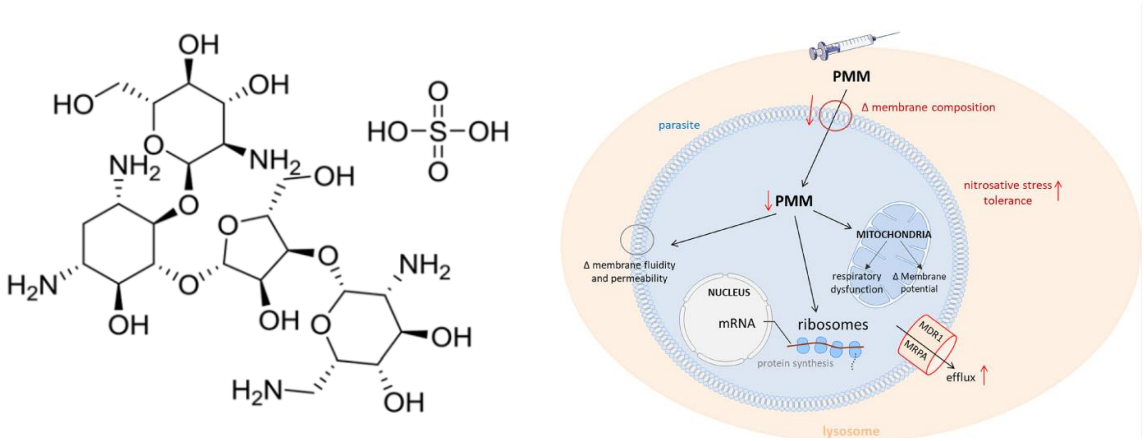


Figure 29. Structure de la paromomycine et mécanisme d'action plausible.[384]

VI. Médicaments azolés

- **Mécanisme d'action** : Ces médicaments inhibent la synthèse de l'ergostérol, un composant clé de la membrane du parasite, entraînant une instabilité membranaire.
- **Résistance** : Bien que leur utilisation en monothérapie n'ait pas été très concluante, ils restent candidats pour des thérapies combinées.

[378] F. O. Bissuel, L. Cotte, M. De Montclos, M. Rabodonirina, C. Trepo, Absence Of Systemic Absorption Of Oral Paromomycin During Long-Term, High-Dose Treatment For Cryptosporidiosis In Aids, Journal of Infectious Diseases 170 (1994) 749–750. https://doi.org/10.1093/infdis/170.3.749.

[379] T.P. Kanyok, A.D. Killian, K.A. Rodvold, L.H. Danziger, Pharmacokinetics of intramuscularly administered aminosidine in healthy subjects, Antimicrob Agents Chemother 41 (1997) 982–986. https://doi.org/10.1128/AAC.41.5.982.

[380] M. Maarouf, Y. De Kouchkovsky, S. Brown, P.X. Petit, M. Robert-Gero, In VivoInterference of Paromomycin with Mitochondrial Activity ofLeishmania, Experimental Cell Research 232 (1997) 339–348. https://doi.org/10.1006/excr.1997.3500.

[381] A.S. Nagle, S. Khare, A.B. Kumar, F. Supek, A. Buchynskyy, C.J.N. Mathison, N.K. Chennamaneni, N. Pendem, F.S. Buckner, M.H. Gelb, V. Molteni, Recent Developments in Drug Discovery for Leishmaniasis and Human African Trypanosomiasis, Chem. Rev. 114 (2014) 11305–11347. https://doi.org/10.1021/cr500365f.

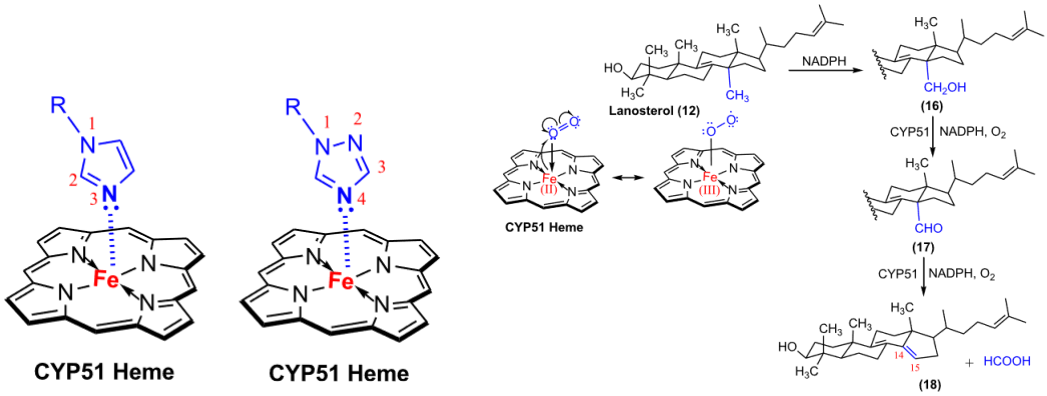
[382] B. Chawla, A. Jhingran, A. Panigrahi, K.D. Stuart, R. Madhubala, Paromomycin Affects Translation and Vesicle-Mediated Trafficking as Revealed by Proteomics of Paromomycin –Susceptible –Resistant Leishmania donovani, PLoS ONE 6 (2011) e26660. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026660.

[383] A. Jhingran, B. Chawla, S. Saxena, M.P. Barrett, R. Madhubala, Paromomycin: Uptake and resistance in Leishmania donovani, Molecular and Biochemical Parasitology 164 (2009) 111–117. https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2008.12.007.

[384] [1] P.J. Koovits, M.A. Dessoy, A. Matheeussen, L. Maes, G. Caljon, L.L.G. Ferreira, R.C. Chelucci, S. Michelan-Duarte, A.D. Andricopulo, S. Campbell, J.M. Kratz, C.E. Mowbray, L.C. Dias, Hit-to-lead optimization of a benzene sulfonamide series for potential antileishmanial agents, RSC Med. Chem. 11 (2020) 1267–1274. https://doi.org/10.1039/D0MD00165A. [2] G.-J. Wijnant, F. Dumetz, L. Dirkx, D. Bulté, B. Cuypers, K. Van Bocxlaer, S. Hendrickx, Tackling Drug Resistance and Other Causes of Treatment Failure in Leishmaniasis, Front. Trop. Dis 3 (2022) 837460. https://doi.org/10.3389/fitd.2022.837460.

Les médicaments tels que le kétoconazole, le fluconazole et l'itraconazole appartiennent à la catégorie des azolés et inhibent la multiplication des parasites *Leishmania* en bloquant la biosynthèse de l'ergostérol à l'étape de la lanostérol 14-α déméthylase, entraînant l'accumulation de stérols 14 α-méthylés.[385] Le mécanisme se développe sélectivement par la coordination de l'atome d'azote N3 ou N4 (dans l'anneau imidazole ou triazole, respectivement) avec le fer héminique de l'enzyme CYP51. Cependant, en raison de leur toxicité élevée, la prolongation des traitements favorise le développement de résistances et réduit l'efficacité thérapeutique.

a.



b.

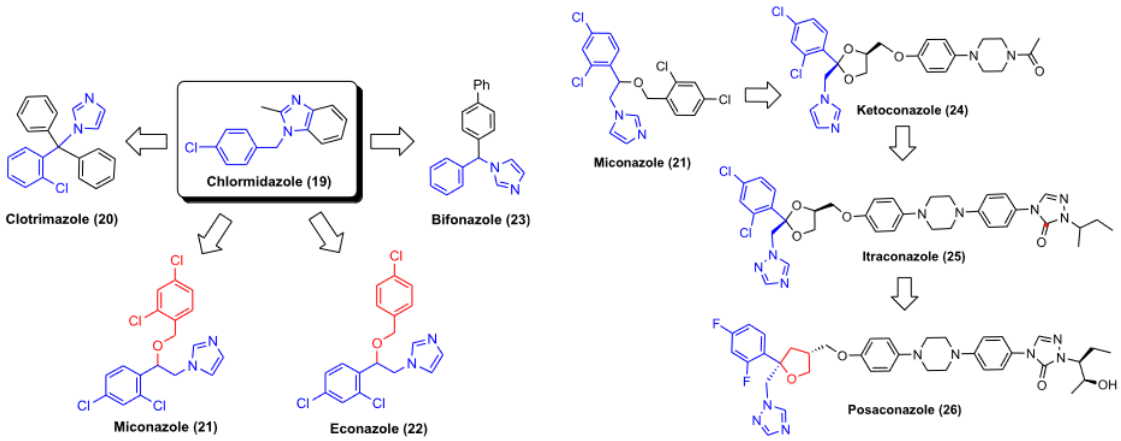


Figure 30. a. Mécanisme de la 14 α-déméthylation du lanostérol par la 14 α-déméthylase dépendante du CYP51. b. Développement du kétoconazole et des analogues.[386]

En 2010, les médicaments azolés ont été identifiés par l'OMS comme une option de traitement pour *L. major* et *L. mexicana.*[387] Compte tenu du nombre insuffisant d'études portant sur le taux de guérison en fonction de l'espèce de *Leishmania*, des preuves supplémentaires sont nécessaires pour tirer des conclusions sur l'efficacité des azolés contre chaque espèce de *Leishmania*.

[385] M. Soni, J.V. Pratap, Development of Novel Anti-Leishmanials: The Case for Structure-Based Approaches, Pathogens 11 (2022) 950. https://doi.org/10.3390/pathogens11080950.

[386] S. Emami, P. Tavangar, M. Keighobadi, An overview of azoles targeting sterol 14α-demethylase for antileishmanial therapy, European Journal of Medicinal Chemistry 135 (2017) 241–259. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.044.

[387] [1] E.L. Galvão, A. Rabello, G.F. Cota, Efficacy of azole therapy for tegumentary leishmaniasis: A systematic review and meta-analysis, PLoS ONE 12 (2017) e0186117. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186117. [2] WHO. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, Switzerland, 22–26 March 2010. WHO technical report series. 2010;(949).

Les structures pharmacophoriques communes à la plupart des médicaments azolés sont le *N*-alkyl-imidazole et le 1,2,4-triazole, pouvant être des structures cibles pour différents projets de découverte de médicaments antileishmaniens.[388]

VII. Autres : Sitamaquine

- **Mécanisme d'action** : La sitamaquine affecte la fonction mitochondriale, provoquant l'effondrement du potentiel de membrane mitochondriale.
- **Résistance** : On en sait peu sur les mécanismes de résistance, mais ils sont liés à une dysfonction mitochondriale.

La sitamaquine est une 8-aminoquinoléine en cours de développement pour le traitement de la leishmaniose viscérale par voie orale, aucune activité n'ayant été observée sur les modèles expérimentaux de leishmaniose cutanée.[389] Des données récentes expliquent comment la sitamaquine s'accumule dans les parasites de *Leishmania*, mais ses cibles moléculaires restent à identifier. Un avantage de la sitamaquine est sa courte demi-vie d'élimination, ce qui empêche l'émergence rapide d'une résistance. L'action antileishmanienne de ses métabolites n'est pas connue.

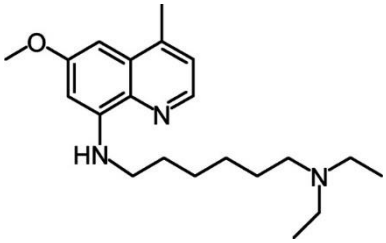


Figure 31. Sitamaquine, un analogue de la 8-aminoquinoléine.

Découverte par le Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR, États-Unis) et sûr développement avec GlaxoSmithKline (Royaume-Uni), la sitamaquine a été synthétisée pour la première fois dans le cadre du programme antipaludique mené en collaboration aux États-Unis (1944-1950), qui a abouti à la primaquine.[390] Des études cliniques l'ont identifiée comme un agent prometteur pour le traitement de la LV tant en Inde [391] qu'au Kenya.[392]

[388] M. Keighobadi, S. Emami, M. Fakhar, A. Shokri, H. Mirzaei, S. Hosseini Teshnizi, Repurposing azole antifungals into antileishmanials: Novel 3-triazolylflavanones with promising in vitro antileishmanial activity against Leishmania major, Parasitology International 69 (2019) 103–109. https://doi.org/10.1016/j.parint.2018.12.006.

[389] P.M. Loiseau, S. Cojean, J. Schrével, Sitamaquine as a putative antileishmanial drug candidate: from the mechanism of action to the risk of drug resistance, Parasite 18 (2011) 115–119. https://doi.org/10.1051/parasite/2011182115.

[390] R.C. Elderfield, H.E. Mertel, R.T. Mitch, I.M. Wempen, E. Werble, Synthesis of Primaquine and Certain of its Analogs 1, J. Am. Chem. Soc. 77 (1955) 4816–4819. https://doi.org/10.1021/ja01623a038.

[391] T.K. Jha, S. Sundar, C.P. Thakur, J.M. Felton, A.J. Sabin, J. Horton, A phase II dose-ranging study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in India, Am J Trop Med Hyg 73 (2005) 1005–1011.

[392] M.K. Wasunna, J.R. Rashid, J. Mbui, G. Kirigi, D. Kinoti, H. Lodenyo, J.M. Felton, A.J. Sabin, M.J. Albert, J. Horton, A phase II dose-increasing study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya, Am J Trop Med Hyg 73 (2005) 871–876.

De plus, jusqu'à présent, il n'y a pas beaucoup de rapports de cas de résistance *in vivo*. Cependant, des études de résistance *in vitro* ont été rapportées contre *L. donovani* promastigote.[393] La sitamaquine est un composé relativement moins efficace que l'AmB et provoque une néphrotoxicité. Ce médicament ne peut donc pas être utilisé en monothérapie pour traiter la leishmaniose.[394] En raison d'une activité et d'une efficacité moindres, les essais cliniques ultérieurs ont été sérieusement limités.[395]

VIII. Critères d'échec thérapeutique ou de réussite

Quelques commentaires supplémentaires sont proposés pour conclure cette section sur la chimiothérapie : en général, toutes les options présentent des avantages et des inconvénients (Figure 32), et il est important d'identifier les conditions appropriées adaptées au patient. Dans ce contexte, afin de promouvoir le succès thérapeutique, l'observance au traitement et aussi l'adhésion du patient sont essentielles pour contrôler l'efficacité du traitement. De plus, la gestion des événements indésirables doit être abordée de manière rigoureuse. Le suivi post-traitement, en général en trois points, au jour 14 (diminution de moitié de la lésion), au jour 28 et à 6 mois, est difficile selon le contexte sanitaire et social. Le même, l'évaluation de la présence de résistance évaluée idéalement aux jours 28, 45, 90, 180, puis tous les six mois jusqu'à la 2ème année, semble un défi clé.

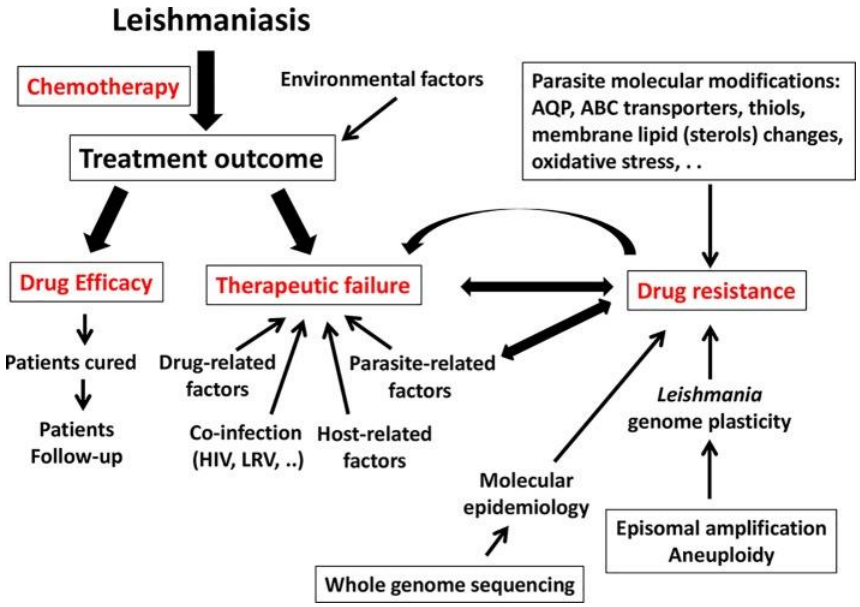


Figure 32. Facteurs associés aux échecs thérapeutiques.[396]

[393] A. Kumar, S.C. Pandey, M. Samant, Slow pace of antileishmanial drug development, Parasitology Open 4 (2018) e4. https://doi.org/10.1017/pao.2018.1.

[394] V. Gouri, S.C. Pandey, D. Joshi, V. Pande, S. Upreti, M. Samant, Natural products as a novel source for antileishmanial drug development, in: Pathogenesis, Treatment and Prevention of Leishmaniasis, Elsevier, 2021: pp. 141–159. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822800-5.00011-1.

[395] T. Garnier, M.B. Brown, M.J. Lawrence, S.L. Croft, In-vitro and in-vivo studies on a topical formulation of sitamaquine dihydrochloride for cutaneous leishmaniasis, Journal of Pharmacy and Pharmacology 58 (2010) 1043–1054. https://doi.org/10.1211/jpp.58.8.0004.

[396] A. Ponte-Sucre, F. Gamarro, J.-C. Dujardin, M.P. Barrett, R. López-Vélez, R. García-Hernández, A.W. Pountain, R. Mwenechanya, B. Papadopoulou, Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge, PLoS Negl Trop Dis 11 (2017) e0006052. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052.

Il n'existe pas de consensus clair concernant la définition de l'échec thérapeutique dans le traitement de la leishmaniose. Certains, comme Bourreau et al., définissent l'échec thérapeutique comme l'absence de réponse à deux cycles de traitement,[397] alors que d'autres le définissent comme l'absence de réponse à un seul cycle.[398]

Plusieurs facteurs peuvent être associés à l'échec thérapeutique : la distribution géographique, l'espèce de *Leishmania* impliquée, les conditions météorologiques, la dissémination du parasite provoquant des lésions secondaires satellites, la multiplicité des lésions, le jeune âge, la prise en charge précoce ou tardive, une durée d'exposition plus courte en région d'endémie, ainsi que la co-infection par le VIH.

Les espèces *L. guyanensis, L. braziliensis, L. amazonensis et L. lainsoni* peuvent être infectées par un virus de la famille des Totiviridae, le *Leishmania* RNA virus type 1 (LRV). Découvert en 1988, ce virus semble favoriser la dissémination des parasites et compromettre la réponse au traitement par l'iséthionate de pentamidine, augmentant ainsi le risque d'échec thérapeutique. Cependant, aucune association n'a été prouvée entre la présence du LRV et l'échec thérapeutique.[399]

- **Approche combinant immuno- et chimio-thérapie**

Étant donné que le parasite fait intervenir de multiples processus immunologiques[400], le traitement de l'infection par immunomodulation pourrait être une stratégie alternative.

L'IFN- γ est une cytokine bien connue qui peut activer les macrophages pour éliminer les parasites de *Leishmania*. L'utilisation de l'IFN- γ comme immunothérapie chez les patients atteints de la LV a permis un contrôle des parasites.[401] Cependant, une étude plus large menée en Inde auprès de 156 patients atteints de la LV et traités par le SbV avec ou sans interféron-γ a suggéré que les avantages de l'IFN- γ dans la LV sont limités.[402]

[397] A. Ponte-Sucre, F. Gamarro, J.-C. Dujardin, M.P. Barrett, R. López-Vélez, R. García-Hernández, A.W. Pountain, R. Mwenechanya, B. Papadopoulou, Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge, PLoS Negl Trop Dis 11 (2017) e0006052. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052.

[398] G.D.A. Santos, J.M. Sousa, A.H.B.M.D. Aguiar, K.C.S. Torres, A.J.S. Coelho, A.L. Ferreira, M.I.S. Lima, Systematic Review of Treatment Failure and Clinical Relapses in Leishmaniasis from a Multifactorial Perspective: Clinical Aspects, Factors Associated with the Parasite and Host, TropicalMed 8 (2023) 430. https://doi.org/10.3390/tropicalmed8090430.

[399] [1] M. Parra-Muñoz, S. Aponte, C. Ovalle-Bracho, C.H. Saavedra, M.C. Echeverry, Detection of Leishmania RNA Virus in Clinical Samples from Cutaneous Leishmaniasis Patients Varies according to the Type of Sample, The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 104 (2021) 233–239. https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-0073. [2] L.O. Neves, A.C. Talhari, E.P.N. Gadelha, R.M.D. Silva Júnior, J.A.D.O. Guerra, L.C.D.L. Ferreira, S. Talhari, Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por Leishmania guyanensis, An. Bras. Dermatol. 86 (2011) 1092–1101. https://doi.org/10.1590/S0365-05962011000600005.

[400] M. Solomon, F. Pavlotzky, A. Barzilai, E. Schwartz, Liposomal amphotericin B in comparison to sodium stibogluconate for Leishmania braziliensis cutaneous leishmaniasis in travelers, Journal of the American Academy of Dermatology 68 (2013) 284–289. https://doi.org/10.1016/j.jaad.2012.06.014.

[401] S. Sundar, H.W. Murray, Effect of Treatment with Interferon- Alone in Visceral Leishmaniasis, Journal of Infectious Diseases 172 (1995) 1627–1629. https://doi.org/10.1093/infdis/172.6.1627.

[402] S. Sundar, F. Rosenkaimer, H.W. Murray, Successful Treatment Of Refractory Visceral Leishmaniasis In India Using Antimony Plus Interferon-a, Journal of Infectious Diseases 170 (1994) 659–662. https://doi.org/10.1093/infdis/170.3.659.

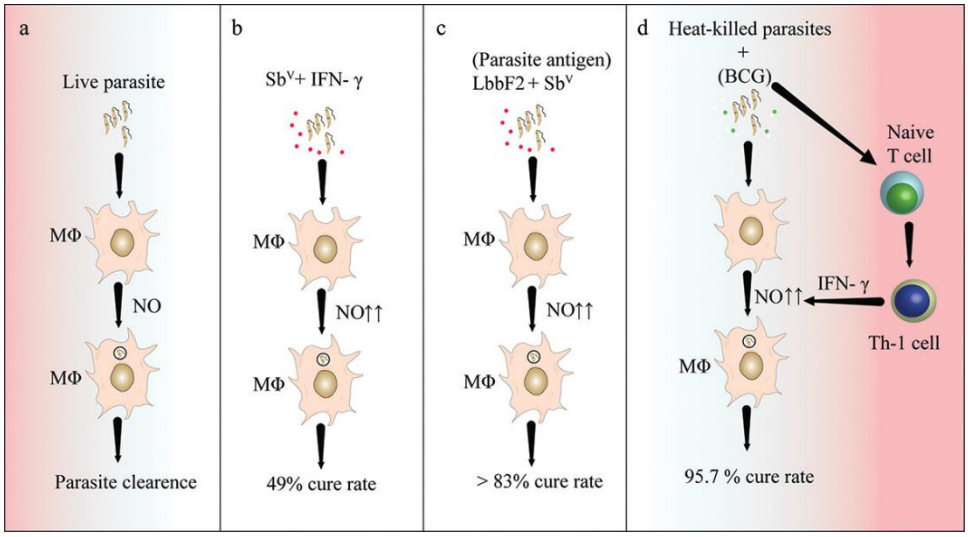


Figure 33. Immunothérapie pour le traitement de la leishmaniose.[403]

Après que les parasites sont phagocytés par les macrophages, sous l'influence de cytokines telles que l'IFN-γ sécrétées par d'autres cellules immunitaires, les macrophages activent l'oxyde nitrique synthase (NOS) pour éliminer la forme intracellulaire du parasite (a). Le traitement des macrophages infectés avec un cocktail d'IFN-γ et d'antimoniate pentavalent peuvent aboutir à un taux de guérison de 49 % (b). De même, le traitement avec un mélange d'antigènes parasitaires Lbbf2 et SbV peut donner un taux de guérison de plus de 83 % (c). *Leishmania* atténuée à la chaleur et en présence de vaccin BCG,[404] a montré un taux de guérison de 95,7 %. Ce résultat est probablement attribué à la polarisation des cellules T naïves en cellules Th-1, qui sécrètent des molécules pro-inflammatoires comme l'IFN-γ. Par la suite, cette activation des macrophages facilite la clairance intracellulaire des parasites (d).[405]

- **Alternatives non-chimio thérapeutiques pour les lésions dermiques :**

Cryothérapie

La cryothérapie à l'aide d'une machine à cryogéniser le CO_2, pendant 4 à 5 semaines, a permis des taux de guérison importants sans cicatrice visible ni récidive. [406] La cryothérapie peut aussi impliquer l'utilisation d'azote liquide, qui représente une température de - 195 °C. Utilisée une ou deux fois par semaine sur des lésions de leishmanies, la cryothérapie a démontré une efficacité de plus de 95 %.[407] La destruction des parasites se produit par la formation de cristaux de glace en

[403] S. Sundar, J. Singh, V.K. Singh, N. Agrawal, R. Kumar, Current and emerging therapies for the treatment of leishmaniasis, Expert Opinion on Orphan Drugs 12 (2024) 19–32. https://doi.org/10.1080/21678707.2024.2335248.

[404] M. Cabrera, J. M.blackwell, M. Castes, D. Trujillo, J. Convit, M. Shaw, Immunotherapy with live BCG plus heat killed Leishmania induces a T helper 1-like response in American cutaneous leishmaniasis patients, Parasite Immunology 22 (2000) 73–79. https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2000.00278.x.

[405] J. Convit, M. Ulrich, O. Zerpa, R. Borges, N. Aranzazu, M. Valera, H. Villarroel, Z. Zapata, I. Tomedes, Immunotherapy of American cutaneous leishmaniasis in Venezuela during the period 1990–1999, Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 97 (2003) 469–472. https://doi.org/10.1016/S0035-9203(03)90093-9.

[406] A. Bassiouny, M. Meshad, M. Talaat, K. Kutty, B. Metawaa, Cryosurgery in cutaneous leishmaniasis, Br J Dermatol 107 (1982) 467–474. https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1982.tb00390.x.

[407] E. Negera, E. Gadisa, J. Hussein, H. Engers, T. Kuru, L. Gedamu, A. Aseffa, Treatment response of cutaneous leishmaniasis due to Leishmania aethiopica to cryotherapy and generic sodium stibogluconate from patients in Silti, Ethiopia, Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 106 (2012) 496–503. https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.02.006.

leur sein, ce qui entraîne une lyse de la membrane et une nécrose ischémique localisée. Parmi les effets secondaires observés, citons le gonflement, la rougeur, ainsi que l'hyper ou l'hypopigmentation au niveau du site de traitement. L'azote liquide peut donc être considéré comme l'une des options de traitement de la LC.[408]

Chauffage

Le traitement thermique de la LC par diverses méthodes a été documenté. Différents exemples sont cités dans la littérature, comme l'utilisation d'un bain d'eau entre 39 à 41 °C à travers un tampon enroulé autour de la lésion pendant une durée cumulée d'au moins 20 heures, sur une période de plusieurs jours ;[409] ou l'exposition de la lésion à une source de chaleur infrarouge,[410] ou bien la thérapie thermique induite par radiofréquence (RFHT).[411]

La thermothérapie pourrait présenter l'avantage d'être une alternative pour les patients présentant des comorbidités telles que des complications rénales, hépatiques et cardiaques pour lesquelles la chimiothérapie devient contre-indiquée.[412] Cependant, l'efficacité de cette méthode reste encore à établir même s'il s'agit d'un mode de traitement pratique, qui peut réduire le fardeau économique et social du patient ; la thermothérapie ne peut pas être utilisée trop près des muqueuses.[413] Les patients peuvent donc utiliser cette alternative en l'absence de services hospitaliers, ce qui peut être pris en compte pour essayer de lutter contre les cas de résistance.[414]

1.2.9. La découverte de nouveaux médicaments contre la Leishmaniose

Il existe plusieurs stratégies pour développer de nouveaux médicaments contre la leishmaniose. La découverte et le développement de médicaments *de novo* constituent une approche très rationnelle, mais il s'agit d'un processus long et coûteux.[415]

[408] L.A. Linquest, L.C. Hickham, B.J. Richardson, P.R. Hickham, Successful Treatment of Cutaneous Leishmaniasis With Cryotherapy, Cureus 15 (2023) e41871. https://doi.org/10.7759/cureus.41871.

[409] F.A. Neva, E.A. Petersen, R. Corsey, D.H. Bogaert, D. Martinez, Observations on Local Heat Treatment for Cutaneous Leishmaniasis, The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 33 (1984) 800–804. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1984.33.800.

[410] A. Jabbar, N. Junaid, Treatment of Cutaneous Leishmaniasis with Infrared Heat, Int J Dermatology 25 (1986) 470–472. https://doi.org/10.1111/j.1365-4362.1986.tb03460.x.

[411] W.F. Refai, N.P. Madarasingha, B. Sumanasena, S. Weerasingha, A. De Silva, R. Fernandopulle, A.R. Satoskar, N.D. Karunaweera, Efficacy, Safety and Cost-Effectiveness of Thermotherapy in the Treatment of Leishmania donovani–Induced Cutaneous Leishmaniasis: A Randomized Controlled Clinical Trial, The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 97 (2017) 1120–1126. https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0879.

[412] J.A. Cardona-Arias, I.D. Vélez, L. López-Carvajal, Efficacy of Thermotherapy to Treat Cutaneous Leishmaniasis: A Meta-Analysis of Controlled Clinical Trials, PLoS ONE 10 (2015) e0122569. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122569.

[413] R. Reithinger, M. Mohsen, M. Wahid, M. Bismullah, R.J. Quinnell, C.R. Davies, J. Kolaczinski, J.R. David, Efficacy of Thermotherapy to Treat Cutaneous Leishmaniasis Caused by Leishmania tropica in Kabul, Afghanistan: A Randomized, Controlled Trial, CLIN INFECT DIS 40 (2005) 1148–1155. https://doi.org/10.1086/428736.

[414] F. Refai, N. Madarasingha, R. Fernandopulle, N. Karunaweera, Nonresponsiveness to standard treatment in cutaneous leishmaniasis: A case series from Sri Lanka, Trop Parasitol 6 (2016) 155. https://doi.org/10.4103/2229-5070.190835.

[415] J.P. Hughes, S. Rees, S.B. Kalindjian, K.L. Philpott, Principles of early drug discovery, Br J Pharmacol 162 (2011) 1239–1249. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x.

- **Repositionnement[416] pour la leishmaniose :**

Le repositionnement de médicaments consiste à utiliser des médicaments existants pour traiter de nouvelles maladies, ce qui permet de gagner du temps et des ressources par rapport au développement de nouvelles molécules.

Certaines thérapies existantes pour la leishmaniose ont été initialement conçues pour d'autres maladies. Par exemple, l'amphotéricine B est un médicament antifongique, la paromomycine est un antibiotique aminoglycoside utilisé pour traiter les infections intestinales, et la miltéfosine a été développée à l'origine comme agent anticancéreux.

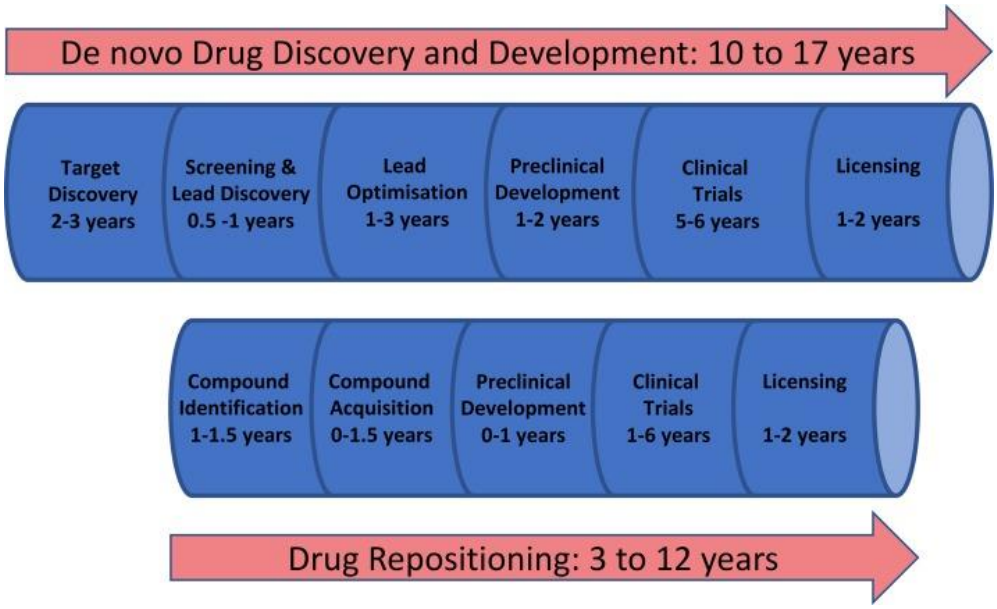


Figure 34. Délais associés entre la découverte de médicaments traditionnelle vs. le repositionnement.[417]

Le repositionnement d'anciens médicaments pour de nouvelles utilisations n'est pas un concept nouveau. Dans ce cas, l'utilisation de médicaments approuvés est particulièrement bénéfique, car les essais cliniques ont déjà été menés avec succès et, souvent, leurs brevets ont expiré, ce qui permet de raccourcir et d'abaisser les délais de découverte. La plupart des médicaments utilisés pour traiter la leishmaniose, qu'ils soient sur le marché ou en cours de développement dans le cadre du processus de découverte de médicaments, étaient initialement destinés à d'autres indications (Tableau 8) :

[416] M. Kaiser, P. Mäser, L.P. Tadoori, J.-R. Ioset, R. Brun, Antiprotozoal Activity Profiling of Approved Drugs: A Starting Point toward Drug Repositioning, PLoS ONE 10 (2015) e0135556. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135556.

[417] R.L. Charlton, B. Rossi-Bergmann, P.W. Denny, P.G. Steel, Repurposing as a strategy for the discovery of new anti-leishmanials: the-state-of-the-art, Parasitology 145 (2018) 219–236. https://doi.org/10.1017/S0031182017000993.

Tableau 8. Activité *in vitro* contre *L. donovani* : CI_{50} (µM) de substances actives.[418]

ID Médicament	[a] *L. don.* axen.	[b] *L. don.* intracell.	[c] Cytotox. mac.inf.	[d] Cytotox. PMM	[e] IS	Indication	Classe chimique	Mode d'action
Auranofine	0.11	> 1.47	4.42	N/D	40	Antirhumatismal	Agent aurifère	Inhibiteur de la kinase kappaB et de la thioredoxine
Amphotericine B	0.34	0.31	32.4	22.39	95	Antifongique / Antiprotiste	Polyènes	Sur la membrane cellulaire
Ciclopirox olamine	1.64	9.09	20.3	20.27	12	Antifongique	Pyridones	-
Tolnaftate	4.33	50.1	97.6	N/D	>23	Antifongique	Thiocarbamates	Inhibiteur de la squalène époxydase
Artésunate	0.35	>7.8	7.8	N/D	>22	Antipaludéen	Endoperoxydes	Inconnu, agissant *via* les espèces radicalaires
Rifamycine SV	1.5	>13.87	41.62	N/D	28	Antibactérien / Antituberculeux	Rifamycines	Inhibiteur de l'ARN polymérase bactérienne
Rifampicine	1.53	>36.45	36.5	N/D	>24	Antibactérien / Antituberculeux	Rifamycines	Inhibiteur de la synthèse d'ADN bactérien
Nitrofurantoïne	2.12	>41.81	125.44	N/D	59	Antibactérien	Nitrohétérocycles	Nitroréductase NADPH insensible
Nifurtimox	2.76	20.68	34.8	15.7	13	Antibactérien / Antiprotiste	Nitrohétérocycles	Induction du stress oxydatif dans les cellules cibles
Troglitazone	4.26	>67.94	68	N/D	>16	Antidiabétique / Antiinflammatoire	Thiazolidinediones	Inhibiteur du récepteur nucléaire (PPAR)
Clofazimine	22.39	0.95	6.34	10.65	10	Antibactérien	Riminophénazines	Inhibiteur de l'ADN bactérien, déstabilisateur de la membrane cellulaire
Nifuroxazide	2.83	>10.86	36.2	N/D	13	Antibactérien	Nitrohétérocycles	Inhibiteur de la lipoamide déshydrogénase
Tipranavir	1.64	>49.78	50.9	N/D	>30	Antiviral / Antirétroviral	Inhibiteur des protéases	Inhibiteur de la protéase du VIH
Lonidamine	8.66	>93.41	93.4	N/D	>11	Anticancéreux	Indazoles	Inhibition de la glycolyse *via* l'activation de l'hexokinase

Notes :

- [a] **L. don. axen.** : Amastigotes axéniques de *L. donovani*, souche MHOM-ET-67/L82.
- [b] **L. don. intracell.** : Amastigotes intracellulaires de *L. donovani*, souche MHOM-ET-67/L82.
- [c] **Cytotox. mac.inf.** : Cytotoxicité sur les macrophages infectés par *L. donovani*.
- [d] **Cytotox. PMM** : Cytotoxicité sur les macrophages péritonéaux de souris.
- [e] **IS** : Indice de sélectivité : CC_{50} Cytotoxicité macrophages / CI_{50} *L. donovani*. Les valeurs CI_{50} sont la moyenne de deux tests indépendants, avec une variation de ±50 %.

Cependant, le repositionnement des médicaments est limité par le nombre de médicaments approuvés et de composés dont les données pharmacocinétiques sont établies ; en outre, le processus de découverte du repositionnement limite les chances de trouver des traitements avec un nouveau mécanisme d'action.

Dans l'ensemble, le repositionnement des médicaments représente une stratégie complémentaire pour l'accès à de nouvelles thérapies pour la leishmaniose.

1. **Points positifs :** gain de temps et réduction des coûts. En réutilisant des médicaments déjà approuvés, les chercheurs contournent certaines étapes longues et coûteuses du

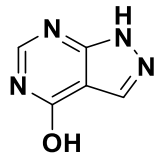
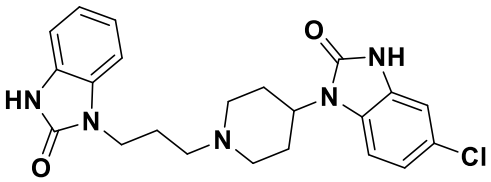
[418] M. Kaiser, P. Mäser, L.P. Tadoori, J.-R. Ioset, R. Brun, Antiprotozoal Activity Profiling of Approved Drugs: A Starting Point toward Drug Repositioning, PLoS ONE 10 (2015) e0135556. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135556.

développement de nouveaux traitements, comme les essais de toxicité et de pharmacocinétique, puisque ces aspects sont déjà bien documentés.

2. **Défis et considérations** : Bien que certains médicaments montrent une activité *in vitro* contre les parasites responsables de la leishmaniose, des études supplémentaires sont nécessaires pour évaluer leur efficacité *in vivo* et déterminer des schémas thérapeutiques adaptés.

- **Médicaments à usage vétérinaire**

D'autres alternatives pharmacologiques sont possibles comme l'allopurinol et la dompéridone, utilisés principalement chez le chien.

Allopurinol	**Dompéridone**
	
1*H*-Pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-ol	6-chloro-3-[1-[3-(2-oxo-3*H*-benzimidazol-1-yl)propyl]piperidin-4-yl]-1*H*-benzimidazol-2-one
Lors de la première étape de la biosynthèse des polyamines, l'allopurinol est un inhibiteur de l'arginase qui catalyse la conversion de la L-arginine en L-ornithine et en urée. Les polyamines sont essentielles aux parasites pour synthétiser le trypanothione, un composé antioxydant, capable de neutraliser les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'oxyde nitrique réactif (NO)[419].	La dompéridone est un dérivé du benzimidazole, ayant une activité antagoniste sélective des récepteurs dopaminergiques D2. Elle induit une augmentation du taux sérique de prolactine comme effet secondaire. Cette hormone, excrétée par l'hypophyse et générée par les lymphocytes, est considérée comme une cytokine pro-inflammatoire. Elle stimule l'immunité cellulaire (Th1) en augmentant la production d'INF-γ, d'IL2, d'IL12 et de TNF-α.

La dompéridone peut être utilisée chez l'homme principalement pour ses effets sur la motilité gastro-intestinale et la gestion des nausées et vomissements. Toutefois, son utilisation a suscité des controverses en raison de risques cardiovasculaires potentiels, ce qui a restreint sa disponibilité dans certains pays.

En médecine vétérinaire, la dompéridone est également employée pour ses propriétés antiémétiques, notamment dans le traitement des troubles liés au transport chez les chiens, l'intolérance à certains médicaments, les gastrites chroniques ou aiguës, et lors des explorations digestives.

[419] L.M. Feitosa, E.R. Da Silva, L.V.B. Hoelz, D.L. Souza, J.A.A.S.S. Come, C. Cardoso-Santos, M.M. Batista, M.D.N.C. Soeiro, N. Boechat, L.C.S. Pinheiro, New pyrazolopyrimidine derivatives as Leishmania amazonensis arginase inhibitors, Bioorganic & Medicinal Chemistry 27 (2019) 3061–3069. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.05.026.

En outre, la capacité de la dompéridone à renforcer les réponses immunitaires a ouvert la voie à son utilisation préventive et thérapeutique dans la leishmaniose canine. Cette utilisation repose sur ses effets immunostimulants qui peuvent soit prévenir la maladie soit gérer ses signes cliniques lorsqu'ils se manifestent. Chez les chiens atteints de leishmaniose, la recherche avance pour comprendre l'impact sur différents marqueurs immunologiques et biochimiques, et définir son mécanisme d'action sur des anticorps sériques, des marqueurs inflammatoires et ceux de la fonction rénale.

L'allopurinol, inhibiteur de la xanthine oxydase, est utilisé chez l'homme pour le traitement de la goutte et d'autres pathologies où il est nécessaire de réduire les taux d'acide urique. En médecine vétérinaire, l'allopurinol est utilisé pour des indications similaires, en particulier pour prévenir la formation de calculs d'urate chez les petits animaux comme les chiens.

L'absorption de l'allopurinol chez les animaux est similaire à celle observée chez l'homme, avec une absorption d'environ 90 % après administration orale. Les dosages peuvent varier et sont souvent ajustés en fonction de la tolérance de l'animal et de la réponse au traitement en surveillant la fonction rénale.

L'allopurinol agit en inhibant la xanthine oxydase, empêchant la transformation des nucléotides en acide urique, qui peut alors favoriser la croissance du parasite *Leishmania* chez le chien. Ce mécanisme a conduit à une utilisation de l'allopurinol dans la prise en charge des leishmanioses canines. Le protocole typique inclut l'administration d'allopurinol en association avec d'autres médicaments comme le *N*-méthylglucamine antimoniate pour une période initiale, suivi par un traitement prolongé avec l'allopurinol seul. La dose habituelle pour le traitement de la leishmaniose canine est de 10 mg/kg, administrée par voie orale deux fois par jour. Ce traitement peut s'étendre sur 6 à 12 mois ou plus, selon les besoins cliniques de l'animal.

Bien que l'allopurinol ne puisse pas éliminer le parasite de manière définitive, il va aider à contrôler les symptômes et à réduire la charge parasitaire, améliorant ainsi la qualité de vie de l'animal et réduisant la possibilité de transmission.

- **Approches Basées sur les Ligands et les Structures**

Les médicaments innovants (*first-in-class drugs)*, entre 1999 et 2013, ont été découverts soit par une stratégie basée sur les ligands, soit par une stratégie basée sur les récepteurs typiquement connus, Ligand-Based Drug Design (LBDD) et Structure-Based Drug Design (SBDD) (Figure 35).

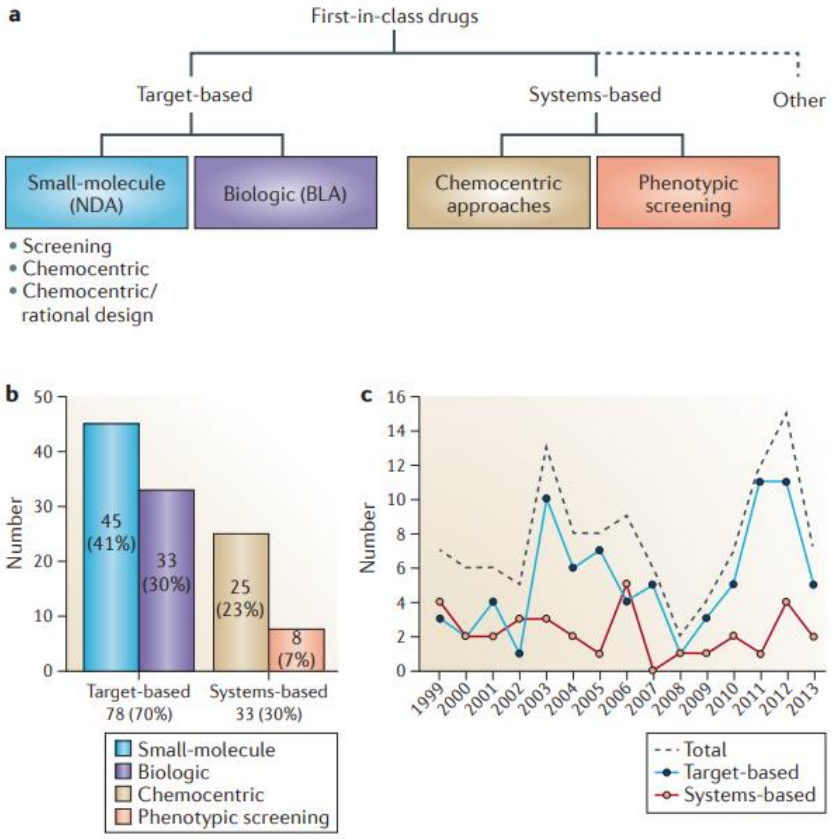


Figure 35 - Découverte de médicaments innovants approuvés par la FDA entre 1999 et 2013.[420]

La stratégie basée sur les ligands, également appelée approche systémique, est agnostique par rapport à la cible, ce qui signifie qu'elle ne dépend pas d'une connaissance préalable précise des mécanismes d'action ou des cibles moléculaires. Elle part généralement d'une molécule déjà identifiée pour son activité biologique et tente de l'optimiser en fonction de ses propriétés pharmacologiques.

Deux approches sont possibles :

- **Chimiocentrique** : La découverte est guidée par la structure chimique. L'idée est souvent de partir de composés connus (ou classes de composés connus) et de les modifier ou optimiser pour en améliorer les propriétés thérapeutiques.
- **Phénotypique** : Le criblage phénotypique est une autre approche souvent complémentaire. Ici, on observe les effets d'une molécule sur un système biologique (par exemple, des cellules ou des modèles animaux) sans nécessairement connaître la cible moléculaire sous-jacente. Cela permet de découvrir des médicaments basés sur leur effet thérapeutique global plutôt que sur leur interaction avec une cible prédéfinie.

[420] J. Eder, R. Sedrani, C. Wiesmann, The discovery of first-in-class drugs: origins and evolution, Nat Rev Drug Discov 13 (2014) 577–587. https://doi.org/10.1038/nrd4336.

Dans la stratégie basée sur les récepteurs, l'approche repose sur la connaissance préalable de la structure tridimensionnelle de la cible biologique, souvent une protéine, afin de guider le développement de petites molécules ou de produits biologiques. Avec cette approche, la plupart de ces produits a été approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis entre 1999 et 2013 (Figure 36).

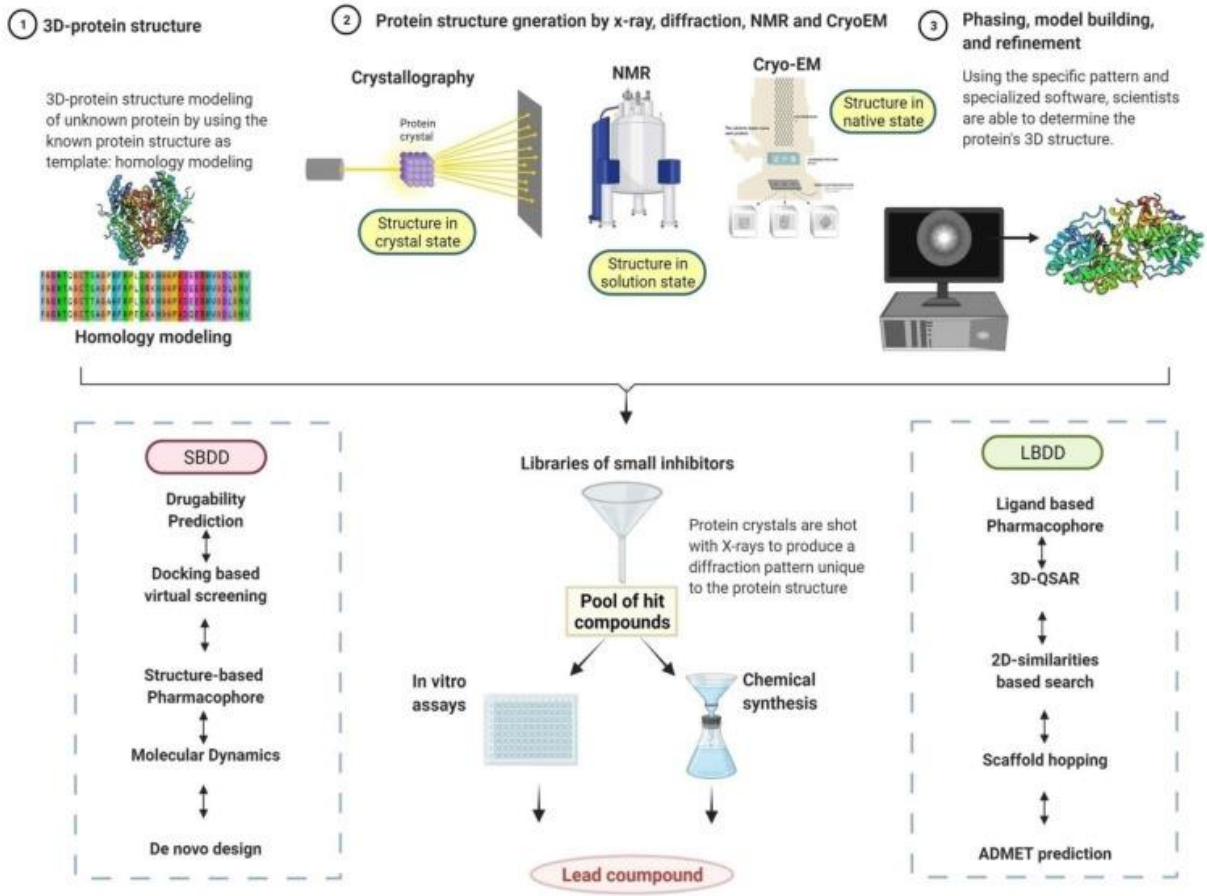


Figure 36. Flux de travail pour la découverte de médicaments spécifiques à une cible.[421]

i. Les étapes principales de cette approche SBDD* incluent :

1. **Identification et préparation de la structure de la cible** : La première étape est d'obtenir ou bien sélectionner la structure tridimensionnelle de la protéine cible. Cela peut être réalisé par des techniques expérimentales comme la cristallographie aux rayons X ou la RMN, ou par des méthodes de modélisation computationnelle. Ensuite, la cible est préparée pour le criblage virtuel.
2. **Criblage *in silico*** : À partir de la structure cible, des bibliothèques de petites molécules sont testées virtuellement à l'aide de logiciels d'amarrage moléculaire (molecular docking). Ces

[421] M. Soni, J.V. Pratap, Development of Novel Anti-Leishmanials: The Case for Structure-Based Approaches, Pathogens 11 (2022) 950. https://doi.org/10.3390/pathogens11080950.

* SBDD, Structure-Based Drug Design

logiciels évaluent comment différentes molécules se lient à la protéine cible en prédisant leurs interactions et en générant des scores de liaison.

3. **Simulations de dynamique moléculaire** : Une fois les molécules candidates identifiées, des simulations peuvent être réalisées pour observer leur comportement dans des conditions proches du réel.

4. **Investigations expérimentales** : Après l'étape de criblage virtuel, les molécules sélectionnées sont soumises à des tests expérimentaux pour valider leur effet sur la cible et leur potentiel thérapeutique. Cela inclut souvent des tests *in vitro* pour évaluer l'activité biochimique et des études phénotypiques pour examiner leurs effets dans des modèles cellulaires ou animaux.

L'utilisation de techniques comme le **High Throughput Screening (HTS)** permet d'accélérer le processus en testant rapidement des milliers de molécules contre des cibles spécifiques. Le HTS est un processus automatisé qui permet d'identifier des inhibiteurs potentiels parmi de grandes bibliothèques de composés.

ii. Les étapes principales du LBDD sont les suivantes :

L'approche LBDD (Ligand-Based Drug Design) exploite les modifications structurales du ligand afin de modifier ou optimiser son activité biologique. Dans le cadre de cette approche, le concept de similitude ou similarité devient clé, faisant principalement appel à des **paramètres de similarité** :

- **Coefficients de similarité :** Les **coefficients de similarité** quantifient la ressemblance entre deux structures moléculaires en attribuant un score numérique. Ils sont utilisés pour comparer des molécules entre elles en fonction de caractéristiques spécifiques, comme leurs empreintes moléculaires.
- **Méthode de Tanimoto** : Le **coefficient de Tanimoto** est l'une des mesures les plus populaires pour évaluer la similarité entre deux molécules. La méthode Tanimoto est souvent privilégiée en chimie thérapeutique. Elle calcule la proportion des caractéristiques communes par rapport au total des caractéristiques entre les deux molécules. Cette méthode dépend du logiciel utilisé, car celui-ci peut utiliser des descripteurs moléculaires différents.
- **Autres coefficients** : Il existe également d'autres coefficients de similarité, comme ceux de Dice (Sorensen-Dice) ou de Cosine, qui évaluent la similarité sur la base de différentes métriques de la chimie computationnelle. Le coefficient de Dice met cependant davantage l'accent sur les caractéristiques communes, en donnant plus de poids aux caractéristiques partagées par rapport à celles qui sont uniques à chaque molécule. Le coefficient de Dice tend à attribuer des scores de similarité plus élevés que celui de Tanimoto lorsque les molécules ont des caractéristiques communes. La similarité cosinus est utilisée pour

évaluer l'angle entre les vecteurs représentant les molécules. Cette méthode est souvent utile pour comparer des molécules lorsque l'empreinte est représentée sous forme de vecteurs continus plutôt que binaires.

Parmi les autres méthodes moins couramment utilisées mais tout aussi disponibles, on peut citer : le coefficient de Jaccard, le coefficient d'Euclide, la méthode des graphes, les empreintes moléculaires, la distance de Manhattan (ou City Block Distance) ou la distance de Hamming.

Avant de continuer la description de la notion de similarité, quelques commentaires sont utiles dans le contexte de la conception de médicaments. Dans une étape de développement ou bien d'optimisation, les objectifs des projets ne se limitent pas seulement à l'obtention d'une activité biologique similaire ou plus puissante.

En partant d'un composé hypothétique 1, de structure et activité S_1-A_1, on peut considérer un autre composé 2, avec une structure et activité S_2-A_2 (Tableau 9).

Le projet de recherche peut alors mettre en valeur, soit l'équilibre entre l'efficacité et les propriétés pharmacocinétiques (PK, ou plus général ADME), soit favoriser un meilleur profil de toxicité.

Trouver un composé 2 ayant une activité similaire au composé 1, plus puissante ou bien avec un rapport plus favorable en considérant la PK ou la toxicité, peut être lié (a, a*, a‡) ou non (b, b*, b‡) à une relation structurelle proche.

Le concept d'isostère devient alors important dans les étapes d'optimisation :

Tableau 9. Relation conceptuelle entre les notions de similarité et activité biologique.

	$S_1=S_2$	$S_1\neq S_2$	$S_1=S_2$	$S_1\neq S_2$	a : équivalent biologique et équivalent chimique : bioisostère. b : équivalent biologique avec différence structurelle: *scafold hopping.* c : équivalent chimique avec perte en activité. : isostère. d : hypothèse non retenue. * activité biologique optimisée. ‡ *propriétés* PK ou Toxicité optimisée.	
$A_1=A_2$	*a*					
$A_1<A_2$	*a**					
$A_1\sim A_2$	*a‡*					
$A_1=A_2$		*b*				
$A_1<A_2$		*b**				
$A_1\sim A_2$		*b‡*				
$A_1>A_2$			*c*			
$A_1>A_2$				*d*		

Le concept de bioisostérisme et la mise en œuvre du remplacement bioisostérique sont fondamentaux pour la chimie médicinale. L'exploration des bioisostères est souvent utilisée pour apprécier les caractéristiques structurelles clés des candidats pharmacophores et améliorer les propriétés pharmacocinétiques. Au fur et à mesure que la compréhension du bioisostérisme a

évolué, des capacités permettant d'entreprendre des remplacements bioisostériques plus ambitieux sont apparues. La notion de « Scaffold hopping » est utilisée dans la littérature pour désigner une variété de stratégies de remplacement bioisostérique différentes, allant de simples remplacements hétérocycliques à des révisions structurelles topologiques.[422]

Le concept classique d'isostérisme existe depuis le début des années 1900, lorsque Langmuir, Grimm et Erlenmeyer ont donné un certain nombre de définitions des isostères chimiques classiques qui se concentraient sur des atomes ou des groupes d'atomes similaires en termes de taille ou de propriétés électroniques (Tableau 10).

Tableau 10. a. Groupements isostériques de Langmuir, **b.** Isostères d'Erlenmeyer en fonction du nombre d'électrons de valence, **c.** distribution de Grimm, **d**. isostères non classiques (bioisostères).[423]

a.)

S.No (Group)	Langmuir Isosteres
1	He, H^-, Li^+
2	F^-, O^{2-}, Ne, Na^+, Al^{3+}, Mg^{2+}
3	S^{2-}, Cl^-, Ar, K^+, Ca^{2+}
4	Zn^{2+}, Cu^{2-}
8	CO, CN^-, N_2
9	NH_4^+, CH_4
10	CO_2, N_2O, $^-N{=}N{=}N$/ (N^{3-}), $N{=}C{=}O^-$ / (CNO^-)
20	CrO_4^{2-}, MnO_4^-
21	SeO_4^{2-}, AsO_4^{3-}

b.)

Isostères d'Erlenmeyer selon le nombre d'électrons de valence				
4	**5**	**6**	**7**	**8**
C	P	S	Cl	Ne
Si	As	O	Br	Ar
N+	Sb	Se	I	ClH
P+	N	Te	SH	BrH
S+	CH	PH	PH	IH
As+	SiH	NH	SH	SH_2
Sb+		CH_2	NH_2	PH_3

[422] G. Schneider, W. Neidhart, T. Giller, G. Schmid, "Scaffold-Hopping" by Topological Pharmacophore Search: A Contribution to Virtual Screening, Angew Chem Int Ed Engl 38 (1999) 2894–2896.

[423] P. Ciapetti, B. Giethlen, Molecular Variations Based on Isosteric Replacements, in: The Practice of Medicinal Chemistry, Elsevier, 2008: pp. 290–342. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374194-3.00015-9.

c.)

Distribution proposé par Grimm					
4A	5A	6A	7A	8A	
6	7	8	9	10	11
C	N	O	F	Ne	Na^+
	CH	NH	OH	FH	-
		CH_2	NH_2	OH_2	FH_2^+
			CH_3	NH_3	OH_3^+
				CH_4	NH_4^+

d.)

Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4	Groupe 5	Groupe 6	Groupe 7
-CO-	**-COOH**	**$-SO_2NH_2$**	**-H**	**-CONH-**	**-COOR**	**$-CONH_2$**
$-CO_2-$	**$-SO_3H$**	**$-PO(OH)NH_2$**	**-F**	**-NHCO-**	**-ROCO-**	**$-CSNH_2$**
$-SO_2-$	**-tétrazole**					
$-SO_2NR-$	**$-SO_2NHR$** **$-SO2NH_2$**		**-OH** **$-CH_2OH$**		**-catéchol**	
-CON-	**-3-hydroxyisoxazole**				**-benzimidazole**	
-CH(CN)-	**-2-hydroxychromones**		**-NHCONH2**			**C_4H_4S**
R-S-R			**$-NH-CS-NH_2$**			**$-C_5H_4N$**
(R-O-R)	**=NH-**					**$-C_6H_5$**
R-N(CN)-	**C(CN)=R'**		**$-NH-C(=CHNO_2)-NH_2$** **$-NH-C(=CHCN)-NH_2$**			
-halogénure						**$-C_4H_4NH$**
	$-CF_3$					
	-CN					
	$-N(CN)_2$					
	$-C(CN)_3$					

Le terme « bioisostère » a été conçu par Friedman en 1951 pour décrire les atomes, les groupements d'atomes ou les molécules qui sont isostériques et qui provoquent une réponse biologique comparable. En 1979, Thornber a élargi la définition du bioisostérisme, qui se concentre sur les groupements fonctionnels ou les molécules présentant des similitudes physiques et chimiques et produisant des effets biologiques largement similaires.[424]

Le « Scaffold hopping » est une stratégie visant à concevoir des composés architecturalement nouveaux. Les composés qui en résultent possèdent une structure centrale chimiquement différente[425] (Figure 37). Cette approche a été au centre de la découverte traditionnelle de médicaments et nécessite des techniques intuitives et informatiques pour son exécution. Par exemple, de nouveaux ligands des récepteurs GABA autres que les benzodiazépines, comme la

[424] J.L. Kraus, Isoterism and molecular modification in drug design: New n-dipropylacetate analogs as inhibitors of succinic semi aldehyde dehydrogenase, Pharmacological Research Communications 15 (1983) 119–129. https://doi.org/10.1016/S0031-6989(83)80054-X.

[425] H.-J. Böhm, A. Flohr, M. Stahl, Scaffold hopping, Drug Discovery Today: Technologies 1 (2004) 217–224. https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.10.009.

zopiclone, le zolpidem et le zaleplon, ont été découverts en 1950, par « Scaffold hopping » du noyau de la benzodiazépine.[426] Une autre série d'exemples concerne les agonistes de la dopamine tels que le fenoldopam ou le quinpirole, découverts par « Scaffold hopping » de ligands naturels,[427] ainsi que les inhibiteurs de COX anti-inflammatoires, le lumiracoxib, le sulindac, le célécoxib et le rofécoxib, obtenus par « Scaffold hopping » de l'indométacine.[428]

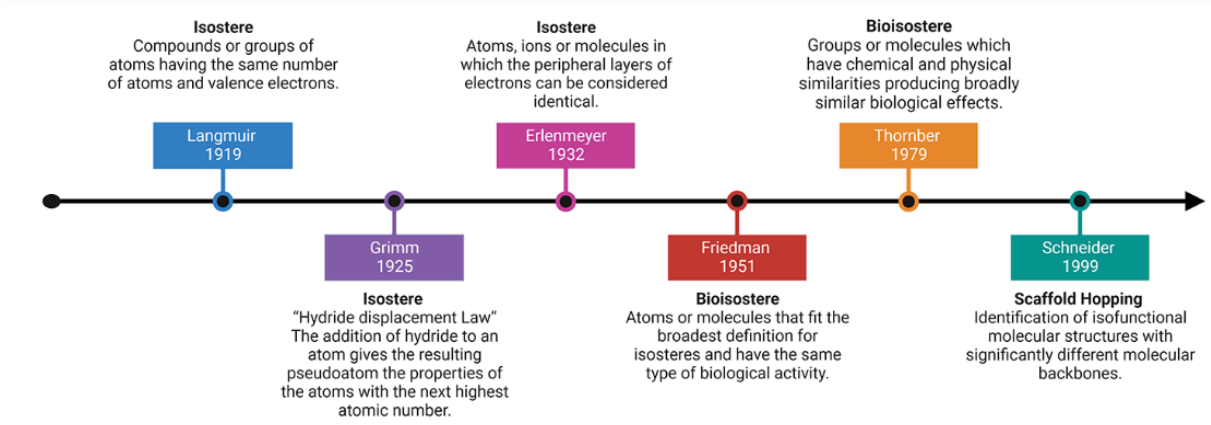


Figure 37. Historique de développement des termes liés à l'isostérisme.[429]

L'amélioration de la sélectivité, la stabilité métabolique, la réduction des effets secondaires, peuvent être modulés par un bioisostérisme approprié. Par exemple, le remplacement de l'hydrogène par le fluor, en tant que bioisostère, est largement utilisé.[430] Les bioisostères d'acides carboxyliques tels que les oxadiazoles, les oxazoles, les tétrazoles, peuvent moduler la lipophilie de la molécule finale.[431]

Dans le cadre de la recherche sur *Leishmania*, Mamidala *et al*. ont rapporté la conception d'une série de dérivés de furopyridinedione en tant qu'inhibiteurs de LdTop1 par « Scaffold hopping » d'inhibiteurs de la topoisomérase-1 connus.[432] De plus, Das *et al*. ont optimisé des dérivés de 2-aminoquinazolines comme agents contre *Leishmania donovani*, en utilisant le *scaffold hopping* inspiré par des composés actifs contre les kinétoplastidés, inclus dans la chimiothèque de l'Open Lab Foundation (OLF) – GSK.[433]

[426] L. Teuber, F. Wätjens, L.H. Jensen, Ligands for the benzodiazepine binding site--a survey, Curr Pharm Des 5 (1999) 317–343.

[427] [1] P.H. Andersen, J.A. Jansen, Dopamine receptor agonists: selectivity and dopamine D1 receptor efficacy, European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology 188 (1990) 335–347. https://doi.org/10.1016/0922-4106(90)90194-3. [2] J.W. Kebabian, F.I. Tarazi, N.S. Kula, R.J. Baldessarini, Compounds selective for dopamine receptor subtypes, Drug Discovery Today 2 (1997) 333–340. https://doi.org/10.1016/S1359-6446(97)01075-1.

[428] [1] D. Lednicer, Tracing the Origins of COX-2 Inhibitors Structures+, CMC 9 (2002) 1457–1461. https://doi.org/10.2174/0929867023369727. [2] G. Trummlitz, J. van Ryn, Designing selective COX-2 inhibitors: molecular modeling approaches, Curr Opin Drug Discov Devel 5 (2002) 550–561.

[429] T.B. Callis, T.R. Garrett, A.P. Montgomery, J.J. Danon, M. Kassiou, Recent Scaffold Hopping Applications in Central Nervous System Drug Discovery, J. Med. Chem. 65 (2022) 13483–13504. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c00969.

[430] G.A. Patani, E.J. LaVoie, Bioisosterism: A Rational Approach in Drug Design, Chem. Rev. 96 (1996) 3147–3176. https://doi.org/10.1021/cr950066q.

[431] C. Ballatore, D.M. Huryn, A.B. Smith, Carboxylic Acid (Bio)Isosteres in Drug Design, ChemMedChem 8 (2013) 385–395. https://doi.org/10.1002/cmdc.201200585.

[432] R. Mamidala, P. Majumdar, K.K. Jha, C. Bathula, R. Agarwal, M.T. Chary, H.K. Majumder, P. Munshi, S. Sen, Identification of Leishmania donovani Topoisomerase 1 inhibitors *via* intuitive scaffold hopping and bioisosteric modification of known Top 1 inhibitors, Sci Rep 6 (2016) 26603. https://doi.org/10.1038/srep26603.

[433] N. Das, J. Roy, B. Patra, E. Saunders, D. Sarkar, S. Goon, B.P. Sinha, S. Roy, S. Roy, J. Sarif, P. Bandopadhyay, S. Barik, S. Mukherjee, N. McNamara, S. Varghese, K. Simpson, J. Baell, M. McConville, D. Ganguly, A. Talukdar, Hit-to-lead optimization of 2-aminoquinazolines as anti-microbial agents against Leishmania donovani, European Journal of Medicinal Chemistry 269 (2024) 116256. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116256.

- **Commentaires sur l'application des deux méthodes dans le contexte de la recherche sur la leishmaniose :**
  Criblages basés sur des cibles spécifiques et criblages phénotypiques.

Beaucoup de critères sont à fixer lorsqu'une recherche contre la leishmaniose est menée :

- **Sélection du parasite** : Cela dépend de l'objectif de la recherche et de la région géographique d'intérêt. On peut cibler une espèce en particulier ou plusieurs. Les principales espèces trouvées en Europe sont *Leishmania infantum* et *Leishmania tropica*. En Amérique, *L. amazonensis* est largement distribuée, mais il existe une grande diversité d'espèces et d'hôtes. Aux États-Unis, à la suite de voyages à l'étranger et d'actions militaires, *L. mexicana* est considéré comme endémique, notamment au Texas et au sud-est de l'Oklahoma. En Asie en en Afrique, *L. infantum* ou *L. donovani* sont les espèces les plus fréquemment impliquées. En Algérie, nous rencontrons une forte incidence de la leishmaniose cutanée, *L. major* étant souvent la cause principale.[434]
- **Choix du test phénotypique** : Il est possible de commencer avec des parasites sous forme promastigote pour des tests de screening *in vitro*, suivis de tests de toxicité et de tests sur la forme amastigote du parasite. Il n'est cependant pas toujours nécessaire de commencer par la forme promastigote. Dans certains cas, les amastigotes axéniques sont utilisés d'emblée. Cela dépend des préférences ou des stratégies de l'équipe de recherche.
- **Tests sur la forme amastigote** : Il est nécessaire de choisir entre les amastigotes axéniques (cultivés en dehors des macrophages) ou les amastigotes intracellulaires, afin de mieux simuler l'état infectieux.
- **Tests de toxicité** : leur mise en œuvre doit tenir compte des facteurs de coût. Ainsi, dans certains cas, tous les composés dont l'activité a été évaluée seront testés pour la toxicité ; mais dans d'autres cas, seules les molécules ayant une bonne activité biologique le seront. L'intérêt de la toxicité dans la première étape consiste à établir des données de sélectivité du traitement et de réduire la probabilité d'exclure des molécules avec des résultats d'activité faussement négatifs.

Les défis majeurs dans la recherche contre la leishmaniose portent aussi sur la nature des criblages. Les tests contre la forme promastigote *in vitro* sont relativement plus faciles à réaliser, mais ne représentent pas le stade infectieux du parasite. Il a été suggéré que seuls 4 % des

[434] E. Montaner-Angoiti, L. Llobat, Is leishmaniasis the new emerging zoonosis in the world?, Vet Res Commun 47 (2023) 1777–1799. https://doi.org/10.1007/s11259-023-10171-5.

résultats positifs identifiés en utilisant des promastigotes de *Leishmania* ont un effet sur les formes amastigotes intracellulaires.[435] Un criblage phénotypique basé sur l'amastigote doit être considéré comme l'approche la plus appropriée à développer.[436]

Il reste encore beaucoup à faire afin de trouver un modèle de criblage phénotypique optimisé, imitant l'environnement pathophysiologique.[437]

1.2.10. Travaux Collaboratifs et Renforcement des Capacités de Recherche

Les travaux collaboratifs, ainsi que la création et le renforcement des réseaux internationaux, jouent un rôle déterminant dans le renforcement des capacités de recherche contre la leishmaniose. En Amérique centrale et du Sud, notamment au Brésil, pays le plus touché proportionnellement, des capacités de recherche significatives ont été développées. L'institut Fiocruz, avec des critères de santé publique et de science ouverte, continue ses programmes de recherche contre cette maladie à travers une approche collaborative et scientifique.

Institut Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) : [438] L'Institut Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) au Brésil mène des recherches dans 66 laboratoires, sur la transmission, le traitement, le contrôle et la prévention de maladies telles que le SIDA, la tuberculose, le paludisme, la fièvre jaune, la dengue, la maladie de Chagas, la leishmaniose, avec un objectif louable :

- **Mission institutionnelle :** Mener des recherches, développer l'enseignement, promouvoir le développement technologique et l'innovation avec des services de référence.
- **Vision :** Être un institut d'excellence en termes de recherche, d'éducation, de technologie et d'innovation, reconnu nationalement et internationalement pour ses actions en santé publique.
- **Laboratoire de Biochimie des Trypanosomatidés (LBQT) :** Le LBQT de l'Institut Oswaldo Cruz, dirigé par le Dr Eduardo Caio Torres-Santos, étudie depuis 1998 les chimiothérapies permettant de lutter contre les trypanosomatidés à travers diverses approches, telles que l'identification de nouvelles cibles pharmacologiques, l'étude des voies métaboliques et des mécanismes de résistance. Le laboratoire participe aussi à des

[435] [1] L.H. Freitas-Junior, E. Chatelain, H.A. Kim, J.L. Siqueira-Neto, Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it?, International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance 2 (2012) 11–19. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2012.01.003.

[436] [1] R.M. Reguera, E. Calvo-Álvarez, R. Álvarez-Velilla, R. Balaña-Fouce, Target-based vs. phenotypic screenings in Leishmania drug discovery: A marriage of convenience or a dialogue of the deaf?, International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance 4 (2014) 355–357. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2014.05.001.

[437] A. Cohen, N. Azas, Challenges and Tools for In Vitro Leishmania Exploratory Screening in the Drug Development Process: An Updated Review, Pathogens 10 (2021) 1608. https://doi.org/10.3390/pathogens10121608.

[438] FIOCRUZ - https://www.ioc.fiocruz.br/en/laboratorios (consulté le 04/09/2024).

propositions de nouvelles formulations et collabore avec des institutions nationales et internationales. Ce laboratoire fait partie des 66 laboratoires de l'institut, suite à l'accréditation pour la période 2023-2028.[439]

Travaux collaboratifs public-privé

Les initiatives publiques et privées peuvent devenir complémentaires ; néanmoins, concrétiser des travaux collaboratifs dans le domaine de la Leishmaniose en partenariat représente un véritable défi.

Pour le présent projet, une demande a été soumise à l'initiative Tres Cantos Open Lab Foundation (https://www.openlabfoundation.org). Dans le cadre du processus d'évaluation, malheureusement notre projet n'a été pas retenu par l'équipe d'évaluation, car la leishmaniose n'était pas une priorité à la date de soumission de la demande (Annexe 1).

[439]LBQT :https://www.ioc.fiocruz.br/lbqt. (consulté le 04/09/2024).

1.3. Conclusion générale du chapitre

La leishmaniose représente un exemple multifactoriel pour rendre compte de la complexité des projets de recherche « drug discovery » à l'origine de nouveaux médicaments anti-infectieux. Parmi ces facteurs, qui ne sont pas toujours évidents ou directement liés à des variables chimiques ou purement biologiques, on peut citer : les phénomènes épidémiologiques de la maladie, le contexte social et économique des populations affectées, les conditions de changement climatique qui influencent l'adaptation du vecteur et, par conséquent, la distribution vers de nouvelles zones géographiques, ainsi que des variables économiques et politiques des acteurs publics et privés, ainsi que des phénomènes géopolitiques.

La possibilité de mener des études de « drug discovery » dans le domaine de la leishmaniose dépend aujourd'hui largement des efforts des institutions publiques. Il existe des consortiums établissant des stratégies de recherche dans le cadre de la dénomination des "maladies négligées". Toutefois, tout au long de ce premier chapitre, une série de considérations a été analysée avec un esprit critique justifiant que cette dénomination n'est pas nécessairement justifiée, en particulier en Amérique (au moins en Colombie).

Les interactions entre la recherche et l'armée sont fondamentales dans le cas de la leishmaniose. Des nombreux traitements existent, mais leurs limitations ainsi que l'apparition de résistance justifient de la recherche de nouveaux médicaments innovants.

Malgré ces limitations, les efforts de recherche ont été maintenus, avec l'objectif de trouver de nouveaux médicaments avec de meilleurs profils de toxicité, notamment pour une administration orale à faible coût. Cela justifie ma démarche et la réalisation de notre projet de recherche.

2. Objectif et méthodologie

2.1. Considérations générales sur le projet

Comme mentionné dans le chapitre précédent, la majorité des médicaments contre la leishmaniose est disponible pour une administration parentérale, ce qui constitue une limitation à l'observance du traitement. Le présent projet prend en compte la nécessité de générer des stratégies d'optimisation "hit-to-lead", en conservant des critères d'administration orale. Voici une brève description des paramètres.

2.1.1. Voie d'administration envisagée

Optimisation en fonction de la voie d'administration :

Le choix de la voie d'administration joue un rôle central dans l'optimisation des propriétés physico-chimiques du médicament.

- **Orale** : Les molécules destinées à une administration orale doivent être suffisamment stables dans le tractus gastro-intestinal, bien absorbées et résister au premier passage hépatique.
- **Injectable** : Les médicaments injectables nécessitent souvent des propriétés différentes, comme une bonne solubilité en milieu aqueux et une stabilité plasmatique.
- **Topique** : Dans le cas de LC, les composés destinés à une application topique doivent avoir une bonne perméabilité à travers la peau, et une absorption systémique limitée. Les modifications visant à améliorer les propriétés lipophiles peuvent favoriser la pénétration cutanée.

Pour ce projet, la voie orale est privilégiée, qu'il s'agisse de formes solides, semi-solides ou liquides, en raison de sa facilité d'administration par rapport aux formes injectables, de son coût relativement plus faible, de sa stabilité, de sa transportabilité et son amélioration de l'observance du patient.

Balance entre l'activité et la toxicité :

Dans certains cas, sacrifier une partie de l'activité d'une molécule peut être justifié si cela permet d'améliorer son profil de sécurité ou de réduire les effets indésirables. Ce choix reste un critère subjectif qui dépend de l'intérêt et de la perspective du chercheur.

Dans le domaine du « Drug Discovery », et en ce qui concerne la leishmaniose, le concept de "drugability" reste imprécis en raison de l'absence de critères homogènes et standardisés. Pour tenter de réduire cette hétérogénéité, un critère usuellement adopté pour les molécules "hits" fixe une valeur d'activité *in vitro* ≤ 10 µM. Le comité coordonné par le Global Health Innovative Technology (GHIT) Fund a élaboré les critères suivants, pour la leishmaniose viscérale :[440]

- Critères clés de sélection des ***hits*** : puissance cellulaire — devrait démontrer une CI_{50} < 10 µM contre *Leishmania donovani* intracellulaire.
- Critères clés de sélection des ***leads*** : dans un modèle de souris (ou hamster) infecté par *L. donovani* ou *L. infantum*, un traitement avec un lead devrait entraîner une réduction de plus de 70 % de la charge parasitaire hépatique après un maximum de 5 doses à 50 mg par kg, administrées par voie orale une ou deux fois par jour.

Ce critère, bien qu'utile, ne doit pas être considéré comme un paramètre inexorable, car il peut conduire à l'élimination de molécules. Au moment de la rédaction du présent document, il n'existe pas de travaux spécifiques sur le nombre de faux négatifs dans les premières étapes de la découverte de médicaments.

Règle des 5 de Lipinski

En 1997, Christopher Lipinski et ses collègues ont examiné les caractéristiques physicochimiques des médicaments approuvés et des candidats en essais cliniques de l'époque, et ont proposé que la "règle des 5" pourrait prédire la probabilité qu'une petite molécule soit active par voie orale :

- Composés ayant une masse moléculaire inférieure à 500 daltons,
- Un logarithme calculé du coefficient de partage octanol-eau (clogP) inférieur à 5,
- Cinq donneurs de liaisons hydrogène ou moins,
- Dix accepteurs de liaisons hydrogène ou moins.

Michael Shultz de Novartis, dans un article publié dans le Journal of Medicinal Chemistry, a évalué les propriétés physicochimiques des 409 petites molécules approuvées par la FDA depuis 1997. Il a constaté que la masse moléculaire dans cette cohorte a considérablement augmenté, et qu'en 2016 et 2017, la masse moléculaire moyenne des médicaments approuvés dépassait 500 daltons. La valeur de la masse moléculaire, serait désormais supérieure à 600 daltons.[441]

2.1.2. Cibles Potentielles

[440] K. Katsuno, J.N. Burrows, K. Duncan, R.H. Van Huijsduijnen, T. Kaneko, K. Kita, C.E. Mowbray, D. Schmatz, P. Warner, B.T. Slingsby, Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world, Nat Rev Drug Discov 14 (2015) 751–758. https://doi.org/10.1038/nrd4683.

[441] A. Mullard, Re-assessing the rule of 5, two decades on, Nat Rev Drug Discov 17 (2018) 777–777. https://doi.org/10.1038/nrd.2018.197.

En ce qui concerne l'activité antileishmanienne des composés contenant le groupement amidoxime, aucune cible spécifique ni aucun mécanisme d'action associé n'ont été identifiés. Cependant, une description générale des cibles pharmacologiques généralement citées est présentée dans la partie des résultats de la publication « European Journal of Medicinal Chemistry » (voir partie 3.3. Pharmacomodulation : série aliphatique).

En général, les cibles telles que la topoisomérase II, les microtubules, les transporteurs de purines et de glucose, ainsi que l'ADN kinétoplastique (kDNA) sont des cibles prometteuses pour le développement de traitements sélectifs. Par exemple, les tubulines spécifiques à *Leishmania* jouent un rôle dans la motilité, la division cellulaire et la morphologie.

2.1.3. Pharmacocinétique dans la recherche des nouveaux médicaments

La possibilité d'incorporer des paramètres pharmacocinétiques ou pharmacodynamiques dès les premières étapes de la recherche de nouveaux médicaments est une stratégie recommandée. Cela permet soit d'éviter des composés susceptibles de présenter des problèmes importants en termes de toxicité ou bien dans les étapes « ADME » (Absorption ; Distribution ; Métabolisme ; Elimination du principe actif et de ses métabolites), ou bien d'optimiser la prise de décision pour sélectionner des composés à tester.

Dans notre travail, nous avons utilisé le logiciel GastroPlus®, afin d'identifier de manière préliminaire certaines données de prédiction sur la biodisponibilité et le métabolisme. L'application web SwissADME (http://www.swissadme.ch/) a également été utilisée.

Tableau 11. Quelques données physicochimiques des composés antileishmaniens sur le marché.

Médicament	Coefficient de partage (ClogP)	Solubilité dans l'eau (mg/ml)	Poids moléculaire (g/mol)	pKa
Amphotéricine B	-2,6	<0.001	924	5,7 et 10
Sulfate de paromomycine	-8,7	>20	714	5,7 à 8.8
Miltéfosine	3,7	>2.5	408	2
Diséthionate de pentamidine	4,0	>20	593	11,5 et 12,9
Stibogluconate de sodium	-3,8	>1	680	-3 à 2,3
Antimoniate de méglumine	-4,2	>300	525	9,1 à 12,7

La peau comme cible optative

Bien que l'administration orale soit la voie d'administration priorisée dans ce projet, certaines considérations sur les caractéristiques associées à une voie d'administration topique sont mentionnées. Les résultats obtenus pourraient permettre d'explorer l'utilisation potentielle des dérivés d'amidoxime dans cette voie, à condition d'une activité prometteuse *in vivo*.

Cette hypothèse peut être envisagée compte tenu de l'activité démontrée des dérivés d'amidoxime contre *L. donovani* et *L. amazonensis*, qui sont en grande partie responsables de la forme cutanée de la maladie.[442]

Les parasites responsables de la leishmaniose cutanée (LC) sont situés dans le derme, ce qui offre la possibilité de traitements localisés. Les traitements topiques sont attrayants car ils minimisent les effets indésirables systémiques et les interactions médicamenteuses tout en étant plus faciles à administrer. Cependant, plusieurs défis majeurs doivent être relevés :

1. **Infection dermique profonde :** Les formulations topiques doivent être conçues pour maximiser la libération et la rétention du médicament dans le derme profond, mais il doit être équilibré pour éviter une élimination rapide du derme supérieur.
2. **Barrière cutanée multilamellaire :** La perméabilité passive de la peau varie en fonction des propriétés physicochimiques du médicament, comme le coefficient de partage, la taille moléculaire et la solubilité. Par exemple, des médicaments comme l'amphotéricine B ou la paromomycine présentent des inconvénients en raison de leur faible perméabilité.
3. **Exemples d'échecs topiques :**
   - Le DNDI-0690 est un dérivé du nitroimidazole qui a montré une activité *in vitro*.[443] Cependant, comme d'autres composés du DNDi présentent de meilleurs profils de sécurité, le développement clinique du DNDI-0690 a été reporté.[444]
   - L'amphotéricine B dans une formulation à usage dermique[445] a montré, malgré sa sécurité d'utilisation, une très faible efficacité en raison de sa perméabilité insuffisante.

2.1.4. Énantiomères

Pour chaque dihydrofurane synthétisé, un centre stéréogène est créé au cours de la réaction de cyclisation, en position 5 (Figure 38). Ainsi, la formation de produits énantiomériquement purs fait partie des variables à considérer. L'exploration de l'effet de l'énantiomérie est une variable qui peut être prise en compte dans les premières étapes des processus d'optimisation. Dans le cadre du présent travail, à la suite des résultats de la pharmacomodulation, la stratégie d'évaluation de cette variable sera envisagée.

[442] R.K. Madusanka, H. Silva, N.D. Karunaweera, Treatment of Cutaneous Leishmaniasis and Insights into Species-Specific Responses: A Narrative Review, Infect Dis Ther 11 (2022) 695–711. https://doi.org/10.1007/s40121-022-00602-2.

[443] K. Van Bocxlaer, K.-N. McArthur, A. Harris, M. Alavijeh, S. Braillard, C.E. Mowbray, S.L. Croft, Film-Forming Systems for the Delivery of DNDI-0690 to Treat Cutaneous Leishmaniasis, Pharmaceutics 13 (2021) 516. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040516.

[444] *Drugs for Neglected Diseases initiative* – DNDi 0690 - Portafolio. https://dndi.org/research-development/portfolio/dndi-0690/ (consulté le 04/09/2024).

[445] L. López, I. Vélez, C. Asela, C. Cruz, F. Alves, S. Robledo, B. Arana, A phase II study to evaluate the safety and efficacy of topical 3% amphotericin B cream (Anfoleish) for the treatment of uncomplicated cutaneous leishmaniasis in Colombia, PLoS Negl Trop Dis 12 (2018) e0006653. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006653.

2.1.5. Espèce de *Leishmania* ciblée

Parmi les espèces du parasite touchant l'homme, *L. amazonensis* représente un important problème de santé publique au Brésil et en Amérique latine en générale. C'est en effet un des principaux agents étiologiques de la leishmaniose tégumentaire (LT) et de la leishmaniose cutanée diffuse (type de LT caractérisé par l'apparition de multiples lésions non ulcéreuses).[446] Rappelons que l'Amérique, les pays du bassin méditerranéen, d'Asie centrale et du Moyen-Orient représentent près de 95 % de la charge mondiale de la leishmaniose cutanée,[447] et que l'efficacité des traitements actuels est de l'ordre des 50 %.[448]

2.1.6. Amidoximes antileishmaniennes

Le développement d'amidoximes antileishmaniennes, possédant un noyau dihydrofurane a été initié par notre équipe au Laboratoire de Pharmaco-Chimie Radicalaire (LPCR) de l'ICR (UMR-CNRS-7273) depuis plusieurs années (Figure 38).

Les composés, portant un groupement amidoxime intégré dans une molécule caractérisée par son noyau dihydrofurane montrent des propriétés antileishmaniennes prometteuses, évaluées sur des souches de *L. donovani* et *L. amazonensis*, avec une CI_{50} de 7,2 µM et 5,4 µM contre la forme promastigote du parasite, respectivement. Pour la forme amastigote intracellulaire, une CI_{50} de 7,9 µM sur *L. amazonensis* a été observée. La stratégie adoptée par le laboratoire a consisté, au départ, à synthétiser des analogues de la pentamidine[449] et de la pafuramidine.[450] En 2002, Clement a montré que les amidoximes pouvaient être utilisées comme des prodrogues des amidines. [451] Nos dérivés présentant des hétérocycles de type 2,3-dihydrofurane (remplaçant le furane dans la pafuramidine) ont été synthétisés par voie radicalaire par Curti,[452] Bouhlel[453] et Tabélé.[454] Leur autre particularité est de ne pas être des prodrogues et d'être directement actifs sur le parasite *in vitro*.

[446] H.O. Valdivia, L.V. Almeida, B.M. Roatt, J.L. Reis-Cunha, A.A.S. Pereira, C. Gontijo, R.T. Fujiwara, A.B. Reis, M.J. Sanders, J.A. Cotton, D.C. Bartholomeu, Comparative genomics of canine-isolated Leishmania (Leishmania) amazonensis from an endemic focus of visceral leishmaniasis in Governador Valadares, southeastern Brazil, Sci Rep 7 (2017) 40804. https://doi.org/10.1038/srep40804.

[447] F.V. Cabral, M. Cerone, S. Persheyev, C. Lian, I.D.W. Samuel, M.S. Ribeiro, T.K. Smith, New insights in photodynamic inactivation of Leishmania amazonensis: A focus on lipidomics and resistance, PLoS ONE 18 (2023) e0289492. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0289492.

[448] DNDI - cutaneous-leishmaniasis : https://dndi.org/diseases/cutaneous-leishmaniasis/facts/ (consulté le 04/09/2024).

[449] M.N. Soeiro, E.M. De Souza, C.E. Stephens, D.W. Boykin, Aromatic diamidines as antiparasitic agents, Expert Opinion on Investigational Drugs 14 (2005) 957–972. https://doi.org/10.1517/13543784.14.8.957.

[450] D.R. Makulu, T.P. Waalkes, Interaction between aromatic diamidines and nucleic acids: possible implications for chemotherapy, J Natl Cancer Inst 54 (1975) 305–309.

[451] B. Clement, reduction of *N*-hydroxylated compounds: amidoximes (n-hydroxyamidines) as pro-drugs of amidines, Drug Metabolism Reviews 34 (2002) 565–579. https://doi.org/10.1081/dmr-120005643.

[452] C. Curti, M.D. Crozet, P. Vanelle, Microwave-assisted manganese(III) acetate based oxidative cyclizations of alkenes with *β*-ketosulfones, Tetrahedron 65 (2009) 200–205. https://doi.org/10.1016/j.tet.2008.10.080.

[453] A. Bouhlel, C. Curti, A. Dumètre, M. Laget, M.D. Crozet, N. Azas, P. Vanelle, Synthesis and evaluation of original amidoximes as antileishmanial agents, Bioorganic & Medicinal Chemistry 18 (2010) 7310–7320. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.06.099.

[454] C. Tabélé, V.D.S. Faiões, F. Grimaud, E.C. Torres-Santos, O. Khoumeri, C. Curti, P. Vanelle, Original antileishmanial hits: Variations around amidoximes, European Journal of Medicinal Chemistry 148 (2018) 154–164. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.02.029.

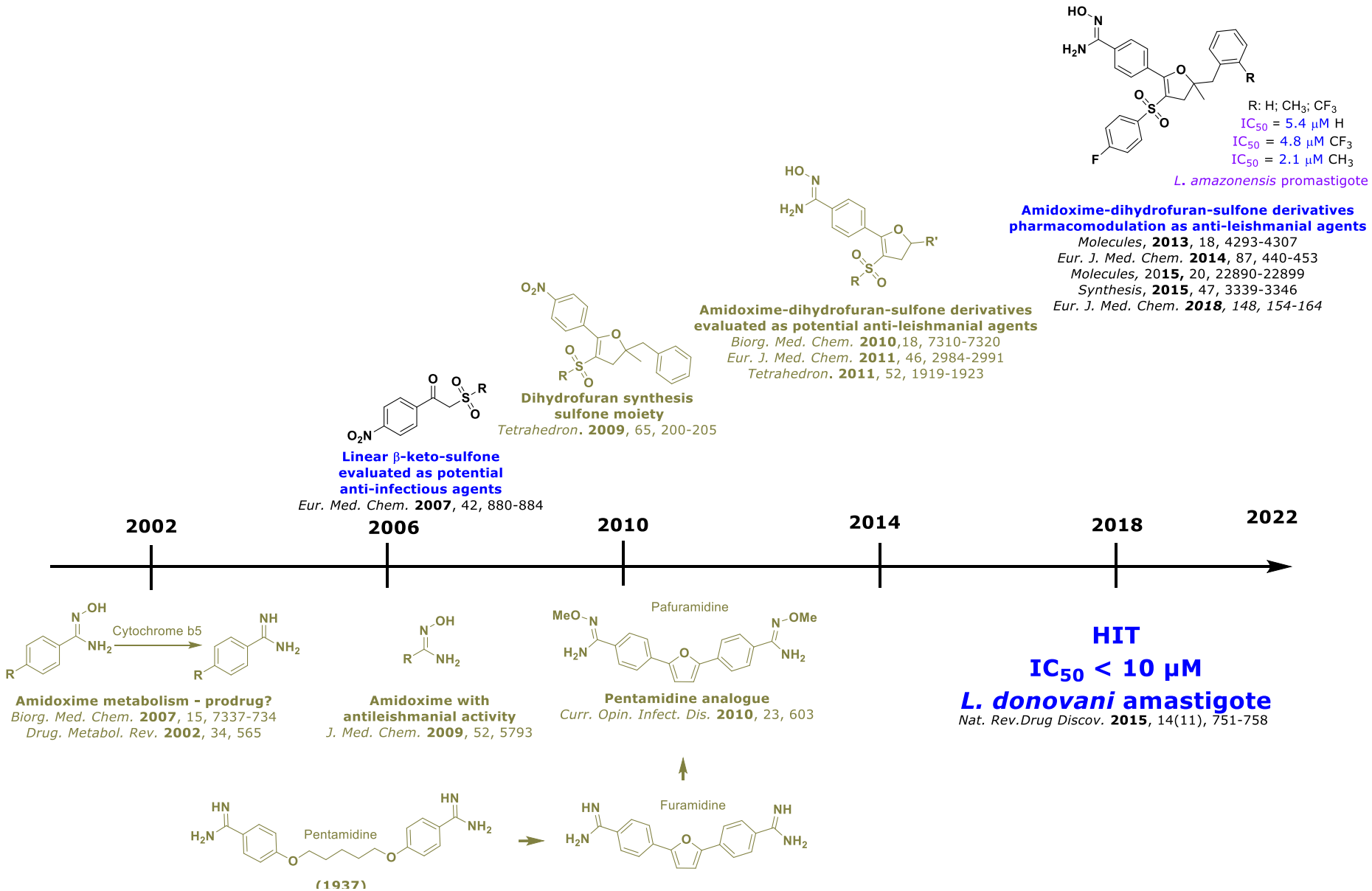


Figure 38. Chronologie du développement des amidoximes antileishmaniennes.

2.1.7. Chimie

- **Formation du noyau dihydrofurane**

La formation du noyau dihydrofurane repose sur des réactions de cyclisation médiées par différents oxydants. Ainsi, différents systèmes ont été décrits pour obtenir le noyau dihydrofurane, notamment par cyclisation de dérivés *β*-dioxo selon les travaux de Snider [455] ou de *β*-cétosulfones selon les études menées par notre équipe.

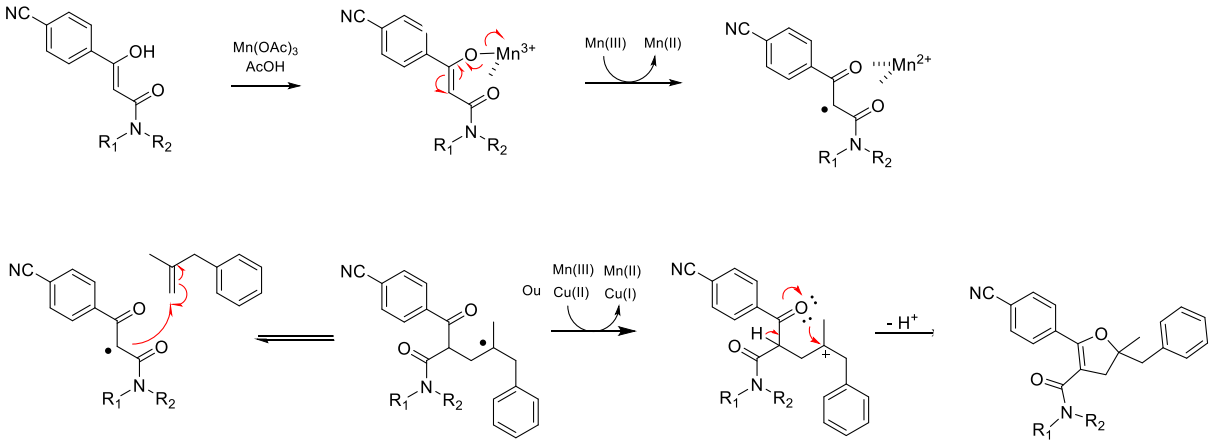


Schéma 1. Mécanisme de réaction plausible de cyclisation oxydative pour former le noyau dihydrofurane.[456]

L'une des méthodes utilisées pour accéder au noyau dihydrofurane implique la cyclisation radicalaire oxydative de substrats *β*-di-carbonylés en présence d'alcènes terminaux, médiée par l'acétate de manganèse(III). Cette méthode est privilégiée, car elle ne nécessite pas de base supplémentaire. L'acétate de manganèse(III) joue à la fois le rôle de catalyseur et d'oxydant. La synthèse de dérivés dihydrofuranes, notamment à partir de dicétones et d'alcènes, a montré des rendements satisfaisants dans des conditions relativement simples : avec l'acide acétique glacial comme solvant, un chauffage à 80°C, et une atmosphère inerte.

Manganèse : La chimie du manganèse (particulièrement l'acétate de manganèse(III)) est largement utilisée en synthèse organique pour ses propriétés oxydantes *via* des mécanismes radicalaires. L'acétate de manganèse(III) est capable de générer des espèces radicalaires à partir de molécules carbonylées contenant des hydrogènes en position *α*, ce qui permet la formation de nouvelles liaisons carbone-carbone.

[455] B.B. Snider, Mechanisms of Mn(OAc)3-based oxidative free-radical additions and cyclizations, Tetrahedron 65 (2009) 10738–10744. https://doi.org/10.1016/j.tet.2009.09.025.

[456] C. Curti, M.D. Crozet, P. Vanelle, Microwave-assisted manganese(III) acetate based oxidative cyclizations of alkenes with β-ketosulfones, Tetrahedron 65 (2009) 200–205. https://doi.org/10.1016/j.tet.2008.10.080.

Le manganèse(III) peut être utilisé directement sous forme d'acétate de manganèse(III) (figure 39A) ou formé *in situ* à partir du permanganate de potassium ($KMnO_4$) (figure 39C).[457] Dans ce cas, des quantités catalytiques de manganèse(III) sont impliquées.

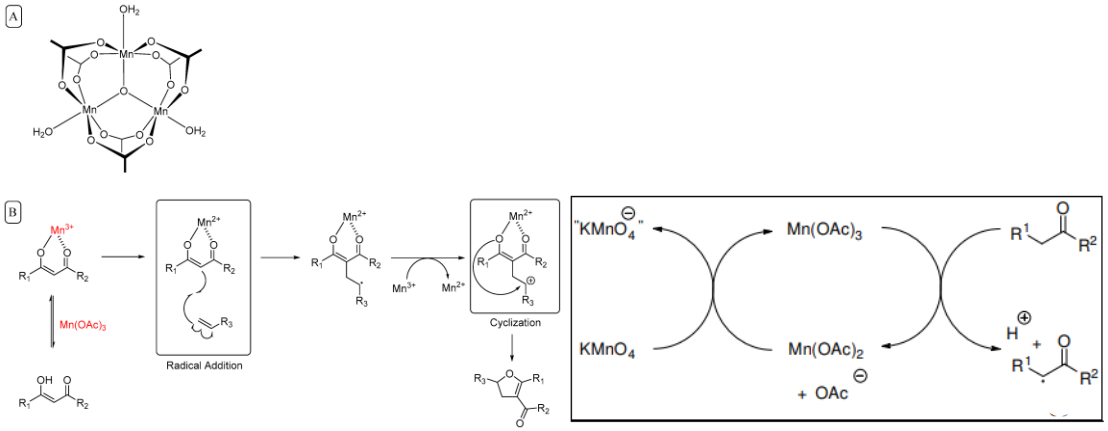


Figure 39. (A) Structure cristalline de l'acétate de manganèse(III), (B) mécanisme de la réaction de transfert d'un électron unique avec l'acétate de manganèse(III),[458] (C) génération de manganèse(III) *in situ*.

L'utilisation du manganèse représente aujourd'hui une alternative très polyvalente dans le domaine de la chimie organique et de la pharmacochimie. Dans les travaux de Biçer et Yilmaz,[458] les avantages suivants ont notamment été mentionnés : globalement, l'acétate de manganèse(III) offre une approche polyvalente et efficace pour former des liaisons C-C. En outre, la cyclisation avec l'acétate de manganèse(III) tend à donner des rendements plus élevés que les autres méthodes (catalyse par le fer, le CAN ou le cuivre, comme décrit ci-dessous). Dans la synthèse de composés naturels, l'acétate de manganèse(III) facilite non seulement la cyclisation, mais permet également une synthèse stéréocontrôlée.[459] L'acétate de manganèse(III) s'avère alors un outil essentiel dans la cyclisation intramoléculaire et intermoléculaire, et permet également l'aromatisation, la polymérisation, le transfert d'halogène, l'oxydation et les réactions de réarrangement, ce qui rationalise le processus et donne des taux de réussite élevés.

Le mécanisme d'oxydation par l'acétate de manganèse(III) implique la génération d'un énolate de manganèse à partir d'une molécule carbonylée (figure 39B). Ce complexe radicalaire s'additionne ensuite à un alcène, formant ainsi une nouvelle liaison C-C. La réaction se poursuit par l'oxydation du radical intermédiaire en carbocation par un deuxième équivalent de Mn (III), conduisant à la fermeture du cycle pour former le dihydrofurane. Cette réaction peut être

[457] T. Linker, Selective reactions of transition-metal-generated radicals, Journal of Organometallic Chemistry 661 (2002) 159–167. https://doi.org/10.1016/S0022-328X(02)01824-7.

[458] E. Biçer, M. Yılmaz, Recent Advances in Manganese(III)-Assisted Radical Cyclization for the Synthesis of Natural Products: A Comprehensive Review, Molecules 29 (2024) 2264. https://doi.org/10.3390/molecules29102264.

[459] D. Yang, X.-Y. Ye, S. Gu, M. Xu, Lanthanide Triflates Catalyze Mn(III)-Based Oxidative Radical Cyclization Reactions. Enantioselective Synthesis of (−)-Triptolide, (−)-Triptonide, and (+)-Triptophenolide, J. Am. Chem. Soc. 121 (1999) 5579–5580. https://doi.org/10.1021/ja9901664.

améliorée par l'ajout de co-oxydants tels que l'acétate de cuivre (II), qui favorisent l'oxydation des radicaux intermédiaires.

Dans le cas des dérivés phosphonylés, la description mécanistique a été laissée ouverte, étant donné que la séquence dans laquelle le processus se déroule n'est pas établie avec certitude, à savoir d'abord l'oxydation puis la cyclisation (voie A, Figure 40), ou le processus inverse (voie B, Figure 40).[460]

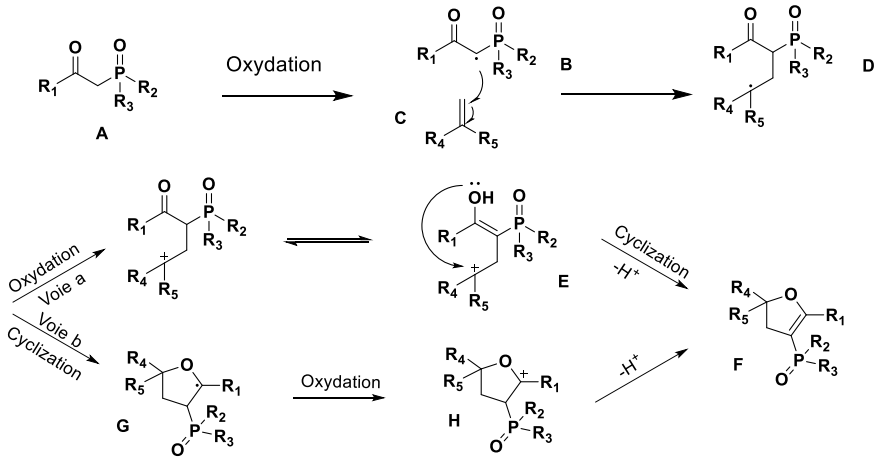


Figure 40. Mécanisme de cyclisation oxydante des 3-phosphonyldihydrofuranes.[461]

Le mécanisme de génération oxydative de radicaux par les métaux de transition a été étudié intensivement au cours des dernières années.[462] Une grande variété de composés acides CH peuvent servir de précurseurs pour de telles réactions, qui produisent des radicaux dans des conditions de transfert d'électrons. Les premières études de Fristad[463] ont montré que le taux de génération de radicaux est corrélé à l'aptitude à former les énolates. Ainsi, les groupements électroattracteurs (CO_2R, CN, NO_2) accélèrent considérablement les réactions.

- **Formation de dihydrofuranes catalysée par le cuivre**

Le cuivre(II), est un autre oxydant utilisé pour des réactions de cyclisation. Des mécanismes similaires sont évoqués, en favorisant l'oxydation des substrats *β*-cétosulfoniques pour faciliter la formation du noyau dihydrofurane. Le cuivre présente l'avantage d'être abondant, peu coûteux et utilisable dans des conditions douces. Il permet également une bonne tolérance vis-à-vis des groupements fonctionnels présents sur le substrat.[464] Un oxydant thermodynamiquement plus

[460] W.E. Fristad, J.R. Peterson, A.B. Ernst, G.B. Urbi, Mechanisms for Manganese(III) Oxidations with Alkenes, Tetrahedron 42 (1986) 3429–3442. https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)87310-5.

[461] G. Lu, B. Lin, Y. Gao, J. Ying, G. Tang, Y. Zhao, Mn(OAc)3-Mediated Synthesis of 3-Phosphonyldihydrofurans from β-Ketophosphonates and Alkenes, Synlett 28 (2016) 724–728. https://doi.org/10.1055/s-0036-1588112.

[462] [1] P. Renaud, M.P. Sibi, eds., Radicals in Organic Synthesis, 1st ed., Wiley, 2001. https://doi.org/10.1002/9783527618293.

[463] [1] W.E. Fristad, J.R. Peterson, A.B. Ernst, G.B. Urbi, Mechanisms for Manganese(III) Oxidations with Alkenes, Tetrahedron 42 (1986) 3429–3442. https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)87310-5.

[464] F.Ş. Kişkan, Copper-catalyzed reactions of β-alkoxy/phenoxy enones with dimethyl diazomalonate, Turkish Journal of Chemistry 47 (2023) 81–87. https://doi.org/10.55730/1300-0527.3519.

faible, le Cu(II), oxyde les radicaux primaires et secondaires environ 350 fois plus rapidement que le Mn(III), ce qui produit des alcènes au lieu de cations.[465]

- **Formation de dihydrofuranes par oxydation au nitrate de cérium ammoniacal (CAN)**

Le nitrate de cérium ammoniacal (CAN) est un oxydant puissant, largement utilisé dans les réactions de cyclisation. Le CAN oxyde rapidement les substrats *β*-dioxo ou *β*-cétosulfones, permettant une cyclisation vers les noyaux dihydrofuranes. Sa réactivité élevée en fait un choix idéal pour des réactions nécessitant une oxydation rapide, bien que son utilisation demande parfois un contrôle plus précis pour éviter les réactions secondaires indésirables.[466]

- **Formation de dihydrofuranes catalysée par le fer**

Les sels de fer, tels que le chlorure de Fe(III), sont aussi utilisés comme oxydants dans des réactions de cyclisation. Le Fe(III) est souvent employé en raison de sa disponibilité, de sa faible toxicité et de son coût modéré par rapport à d'autres oxydants.[467]

2.2. Stratégies spécifiques au projet

2.2.1. Objectif spécifique

Notre projet vise en priorité à apporter des modifications structurelles afin d'optimiser le composé HIT, en améliorant l'activité biologique ou les propriétés physicochimiques en vue d'une utilisation orale et humaine. La Figure 41 présente le composé de référence, ainsi qu'une synthèse des relations structure-activité connues. Compte tenu des études de pharmacomodulation précédentes, les modifications en position 3 ont été prioritaires, en remplaçant le groupement sulfone :

[465] Y. Chen, H. Wang, Y. Wang, Y. Luo, H. Zhu, P. Xu, Base- and Copper-Catalyzed Intramolecular Cyclization for the Direct Synthesis of Dihydrofurans, Adv Synth Catal 352 (2010) 1163–1168. https://doi.org/10.1002/adsc.201000005.

[466] J. Světlík, F. Tureček, K. Hartwich, K. Kozieł, P. Pakulski, A. Pałasz, J. Kalinowska-Tłuścik, D. Cież, Cerium(IV) based oxidative free radical cyclization of active methylene compounds with some cyclic alkenes: A useful annulation method for terpene functionalization, Tetrahedron 75 (2019) 2652–2663. https://doi.org/10.1016/j.tet.2019.03.039. [2] V. Nair, L. Balagopal, R. Rajan, J. Mathew, Recent Advances in Synthetic Transformations Mediated by Cerium(IV) Ammonium Nitrate, Acc. Chem. Res. 37 (2004) 21–30. https://doi.org/10.1021/ar030002z.

[467] Q.-Q. Kang, Y.-N. Meng, J.-H. Zhang, L. Li, G.-P. Ge, H. Zheng, H. Liu, W.-T. Wei, Iron-catalyzed oxidative cyclization of olefinic 1,3-dicarbonyls with ketone C(sp 3)–H bonds: facile access to 2,3-dihydrofurans, New J. Chem. 45 (2021) 13639–13643. https://doi.org/10.1039/D1NJ02378K.

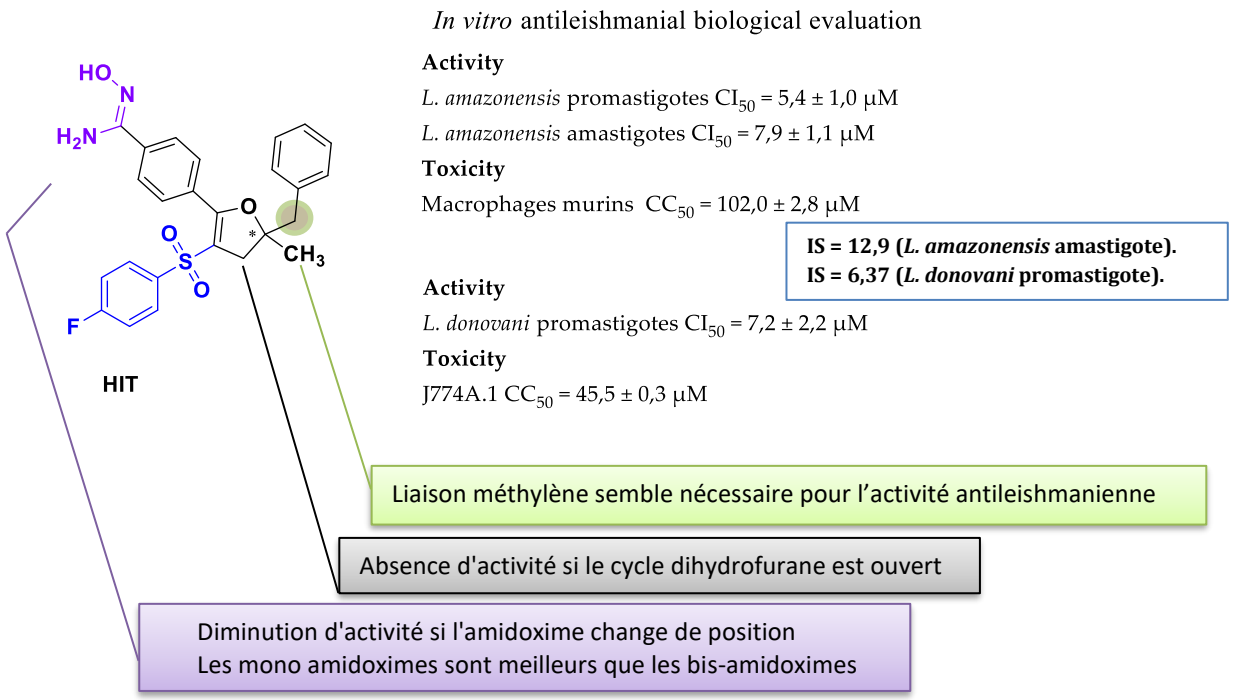


Figure 41. Amidoxime HIT et influence des substituants.

2.2.2. L'approche de la méthode de recherche

Une approche basée sur le ligand (c'est-à-dire sur la structure du composé Hit lui-même) a été rendue nécessaire du fait de l'absence de mécanisme d'action identifié ou de récepteurs connus. Des stratégies telles que « la méthode de similarité » ont été sélectionnées.

2.2.3. Biologie

Des souches de *L. amazonensis*, ont été soumises à un criblage phénotypique *in vitro*, d'abord contre la forme promastigote.

Ensuite, l'évaluation contre la forme amastigote et l'évaluation de la toxicité ont été effectuées avec les meilleurs composés contre la forme promastigote. Une référence d'activité avec une concentration de 10 µM a été pris en compte pour discriminer les molécules. Cette concentration est considérée comme une référence, mais pas comme un critère absolu.

Ces stratégies sont résumées dans la figure 42.

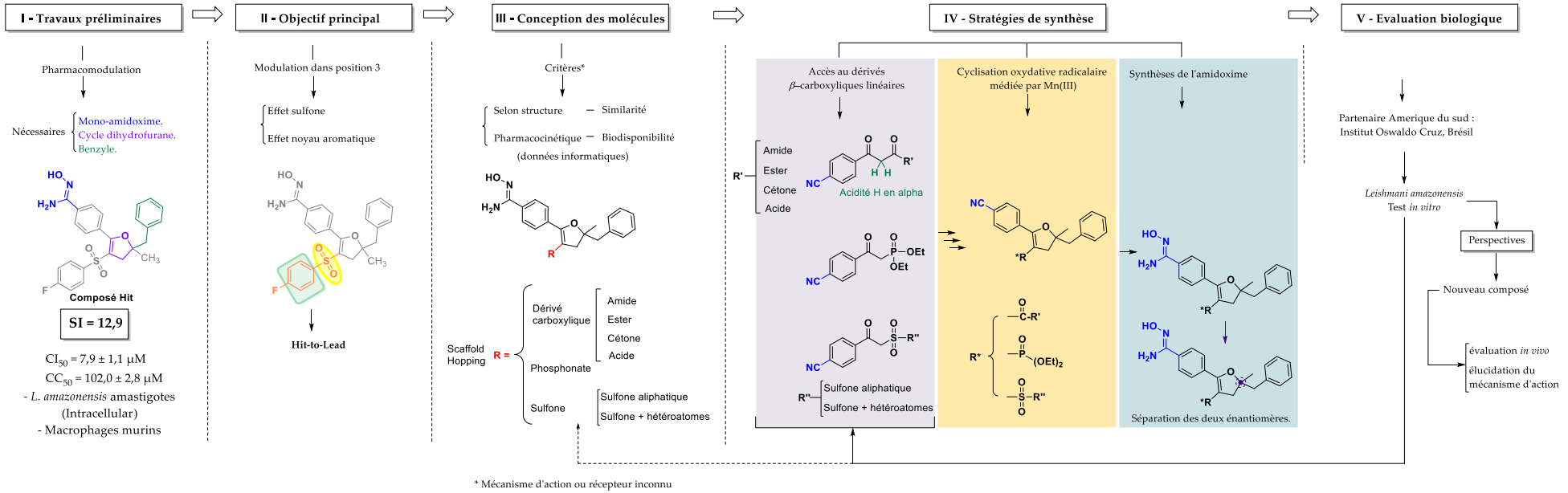


Figure 42. Stratégies de synthèse. Modification en position 3 du noyau dihydrofurane : Dérivés carbonyles, phosphonate et sulfone aliphatique.

3. Résultats et discussions

Pour une meilleure organisation des résultats obtenus, les travaux publiés ou soumis pour publication sont présentés en premier, suivis des travaux en attente de finalisation des tests *in vitro*. L'activité biologique consolidée des composés évalués a été répartie en deux grandes séries, une aliphatique et une aromatique, et une troisième série a été également réalisée avec des modifications diverses.

Par la suite, une autre série de composés a été synthétisée sur demande de l'équipe de FIOCRUZ, qui s'intéressait à l'évaluation biologique de dérivés nitro-substitués.

3.1. Effet du groupement phosphonate

En termes de synthèse, le dérivé *β*-céto-phosphonate correspondant a été préparé par une réaction connue sous le nom de réaction d'Arbuzov, accompagnée de la formation d'un produit secondaire dénommé "produit de Perkow". La réaction de cyclisation radicalaire oxydative puis l'obtention de l'amidoxime ont été réalisées avec un rendement modéré.

Concernant l'activité biologique, elle a été évaluée *in vitro* contre la forme promastigote de *L. amazonensis* et s'est avérée être largement inférieure (CI_{50} = 91,1 ± 1,06 µM) à celle du HIT sulfone (CI_{50} = 5,4 ± 1,0 µM).

Ce travail a fait l'objet de la publication ci-dessous :

Diethyl (5-Benzyl-2-(4-(N′-hydroxycarbamimidoyl)phenyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-3-yl)phosphonate

by Oscar Leonardo Avendaño Leon [1], Christophe Curti [1], Fabiana Maia Santos Urbancg Moncorvo [2], Youssef Kabri [1], Sébastien Redon [1], Eduardo Caio Torres-Santos [2],Romain Paoli-Lombardo [1] and Patrice Vanelle [1,*]

[1] Aix Marseille Univ, CNRS, ICR UMR 7273, Equipe Pharmaco-Chimie Radicalaire, Faculté de Pharmacie, 27 Boulevard Jean Moulin, CS30064, CEDEX 05, 13385 Marseille, France

[2] Laboratório de Bioquímica de Tripanossomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Av. Brasil, 4365, Rio de Janeiro 21040-900, Brazil

*Author to whom correspondence should be addressed.

Molbank **2023**, *2023(4)*, M1736; https://doi.org/10.3390/M1736

Submission received: 11 September 2023 / Revised: 6 October 2023 / Accepted: 11 October 2023 / Published: 13 October 2023

Correction : Dans la description du spectre RMN ^{13}C du compose 2', une erreur involontaire a entraîné leur enregistrement partiel dans la publication. Néanmoins, nous soulignons que la description complète et correcte est disponible dans les *Informations Supplémentaires* de la publication : ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 150.7 (d, *J* = 7.4 Hz, C), 138.7 (d, *J* = 6.6 Hz, C), 132.4 ($2CH_{Ar}$), 125.9 ($2CH_{Ar}$), 118.6 (C), 112.7 (C), 100.7 (d, *J* = 3.7 Hz, CH_2), 65.0 (d, *J* = 6.2 Hz, $2CH_2$), 16.2 (d, *J* = 6.8 Hz, $2CH_3$).

molbank

MDPI

Short Note

Diethyl (5-Benzyl-2-(4-(*N*′-hydroxycarbamimidoyl)phenyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-3-yl)phosphonate

Oscar Leonardo Avendaño Leon [1], Christophe Curti [1], Fabiana Maia Santos Urbancg Moncorvo [2], Youssef Kabri [1], Sébastien Redon [1], Eduardo Caio Torres-Santos [2], Romain Paoli-Lombardo [1] and Patrice Vanelle [1,*]

[1] Aix Marseille Univ, CNRS, ICR UMR 7273, Equipe Pharmaco-Chimie Radicalaire, Faculté de Pharmacie, 27 Boulevard Jean Moulin, CS30064, CEDEX 05, 13385 Marseille, France; oscar-leonardo.avendano-leon@etu.univ-amu.fr (O.L.A.L.); christophe.curti@univ-amu.fr (C.C.); youssef.kabri@univ-amu.fr (Y.K.); sebastien.redon@univ-amu.fr (S.R.); romain.paoli-lombardo@univ-amu.fr (R.P.-L.)

[2] Laboratório de Bioquímica de Tripanossomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Av. Brasil, 4365, Rio de Janeiro 21040-900, Brazil; fabianamaia.santos@gmail.com (F.M.S.U.M.); ects@ioc.fiocruz.br (E.C.T.-S.)

* Correspondence: patrice.vanelle@univ-amu.fr; Tel.: +33-4-9183-5580

Abstract: As part of our ongoing research into the antileishmanial properties of amidoxime derivatives, we report a preliminary assessment of the antiparasitic properties of a novel compound, diethyl (5-benzyl-2-(4-(*N*′-hydroxycarbamimidoyl)phenyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-3-yl)phosphonate. This compound was evaluated in vitro for the first time against the promastigote form of *Leishmania amazonensis*. Compounds containing both amidoxime and phosphonyl functional groups in dihydrofuran scaffolds are relatively rare, despite the extensive study of this heterocycle in various biological applications. Therefore, this work makes a valuable contribution to the fight against *Leishmania* spp. as a neglected disease. The cyclized 4,5-dihydrofuran intermediate scaffold was obtained via a three-step synthetic route that had previously been developed for accessing other derivatives, including the sulfone moiety. This synthesis was performed using a manganese-based free radical oxidative method under microwave irradiation. The intermediary 4,5-dihydrofuran, which included a nitrile group, tolerated the subsequent reaction with hydroxylamine hydrochloride, resulting in the formation of the target product. The target compound showed moderate activity in vitro against the promastigote form of *L. amazonensis* (IC_{50} = 91.1 μM).

Keywords: amidoxime; 4,5-dihydrofuran-phosphonyl derivative; leishmaniasis; microwave irradiation

check for updates

Citation: Avendaño Leon, O.L.; Curti, C.; Santos Urbancg Moncorvo, F.M.; Kabri, Y.; Redon, S.; Torres-Santos, E.C.; Paoli-Lombardo, R.; Vanelle, P. Diethyl (5-Benzyl-2-(4-(*N*′-hydroxycarbamimidoyl)phenyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-3-yl)phosphonate. *Molbank* **2023**, *2023*, M1736. https://doi.org/10.3390/M1736

Academic Editor: R. Alan Aitken

Received: 11 September 2023
Revised: 6 October 2023
Accepted: 11 October 2023
Published: 13 October 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Leishmaniasis is a neglected tropical disease caused by a protozoan of the genus *Leishmania*. This parasitic infection affects nearly a billion people in over 90 countries worldwide, with up to 1 million new cases and 30,000 deaths estimated annually [1]. Conventional antileishmanial treatments available on the market have clinical limitations such as toxicity, drug resistance, or high cost (pentamidine, antimonials, amphotericin B, and miltefosine) [2]. Additionally, the three major clinical forms (cutaneous, mucocutaneous, and visceral leishmaniasis) can cause significant medical issues and even be fatal in the absence of treatment [3]. In this context, the research to find new cost-effective compounds designed for oral use is currently highly relevant.

Among heterocyclic compounds, dihydrofurans are important scaffolds that frequently appear in natural products [4] and are extensively studied in various biological applications, serving as intermediates in organic synthesis [5]. However, the derivatives of dihydrofuran derivatives bearing both the phosphonyl and amidoxime groups are relatively rare [6]. Thus, this work contributes to the efforts to combat *Leishmania* spp. As a neglected dis-

ease by providing preliminary information on the in vitro biological activity of the target compound against the promastigote form of *Leishmania amazonensis* for the first time.

The amidoxime functional group has demonstrated potential for pharmaceutical applications, particularly in their antiparasitic activity against *Leishmania* spp. [7]. As a part of our research program, the hit molecule 4-(5-benzyl-3-((4-fluorophenyl)sulfonyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-*N*′-hydroxybenzimidamide (**Hit 1**) was reported with promising activity (Figure 1) and obtained via a three-step synthetic route involving oxidative free radical cyclization mediated using manganese (III) acetate. [8]. In this work, given that phosphorus modification is widely employed in drug design to modulate selectivity or bioavailability [9], the replacement of the sulfone moiety at position **3** with a phosphate derivative (**A**) was considered useful for modulating physicochemical properties (e.g., aqueous solubility or Log P) with the expectation of an oral administration. Hence, our interest lies in verifying if the antiparasitic activity is retained.

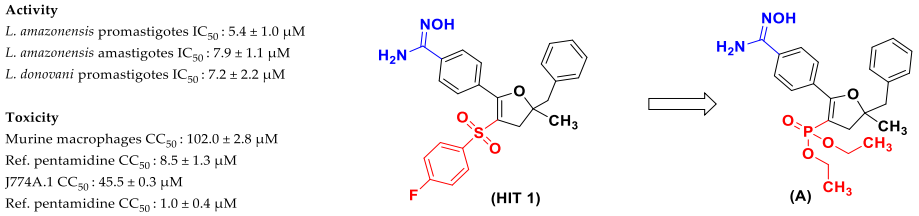
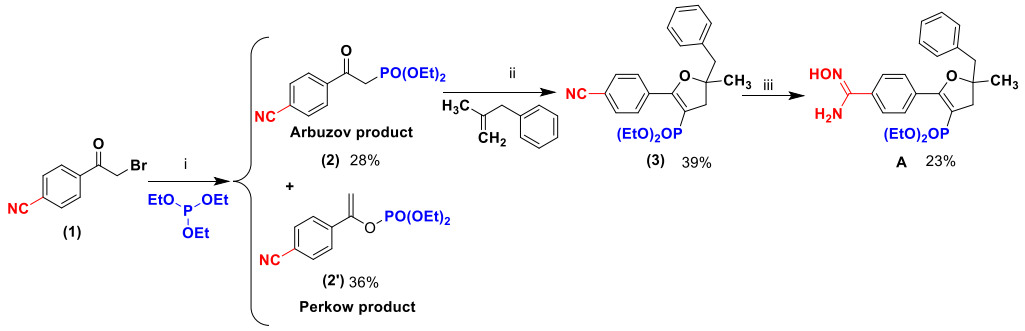


Figure 1. Antileishmanial amidoxime compounds.

2. Results and Discussion

2.1. Synthesis

Using a synthetic route previously developed in our team to access dihydrofuran derivatives [7], diethyl (5-benzyl-2-(4-(*N*′-hydroxycarbamimidoyl)phenyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-3-yl)phosphonate was obtained via a three-step synthesis (Scheme 1).



Scheme 1. Synthesis of compound **A**, a 4,5-dihydrofuran scaffold bearing a phosphonyl group in position 3. Reagents and conditions: (i) triethyl phosphite (1 equiv.), 120 °C, 18 h. (ii) (2-methylallyl)benzene (2 equiv.), $Mn(OAc)_3$ (2.1 equiv.), $Cu(Oac)_2$ (1 equiv.), AcOH, MW, 80 °C, 2.5 h. (iii) *t*BuOK (10 equiv.), NH_2OH-HCl (10 equiv.), DMSO, 18 h, 0 °C to RT, N_2.

A Michaelis-Arbuzov reaction was performed with 4-(2-bromoacetyl)benzonitrile (**1**) and triethyl phosphite to yield diethyl (2-(4-cyanophenyl)-2-oxoethyl)phosphonate (**2**). Subsequently, a cyclization reaction leading to diethyl (5-benzyl-2-(4-cyanophenyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-3-yl)phosphonate (**3**) was performed via a microwave-mediated reaction on a mixture of **2**, manganese (III) acetate (2.1 equiv.) and 2-methyl-3-phenyl-1-propene (2 equiv.). Finally, compound **3** was subjected to a reaction with a substantial excess of hydroxylamine hydrochloride and potassium *tert*-butoxide in DMSO, yielding the intended amidoxime derivative **A**.

The reaction to obtain **2** was limited by the formation of a by-product identified as a vinyl phosphate Perkow product (**2′**) [10]. This is concordant with the literature; the Arbuzov reaction yield is often described as decreased via a concomitant Perkow side reaction [11].

2.2. Biological Activity

The biological activity of compound **A** was evaluated in vitro against the promastigote form of *L. amazonensis* and showed moderate activity IC_{50} = 91.1 ± 1.06 μM. compared with HIT 1 (IC_{50} = 5.4 ± 1.0 μM). Cytotoxicity tests were not performed for this compound because the activity is notably far from the 10 μM of reference [12].

3. Materials and Methods

3.1. Chemistry

Reagents were purchased from Sigma-Aldrich (3050 Spruce Street St. Louis, MO, 63103, USA), Fluorochem (Unit 14 Graphite Way, Hadfield, Glossop SK13 1QH, UK), Fisher Scientific (168 3rd Ave, Waltham, MA 02451, USA), or TCI chemicals (9211 North Harborgate Street, Portland, OR 97203, USA) and used without further purification. Microwave reactions were performed using monomode reactors: Biotage Initiator® classic (Uppsala, Sweden) in sealed vials with output power from 0 to 400 W. The following adsorbent was used for column chromatography: silica gel 60 (Merck KgaA, Darmstadt, Germany, particle size 0.063–0.200 mm, 70–230 mesh ASTM). Reaction monitoring of intermediary compounds **2**, **2′**, and **3** was performed either using aluminum TLC plates (5 × 5 cm) with silica gel coated 60F-254 (Merck) in an appropriate eluent and visualized using ultraviolet light in a UV-Lamp VL-6.CL., 254 nm (6 W) and 365 nm (6 W) or using an LC-MS apparatus Thermo Scientific Accela High Speed LC System® coupled to a Thermo MSQ Plus® quadrupole mass spectrometer, with an HPLC column Thermo Hypersil Gold® (168 3rd Ave, Waltham, MA 02451, USA) 50 × 2.1 mm (C_{18} bounded), with particles of a diameter of 1.9 mm. The volume of sample injected into the column was 1 μL. Chromatographic analysis, total duration of 8 min, was on the gradient of the following solvents: t = 0 min, methanol/water 50:50; 0 < t < 4 min, linear increase in the proportion of methanol to a methanol/water ratio of 95:5; 4 < t < 6 min, methanol/water 95:5; 6 < t < 7 min, linear decrease in the proportion of methanol to return to a methanol/water ratio of 50:50; 6 < t < 7 min, methanol/water 50:50. The water used was buffered with ammonium acetate 5 mM. The flow rate of the mobile phase was 0.3 mL/min.

Low-resolution mass spectra were recorded for products **2**, **2′**, **3**, and **A**, in an Agilent SQ G6120B mass spectrometer (5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, CA 95051, USA) in positive and negative electrospray mode using liquid chromatography with Diode-Array Detection at 254 nM, column Agilent Poroshell (5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, CA 95051, USA) 120 EC-C18 2.7 μm (4.6 × 50 mm), mobile phase (A: H_2O + 0.1% Formic acid, B: MeCN + 0.1% Formic acid), method flow rate 0.5 mL/min, time/%B 0/10, 5/100, 9/100, at the Faculté de Pharmacie of Marseille.

The high-resolution mass spectrum of compound **A** was recorded on an SYNAPT G2 HDMS (Waters, 34 Maple St., Milford, MA 01757, USA) equipped with a pneumatically assisted atmospheric pressure ionization (API) source. The sample was ionized in positive electrospray mode under the following conditions: electrospray voltage: 2.8 kV; orifice voltage: 20 V; nebulizing gas flow rate (nitrogen): 100 L/h. The sample was dissolved in 300μL of dichloromethane and then diluted 1:103 in a solution of methanol with 3 mM ammonium acetate. The extract solution was introduced into the ionization source via infusion at a flow rate of 10 μL/min. Exact mass measurement was performed in triplicate with external calibration. HRMS was performed at the Faculté des Sciences de Saint-Jérôme (Marseille).

NMR spectra were recorded on a Bruker Avance NEO 400 MHz NanoBay spectrometer at the Faculté de Pharmacie of Marseille. Residual ^1H and ^{13}C peaks in deuterated solvents ($CDCl_3$ and DMSO-d_6) were used for chemical shift calibration without the need for an additional internal standard. ^1H NMR: reference $CDCl_3$ δ = 7.26 ppm, reference DMSO-d_6 δ = 2.50 ppm and ^{13}C NMR: reference $CDCl_3$ δ = 77.16 ppm, reference DMSO-d_6 δ = 39.52 ppm. Data for ^1H NMR are reported as follows: chemical shifts (δ) in parts per million (ppm), multiplicity (described as follows: s, singlet; bs, broad singlet; d, doublet; t, triplet; q, quadruplet; dd, doublet of doublet; ddd, doublet of doublet of doublet;

m, multiplet), coupling constants (*J*) in Hertz (Hz) and integration. Data for ^{13}C NMR are reported as follows: chemical shifts (δ) in parts per million (ppm).

Diethyl (2-(4-cyanophenyl)-2-oxoethyl)phosphonate (**2**)

The Michaelis–Arbuzov reaction was performed in a round-bottom flask dried, mixing 4-(2-bromoacetyl)benzonitrile (2 g, 8.92 mmol, 1 equiv.) and triethyl phosphite (1 equiv.) and heated at 120 °C for 18 h. The TLC monitoring reaction was performed using DCM-AcOEt (4:1) as eluent and visualized with ultraviolet light in a UV-Lamp VL-6.CL., 254 nm (6 W), with a retardation factor of 0.28, and verified via low-resolution LC-MS. The mixture was allowed to cool down to room temperature and concentrated in vacuo. The crude product was purified via column chromatography (silica gel; eluent: dichloromethane/cyclohexane/AcOEt 80/10/10) affording the title product. Yield 28% (678 mg). The product was obtained in the keto form principally, with traces of enol form as an orange oily solid. The NMR data were in agreement with the literature values [13,14] (Supplementary Materials). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.12 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.8 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.78 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.8 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 4.18–4.09 (m, 4H, $2CH_2$), 3.63 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 22.9 Hz, 2H, CH_2), 1.28 (t, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 7.1 Hz, 6H, $2CH_3$). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 190.9 (d, $J_{P\text{-}C}$ = 6.6 Hz, C), 139.5 (C), 132.6 ($2CH_{Ar}$), 129.6 ($2CH_{Ar}$), 117.9 (C), 117.0 (C), 63.1 (d, $J_{P\text{-}C}$ = 6.8 Hz, $2CH_2$), 39.2 (d, $J_{P\text{-}C}$ = 131.5 Hz, CH_2), 16.3 (d, $J_{P\text{-}C}$ = 6.0 Hz, $2CH_3$). $C_{13}H_{16}NO_4P$: LC/MS ESI+ t_R 4.45 min, (*m*/*z*) $[M + H]^+$ 281.25/282.70.

1-(4-Cyanophenyl)vinyl diethyl phosphate (**2′**)

The Perkow product was achieved with the same method to obtain 2. The TLC monitoring reaction was performed using DCM-AcOEt (4:1) as eluent and visualized with ultraviolet light in a UV-Lamp VL-6.CL., 254 nm (6 W), with a retardation factor of 0.63, and verified via low-resolution LC-MS. The crude product was purified via column chromatography (silica gel; eluent: dichloromethane/cyclohexane/AcOEt 40/50/10) affording the title product. Yield 36% (875 mg). The product was obtained as a brown oily solid. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 7.72–7.62 (m, 4H, $4CH_{Ar}$), 5.45–5.38 (m, 2H, CH_2), 4.29–4.15 (m, 4H, $2CH_2$), 1.35 (td, $J_{H\text{-}H}$ = 1.2 Hz, $J_{H\text{-}H}$ = 7.2 Hz, 6H, $2CH_3$). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 150.7 (d, *J* = 7.4 Hz, C), 138.7 (d, *J* = 6.6 Hz, C), 132.4 ($2CH_{Ar}$), 125.9 ($2CH_{Ar}$). $C_{13}H_{16}NO_4P$: LC/MS ESI+ t_R 5.10 min, (*m*/*z*) $[M + H]^+$ 281.25/282.60.

Diethyl (5-benzyl-2-(4-(N′-hydroxycarbamimidoyl)phenyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-3-yl)phosphonate (**3**)

In a microwave vial of 20 mL equipped with a stirring bar, a solution of manganese (III) acetate dihydrate (2.1 equiv.) and copper (II) acetate (1 equiv.) in 12 mL of glacial acetic acid was heated at 80 °C under microwave irradiation for 15 min. Then, the reaction mixture was cooled and compound **2** (300 mg, 1.07 mmol, 1 equiv.) and 2-methyl-3-phenyl-1-propene (2 equiv.) in 13 mL of acetic acid was added. The reaction mixture was heated for 2.5 h under microwave irradiation under the same conditions. The TLC monitoring reaction was performed using DCM-AcOEt (4:1) as eluent and visualized with ultraviolet light in a UV-Lamp VL-6.CL., 254 nm and 365 nm (6 W), with a retardation factor of 0.58, and verified via low-resolution LC-MS. The resulting product was poured into 50 mL of cold water and extracted with dichloromethane (3 × 40 mL). The organic extracts were collected and washed with saturated aqueous $NaHCO_3$ (3 × 40 mL) and dried over Na_2SO_4. The solvent was evaporated under reduced pressure, and the crude product was purified via column chromatography (silica gel; eluent: dichloromethane/MeOH 98/2) affording the title product as a yellow oily solid, Yield 39% (171 mg). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.91 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.4 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.65 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.4 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.31–7.19 (m, 5H, CH), 3.97–3.68 (m, 4H, $2CH_2$), 3.06 (dd, $^{4}J_{H\text{-}H}$ = 3.4 Hz, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 15.3 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.00 (dd, $^{4}J_{H\text{-}H}$ = 14.1 Hz, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 40.1 Hz, 2H, H-(CH_2)), 2.80 (dd, $^{4}J_{H\text{-}H}$ = 3.3 Hz, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 15.5 Hz, 1H, H-(CH_2)), 1.50 (s, 3H, CH_3), 1.18 (t, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 7.0 Hz, 3H, CH_3), 1.13 (t, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 7.0 Hz, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 161.7 (d, *J* = 26.2 Hz, C), 136.5 (C), 134.5 (C), 131.7 ($2CH_{Ar}$), 130.6 ($2CH_{Ar}$), 129.6 ($2CH_{Ar}$), 128.4 ($2CH_{Ar}$), 127.0 (CH_{Ar}), 118.7 (C), 113.6 (C), 97.3 (d, *J* = 213.8 Hz, C), 88.1 (d, *J* = 11.8 Hz, C), 61.7 (t, *J* = 6.3 Hz, $2CH_2$), 46.8 (CH_2), 44.3 (d, *J* = 8.6 Hz, CH_2), 27.1 (CH_3), 16.3 (t, *J* = 6.4 Hz, $2CH_3$). ^{31}P NMR

(161.9 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 17.0. $C_{23}H_{26}NO_4P$: LC/MS ESI+ t_R 6.23 min, (*m*/*z*) [M + H] + 412.51. $[M + H]^+$ 411.16/411.60.

Diethyl (5-benzyl-2-(4-(N′-hydroxycarbamimidoyl)phenyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-3-yl)phosphonate (**A**)

A suspension of hydroxylamine hydrochloride (10 equiv.) in DMSO was stirred under inert atmosphere and cooled to 0 °C. Potassium *tert*-butoxide (10 equiv.) was added gradually, and the reaction mixture was stirred for 30 min. Then, compound **3** was added (160 mg, 0.38 mmol, 1 equiv.), and the reaction mixture was stirred for 18 h at room temperature. The TLC monitoring reaction was performed using DCM-MeOH (95:5) as eluent and visualized with ultraviolet light in a UV-Lamp VL-6.CL., 254 and 365 nm (6 W), with a retardation factor of 0.55, and verified via low-resolution LC-MS. The resulting mixture was poured into cold water. Then, the reaction mixture was extracted with EtOAc (3 × 15 mL), and the organic layers were combined, washed with water (1 × 20 mL), brine (1 × 20 mL), dried over Na_2SO_4, and concentrated. The crude product was purified via column chromatography (eluent: dichloromethane/MeOH 98/2), Rf 0.32. Yield 23% (40 mg). The product was obtained as a yellow solid and verified via HRMS. Mp 110–111 °C. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ (ppm) 9.82 (s, 1H, OH), 7.77–7.66 (m, 4H, $4CH_{Ar}$), 7.33–7.17 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 5.96 (br s, 2H, NH_2), 3.83–3.68 (m, 2H, CH_2), 3.65–3.54 (m, 2H, CH_2), 3.01 (q, $J_{H\text{-}H}$ = 16.5 Hz, 2H, CH_2), 2.93 (dd, $^4J_{H\text{-}H}$ = 2.9 Hz, $^2J_{H\text{-}H}$ = 15.2 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.70 (dd, $^4J_{H\text{-}H}$ = 2.8 Hz, $^2J_{H\text{-}H}$ = 15.3 Hz, 1H, H-(CH_2)), 1.44 (s, 3H, CH_3), 1.08 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.0 Hz, 3H, CH_3), 1.01 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.0 Hz, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 163.5 (d, *J* = 26.2 Hz, C), 152.5 (C), 136.6 (C), 133.6 (C), 131.8 (C), 130.6 ($2CH_{Ar}$), 129.2 ($2CH_{Ar}$), 128.3 ($2CH_{Ar}$), 126.8 (CH_{Ar}), 125.4 ($2CH_{Ar}$), 94.8 ((d, *J* = 214.7 Hz, C), 87.6 (d, *J* = 11.8 Hz, C), 61.6 (t, *J* = 6.3 Hz, $2CH_2$), 46.8 (CH_2), 44.3 (d, *J* = 8.6 Hz, CH_2), 27.1 (CH_3), 16.3 (t, *J* = 6.4 Hz, $2CH_3$). ^{31}P NMR (161.9 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 17.0. $C_{23}H_{29}N_2O_5P$: LC/MS ESI+ t_R 5.14 min, *(m/z)* $[M + H]^+$ 444.47/445.90; HRMS: *m*/*z* $[M + H]^+$ calculated 445.1887; found 445.1884.

3.2. Biology

3.2.1. Parasites

Leishmania amazonensis (MHOM/BR/77/LTB0016) was maintained as promastigotes at 26 °C in Schneider's insect medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) with 10% heat-inactivated fetal calf serum (HIFCS), 100 µg/mL streptomycin and 100 U/mL penicillin. Parasites were maintained until the 10th passage; subsequently, new cultures were obtained from infected animals.

3.2.2. Antipromastigote Activity

L. amazonensis promastigotes were cultivated in Schneider's insect medium supplemented with 10% HIFCS, as indicated above, in either absence or presence of different concentrations of the substances. Culture was initiated with 1.0×10^6 cells/mL and maintained at 26 °C for 72 h. Cell viability was estimated via reduction of resazurin. The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) was determined via logarithmic regression analysis using GraphPrism 5 software.

4. Conclusions

We reported the synthesis of diethyl (5-benzyl-2-(4-(*N′*-hydroxycarbamimidoyl) phenyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-3-yl)phosphonate. This dihydrofuran derivative, which bears a phosphonyl and an amidoxime group, showed low in vitro activity against the promastigote form of *L. amazonensis* compared to previously identified **Hit 1**. This compound was obtained with a synthetic route that demonstrates the versatility of $Mn(OAc)_3$ to perform the cyclization of β-ketophosphonate type substrate under microwave irradiation and access to the dihydrofuran scaffold in moderate yield. This information may be useful in further structure–activity relationship analysis either for an antileishmanial activity or for other biological applications of the 4,5-dihydrofuran derivatives.

Supplementary Materials: The following are available online, Figure S1: LC-MS spectra of compounds **2** and **2′**. Figure S2: LC-MS spectra of compound **3**. Figure S3: LC-MS spectra of compound **A**. Figure S4: HRMS spectra of compound A. Figures S5–S12: ^{1}H NMR and ^{13}C NMR spectra of compounds **2**, **2′**, **3** and **A**.

Author Contributions: Conceptualization, O.L.A.L., C.C., Y.K., S.R. and P.V.; methodology, O.L.A.L., C.C., Y.K., S.R., F.M.S.U.M. and E.C.T.-S.; formal analysis, O.L.A.L., C.C., Y.K., S.R., F.M.S.U.M. and E.C.T.-S.; investigation, O.L.A.L., C.C., Y.K., S.R., F.M.S.U.M. and E.C.T.-S.; resources, C.C., O.L.A.L., E.C.T.-S. and P.V.; writing—original draft preparation, O.L.A.L.; writing—review and editing, O.L.A.L., C.C., Y.K., S.R., R.P.-L. and P.V.; visualization, O.L.A.L., C.C., Y.K., S.R., R.P.-L. and P.V.; supervision, C.C., E.C.T.-S. and P.V.; project administration, P.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Ph.D. Student Oscar Leonardo AVENDANO LEON was funded by COLCIENCIAS—Ministry of Science, Technology and Innovation of Colombia, Government Resolution 071 Janvier 2021—call for PhD applications 885-2020. The antileishmanial study was supported by the Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: Aix Marseille Université and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) are gratefully acknowledged for financial support. E.C.T.-S. thanks CNPq for the research productivity scholarship.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Samples of the compounds are available from the authors.

References

1. World Health Organization (WHO). World Health Statistics 2023: Monitoring Health for the SDGs, Sustainable Development Goals. Available online: www.who.int/data/gho/publications/world-health-statistics (accessed on 29 August 2023).
2. Mann, S.; Frasca, K.; Scherrer, S.; Henao-Martínez, A.F.; Newman, S.; Ramanan, P.; Suarez, J.A. A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. *Curr. Trop. Med. Rep.* **2021**, *8*, 121–132. [CrossRef] [PubMed]
3. Burza, S.; Croft, S.L.; Boelaert, M. Leishmaniasis. *Lancet* **2018**, *392*, 951–970. [CrossRef] [PubMed]
4. Quintavalla, A.; Veronesi, R.; Carboni, D.; Martinelli, A.; Zaccheroni, N.; Mummolo, L.; Lombardo, M. Chemodivergent Photocatalytic Synthesis of Dihydrofurans and β,γ-Unsaturated Ketones. *Adv. Synth. Catal.* **2021**, *363*, 3267–3282. [CrossRef]
5. Ma, S.; Zheng, Z.; Jiang, X. Pd(0)-Catalyzed Coupling−Cyclization of 2-(2′,3′-Allenyl)Acetylacetates and Organic Halides: An Efficient Synthesis of 4,5-Dihydrofuran Derivatives. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 529–531. [CrossRef] [PubMed]
6. Lu, G.; Lin, B.; Gao, Y.; Ying, J.; Tang, G.; Zhao, Y. Mn(OAc)3-Mediated Synthesis of 3-Phosphonyldihydrofurans from β-Ketophosphonates and Alkenes. *Synlett* **2016**, *28*, 724–728. [CrossRef]
7. Curti, C.; Crozet, M.D.; Vanelle, P. Microwave-Assisted Manganese(III) Acetate Based Oxidative Cyclizations of Alkenes with β-Ketosulfones. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 200–205. [CrossRef]
8. Tabélé, C.; Faiões, V.D.S.; Grimaud, F.; Torres-Santos, E.C.; Khoumeri, O.; Curti, C.; Vanelle, P. Original Antileishmanial Hits: Variations around Amidoximes. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *148*, 154–164. [CrossRef] [PubMed]
9. Yu, H.; Yang, H.; Shi, E.; Tang, W. Development and Clinical Application of Phosphorus-Containing Drugs. *Med. Drug Discov.* **2020**, *8*, 100063. [CrossRef] [PubMed]
10. Borowitz, I.J.; Firstenberg, S.; Borowitz, G.B.; Schuessler, D. Organophosphorus Chemistry. XVII. Kinetics and Mechanism of the Perkow Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 1623–1628. [CrossRef]
11. Afarinkia, K.; Cadogan, J.I.G.; Rees, C.W. Synthesis of 1,2-Azaphosphetidines. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, *3*, 285. [CrossRef]
12. Katsuno, K.; Burrows, J.N.; Duncan, K.; Van Huijsduijnen, R.H.; Kaneko, T.; Kita, K.; Mowbray, C.E.; Schmatz, D.; Warner, P.; Slingsby, B.T. Hit and Lead Criteria in Drug Discovery for Infectious Diseases of the Developing World. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14*, 751–758. [CrossRef] [PubMed]
13. Zhou, P.; Hu, B.; Li, L.; Rao, K.; Yang, J.; Yu, F. Mn(OAc)s_3–Promoted Oxidative $C_{sp}{}^3$–P Bond Formation through C $_{sp}{}^2$–C $_{sp}{}^2$ and P–H Bond Cleavage: Access to β-Ketophosphonates. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 13268–13276. [CrossRef] [PubMed]
14. Zhou, M.; Chen, M.; Zhou, Y.; Yang, K.; Su, J.; Du, J.; Song, Q. β-Ketophosphonate Formation via Aerobic Oxyphosphorylation of Alkynes or Alkynyl Carboxylic Acids with H-Phosphonates. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 1786–1789. [CrossRef] [PubMed]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

3.2. Optimisation de la méthode de synthèse du groupement amidoxime

La synthèse de l'amidoxime a été effectuée à partir du groupement nitrile en milieu basique (*tert*-butoxyde de potassium) et dans le DMSO, avec des quantités importantes de réactifs. Cependant, dans le but de réduire la consommation de réactifs et d'énergie, une méthode alternative a été employée utilisant un chauffage par micro-ondes (éthanol/Na_2CO_3). Pour certains composés, la réaction a abouti. Cependant, pour les composés contenant un groupement nitro en position *méta* par rapport au nitrile, la réaction conduit à la formation surprenante du dérivé amide.

Ce travail a fait l'objet de la publication ci-dessous :

4-(5-Benzyl-3-((4-fluorophenyl)sulfonyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-2-nitrobenzamide

by Oscar Leonardo Avendaño Leon [1], Christophe Curti [1], Hussein El-Kashef [2,3], Youssef Kabri [1], Sébastien Redon [1] and Patrice Vanelle [1,*]

[1] Aix Marseille Univ, CNRS, ICR UMR 7273, Equipe Pharmaco-Chimie Radicalaire, Faculté de Pharmacie, 27 Boulevard Jean Moulin, CS30064, CEDEX 05, 13385 Marseille, France

[2] Department of Chemistry, Faculty of Science, Assiut University, Assiut 71516, Egypt

[3] Faculty of Pharmacy, Sphinx University, New Assiut 71515, Egypt

Molbank **2023**, *2023(4)*, M1750; https://doi.org/10.3390/M1750

Submission received: 25 November 2023 / Revised: 11 December 2023 / Accepted: 13 December 2023 / Published: 15 December 2023

(This article belongs to the Collection Molecules from Side Reactions)

molbank

MDPI

Short Note

4-(5-Benzyl-3-((4-fluorophenyl)sulfonyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-2-nitrobenzamide

Oscar Leonardo Avendaño Leon [1], Christophe Curti [1], Hussein El-Kashef [2,3], Youssef Kabri [1], Sébastien Redon [1] and Patrice Vanelle [1,*]

[1] Aix Marseille Univ, CNRS, ICR UMR 7273, Equipe Pharmaco-Chimie Radicalaire, Faculté de Pharmacie, 27 Boulevard Jean Moulin, CS30064, CEDEX 05, 13385 Marseille, France; oscar-leonardo.avendano-leon@etu.univ-amu.fr (O.L.A.L.); christophe.curti@univ-amu.fr (C.C.); youssef.kabri@univ-amu.fr (Y.K.); sebastien.redon@univ-amu.fr (S.R.)
[2] Department of Chemistry, Faculty of Science, Assiut University, Assiut 71516, Egypt; elkashef@aun.edu.eg
[3] Faculty of Pharmacy, Sphinx University, New Assiut 71515, Egypt
* Correspondence: patrice.vanelle@univ-amu.fr; Tel.: +33-4-9183-5580

Abstract: As part of our ongoing attempt to broaden the applications of the amidoxime moiety as a potential source of new antileishmanial agents, this study focuses on the product 4-(5-Benzyl-3-((4-fluorophenyl)sulfonyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-2-nitrobenzamide. This unexpected amide was obtained in an 85% yield as the major product with a conventional amidoxime synthesis protocol (Ethanol/Na_2CO_3) involving the reaction of hydroxylamine and a nitrile group. The formation of this amide derivative instead of the expected amidoxime can be attributed to two complementary effects: the strong electron effect of the nitro group and the influence of ethanol, a polar protic solvent. Alternatively, the desired amidoxime derivative, 4-(5-benzyl-3-((4-fluorophenyl)sulfonyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-*N*′-hydroxy-2-nitrobenzimidamide, was obtained in an 80% yield by an alternative protocol (DMSO/KO*t*Bu). This original compound, featuring a nitro group in the ortho position to the amidoxime, will be further evaluated, both in the field of medicinal chemistry and in other relevant areas, highlighting an unusual method to access amidoximes from hindered substrates.

Keywords: amidoxime; amide; 4,5-dihydrofuran; nitro group; leishmania

check for updates

Citation: Avendaño Leon, O.L.; Curti, C.; El-Kashef, H.; Kabri, Y.; Redon, S.; Vanelle, P. 4-(5-Benzyl-3-((4-fluorophenyl)sulfonyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-2-nitrobenzamide. *Molbank* **2023**, *2023*, M1750. https://doi.org/10.3390/M1750

Academic Editor: Ping-Jyun Sung

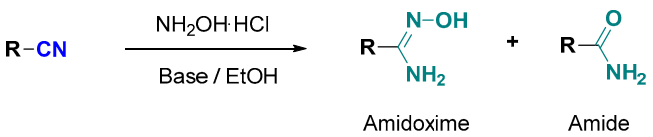
Received: 25 November 2023
Revised: 11 December 2023
Accepted: 13 December 2023
Published: 15 December 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Amidoxime is a functional group extensively studied for environmental applications, for example in the treatment of seawater or wastewater [1–3]. The growing number of citations and publications over time indicates significant interest, which extends to other fields such as polymer science, organic chemistry and medicinal chemistry [4–8]. Our team has previously reported the antileishmanial activity of some original compounds bearing a dihydrofuran and an amidoxime group [9,10].

The amidoxime group is usually obtained by reacting hydroxylamine (released in situ from its hydrochloride salt in a protic solvent: ethanol or methanol) with nitriles under basic conditions, usually involving $CaCO_3$ or Na_2CO_3, (Scheme 1). The desired amidoxime formation is often accompanied by the corresponding amide byproduct, which can vary in yield. In certain cases, the formation of amide is not reported, which could be a result of methods that achieved yields reaching as much as 100% [11].



Scheme 1. Traditional amidoxime synthesis.

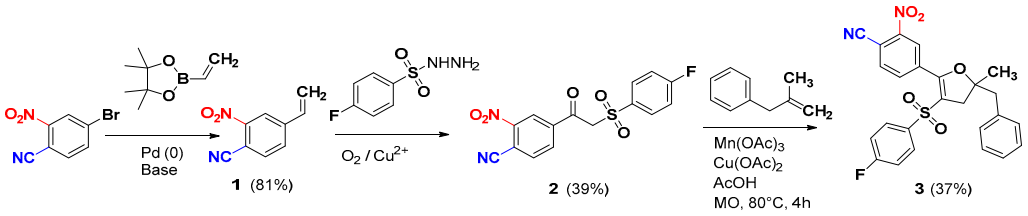
Other synthetic methods, such as the reaction of hydroxylamine with iminoethers or amidine hydrochlorides, as well as the reduction of oxyamidoximes or nitrosolic acids, are limited in their operations or used under specific conditions [12–16]. Less common conditions involve KO*t*Bu in DMSO [17,18]. However, there is little available information about other aryl nitriles, particularly those bearing a nitro group in the ortho position to the nitrile function.

The literature survey revealed that the amidoxime formation reaction is limited to aryl-nitriles and to certain alkyl substrates, with a lack of information regarding more complex or sterically hindered electrophilic substrates. Although this reaction has been widely reported to be highly efficient, the scope of more diverse substrates remains to be clarified.

In this work, an unexpected amide product was obtained via a conventional amidoxime protocol from an aryl nitrile substrate. Notably, the distinctive feature of the starting material, in this case, was the presence of a nitro group in the ortho position to the cyano group.

2. Results

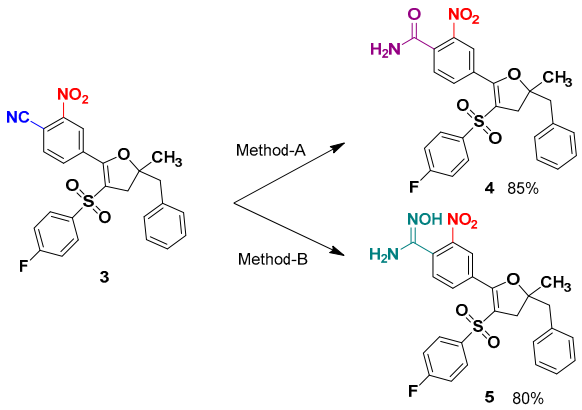
A three-step synthesis was performed to access the aryl nitrile **3** bearing a nitro group in the ortho position, serving as the substrate to obtain the amidoxime derivative **5** (Scheme 2). To achieve this synthesis, a vinyl intermediate was synthesized, compound **1**, (81% of yield) through a cross-coupling Suzuki–Miyaura reaction with 4-bromo-2-nitrobenzonitrile as the starting material. Subsequently, compound **1** was converted to a linear β-ketosulphone **2** through a radical reaction, and the appropriate hydrazine, in a 39% yield. A subsequent oxidative radical cyclization step mediated by $Mn(OAc)_3$ led to the 4,5-dihydrofuran scaffold **3** in a moderate yield (37%).



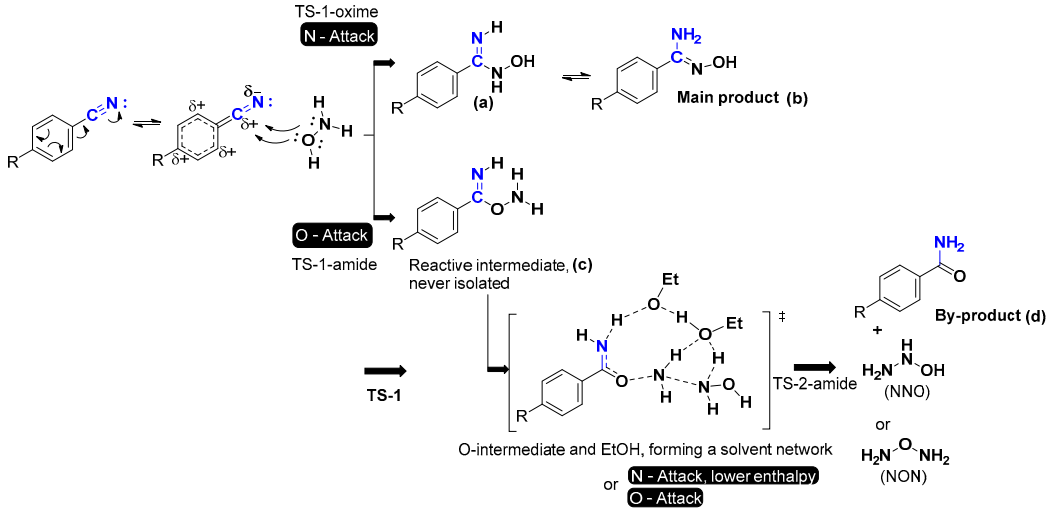
Scheme 2. Synthesis of an aryl nitrile substrate bearing a nitro group in the ortho position.

In an attempt to obtain the amidoxime **5**, the latter compound **3** was subjected to a microwave assisted reaction following method (A) (Scheme 3). Surprisingly, the structure of the major product obtained (with an 85% yield) was identified and confirmed by HRMS to be of the amide derivative 4-(5-benzyl-3-((4-fluorophenyl)sulfonyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-2-nitrobenzamide. Based on this result, it was hypothesized that the formation of the amide could come from interactions between ethanol and hydroxylamine, as the solvation effect could modify the nucleophilic character of the hydroxylamine. Their ambident behavior (O- or N-attack) has been documented for other substrates [19–21]. Taking this into consideration, an alternative solvent DMSO was used (method B, Scheme 3), giving the amidoxime **5** in an 80% yield (method B, Scheme 3).

Plausible mechanistic explanations have been suggested by Srivastava et al. [22] and Stephenson et al. [23], as shown in Scheme 4, considering the ambident nucleophile nature of NH_2OH (O and N atoms possessing sharply different nucleophilicities) the N-attack and the O-attack ways have been highlighted. In the case of an N-attack over the carbon atom of the nitrile, the amidoxime formation could be favored (compound b) via *N*-hydroxybenzimidamide (compound a, Scheme 4). Moreover, with an O-attack type, the amide formation may be favored with the attack of a second equivalent of hydroxylamine (by the oxygen or nitrogen) and the subsequent formation of the O-aminohydroxylamine (NON) or the hydroxyhydrazine (NNO).



Scheme 3. Influence of the reaction conditions on the amide and the amidoxime synthesis. Method-A: 4 equiv. $NH_2OH\cdot HCl$, 2 equiv. Na_2CO_3, EtOH, N_2, 90 °C, MW, 1 h. Method-B: 10 equiv. $NH_2OH\cdot HCl$, 10 equiv. KO*t*Bu, DMSO, N_2, 0 °C to RT, 18 h.

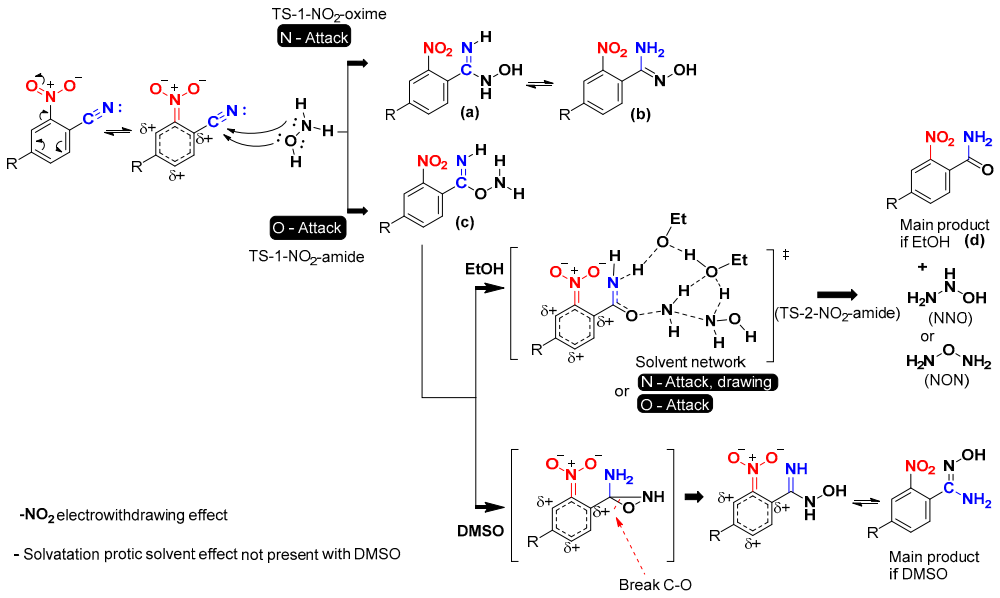


Scheme 4. Reaction mechanisms of the reaction between nitriles and hydroxylamine.

Vörös et al. reported a theoretical and experimental analysis to describe the byproduct formation (not as the main product) of the amide [24,25]. This mechanism depends on the energetic requirement for two types of solvents, a protic type vs. ionic liquids. According to their thermodynamic analysis, in a protic solvent as ethanol, the transformation of intermediate **c** into the amide byproduct **d** exhibits a transition state (TS-2-amide) with a lower enthalpy than the transition state of the formation of compound **a** (TS-1-oxime), as shown in Scheme 4. Likewise, the enthalpy difference between the two transition states, TS-1-oxime and TS-2-amide varies with the solvent with TS-1-oxime > TS-2-amide in a protic solvent like ethanol, but inverted to TS-2-amide > TS-1-oxime with an ionic solvent. Therefore, the reaction conditions favoring a more stable TS-2-amide might then explain the byproduct formation of the amide [24,25].

Our results showed that a combined effect may be suggested to explain the formation of an amide as the main product. Notably, we observed that substrates without a nitro group predominantly form amidoxime in both DMSO and ethanol conditions. However, when a nitro group is introduced in ortho position to the nitrile function, in a protic solvent such as ethanol, this predominantly gives the amide product, while DMSO demonstrates a more specific tendency towards amidoxime formation. These observations suggest the next plausible theoretical approaches considering both the mechanistic insights reported by Vörös et al. and the theory of 'hard and soft' nucleophiles and electrophiles [26,27]. Specifically, the predominant formation of the amide derivative as the main product using ethanol

as a solvent could be related to the more stable transition state O-intermediate-to-amide (TS-2-NO_2-amide), Scheme 5. This enhanced stability could be influenced by both the electronic influence of the nitro group and the solvation effect of the ethanol (where hydrogen bond interactions occur) forming a solvent network that could mediate the proton transfer in the course of the reaction [28]. Furthermore, regarding the inductive and mesomeric effects of the nitro group [29,30], the nitrile becomes a more electrophilic center, and therefore a 'harder' electrophile that predominantly undergoes an O-attack from the hydroxylamine in TS-1, since 'hard–hard' (and 'soft–soft') interactions are preferred [31,32]. Meanwhile, the predominant formation of amidoxime observed with DMSO as a solvent could be explained either by a hindered second hydroxylamine attack in the absence of an appropriate solvent network necessary to stabilize the TS-2; then, the intermediary compound **c** via TS-1 is unable to transform forward **d** and the process either turns back to an N-attack or to an alternative possibility involving a cyclic intermediate rearrangement [25].



Scheme 5. Theorical difference in the reaction mechanisms with an electron-withdrawing group.

3. Materials and Methods

3.1. Chemistry

Reagents were purchased from Sigma-Aldrich (3050 Spruce Street St. Louis, MO, USA), Fluorochem (Unit 14 Graphite Way, Hadfield, Glossop SK13 1QH, UK), Fisher Scientific (168 3rd Ave, Waltham, MA, USA) or TCI chemicals (9211 North Harborgate Street, Portland, OR, USA), and used without further purification. Microwave reactions were performed using monomode reactors: Biotage Initiator® classic (Uppsala, Sweden) in sealed vials with output power ranging from 0 to 400 W. The following adsorbent was used for column chromatography: silica gel 60 (Merck KgaA, Darmstadt, Germany, particle size 0.063–0.200 mm, 70–230 mesh ASTM). Reaction monitoring of intermediary compounds was performed either using aluminum TLC plates (5 × 5 cm) with silica gel coated 60F-254 (Merck) in an appropriate eluent and visualized using ultraviolet light under a UV-Lamp VL-6.CL., at 254 nm (6 W) and 365 nm (6 W) or using an LC-MS apparatus, Thermo Scientific Accela High Speed LC System® coupled to a Thermo MSQ Plus® quadrupole mass spectrometer, with an HPLC column Thermo Hypersil Gold® (168 3rd Ave, Waltham, MA, USA) 50 × 2.1 mm (C18 bounded), with particles of a diameter of 1.9 mm. The volume of sample injected into the column was 1 µL. Chromatographic analysis, total duration of 8 min, was on the gradient of the following solvents: t = 0 min, methanol/water 50:50; 0 < t < 4 min, a linear increase in the proportion of methanol to a methanol/water ratio of 95:5; 4 < t < 6 min, methanol/water 95:5; 6 < t < 7 min, a linear decrease in the proportion

of methanol to return to a methanol/water ratio of 50:50; 6 < t < 7 min, methanol/water 50:50. The water used was buffered with ammonium acetate 5 mM. The flow rate of the mobile phase was 0.3 mL/min, at the Faculté de Pharmacie of Marseille.

The high-resolution mass spectrum was recorded on an SYNAPT G2 HDMS (Waters, 34 Maple St, Milford, MA, USA) equipped with a pneumatically assisted atmospheric pressure ionization (API) source. The sample was ionized in positive electrospray mode under the following conditions: electrospray voltage—2.8 kV; orifice voltage—20 V; nebulizing gas flow rate (nitrogen)—100 L/h. The sample was dissolved in 300 µL of dichloromethane and then diluted 1:103 in a solution of methanol with 3 mM ammonium acetate. The extract solution was introduced into the ionization source via in-fusion at a flow rate of 10 µL/min. The exact mass measurement was performed in triplicate with external calibration. HRMS was performed at the Faculté des Sciences de Saint-Jérôme (Marseille, France). Elemental analysis was performed on a Flash EA 1112 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), controlled by Eager Xperience software (Ver. 1.2), under the conditions: temperature—970 °C, carrier gas—helium, gas flow rate—140 mL/min, detector catharometer, performed at the Faculté des Sciences de Saint-Jérôme (Marseille, France).

NMR spectra were recorded on a Bruker Avance NEO 400 MHz NanoBay spectrometer at the Faculté de Pharmacie of Marseille. Residual ^{1}H and ^{13}C peaks in deuterated solvent ($CDCl_3$) were used for chemical shift calibration without the need for an additional internal standard. ^{1}H NMR: reference $CDCl_3$ δ = 7.26 ppm and ^{13}C NMR: reference $CDCl_3$ δ = 77.16 ppm. Data for ^{1}H NMR are reported as follows: chemical shifts (δ) in parts per million (ppm), multiplicity (described as follows: s, singlet; bs, broad singlet; d, doublet; t, triplet; q, quadruplet; dd, doublet of doublet; ddd, doublet of doublet of doublet; m, multiplet), coupling constants (*J*) in Hertz (Hz) and integration. Data for ^{13}C NMR are reported as follows: chemical shifts (δ) in parts per million (ppm).

*3.2. 2-Nitro-4-vinylbenzonitrile (**1**)*

A microwave vial of 20 mL was charged with 4-bromo-2-nitrobenzonitrile (500 mg, 1.0 equiv.), vinylboronic acid pinacol ester (1.2 equiv.), potassium carbonate (3.0 equiv.) and tetrakis(triphenylphosphine)palladium (0) (5 mol%). The system was capped and a mixture of 4 mL of dioxane–water (3:1) was introduced under nitrogen atmosphere. The reaction mixture was stirred at 120 °C for the appropriate time. The TLC monitoring reaction was performed using cyclohexane-AcOEt (7:3) as an eluent and visualized with ultraviolet light under a UV-Lamp VL-6.CL., 254 nm (6 W), with a retardation factor of 0.61, and verified via low-resolution LC-MS. The reaction mixture was poured into cold water and extracted with ethyl acetate (3 × 20 mL). The organic layer was washed with brine, dried over sodium sulphate and the solvent was removed in vacuo. Then, the obtained crude was purified via column chromatography on silica gel from 90:10 to 50:50 of petroleum ether/dichloromethane, to afford the desired product with a yield of 81% (310 mg). The product was obtained as a light orange solid. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.32 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.86 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.78 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 6.80 (dd, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 10.9 Hz, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 17.6 Hz, 1H, CH), 6.05 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 17.6 Hz, 1H, H-CH_2), 5.66 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 10.9 Hz, 1H, H-CH_2). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 143.6 (C), 135.9 (CH_{Ar}), 133.6 (CH_{Ar}), 131.4 (CH_{Ar}), 122.9 (CH_{Ar}), 121.1 (2C), 115.2 (C), 106.4 (C). Analysis calculated for $C_9H_6N_2O_2$: C 62.07%, H 3.47%, N 16.09%, and found C 62.07%, H 3.41%, N 15.99%. LC/MS ESI+ t_R 4.46 min, (*m*/*z*) $[M + Na]^+$ 197.29/197.15. Mp 113–114 °C.

*3.3. 4-(2-((4-Fluorophenyl)sulfonyl)acetyl)-2-nitrobenzonitrile (**2**)*

A mixture of 2-nitro-4-vinylbenzonitrile (1) (270 mg, 1.55 mmol), sulfonylhydrazide (1.55 mmol), $Cu(OAc)_2$ (5 mol%), and EtOH (6 mL) in a 25 mL round-bottomed flask was placed under O_2 (balloon). The reaction vessel was allowed to stir at 80 °C for 72 h. The TLC monitoring reaction was performed using cyclohexane-AcOEt (1:1) as an eluent and visualized with ultraviolet light under a UV-Lamp VL-6.CL., 254 nm (6 W), with a retardation factor of 0.45, and verified via low-resolution LC-MS. After the reaction, the

resulting mixture was concentrated under vacuum and the residue was purified by flash column chromatography using a mixture of petroleum ether—AcOEt (from 9:1 to 4:6) as an eluent to give the desired product as a light brown solid with a yield of 39% (196 mg). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.88 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.45 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.1 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.12 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.1 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.92–7.89 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.34–7.29 (m, 2H, CH_{Ar}), 4.79 (s, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 185.4 (C), 166.7 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 258.9 Hz, C), 149.2 (C), 139.4 (C), 136.6 (CH_{Ar}), 134.3 (CH_{Ar}), 134.0 (C), 131.7 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 9.8 Hz, 2CH_{Ar}), 126.0 (CH_{Ar}), 117.1 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 23.0 Hz, 2CH_{Ar}), 114.1 (C), 112.6 (C), 64.1 (CH_2). ^{19}F NMR (376.5 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) −100.6. Analysis calculated for $C_{15}H_9FN_2O_5S$: C 51.73%, H 2.60%, N 8.04%, and found C 52.10%, H 2.58%, N 8.18%. LC/MS ESI+ t_R 4.39 min, (*m*/*z*) $[M + 2Na]^+$ 197.40/197.14. Mp 128–129 °C.

*3.4. 4-(5-Benzyl-3-((4-fluorophenyl)sulfonyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-2-nitrobenzonitrile (**3**)*

In a microwave vial of 20 mL equipped with a stirring bar, a solution of manganese (III) acetate dihydrate (2.1 equiv.) and copper (II) acetate (1 equiv.) in 12 mL of glacial acetic acid was heated at 80 °C under microwave irradiation for 15 min. Then, the reaction mixture was cooled and compound 2 (165 mg, 0.48 mmol, 1 equiv.) and 2-methyl-3-phenyl-1-propene (2 equiv.) in 13 mL of acetic acid were introduced. The reaction mixture was heated for 2.5 h under microwave irradiation under the same conditions. The TLC monitoring reaction was performed using cyclohexane-AcOEt (6:4) as an eluent and visualized with ultraviolet light under a UV-Lamp VL-6.CL., 254 nm and 365 nm (6 W), with a retardation factor of 0.54. The resulting product was poured into 50 mL of cold water and extracted with dichloromethane (3 × 40 mL). The organic extracts were collected and washed with saturated aqueous $NaHCO_3$ (3 × 40 mL) and dried over Na_2SO_4. The solvent was evaporated under reduced pressure, and the crude product was purified via column chromatography (silica gel; eluent: cyclohexane-AcOEt from 9:1 to 7:3) affording the title product as a white oily solid and verified via HRMS. Yield: 37% (84 mg). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.45 (d, $^{4}J_{H\text{-}H}$ = 1.6 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.06 (dd, $^{4}J_{H\text{-}H}$ = 1.6 Hz, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.1 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.94 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.2 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.58–7.54 (m, 2H, 2CH_{Ar}), 7.24–7.12 (m, 5H, 5CH_{Ar}), 7.05 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.2 Hz, 2H, 2CH_{Ar}), 3.04 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.7 Hz, 2H, CH_2), 2.92–2.82 (m, 2H, CH_2), 1.43 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 165.6 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 255.9 Hz, C), 157.5 (C), 136.7 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 3.5 Hz, C), 135.2 (CH_{Ar}), 135.1 (CH_{Ar}), 135.0 (2C), 134.4 (C), 130.3 (2CH_{Ar}), 129.8 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 10.1 Hz, 2CH_{Ar}), 128.5 (2CH_{Ar}), 127.4 (CH_{Ar}), 126.4 (CH_{Ar}), 116.8 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 22.5 Hz, 2CH_{Ar}), 114.6 (C), 113.7 (C), 109.5 (C), 89.9 (C), 46.7 (CH_2), 41.7 (CH_2), 27.7 (CH_3). ^{19}F NMR (376.5 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) −103.5. $C_{25}H_{19}FN_2O_5S$: HRMS: *m*/*z* $[M + Na]^+$ calculated 501.0891; found 501.0891.

*3.5. 4-(5-Benzyl-3-((4-fluorophenyl)sulfonyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-2-nitrobenzamide (**4**)*

In a microwave vial of 20 mL equipped with a stirring bar, a solution of compound 3 (45 mg, 0.09 mmol), in water (2 mL) and ethanol (9 mL) was inserted. Hydroxylamine hydrochloride (26 mg, 0.38 mmol, 4 equiv.) and sodium carbonate (20 mg, 0.19 mmol) were added. The mixture was heated at 90 °C under N_2 and microwave irradiation for 1h. The TLC monitoring reaction was performed using DCM/MeOH (4%) as an eluent and visualized with ultraviolet light under a UV-Lamp VL-6.CL., 254 nm (6 W), with a retardation factor of 0.45. The reaction was allowed to cool, and the ethanol was removed under reduced pressure. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate (3 × 5 mL), the combined organic fractions were dried over anhydrous Na_2SO_4 and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified via column chromatography (silica gel; eluent: DCM/MeOH from 2% to 4%) affording the title product as a white oily solid and verified via HRMS. Yield 85% (37 mg). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.17 (d, $^{4}J_{H\text{-}H}$ = 1.6 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.91 (dd, $^{4}J_{H\text{-}H}$ = 1.6 Hz, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.60 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.57–7.52 (m, 2H, 2CH_{Ar}), 7.24–7.10 (m, 5H, 5CH_{Ar}), 7.05 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 7.7 Hz, 2H, 2CH_{Ar}), 6.09 (br s, 2H, NH_2), 3.03 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.9 Hz, 1H, CH_2), 3.02 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.8 Hz, 1H, CH_2), 2.88 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.8 Hz, 1H, CH_2), 2.83 (d,

$^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.9 Hz, 1H, CH_2), 1.54 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 167.8 (C), 165.6 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 255.5 Hz, C), 159.0 (C), 145.9 (C), 137.1 (C), 135.2 (C), 134.9 (CH_{Ar}), 133.8 (C), 131.6 (C), 130.4 ($2CH_{Ar}$), 129.8 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 9.6 Hz, $2CH_{Ar}$), 128.5 ($2CH_{Ar}$), 128.3 (CH_{Ar}), 127.3 (CH_{Ar}), 125.5 (CH_{Ar}), 116.7 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 23.5 Hz, $2CH_{Ar}$), 112.1 (C), 89.5 (C), 46.7 (CH_2), 41.6 (CH_2), 27.7 (CH_3). ^{19}F NMR (376.5 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) −103.9. $C_{25}H_{21}FN_2O_6S$: HRMS: m/z $[M + NH_4]^+$ calculated 514.1443; found 514.1443.

*3.6. 4-(5-Benzyl-3-((4-fluorophenyl)sulfonyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-N′-hydroxy-2-nitrobenzimidamide (**5**)*

A suspension of hydroxylamine hydrochloride (10 equiv.) in DMSO was stirred under inert atmosphere and cooled to 0 °C. Potassium *tert*-butoxide (10 equiv.) was added gradually, and the reaction mixture was stirred for 30 min. Then, compound 3 was added (30 mg, 0.08 mmol, 1 equiv.), and the reaction mixture was stirred for 18 h at room temperature. The TLC monitoring reaction was performed using DCM-MeOH (96:4) as an eluent and visualized with ultraviolet light under a UV-Lamp VL-6.CL., 254 and 365 nm (6 W), with a retardation factor of 0.39. The resulting mixture was poured into cold water. Then, the reaction mixture was extracted with EtOAc (3 × 15 mL), and the organic layers were combined, washed with water (1 × 20 mL), brine (1 × 20 mL), dried over Na_2SO_4, and concentrated. The crude product was purified via column chromatography (eluent: dichloromethane/MeOH 98/2): yield 80% (33 mg). The product was obtained as a yellow oily solid and verified via HRMS. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.05 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.89 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.6 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.66 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.57–7.52 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.23–7.03 (m, 7H, CH_{Ar}), 5.12 (br s, 2H, NH_2), 3.03 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.5 Hz, 2H, CH_2), 2.89–2.82 (m, 2H, CH_2), 1.53 (s, 3H, CH_3). OH not observed. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 165.5 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 255.9 Hz, C), 159.1 (C), 150.4 (C), 148.0 (C), 137.1 (C), 135.3 (C), 134.1 (CH_{Ar}), 131.7 (C), 130.9 (CH_{Ar}), 130.4 ($2CH_{Ar}$), 129.8 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 9.7 Hz, $2CH_{Ar}$), 128.8 (C), 128.5 ($2CH_{Ar}$), 127.3 (CH_{Ar}), 125.3 (CH_{Ar}), 116.7 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 22.8 Hz, $2CH_{Ar}$), 112.2 (C), 89.5 (C), 46.7 (CH_2), 41.7 (CH_2), 27.6 (CH_3). ^{19}F NMR (376.5 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) −104.1. $C_{25}H_{22}FN_3O_6S$: LC/MS ESI+ t_R 8.10 min, *(m/z)* $[M + H]^+$ 511.8/511.52; HRMS: m/z $[M + Na]^+$ calculated 534.1106; found 534.1105.

4. Conclusions

This study highlights the formation of the product 4-(5-Benzyl-3-((4-fluorophenyl)sulfonyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-2-nitrobenzamide, formed through a method conventionally yielding to the amidoxime in major yields. Two complementary effects have been theorized to explain this unexpected result. First an electronic effect associated with the presence of the nitro moiety and a solvation by the protic solvent. Considering that the formation of the amide derivative is mainly linked to the O-attack of hydroxylamine it was hypothesized that the electron effect could favor a more stable transition state prior to the amide formation. These conditions are not present when DMSO is used then the desired product 4-(5-Benzyl-3-((4-fluorophenyl)sulfonyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-*N*′-hydroxy-2-nitrobenzimidamide can be obtained. This original compound, featuring a nitro group in the ortho position to the amidoxime moiety, will be further evaluated, both in the field of medicinal chemistry and in other relevant areas.

Supplementary Materials: The following are available online: Figure S1: LC-MS spectra of compound **1**, Figure S2: LC-MS spectra of compound **2**, Figure S3: HRMS spectra of compound **3**, Figure S4: HRMS spectra of compound **4**, Figure S5: HRMS spectra of compound **5**, Figures S6–S15: ^{1}H NMR and ^{13}C NMR spectra of compounds **1**, **2**, **3**, **4** and **5**.

Author Contributions: Conceptualization, O.L.A.L., C.C., Y.K., S.R. and P.V.; methodology, O.L.A.L., C.C., Y.K. and S.R.; formal analysis, O.L.A.L., C.C., H.E.-K., Y.K. and S.R.; investigation, O.L.A.L., C.C., Y.K. and S.R.; resources, C.C., O.L.A.L. and P.V.; writing—original draft preparation, O.L.A.L.; writing—review and editing, O.L.A.L., C.C., H.E.-K., Y.K., S.R. and P.V.; visualization, O.L.A.L., C.C., Y.K., S.R. and P.V.; supervision, C.C. and P.V.; project administration, P.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Ph.D. Student Oscar Leonardo Avendaño Leon was funded by COLCIENCIAS—Ministry of Science, Technology and Innovation of Colombia, Government Resolution 071 Janvier 2021—call for PhD applications 885-2020.

Data Availability Statement: Data are contained within the article and supplementary materials.

Acknowledgments: Aix Marseille Université and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) are gratefully acknowledged for their financial support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Yang, H.; Liu, J.; Wu, W.; Luo, Y.; Mo, G.; Huang, K. Synthesis of Amidoxime-modified Hollow Organic Porous Nanospheres for Efficient Uranium Adsorption from Aqueous Solution. *ChemistrySelect* **2023**, *8*, e202301214. [CrossRef]
2. Tang, J.; Bai, X.; Huang, H.; Xue, S.; Pan, J. Templating Synthesis of Oxime/Amidoxime Functionalized Hollow Nanospheres by Air Bubbles Generated from "Ouzo-Like" Effect for Fast and Massive Uranium Uptake. *Sep. Purif. Technol.* **2023**, *306*, 122463. [CrossRef]
3. Ahmad, Z.; Li, Y.; Yang, J.; Geng, N.; Fan, Y.; Gou, X.; Sun, Q.; Chen, J. A Membrane-Supported Bifunctional Poly(Amidoxime-ethyleneimine) Network for Enhanced Uranium Extraction from Seawater and Wastewater. *J. Hazard. Mater.* **2022**, *425*, 127995. [CrossRef] [PubMed]
4. Lutsenko, I.A.; Vologzhanina, A.V.; Kayukova, L.A.; Yergalieva, E.M.; Koshenskova, K.A.; Bekker, O.B.; Dorovatovskii, P.V.; Eremenko, I.L. Mixed-Valence Hexanuclear CoII,III Complex with Amidoxime: Synthesis, Structure, and in Vitro Biological Activity against the Non-Pathogenic Strain of Mycolicibacterium Smegmatis. *Russ. Chem. Bull.* **2022**, *71*, 2172–2178. [CrossRef]
5. Bhavsar, S.; Tadiparthi, R.; Pawar, S.; Kayastha, A.K.; Chavan, V.; Yeole, R.; Deshpande, P.; Bhagwat, S.; Patel, M. Design of Novel Amidoxime Ketolide Core and an Efficient Synthesis of WCK 4763: For Treatment of Gram-Positive Pneumococci. *Med. Chem. Res.* **2023**, *32*, 1726–1735. [CrossRef]
6. Berger, O.; Ortial, S.; Wein, S.; Denoyelle, S.; Bressolle, F.; Durand, T.; Escale, R.; Vial, H.J.; Vo-Hoang, Y. Evaluation of Amidoxime Derivatives as Prodrug Candidates of Potent Bis-Cationic Antimalarials. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2019**, *29*, 2203–2207. [CrossRef] [PubMed]
7. Sahyoun, T.; Arrault, A.; Schneider, R. Amidoximes and Oximes: Synthesis, Structure, and Their Key Role as NO Donors. *Molecules* **2019**, *24*, 2470. [CrossRef] [PubMed]
8. Fylaktakidou, K.; Hadjipavlou-Litina, D.; Litinas, K.; Varella, E.; Nicolaides, D. Recent Developments in the Chemistry and in the Biological Applications of Amidoximes. *CPD* **2008**, *14*, 1001–1047. [CrossRef]
9. Tabélé, C.; Faiões, V.D.S.; Grimaud, F.; Torres-Santos, E.C.; Khoumeri, O.; Curti, C.; Vanelle, P. Original Antileishmanial Hits: Variations around Amidoximes. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *148*, 154–164. [CrossRef]
10. Avendaño Leon, O.L.; Curti, C.; Santos Urbancg Moncorvo, F.M.; Kabri, Y.; Redon, S.; Torres-Santos, E.C.; Paoli-Lombardo, R.; Vanelle, P. Diethyl (5-Benzyl-2-(4-(N′-Hydroxycarbamimidoyl)Phenyl)-5-Methyl-4,5-Dihydrofuran-3-Yl)Phosphonate. *Molbank* **2023**, *2023*, M1736. [CrossRef]
11. Festa, C.; Finamore, C.; Marchianò, S.; Di Leva, F.S.; Carino, A.; Monti, M.C.; Del Gaudio, F.; Ceccacci, S.; Limongelli, V.; Zampella, A.; et al. Investigation around the Oxadiazole Core in the Discovery of a New Chemotype of Potent and Selective FXR Antagonists. *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10*, 504–510. [CrossRef] [PubMed]
12. Tang, N.; Liang, J.; Niu, C.; Wang, H.; Luo, Y.; Xing, W.; Ye, S.; Liang, C.; Guo, H.; Guo, J.; et al. Amidoxime-Based Materials for Uranium Recovery and Removal. *J. Mater. Chem. A* **2020**, *8*, 7588–7625. [CrossRef]
13. Faïon, L.; Djaout, K.; Pintiala, C.; Piveteau, C.; Leroux, F.; Biela, A.; Slupek, S.; Antoine, R.; Záhorszká, M.; Cantrelle, F.-X.; et al. Exploring the Antitubercular Activity of Anthranilic Acid Derivatives: From MabA (FabG1) Inhibition to Intrabacterial Acidification. *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, 335. [CrossRef] [PubMed]
14. Shabalin, D.A.; Dunsford, J.J.; Ngwerume, S.; Saunders, A.R.; Gill, D.M.; Camp, J.E. Synthesis of 2,4-Disubstituted Imidazoles via Nucleophilic Catalysis. *Synlett* **2020**, *31*, 797–800. [CrossRef]
15. Murarka, S.; Martín-Gago, P.; Schultz-Fademrecht, C.; Al Saabi, A.; Baumann, M.; Fansa, E.K.; Ismail, S.; Nussbaumer, P.; Wittinghofer, A.; Waldmann, H. Development of Pyridazinone Chemotypes Targeting the PDEδ Prenyl Binding Site. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 6083–6093. [CrossRef] [PubMed]
16. Rahman, M.N.; Bhowmick, R.R.; Nurnabi, M.; Molla, A.I. Synthesis and Characterization of an Amidoxime Compound with Benzimidazole Moiety and pH Sensing Behavior Under Basic Condition in Methanol and DMSO. *J. Chil. Chem. Soc.* **2018**, *63*, 4047–4050. [CrossRef]
17. Bouhlel, A.; Curti, C.; Dumètre, A.; Laget, M.; Crozet, M.D.; Azas, N.; Vanelle, P. Synthesis and Evaluation of Original Amidoximes as Antileishmanial Agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7310–7320. [CrossRef]
18. Bakunova, S.M.; Bakunov, S.A.; Wenzler, T.; Barszcz, T.; Werbovetz, K.A.; Brun, R.; Tidwell, R.R. Synthesis and Antiprotozoal Activity of Pyridyl Analogues of Pentamidine. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4657–4667. [CrossRef]
19. Kirby, A.J.; Davies, J.E.; Brandão, T.A.S.; Da Silva, P.F.; Rocha, W.R.; Nome, F. Hydroxylamine as an Oxygen Nucleophile. Structure and Reactivity of Ammonia Oxide. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12374–12375. [CrossRef]

20. Medeiros, M.; Souza, B.S.; Orth, E.S.; Brandão, T.A.S.; Rocha, W.; Kirby, A.J.; Nome, F. The Reaction of Hydroxylamine with Aspirin. *Arkivoc* **2011**, *2011*, 461–476. [CrossRef]
21. Buncel, E.; Um, I.H.; Terrier, F. Hydroxylamine, Oximate and Hydroxamate as α-Nucleophiles in Dephosphorylation. In *PATAI'S Chemistry of Functional Groups*; Rappoport, Z., Liebman, J.F., Eds.; Wiley: New York, NY, USA, 2008; pp. 817–837. ISBN 978-0-470-51261-6.
22. Srivastava, R.M.; Pereira, M.C.; Faustino, W.W.M.; Coutinho, K.; Dos Anjos, J.V.; De Melo, S.J. Synthesis, Mechanism of Formation, and Molecular Orbital Calculations of Arylamidoximes. *Monatsh. Chem.* **2009**, *140*, 1319–1324. [CrossRef]
23. Stephenson, L.; Warburton, W.K.; Wilson, M.J. Reaction of Some Aromatic Nitriles with Hydroxylamine to Give Amides, and an Alternative Preparation of Amidoximes. *J. Chem. Soc. C* **1969**, *6*, 861. [CrossRef]
24. Voros, A.; Baan, Z.; Timari, G.; Hermecz, I.; Mizsey, P.; Finta, Z. Highly Efficient and Selective Addition of Hydroxylamine to Nitriles in Ionic Liquids. *COS* **2014**, *11*, 751–756. [CrossRef]
25. Vörös, A.; Mucsi, Z.; Baán, Z.; Timári, G.; Hermecz, I.; Mizsey, P.; Finta, Z. An Experimental and Theoretical Study of Reaction Mechanisms between Nitriles and Hydroxylamine. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 8036–8047. [CrossRef] [PubMed]
26. LoPachin, R.M.; Geohagen, B.C.; Nordstroem, L.U. Mechanisms of Soft and Hard Electrophile Toxicities. *Toxicology* **2019**, *418*, 62–69. [CrossRef] [PubMed]
27. Pearson, R.G. Hard and Soft Acids and Bases, HSAB, Part 1: Fundamental Principles. *J. Chem. Educ.* **1968**, *45*, 581. [CrossRef]
28. Meredith, N.Y.; Borsley, S.; Smolyar, I.V.; Nichol, G.S.; Baker, C.M.; Ling, K.B.; Cockroft, S.L. Dissecting Solvent Effects on Hydrogen Bonding. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202206604. [CrossRef]
29. Graneek, J.B.; Bailey, W.C.; Schnell, M. Electron-Withdrawing Effects on the Molecular Structure of 2- and 3-Nitrobenzonitrile Revealed by Broadband Rotational Spectroscopy and Their Comparison with 4-Nitrobenzonitrile. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20*, 22210–22217. [CrossRef]
30. Jezuita, A.; Ejsmont, K.; Szatylowicz, H. Substituent Effects of Nitro Group in Cyclic Compounds. *Struct. Chem.* **2021**, *32*, 179–203. [CrossRef]
31. Chambers, R.D.; Edwards, A.R.; Batsanov, A.; Howard, J.A.K. Ambident Nucleophilic Addition to Ethyl Trifluoromethylacetoacetate. *J. Fluor. Chem.* **1998**, *88*, 95–97. [CrossRef]
32. Fernández, M.I.; Canle, M.; García, M.V.; Santaballa, J.A. A Theoretical Analysis of the Acid–Base Equilibria of Hydroxylamine in Aqueous Solution. *Chem. Phys. Lett.* **2010**, *490*, 159–164. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

3.3. Pharmacomodulation : série aliphatique

La modification en position 3 du noyau dihydrofurane par divers composés aliphatiques dérivés d'amide, d'ester et de sulfone a mis en évidence une grande variation de l'activité de ces composés. Les dérivés aliphatiques sulfonylés, de type méthyle et butyle, ont présenté une perte d'activité par rapport au composé HIT (porteur d'une sulfone aromatique) ; les dérivés de type amide ont montré une activité modérée. Enfin, les dérivés esters de méthyle et d'éthyle, ont présenté une activité biologique prometteuse, non seulement parce que l'activité est maintenue à une concentration comparable à celle du composé HIT, mais aussi parce qu'ils ont démontré une toxicité plus faible, conduisant à de meilleurs indices de sélectivité.

Meilleur composé de la série aliphatique (Figure 43) :

- Activité contre *L. amazonensis* amastigotes intracellulaires CI_{50} (µM/72 h): 1,3 ± 0,2
- Toxicité -macrophages murins- CC_{50} (µM/72 h) : 112,4 ± 9,3
- IS = 87,8

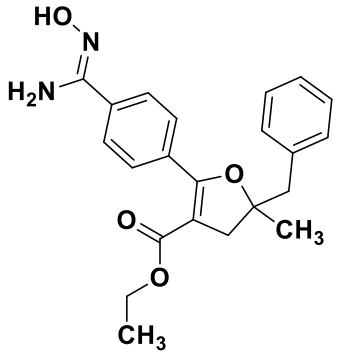


Figure 43. Ethyl 5-benzyl-2-(4-(*N*'-hydroxycarbamimidoyl)phenyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-3-carboxylate

Ce travail a fait l'objet de la publication ci-dessous :

European Journal of Medicinal Chemistry, Volume 280, 15 December 2024, 116935.
Research paper

Hit-to-lead optimization of 4,5-dihydrofuran-3-sulfonyl scaffold against Leishmania amazonensis. Effect of an aliphatic moiety

Oscar Leonardo Avendaño Leon [a 1], Fabiana Maia Santos Urbancg Moncorvo [c 1], Christophe Curti [a b], Youssef Kabri [a], Sébastien Redon [a], Patrice Vanelle [a b], Eduardo Caio Torres-Santos [c]

[a] Aix Marseille Univ, CNRS, ICR UMR 7273, Equipe Pharmaco-Chimie Radicalaire, Faculté de Pharmacie, 27 Boulevard Jean Moulin, CS30064, CEDEX 05, 13385, Marseille, France
[b] Service Central de la Qualité et de l'Information Pharmaceutiques (SCQIP) Hôpital de la Conception, Pharmacy Department. Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille (AP-HM), 147 Bd Baille, 13005, France
[c] Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Av. Brasil, 4365, Rio de Janeiro, 21040-900, Brazil
Received 12 July 2024, Revised 1 October 2024, Accepted 1 October 2024, Available online 5 October 2024, Version of Record 9 October 2024.

European Journal of Medicinal Chemistry 280 (2024) 116935

Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejmech

Research paper

Hit-to-lead optimization of 4,5-dihydrofuran-3-sulfonyl scaffold against *Leishmania amazonensis*. Effect of an aliphatic moiety

Oscar Leonardo Avendaño Leon [a,1], Fabiana Maia Santos Urbancg Moncorvo [c,1], Christophe Curti [a,b], Youssef Kabri [a], Sébastien Redon [a], Patrice Vanelle [a,b,*], Eduardo Caio Torres-Santos [c]

[a] Aix Marseille Univ, CNRS, ICR UMR 7273, Equipe Pharmaco-Chimie Radicalaire, Faculté de Pharmacie, 27 Boulevard Jean Moulin, CS30064, CEDEX 05, 13385, Marseille, France

[b] Service Central de la Qualité et de l'Information Pharmaceutiques (SCQIP) Hôpital de la Conception, Pharmacy Department. Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille (AP-HM), 147 Bd Baille, 13005, France

[c] Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Av. Brasil, 4365, Rio de Janeiro, 21040-900, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Leishmaniasis
Pharmacomodulation
4,5-Dihydrofuran
Amidoxime

ABSTRACT

In line with our objective of designing new antileishmanial compounds for oral use, we report the synthesis and biological evaluation *in vitro* of original 4,5-dihydrofuran derivatives bearing an amidoxime group. Previous optimization focused on position 3 of the dihydrofuran ring involving aromatic fragments, resulting in the identification of the compound (HIT) 4-(5-benzyl-3-((4-fluorophenyl)sulfonyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-*N*′-hydroxybenzimidamide (IC_{50} = 5.4 ± 1.0 μM, *L. amazonensis* promastigote, IC_{50} = 7.9 ± 1.1 μM, *L. amazonensis* intracellular amastigote). In the present work, position 3 was substituted with an aliphatic moiety. This modification was guided by a ligand-based approach, given the unknown biological target or mechanism of action for this compound. The 4,5-dihydrofuran derivatives were synthesized using microwave-assisted manganese (III) acetate-based oxidative cyclization of linear β-keto-carboxylic and β-keto-sulfone substrates, overcoming synthetic challenges to obtain aliphatic derivatives of 4,5-dihydrofuran-3-carboxamides. Finally, an unexpected and interesting biological activity with the 4,5-dihydrofuran-3-carboxylate ($IC_{50} < 5$ μM) against the amastigote form is discussed.

1. Introduction

Leishmaniasis is a complex vector-borne disease caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*, transmitted through the bite of infected female phlebotomine sandflies. This disease affects nearly one billion individuals across 90 countries worldwide, resulting in around 1 million new cases and 30,000 deaths estimated annually [1]. The epidemiology of leishmaniasis is intricately linked to environmental factors. Climate change, particularly alterations in temperature and rainfall patterns, can expand the habitats of these vectors, potentially increasing the risk of transmission. This expansion is further exacerbated by secondary effects such as population displacement and malnutrition, which can increase susceptibility to infection. The disease manifests in three main forms: visceral (VL), cutaneous (CL), and mucocutaneous leishmaniasis (MCL), each presenting distinct clinical symptoms ranging from skin ulcers to severe organ damage [2]. Moreover, leishmaniasis can lead to significant health complications and even be fatal in the absence of treatment [3].

Existing conventional antileishmanial treatments have clinical limitations, such as toxicity, drug resistance, or high cost (e.g., pentamidine, antimonials, amphotericin B, and miltefosine) [4,5]. Hence, ongoing research to discover new cost-effective antileishmanial compounds conceived for oral use is of key importance. These advancements aim to improve patient outcomes and contribute to efforts to control and

* Corresponding author. Aix Marseille Univ, CNRS, ICR UMR 7273, Equipe Pharmaco-Chimie Radicalaire, Faculté de Pharmacie, 27 Boulevard Jean Moulin, CS30064, CEDEX 05, 13385, Marseille, France.

E-mail addresses: oscar-leonardo.avendano-leon@etu.univ-amu.fr (O.L. Avendaño Leon), fabianamaia.santos@gmail.com (F.M. Santos Urbancg Moncorvo), christophe.curti@univ-amu.fr (C. Curti), youssef.kabri@univ-amu.fr (Y. Kabri), sebastien.redon@univ-amu.fr (S. Redon), patrice.vanelle@univ-amu.fr (P. Vanelle), ects@ioc.fiocruz.br (E.C. Torres-Santos).

[1] These authors contributed equally.

https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116935
Received 12 July 2024; Received in revised form 1 October 2024; Accepted 1 October 2024
Available online 5 October 2024
0223-5234/© 2024 The Authors. Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

eventually eliminate this debilitating disease.

With the perspective of progressing toward *in vivo* testing, a Hit-to-Lead optimization process was performed to enhance activity against *Leishmania amazonensis*. In this work the effect of aliphatic derivatives at position 3 of the dihydrofuran ring was explored, whereas previous research focused on aromatic derivatives at this position. Therefore, an aliphatic series was designed using a scaffold hopping approach, inspired by a previously identified HIT compound featuring a 3-Arylsulfonyl structure [6,7], Scheme 1.

The biological target or mechanism of action linked to the antileishmanial activity of the amidoxime group remains unknown. Therefore, conducting computer-aided drug design (structure-based approach) without a reasonable hypothesis seems challenging due to the wide diversity of antileishmanial targets with varying mechanisms of action [8,9], as shown in Table 1. Consequently, foreseeing a hypothetical bioisosteric effect [10–12], in this work, a similarity drug-drug method was proposed, combined with predicted pharmacokinetics descriptors, to identify suitable aliphatic derivatives for evaluation [13,14].

From our ongoing work, we have previously reported that both the dihydrofuran and amidoxime moieties are necessary for the antileishmanial effect. The current work aims to investigate whether the sulfone moiety is also indispensable for antileishmanial activity or if it can be effectively replaced.

Table 1
Types of targets and mechanisms of action reported for antileishmanial compounds.

Principal mechanism	Target	Principal mechanism	Target
Redox balance/ Polyamine biosynthesis pathway	Trypanothione reductase, TR1 [15]	Thiol metabolism	Cysteine proteinase [16]
	Trypanothione synthase [17]	Purine salvage pathway	Nucleoside hydrolase [18]
	l-Arginase [19]		Nucleoside diphosphate Kinase NDK [20,21]
	Tryparedoxin peroxidase (TXNPX) [22]		RNA translation [23]
Folate metabolism	Pteridine reductase 1, PTR1 [24]	Mitochondrial electron chain	NADH dehydrogenase [25]
	Dihydrofolate reductase DHFR [26]		
Pyrimidine salvage pathway	Nucleoside transporter [27,28]	Protein kinases	Protein kinase CRK [29]
			Mitogen-activated kinases MAPKs [30]
Sterol biosynthesis	Sterol-14-alpha-demethylase [31]	Glycolitic pathway	GAPDH [32]
	SQS - Squalene epoxidase [33]		
	HMGR - 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase [34]		Phosphoglycerate kinase [35]
			Mannosyltransferase [36]

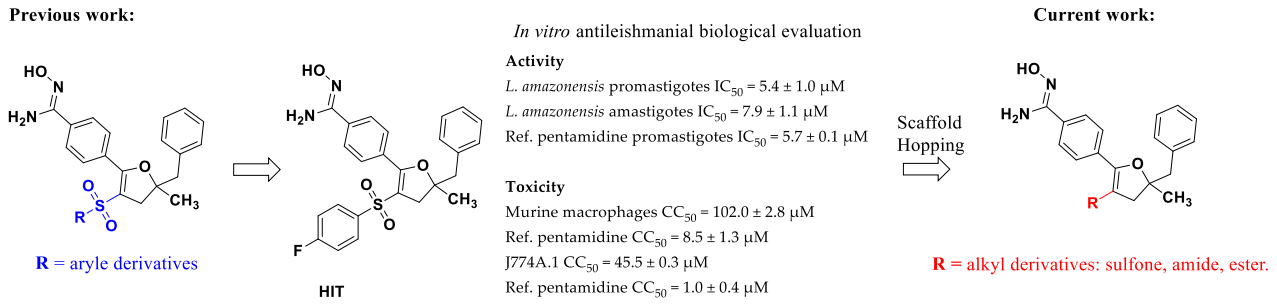
2. Results and discussion

2.1. Chemistry

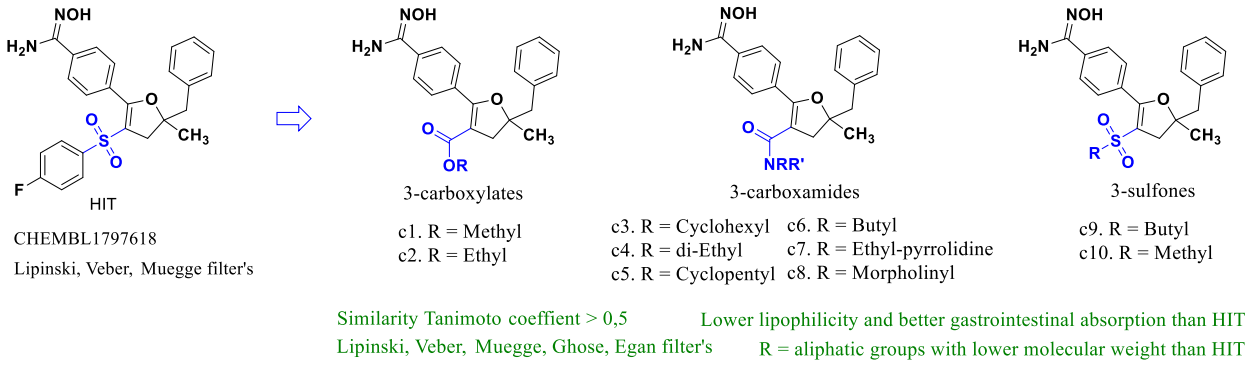
A preliminary analysis of suitable modifications was guided by the Similarity Tanimoto coefficient [37–40], along with other biopharmaceutical predicted parameters and synthetic accessibility, Scheme 2 Software ADMET Predictor® and Open-source programs such as Swiss Drug Design®, R package®, and the ChEMBL library [41,42] were used to perform this initial assessment (further details can be found in the supplementary document). Thus, a selection of ten aliphatic compounds was made for synthesis. Among these, modifications bearing the ester group (compounds **c1** and **c2**) and the amide group (compounds **c3** to **c8**) were designed to enhance predicted physicochemical properties for oral bioavailability [43]. Compounds **c9** and **c10**, featuring the sulfone group with alkyl moieties, were included as reference compounds.

The synthesis of compounds **c1** to **c10** was conducted using previously reported methods, Scheme 3. For ester **c1** and **c2**, the synthetic pathway involved in the first step an oxidative free-radical cyclization mediated by $Mn(OAc)_3$ of the respective linear β-keto-ester substrates (**a1** and **a2**) and terminal alkene (2-methylallyl)benzene, yielding the 4,5-dihydrofuran-carboxylate moiety in good yields (**b1**: 40 % and **b2**: 69 %). The formation of the intermediate dihydrofuran scaffold possibly proceeds via a mechanism analogous to those previously reported for β-ketosulfones and alkenes, such as vinylbenzene, 1,1-diphenylethene, or substituted allylbenzene, Scheme 4. According to this mechanism, after the formation of a manganese (III)-enolate complex with a linear β-ketoester or a linear β-ketoamide, widely described for α-unsubstituted compounds, (2-methylallyl)benzene allows a carbon–carbon bond formation with a tertiary carbon radical (**a**) stable enough to undergo oxidation by a second equivalent of $Mn(OAc)_3$ or $Cu(OAc)_2$. This oxidation gives rise to a carbocation (**b**), followed by intramolecular cyclization to yield 2,3-dihydrofuran. As previously reported, this reaction is sensitive to the type of alkene; for example, non-substituted allylbenzene, with a less stable intermediate radical, leads to the formation of a tetralin derivative [44].

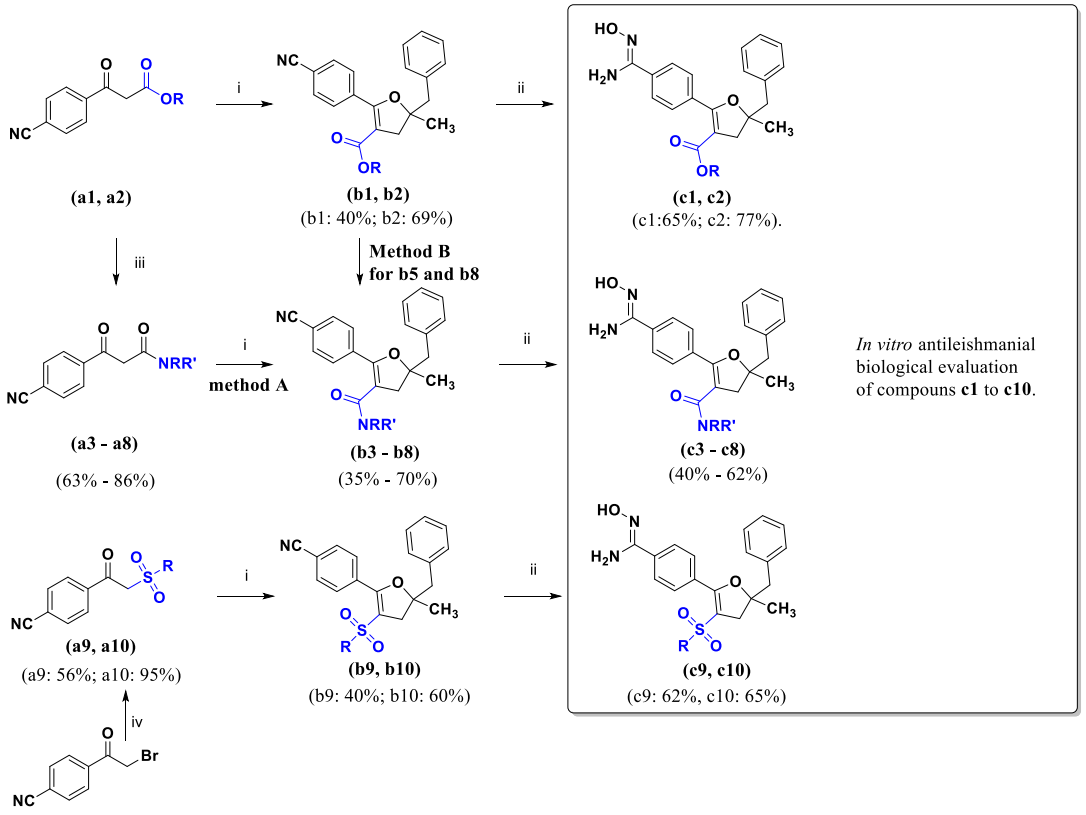
These intermediate compounds, bearing a cyano group, were then reacted with hydroxylamine hydrochloride and potassium *tert*-butoxide in DMSO, providing amidoximes **c1** and **c2** in good yields (**c1**:65 %, **c2**: 77 %). Amide derivatives **c3** to **c8** were obtained through a three-step synthetic pathway. In the first step, compounds **a3** to **a8** were obtained under microwave irradiation of commercially available compound **a2** (ethyl 3-(4-cyanophenyl)-3-oxopropanoate) and the corresponding amine with a catalytic amount of DMAP (0.1 equiv.). Yields of linear β-keto-amides ranged from 63 % to 86 %, which is consistent with previously reported values [45–48]. These products were obtained in a keto-enol equilibrium, with the ratio of keto to enol forms varying significantly based on the nature of the substituents, as



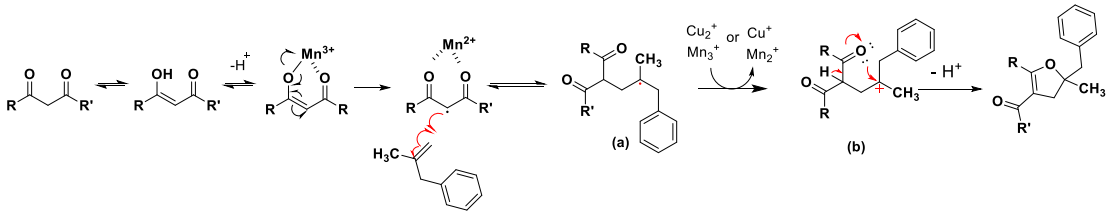
Scheme 1. Optimization of 4,5-dihydrofuran-3-sulfonyl scaffold against *Leishmania amazonensis*.



Scheme 2. Modulation at position 3 of the dihydrofuran scaffold bearing an amidoxime group.



Scheme 3. Synthesis of 4,5-dihydrofuran derivatives bearing an amidoxime group.
Reagent and conditions: i) (2-methylallyl)benzene (2 equiv.), $Mn(OAc)_3$ (2.1 equiv.), $Cu(OAc)_2$ (1 equiv.), AcOH, MW, 80 °C, 3 h. ii) KO*t*Bu (10 equiv.), $NH_2OH{\cdot}HCl$ (10 equiv.), DMSO, 18 h, 0 °C - RT, N_2. iii) Amine (2 equiv.), DMAP (0.1 equiv.), Toluene, MW, 150 °C, 3 h. iv) CH_3SO_2Na (1 equiv.), Dioxane-H_2O 1:1 reflux 12 h; or $C_4H_9SO_2Cl$ (1.5 equiv.), Na_2SO_3 (1.5 equiv.), $NaHCO_3$ (1.5 equiv.), H_2O, MW, 100 °C, 1 h, 200 W. Method B: Morpholine (1.5 equiv.), LiHMDS (2.5 equiv.), Toluene, 18 h, 70 °C, N_2.



Scheme 4. Manganese (III) – based oxidative free radical cyclization of dicarbonyl compounds with (2-methylallyl)benzene.

described in the experimental section. Notably, the substitution with ethyl-pyrrolidine (**a7**) resulted in an almost exclusive formation of the enol form (keto/enol ratio of 1/99). In contrast, derivatives with di-ethyl and morpholinyl substituents (**a4**, **a8**) showed keto/enol ratios of 1/5 and 1/2, respectively. Compounds with cyclohexyl and butyl groups (**a3**, **a6**) displayed a balanced equilibrium, with a ratio of 1/1. A plausible mechanism for this reaction was suggested (see supplementary materials).

The second step, an oxidative free-radical cyclization mediated by $Mn(OAc)_3$ of the respective linear β-keto-amide substrates (**a3** to **a8**) and terminal alkene (2-methylallyl)benzene, yielding the 4,5-dihydrofuran-carboxamide moiety in moderate to good yields (35 %–70 %). Purification of 4,5-dihydrofuran-carboxamide containing the morpholine moiety from the respective linear β-keto-amide **a8** proved unexpectedly challenging. Thus, method B was subsequently proposed [49–53], involving an aminolysis reaction mediated by lithium bis(trimethylsilyl) amide (LiHMDS) of the cyclized ester ethyl 4,5-dihydrofuran carboxylate (**b2**), yielding the intermediate **b8**. In the third step, these intermediates **b3** to **b8**, bearing a cyano group, underwent a reaction with hydroxylamine hydrochloride and potassium *tert*-butoxide in DMSO, providing amidoximes **c3** to **c8** in moderate to good yields (40–62 %). The sulfone derivatives **c9** and **c10** were synthesized also through a three-step synthetic pathway. Initially, linear β-keto-sulfones **a9** and **a10** were obtained by nucleophilic substitution of the bromoacetophenone starting material with the corresponding sulfonyl group under MW irradiation [54], (**a9**: 56 % and **a10**: 95 %), methods previously studied by our team. Next, the second step, oxidative free-radical cyclization mediated by $Mn(OAc)_3$ of these compounds and the terminal alkene (2-methylallyl)benzene yielded the 4,5-dihydrofuran-sulfone moiety, **b9** and **b10** (**b9**: 40 % and **b10**: 60 %). These intermediates, containing a cyano group, underwent a reaction with hydroxylamine hydrochloride and potassium *tert*-butoxide in DMSO, providing amidoximes **c9** to **c10** in good yields (**c9**: 62 %, **c10**: 65 %).

2.2. Biology

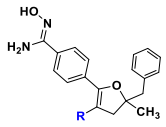
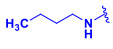
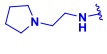
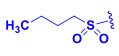
The synthesized **c1**-**c10** amidoximes were evaluated *in vitro* for their activity against both *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016) promastigotes and intracellular amastigotes, as well as their cytotoxicity in murine macrophages. Preliminary activity tests were carried out on *L. amazonensis* promastigotes. The 50 % growth inhibitory activity (IC_{50}) was determined after 72 h of cultivation with each compound and evaluated by assay with resazurin, through independent experiments in triplicates. Compounds **c1**-**c10** showed antileishmanial activities with IC_{50} values ranging from 4.7 to 101.7 μM (Table 2). The amide type modifications yielded compounds with moderate activity, showing concentrations above 10 μM. Globally, no advantage was observed for the amide aliphatic derivatives compared to the sulphone HIT (IC_{50} 5.4 ± 1.0 μM) or the drug pentamidine (IC_{50} 5.7 ± 0.1 μM) as previously reported [11]. Sulfone alkyl derivatives exhibited reduced activity compared to the same reference with IC_{50} values of 63.5 and 91.4 μM for **c9** and **c10** respectively.

On the other hand, the ester derivatives, compounds **c1** and **c2**, demonstrated significant activity against the promastigote form of the parasites, with IC_{50} values of 4.7 and 6.3 μM, respectively. In the interest of investigating an adequate bioactivity profile of these 4,5-dihydrofuran-carboxylate derivatives, a cytotoxicity test was carried out before evaluating their effectiveness against the amastigote form of the parasite, involved in human infection. (Table 3). Compound **c1** had a 50 % cytotoxic concentration (CC_{50}) of 70.6 μM and compound **c2** had a 50 % cytotoxic concentration (CC_{50}) of 112.4 μM. Both compounds **c1** and **c2** demonstrated interesting activity against the amastigote form of the parasites with inhibitory concentrations (IC_{50}) of 2.3 and 1.3 μM respectively. The selectivity index for **c1** was 30.7 and 87.8 for **c2**, which means that compounds **c1** and **c2** cause cytotoxicity in the host cell at a concentration that is 30.7 and 87.8 times higher than that required for a therapeutic effect, respectively. These results meet the current guidelines in the literature, which indicate that for a compound to be considered a lead for the treatment of leishmaniasis, it should have an IC_{50} below 10 μM and a selectivity index higher than 10 [55].

Both 4,5-dihydrofuran-carboxylate derivatives showed similar activity against the amastigote form compared to the promastigote form. However, the ethyl derivative containing the ester group, compound **c2** (IC_{50} = 1.3 ± 0.2 μM) demonstrated promising antileishmanial activity, surpassing the biological activity of the Hit compound (IC_{50} of intracellular amastigotes = 7.9 ± 1.1 μM). Furthermore, the selectivity index for this ethyl ester derivative increased significantly (SI = 87.8), being almost 5 times higher than that of the HIT sulfone (SI = 12.9). This highlights that the effectiveness of the 4,5-dihydrofuran structure is significantly influenced by the nature of the moiety at position 3. This enhanced antileishmanial effect of the ester group has also been reported in other hit-to-lead projects [56,57], in contrast to amide or sulfone groups, which demonstrated a loss of activity. The physicochemical properties modulated by the ester group of the molecule may play a role in cellular interactions, for example in the intracellular form of the parasite, where membrane crossing capabilities are important. The ester group may offer better performance in this aspect or may undergo different metabolic pathways compared to the sulfone or amide groups.

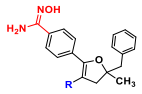
Regarding the predicted data, the corresponding carboxylates could potentially constitute a portion of the overall metabolic products, along with other significant metabolites resulting from aromatic

Table 2
Antipromastigote activity of amidoxime derivatives carrying aliphatic groups at position 3 on 4,5-dihydrofuran.

	Compound	R	Activity[a]	Compound	R	Activity[a]
	**c1**		4.7 ± 1.02	**c6**		92.6 ± 1.04
	c2		6.3 ± 1.02	**c7**		101.7 ± 1.03
	c3		43.6 ± 1.02	**c8**		>128
	c4		60.4 ± 1.01	**c9**		63.5 ± 1.13
	c5		61.1 ± 1.00	**c10**		91.4 ± 1.04

[a] *L. amazonensis* promastigotes. The IC_{50} (μM/72 h) values correspond to the mean ± SD of three independent experiments.

Table 3
Antileishmanial activity, cytotoxicity and selectivity index of the 4,5- dihydrofuran-3-carboxylate carrying an amidoxime group.

	Compound	Structure	Cytotoxicity CC_{50} (μM/72 h)	Intracellular Amastigotes IC_{50} (μM/72 h)	SI=CC_{50}/IC_{50} Intracellular Amastigotes
	**c1**		70.6 ± 6.1	2.3 ± 0.2	30.7
	c2		112.4 ± 9.3	1.3 ± 0.2	87.8

hydroxylation or hydroxylation of the methylene group on the benzyl moiety. Thus, further *in vivo* studies will focus on the ethyl carboxylate. Considering the wide complexity of mammalian carboxylesterases—including tissue distribution, substrate specificity, and factors affecting the regulation and activity of these enzymes, such as genetic polymorphisms, nuclear receptors, and drug interactions—these studies will aim to experimentally identify and test the specific metabolic products [58].

On the other hand, the amidoxime group may contribute to the higher activity against intracellular amastigotes compared to promastigotes. As the parasitophorous vacuole is acidic (which reaches a pH of 4.5 [59,60]) while the cytoplasm is neutral, apolar compounds could cross the vacuole membrane [61,62]. Once inside, the amidoxime could be protonated [63,64], leading to the accumulation of the compounds and enhancing the anti-amastigote activity.

3. Conclusion

The evaluation of the biological activity of the 4,5-dihydrofuran scaffold shows a significant influence by the nature of the moiety at position 3. Our findings indicate that the ester group exhibits enhanced activity, contrasting with alkyl amides and alkyl sulfones that showed a loss of activity against *L. amazonensis*. These results have prompted further investigation into the ester moiety, which has demonstrated promising activity against both promastigotes and intracellular amastigotes, along with a superior selectivity index compared to the sulfone HIT. These results suggest potential for further *in vivo* testing of 4,5-dihydrofuran-carboxylate derivatives bearing an amidoxime group against *L. amazonensis*.

4. Experimental

4.1. Chemistry

4.1.1. General

Reagents were purchased from Sigma-Aldrich (3050 Spruce Street St. Louis, MO, 63103, USA), Fluorochem (Unit 14 Graphite Way, Hadfield, Glossop SK13 1QH, UK), Fisher Scientific (168 3rd Ave, Waltham, MA 02451, USA), or TCI chemicals (9211 North Harborgate Street, Portland, OR 97203, USA) and used without further purification. Microwave reactions were performed using either monomode reactors: Biotage Initiator® classic (Uppsala, Sweden) in sealed vials with output power from 0 to 400 W or in a multimode microwave oven ETHOS Synth Lab Station (Ethos start, Milestone Inc.).

Reaction monitoring was performed either using Thin Layer Chromatography (TLC) on aluminum plates (5 × 5 cm) precoated with silica gel 60 $F^{25}4$ nm (Merck-F_{254} or Alugram®: Macherey-Nagel) in an appropriate eluent and visualized using ultraviolet light under a UV-Lamp VL-6.CL., 254 nm (6 W) and 365 nm (6 W), either by LC-MS analyses on a Thermo Scientific Accela High Speed LC System® (168 3rd Ave, Waltham, MA, USA) coupled with a single quadrupole mass spectrometer Thermo MSQ Plus® (168 3rd Ave, Waltham, MA, USA), with an HPLC column Thermo Hypersil Gold® (168 3rd Ave, Waltham, MA 02451, USA) 50 × 2.1 mm (C18 bounded), with particles of a diameter of 1.9 mm. The volume of sample injected into the column was 1 μL. Chromatographic analysis, total duration of 8 min, was on the gradient of the following solvents: t = 0 min, methanol/water 50:50; 0 < t < 4 min, linear increase in the proportion of methanol to a methanol/water ratio of 95:5; 4 < t < 6 min, methanol/water 95:5; 6 < t < 7 min, linear decrease in the proportion of methanol to return to a methanol/water ratio of 50:50; 6 < t < 7 min, methanol/water 50:50. The water used was buffered with ammonium acetate 5 mM. The flow rate of the mobile phase was 0.3 mL/min, at the Faculté de Pharmacie of Marseille. The purity of synthesized compounds was checked by the relative area in the LC chromatogram, >90 % for intermediates and >95 % for tested compounds.

Melting points were determined on a Köfler melting point apparatus (Wagner & Munz GmbH, München, Germany) and were uncorrected.

Elemental analysis was performed on a Flash EA 1112 analyzer (Thermo Fisher Scientific, Finnigan, San Jose, CA, USA) con-trolled by Eager Xperience software - Ver. 1.2, under the conditions: temperature 970 °C, carrier gas helium, gas flow rate 140 mL/min, detector catharometer, performed at the Spectropole, Faculté des Sciences de Saint-Jérôme (Marseille, France).

The following adsorbent was used for column chromatography: silica gel 60 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany, particle size 0.063–0.200 mm, 70–230 mesh ASTM or Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany, particle size 0.063–0.04 mm).

Flash chromatography was performed on a puriFlash® 5.020 apparatus (Interchim, Montluçon, France). PuriFlash ® 5.020. Mode injection valve with solid deposit in dry-load PF-DEL-F004 with Celite 545 CAS 68855-54-9. Maximum pressure 15 bar, Flow rate 15 mL/min. UV-VIS detector configured in 254 nm.

NMR spectra were recorded on a Bruker Avance NEO 400 MHz NanoBay spectrometer at the "Faculté de Pharmacie" of Marseille. Residual ^1H and ^{13}C peaks in deuterated solvent ($CDCl_3$) were used for chemical shift calibration without the need for an additional internal standard. ^1H NMR: reference $CDCl_3$ $\delta = 7.26$ ppm, reference DMSO-d_6 $\delta = 2.50$ ppm and ^{13}C NMR: reference $CDCl_3$ $\delta = 77.16$ ppm, reference DMSO-d_6 $\delta = 39.52$ ppm. Data for ^1H NMR are reported as follows: chemical shifts (δ) in parts per million (ppm), multiplicity (described as follows: s, singlet; bs, broad singlet; d, doublet; t, triplet; q, quadruplet; dd, doublet of doublet; ddd, doublet of doublet of doublet; m, multiplet), coupling constants (J) in Hertz (Hz) and integration. Data for ^{13}C NMR are reported as follows: chemical shifts (δ) in parts per million (ppm).

4.1.2. Methyl 3-(4-cyanophenyl)-3-oxopropanoate [65] (a1)

To a 100 mL two-neck flask charged with a suspension of 60 % NaH in THF (5.6 g, 0.14 mmol) in 8.4 mL (100 mmol) dimethyl carbonate (DMC) was added dropwise acetophenone (7.25 g, 50 mmol) in 10 mL dimethyl carbonate. The resulting solution was refluxed at 100 °C for 2 h. After the indicated time, the reaction mixture was quenched with NH_4Cl, and extracted with EtOAc. The organic layers were combined, washed with water (1 × 20 mL), brine (1 × 20 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated. The crude product was purified by column chromatography (silica gel; eluent: AcOEt/Petroleum ether, 30/70). The analytical data are consistent with those in previous literature [66]. The product was obtained in the enol form, as a white solid. Yield 80 %. $C_{11}H_9NO_3$ ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 12.46 (s, 1H, OH), 7.87 (d, $^3J_{H\text{-}H} = 8.4$ Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.72 (d, $^3J_{H\text{-}H} = 8.4$ Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 5.72 (s, 1H, CH), 3.83 (s, 3H, CH_3).

4.1.3. General procedure for preparation of linear β-ketoamides

A microwave vial of 20 mL equipped with a stirring bar was charged with ethyl 3-(4-cyanophenyl)-3-oxopropanoate (500 mg, 2.3 mmol, 1.0 equiv.), dimethylaminopyridine – DMAP (0.1 equiv.) and respective amine (2.0 equiv.), in 15 mL of toluene. The reaction mixture was stirred for 3 h at 150 °C under microwave irradiation. After 3 h, solvent was evaporated under vacuum, and then the mixture was purified by column chromatography on silica gel in an appropriate solvent, affording the title product.

*4.1.3.1. 3-(4-Cyanophenyl)-N-cyclohexyl-3-oxopropanamide **(a3)**.* Compound **a3** was synthesized following the former general procedure, using cyclohexanamine (456 mg, 4.6 mmol, 2 equiv.). The crude product was purified by column chromatography (silica gel; eluent: dichloromethane/methanol from 100/0 to 97/3). The product was obtained as a mixture of keto and enol forms as a light orange solid. Yield 71 %. M.p. 132 °C. The ratio of 1/1 Keto/Enol was estimated according to ^{1}H NMR integration. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 14.36 (s, 1H, OH), 8.12–8.09 (m, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.84–7.77 (m, 4H, $4CH_{Ar}$, keto + enol), 7.71–7.65 (m, 2H, $2CH_{Ar}$), 6.58 (br s, 1H, NH), 5.49 (s, 1H, CH, enol), 5.30 (br s, 1H, NH), 3.91 (s, 2H, CH_2, keto), 3.86–3.74 (m, 2H, 2 C H, keto + enol), 2.01–1.87 (m, 4H, $2CH_2$, keto + enol), 1.75–1.58 (m, 6H, $3CH_2$, keto + enol), 1.42–1.34 (m, 4H, $2CH_2$, keto + enol), 1.23–1.14 (m, 6H, $3CH_2$, keto + enol). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 194.7 (C), 170.7 (C), 167.0 (C), 163.9 (C), 139.2 (C), 138.8 (C), 132.8 ($2CH_{Ar}$), 132.4 ($2CH_{Ar}$), 129.2 ($2CH_{Ar}$), 126.3 ($2CH_{Ar}$), 118.5 (C), 117.8 (C), 117.3 (C), 113.9 (C), 91.1 (CH), 48.8 (CH), 48.3 (CH), 46.8 (CH_2), 33.3 ($2CH_2$), 33.0 ($2CH_2$), 25.6 ($2CH_2$), 24.9 ($2CH_2$), 24.8 ($2CH_2$). Anal. calcd for $C_{16}H_{18}N_2O_2$ (270.33): C 71.09, H 6.71, N 10.36; found C 71.38, H 6.68, N 10.33.

*4.1.3.2. 3-(4-Cyanophenyl)-N,N-diethyl-3-oxopropanamide **(a4)**.* Compound **a4** was synthesized following the former general procedure, using diethylamine (336 mg, 4.6 mmol, 2 equiv.). The crude product was purified by column chromatography (silica gel; eluent: dichloromethane/methanol from 100/0 to 97/3). The product was obtained as a mixture of keto and enol forms as a light brown solid. Yield 78 %. M.p. 67–68 °C. The Keto/Enol ratio of 1/5 was estimated according to ^{1}H NMR integration. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 15.64 (s, 1H, OH), 8.11 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$, keto), 7.86 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$, enol), 7.76 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$, keto), 7.68 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.6 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$, enol), 5.78 (s, 1H, CH, enol), 4.04 (s, 2H, CH_2, keto), 3.54–3.36 (m, 8H, $4CH_2$, keto + enol), 1.32–1.17 (m, 12H, $4CH_3$, keto + enol). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 193.3 (C), 171.0 (C), 169.1 (C), 165.4 (C), 139.6 (C), 139.5 (C), 132.6 ($2CH_{Ar}$), 132.3 ($2CH_{Ar}$), 129.4 ($2CH_{Ar}$), 126.6 ($2CH_{Ar}$), 118.6 (C), 118.0 (C), 116.7 (C), 113.8 (C), 86.9 (CH), 45.8 (CH_2), 42.9 (CH_2), 42.5 (CH_2), 40.8 (CH_2), 40.5 (CH_2) 14.5 (CH_3), 14.4 (CH_3), 13.4 (CH_3), 13.0 (CH_3). Analysis calculated for $C_{14}H_{16}N_2O_2$: C 68.83, H 6.60, N 11.47; found C 68.58, H 6.41, N 11.20. The NMR data were in agreement with the literature values [67].

*4.1.3.3. N-butyl-3-(4-cyanophenyl)-3-oxopropanamide **(a6)**.* Compound **a6** was synthesized following the former general procedure, with butan-1-amine (336 mg, 4.6 mmol, 2 equiv.). The crude product was purified by column chromatography (silica gel; eluent: dichloromethane/methanol from 100/0 to 97/3). The title product was obtained as a mixture of keto and enol forms as a light brown solid. Yield 63 %. M.p. 135–136 °C. The Keto/Enol ratio of 1/1 was estimated according to ^{1}H NMR integration. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.07 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$, keto), 7.84–7.72 (m, 4H, $4CH_{Ar}$, keto + enol), 7.63 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$, enol), 6.91 (s, 1H, NH), 5.90 (s, 1H, NH), 5.56 (s, 1H, CH, enol), 3.94 (s, 2H, CH_2, keto), 3.37–3.20 (m, 4H, $2CH_2$, keto + enol), 1.59–1.43 (m, 4H, $2CH_2$ keto + enol), 1.39–1.28 (m, 4H, $2CH_2$, keto + enol), 0.95–0.82 (m, 6H, $2CH_3$, keto + enol). OH not observed. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 194.4 (C), 171.5 (C), 166.5 (C), 165.2 (C), 139.1 (C), 138.8 (C), 132.7 ($2CH_{Ar}$), 132.3 ($2CH_{Ar}$), 129.1 ($2CH_{Ar}$), 126.3 ($2CH_{Ar}$), 118.5 (C), 117.8 (C), 117.0 (C), 113.6 (C), 91.0 (CH), 46.4 (CH_2), 39.7 (CH_2), 39.1 (CH_2), 31.6 (CH_2), 31.4 (CH_2), 20.0 ($2CH_2$), 13.7 ($2CH_3$). Analysis calculated for $C_{14}H_{16}N_2O_2$: C 68.83, H 6.60, N 11.47; found C 68.84, H 6.72, N 11.24.

*4.1.3.4. 3-(4-Cyanophenyl)-3-oxo-N-(2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl)propenamide **(a7)**.* Compound **a7** was synthesized following the former general procedure, with 2-(pyrrolidin-1-yl)ethanamine (525 mg, 4.6 mmol, 2 equiv.). The crude product was purified by column chromatography (silica gel; eluent: dichloromethane/methanol from 100/0 to 95/5). The product was obtained in the enol form (traces of keto form) as an oily brown solid. Yield 86 %. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 7.92 (br s, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.70 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.1 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 6.76 (br s, 1H, CH, enol), 3.49–3.37 (m, 2H, CH_2), 2.65 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 5.9 Hz, 2H, CH_2), 2.57–2.48 (m, 4H, $2CH_2$), 1.84–1.75 (m, 4H, $2CH_2$). NOH and NH not observed. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 181.0 (C), 161.4 (C), 139.0 (2C), 132.5 ($2CH_{Ar}$), 128.2 ($2CH_{Ar}$), 118.3 (C), 89.9 (CH), 54.6 (CH_2), 53.9 ($2CH_2$), 38.0 (CH_2), 23.6 ($2CH_2$). HRMS (ESI +) *m/z* calcd for $C_{16}H_{19}N_3O_2$ $[M+H]^+$ 286.1550; found 286.1558.

*4.1.3.5. 4-(3-Morpholino-3-oxopropanoyl)benzonitrile **(a8)**.* Compound **a8** was synthesized following the former general procedure, with morpholine (401 mg, 4.6 mmol, 2 equiv.). The crude product was purified by column chromatography (silica gel; eluent: dichloromethane/methanol from 100/0 to 97/5). The product was obtained as a mixture of keto and enol forms as a light-yellow solid. Yield 76 %. M.p. 158–159 °C. The Keto/Enol ratio of 1/2 was estimated according to ^{1}H NMR integration. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 15.25 (s, 1H, OH), 8.14 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$, keto), 7.86 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$, enol), 7.79 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$, keto), 7.70 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$, enol), 5.81 (s, 1H, CH, enol), 4.10 (s, 2H, CH_2, keto), 3.78–3.51 (m, 16H, $8CH_2$, keto + enol). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 192.7 (C), 170.6 (C), 169.7 (C), 164.6 (C), 139.2 (C), 139.1 (C), 132.7 ($2CH_{Ar}$), 132.4 ($2CH_{Ar}$), 129.4 ($2CH_{Ar}$), 126.6 ($2CH_{Ar}$), 118.5 (C), 117.9 (C), 117.2 (C), 114.2 (C), 86.0 (CH), 66.8 ($2CH_2$), 66.7 ($2CH_2$), 47.1 (CH_2), 45.9 ($2CH_2$), 42.6 ($2CH_2$). Analysis calculated for $C_{14}H_{14}N_2O_3$: C 65.11, H 5.46, N 10.85; found 64.96, H 5.31, N 10.73.

4.1.4. Preparation of linear β-ketosulfones

*4.1.4.1. 4-(2-(Butylsulfonyl)acetyl)benzonitrile **(a9)**.* To a solution of 1-butanesulfonyl chloride (1.05 g, 6.7 mmol, 1.5 equiv.) in water (40 mL), sodium sulfite (851 mg, 6.7 mmol, 1.5 equiv.) and sodium bicarbonate (567 mg, 6.7 mmol, 1.5 equiv.) were added. The reaction mixture was heated under reflux in a microwave oven under irradiation at 500 W during 20 min. Then, an ethanolic solution of 4-(2-bromoacetyl)benzonitrile (1 g, 4.5 mmol, 1 equiv.) was added. Heating of the reaction mixture was continued for 10 min under the same conditions. After cooling, the reaction mixture was neutralized by adding diluted chlorhydric acid and the solid product obtained was filtered and crystallized from isopropanol. Yellow powder, yield 56 %. M.p. 125 °C. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 8.13 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.6 Hz, 2H, $2H_{Ar}$), 7.83 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.6 Hz, 2H, $2H_{Ar}$), 4.57 (s, 2H, CH_2), 3.27–3.19 (m, 2H, CH_2), 1.94–1.83 (m, 2H, CH_2), 1.54–1.47 (m, 2H, CH_2), 0.99 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.50 Hz, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 188.5 (C), 138.7 (C), 132.9 ($2CH_{Ar}$), 129.9 ($2CH_{Ar}$), 117.9 (C), 117.6 (C), 60.0 (CH_2), 53.7 (CH_2), 24.0 (CH_2), 21.7 (CH_2), 13.6 (CH_3). Anal. calcd for $C_{13}H_{15}NO_3S$: C, 58.85; H, 5.70; N, 5.28; S, 12.08. Found: C, 58.51; H, 5.66; N, 5.21; S, 11.81.

*4.1.4.2. 4-(2-(Methylsulfonyl)acetyl)benzonitrile **(a10)**.* Sodium sulfinate ($MeSO_2Na$, 228 mg, 2.2 mmol, 1.0 equiv.) was added to a solution of 4-(2-bromoacetyl)benzonitrile (500 mg, 2.2 mmol, 1.0 equiv.) in a

cosolvent of 1,4-dioxane and water (20 mL, v/v = 1:1) at rt. The reaction mixture was stirred at reflux for 6 h. The reaction mixture was cooled to rt and extracted with dichloromethane (3 × 40 mL). The organic extracts were collected and washed with saturated aqueous $NaHCO_3$ (3 × 40 mL) and dried over Na_2SO_4. The solvent was evaporated under reduced pressure, and the crude product was purified by column chromatography (silica gel; eluent: AcOEt/Cyclohexane 1:1) affording a pale-yellow powder, yield 95 %. M.p. 95 °C. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 8.12 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.7 Hz, 2H, $2H_{Ar}$), 7.84 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.7 Hz, 2H, $2H_{Ar}$), 4.61 (s, 2H, CH_2), 3.15 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 188.4 (C), 138.5 (C), 132.9 ($2CH_{Ar}$), 129.8 ($2CH_{Ar}$), 118.0 (C), 117.6 (C), 61.7 (CH_2), 41.9 (CH_3). Anal. calcd for $C_{10}H_9NO_3S$: C, 53.80; H, 4.06; N, 6.27; S, 14.36. Found: C, 53.63; H, 4.01; N, 6.21; S, 14.19. The NMR data are consistent with those in previous literature [68].

4.1.5. General procedure for preparation of 4,5-dihydrofuran derivatives by microwave-assisted $Mn(OAc)_3$-based cyclization reaction

In a microwave vial of 20 mL equipped with a stirring bar, a solution of manganese (III) acetate dihydrate (2.1 equiv.) and copper (II) acetate (1 equiv.) in 12 mL of glacial acetic acid was heated at 80 °C under microwave irradiation 100 W for 15 min. Then the reaction mixture was cooled, and a solution of β-keto derivative (1 equiv.) and 2-methyl-3-phenyl-1-propene (2 equiv.) in 13 mL of acetic acid was added. The reaction mixture was heated for 3 h under microwave irradiations under the same conditions. The resulting product was poured into 50 mL of cold water and extracted with dichloromethane (3 × 40 mL). The organic extracts were collected and washed with saturated aqueous $NaHCO_3$ (3 × 40 mL) and dried over Na_2SO_4. Filtrate solvent was evaporated under reduced pressure and crude product was purified by flash chromatography using appropriate solvent affording the title product.

*4.1.5.1. Methyl 5-benzyl-2-(4-cyanophenyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-3-carboxylate **(b1)**.* Compound **b1** was obtained following the former general procedure, with methyl 3-(4-cyanophenyl)-3-oxopropanoate (**a1**) (1 g, 4.9 mmol, 1 equiv.) and 2-methyl-3-phenyl-1-propene (1.3 g, 9.8 mmol, 2 equiv.). The reaction mixture was monitored by TLC (eluent: dichloromethane/methanol 95/5, Rf 0.46). The crude product was purified by column chromatography (silica gel; eluent: dichloromethane/methanol from 100/0 to 98/2). The product was obtained as a white solid. Yield 40 %. Mp 85 °C. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.88 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.4 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.66 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.4 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.32–7.21 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 3.64 (s, 3H, CH_3), 3.12 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 15.5 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.02 (s, 2H, CH_2), 2.83 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 15.5 Hz, 1H, H-(CH_2)), 1.47 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 165.5 (C), 161.7 (C), 136.6 (C), 134.7 (C), 131.5 ($2CH_{Ar}$), 130.5 ($2CH_{Ar}$), 130.0 ($2CH_{Ar}$), 128.4 ($2CH_{Ar}$), 127.0 (CH_{Ar}), 118.7 (C), 113.6 (C), 104.1 (C), 88.3 (C), 51.3 (CH_3), 46.8 (CH_2), 42.2 (CH_2), 26.8 (CH_3). LC/MS ESI + tr, 7.02 min, (*m/z*) calcd for $C_{21}H_{19}NO_3$ $[M + Na]^+$ 356.11; found 356.38. HRMS (ESI +) *m/z* $[M+H]^+$ 334.1438; found 334.1440.

*4.1.5.2. Ethyl 5-benzyl-2-(4-cyanophenyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-3-carboxylate **(b2)**.* Compound **b2** was obtained following the former general procedure, with ethyl 3-(4-cyanophenyl)-3-oxopropanoate (500 mg, 2.3 mmol, 1 equiv.) and 2-methyl-3-phenyl-1-propene (608 mg, 4.6 mmol, 2 equiv.). The reaction mixture was monitored by TLC (eluent: cyclohexane/AcOEt 70/30, Rf 0.69). The crude product was purified by flash chromatography (column PuriFlash® IR-20SI–F0025; eluent: cyclohexane/AcOEt from 100/0 to 80/20 in 20 CVs - Column Volume). The UV-VIS detector was additionally configured at 307 nm, 235 nm and 205 nm. The product was obtained as an oily white solid. Yield 69 %. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.85 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.6 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.64 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.6 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.30–7.19 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 4.08 (q, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.1 Hz, 2H, CH_2), 3.10 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 15.5 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.05 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.02 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.82 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 15.5 Hz, 1H, H-(CH_2)), 1.45 (s, 3H, CH_3), 1.17 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.2 Hz, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 164.6 (C), 161.0 (C), 136.1 (C), 134.5 (C), 131.1 ($2CH_{Ar}$), 130.2 ($2CH_{Ar}$), 129.8 ($2CH_{Ar}$), 128.0 ($2CH_{Ar}$), 126.6 (CH_{Ar}), 118.3 (C), 113.2 (C), 104.2 (C), 87.8 (C), 59.7 (CH_2), 46.5 (CH_2), 42.1 (CH_2), 26.4 (CH_3), 14.0 (CH_3). HRMS (ESI +) *m/z* calcd for $C_{22}H_{21}NO_3$ $[M+Na]^+$ 370.1414; found 370.1413.

*4.1.5.3. 5-Benzyl-2-(4-cyanophenyl)-N-cyclohexyl-5-methyl-4,5-dihydrofuran-3-carboxamide **(b3)**.* Compound **b3** was obtained following the former general procedure, with 3-(4-cyanophenyl)-*N*-cyclohexyl-3-oxopropanamide (**a3**) (450 mg, 1.7 mmol, 1 equiv.) and 2-methyl-3-phenyl-1-propene (440 mg, 3.4 mmol, 2 equiv.). The reaction mixture was monitored by TLC (eluent: dichloromethane/methanol 98/2, Rf 0.34). The crude product was purified by flash chromatography (column PuriFlash® IR-20SI–F0025; eluent: first, cyclohexane in 2 CVs - Column Volume, then dichloromethane/methanol from 100/0 to 98/2 in 20 CVs - Column Volume). The UV-VIS detector was additionally configured at 307 nm, 235 nm and 205 nm. The product was obtained as a light brown oil. Yield 35 %. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.82 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.64 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.32–7.23 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 4.92 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.2 Hz, 1H, NH), 3.79–3.69 (m, 1H, CH), 3.04 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.02 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.2 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.98 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.2 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.83 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 1.89–1.82 (m, 2H, CH_2), 1.69–1.63 (m, 2H, CH_2), 1.49 (s, 3H, CH_3), 1.38–1.30 (m, 2H, CH_2), 1.17–1.09 (m, 2H, CH_2), 1.06–0.95 (m, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 164.0 (C), 156.0 (C), 136.5 (C), 134.9 (C), 131.7 ($2CH_{Ar}$), 130.4 ($2CH_{Ar}$), 129.6 ($2CH_{Ar}$), 128.3 ($2CH_{Ar}$), 127.0 (CH_{Ar}), 118.7 (C), 113.1 (C), 107.4 (C), 86.9 (C), 48.2 (CH), 47.0 (CH_2), 43.01 (CH_2), 33.2 (CH_2), 33.1 (CH_2), 27.0 (CH_2), 26.9 (CH_3), 25.6 (CH_2), 24.9 (CH_2). HRMS (ESI +) *m/z* calcd for $C_{26}H_{28}N_2O_2$ $[M+H]^+$ 401.2224; found 401.2228.

*4.1.5.4. 5-Benzyl-2-(4-cyanophenyl)-N,N-diethyl-5-methyl-4,5-dihydrofuran-3-carboxamide **(b4)**.* Compound **b4** was obtained following the former general procedure, with 3-(4-Cyanophenyl)-*N,N*-diethyl-3-oxopropanamide (**a4**) (440 mg, 1.8 mmol, 1 equiv.) and 2-methyl-3-phenyl-1-propene (476 mg, 3.6 mmol, 2 equiv.). The reaction mixture was monitored by TLC (eluent: dichloromethane/methanol 98/2, Rf 0.38). The crude product was purified by flash chromatography (column PuriFlash® IR-20SI–F0025; eluent: first, cyclohexane in 2 CVs - Column Volume, then dichloromethane/methanol from 100/0 to 98/2 in 20 CVs - Column Volume). The UV-VIS detector was additionally configured at 365 nm, and 254 nm. The product was obtained as a light brown oil. Yield 35 %. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.64 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.6 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.60 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.25–7.29 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 3.51–3.27 (m, 2H, CH_2), 3.10 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.01 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 16.1 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.91 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.87 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 16.1 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.79–2.54 (m, 2H, CH_2), 1.52 (s, 3H, CH_3), 1.12 (br s, 3H, CH_3), 0.69 (br s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 166.9 (C), 148.1 (C), 136.9 (C), 134.8 (C), 132.2 ($2CH_{Ar}$), 130.7 ($2CH_{Ar}$), 128.3 ($2CH_{Ar}$), 127.1 ($2CH_{Ar}$), 126.9 (CH_{Ar}), 118.7 (C), 112.3 (C), 108.2 (C), 86.1 (C), 47.0 (CH_2), 44.7 (CH_2), 42.5 (CH_2), 38.9 (CH_2), 27.9 (CH_3), 14.4 (CH_3), 12.5 (CH_3). LC/MS ESI + tr, 6.10 min, (*m/z*) calcd for $[M + H]^+$ 375.15; found 375.48.

*4.1.5.5. 5-Benzyl-N-butyl-2-(4-cyanophenyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-3-carboxamide **(b6)**.* Compound **b6** was obtained following the former general procedure, with *N*-butyl-3-(4-cyanophenyl)-3-oxopropanamide (**a6**) (440 mg, 1.8 mmol, 1 equiv.) and 2-methyl-3-phenyl-1-propene (476 mg, 3.6 mmol, 2 equiv.). The reaction mixture was monitored by TLC (eluent: dichloromethane/methanol 97/3, Rf 0.35). The crude product was purified by flash chromatography (column PuriFlash® IR-20SI–F0025; eluent: first, cyclohexane in 2 CVs - Column Volume, then dichloromethane/methanol from 100/0 to 98/2 in 20 CVs - Column

Volume). The UV-VIS detector was additionally configured at 365 nm and 254 nm. The product was obtained as a light brown oil. Yield 35 %. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.84 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.4 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.65 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.4 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.32–7.23 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 5.12 (br s, 1H, NH), 3.26–3.19 (m, 2H, CH_2), 3.05 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.7 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.03 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 13.9 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.00 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 13.9 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.82 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.7 Hz, 1H, H-(CH_2)), 1.50 (s, 3H, CH_3), 1.44–1.39 (m, 2H, CH_2), 1.32–1.23 (m, 2H, CH_2), 0.91 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.30 Hz, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 164.8 (C), 156.5 (C), 136.4 (C), 134.9 (C), 131.7 ($2CH_{Ar}$), 130.4 ($2CH_{Ar}$), 129.6 ($2CH_{Ar}$), 128.3 ($2CH_{Ar}$), 127.0 (CH_{Ar}), 118.7 (C), 113.1 (C), 106.9 (C), 87.0 (C), 46.9 (CH_2), 42.9 (CH_2), 39.3 (CH_2), 31.6 (CH_2), 26.9 (CH_3), 20.2 (CH_2), 13.8 (CH_3). HRMS (ESI +) *m/z* calcd for $C_{24}H_{26}N_2O_2$ $[M+H]^+$ 375.2067; found 375.2065.

*4.1.5.6. 5-Benzyl-2-(4-cyanophenyl)-5-methyl-N-(2-(pyrrolidin-1-yl) ethyl)-4,5-dihydrofuran-3-carboxamide **(b7)***. Compound **b7** was obtained following the former general procedure, with 3-(4-cyanophenyl)-3-oxo-*N*-(2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl)propenamide (**a7**) (566 mg, 1.98 mmol, 1 equiv.) and 2-methyl-3-phenyl-1-propene (520 mg, 3.96 mmol, 2 equiv.). The reaction mixture was monitored by TLC (eluent: dichloromethane/methanol 95/5, Rf 0.31). The crude product was purified by column chromatography (silica gel; eluent: dichloromethane/methanol/TEA from 100/0/0 to 88/10/2). The title product was obtained as a light brown oil. Yield 70 %. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.84 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.63 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.6 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.30–7.22 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 6.78 (br s, 1H, NH), 3.45–3.44 (m, 2H, CH_2), 3.11 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.9 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.02 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.98 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.86 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.9 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.80–2.76 (m, 6H, $3CH_2$), 1.86–1.83 (m, 4H, $2CH_2$), 1.46 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 165.0 (C), 157.6 (C), 136.5 (C), 135.3 (C), 131.6 ($2CH_{Ar}$), 130.6 ($2CH_{Ar}$), 129.9 ($2CH_{Ar}$), 128.3 ($2CH_{Ar}$), 126.9 (CH_{Ar}), 118.8 (C), 113.1 (C), 106.8 (C), 87.2 (C), 55.1 (CH_2), 54.0 ($2CH_2$), 46.9 (CH_2), 42.7 (CH_2), 37.2 (CH_2), 26.8 (CH_3), 23.5 ($2CH_2$). HRMS (ESI +) *m/z* calcd for $C_{26}H_{29}N_3O_2$ $[M+H]^+$ 416.2333; found 416.2330.

*4.1.5.7. 4-(5-Benzyl-3-(butylsulfonyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-2-yl) benzonitrile **(b9)***. Compound **b9** was obtained following the former general procedure, with 4-(2-(butylsulfonyl)acetyl)benzonitrile (**a9**) (600 mg, 2.26 mmol, 1 equiv.) and 2-methyl-3-phenyl-1-propene (593 mg, 4.52 mmol, 2 equiv.). The reaction mixture was monitored by TLC (eluent: dichloromethane/methanol 97/3, Rf 0.25). The crude product was purified by column chromatography (silica gel; eluent: dichloromethane/methanol from 100/0 to 97/3). The title product was obtained as a light brown oil. Yield 40 %. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.76 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.56 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.34–7.24 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 3.17 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 15.1 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.14 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.5 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.98 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 15.1 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.92 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.5 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.65–2.56 (m, 2H, CH_2), 1.59 (s, 3H, CH_3), 1.42–1.32 (m, 2H, CH_2), 1.28–1.20 (m, 2H, CH_2), 0.81 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.1 Hz, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 160.6 (C), 135.8 (C), 133.2 (C), 131.8 ($2CH_{Ar}$), 130.6 ($2CH_{Ar}$), 130.1 ($2CH_{Ar}$), 128.6 ($2CH_{Ar}$), 127.4 (CH_{Ar}), 118.3 (C), 114.5 (C), 110.3 (C), 88.7 (C), 54.5 (CH_2), 46.8 (CH_2), 42.2 (CH_2), 27.8 (CH_3), 24.0 (CH_2), 21.6 (CH_2), 13.6 (CH_3). LC/MS ESI + tr, 4.18 min, (*m/z*) calcd for $C_{23}H_{25}NO_3S$ $[M + Na]^+$ 418.30; found.418.51.

*4.1.5.8. 4-(5-Benzyl-5-methyl-3-(methylsulfonyl)-4,5-dihydrofuran-2-yl) benzonitrile **(b10)***. Compound **b10** was obtained following the former general procedure, with 4-(2-(methylsulfonyl)acetyl)benzonitrile (a10) (135 mg, 0.60 mmol, 1 equiv.) and 2-methyl-3-phenyl-1-propene (160 mg, 1.2 mmol, 2 equiv.). The reaction mixture was monitored by TLC (eluent: dichloromethane/methanol 95/5, Rf 0.31). The crude product was purified by column chromatography (silica gel; eluent: dichloromethane/methanol from 100/0 to 95/5). The title product was obtained as a white oily powder. Yield 60 %. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.75 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.6 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.68 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.6 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.33–7.23 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 3.21 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 15.1 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.11 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 13.9 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.03 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 15.1 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.92 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 13.9 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.57 (s, 3H, CH_3), 1.60 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 160.0 (C), 135.7 (C), 132.8 (C), 131.7 ($2CH_{Ar}$), 130.4 ($2CH_{Ar}$), 130.0 ($2CH_{Ar}$), 128.4 ($2CH_{Ar}$), 127.3 (CH_{Ar}), 118.2 (C), 114.3 (C), 111.3 (C), 88.7 (C), 46.9 (CH_3), 43.0 (CH_2), 42.0 (CH_2), 27.5 (CH_3). LC/MS ESI + tr, 4.22 min, (*m/z*) calcd for $C_{20}H_{19}NO_3S$ $[M + H]^+$ calculated 354.29; found 354.44.

4.1.6. Procedure for preparation of compound b5 and b8 by amidation from cyclized carboxylate

A microwave vial of 5 mL equipped with a stirring bar was charged with ethyl 5-benzyl-2-(4-cyanophenyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-3-carboxylate (100 mg, 0.29 mmol, 1.0 equiv.), the respective amine (1.5 equiv.), then placed under a positive pressure of nitrogen, and subjected to three evacuation/backfilling cycles. Toluene (2 mL) and LiHMDS (1.0 M in THF, 2.5 equiv.) were sequentially added with vigorous stirring at room temperature, and the reaction mixture was stirred for 15 h at 70 °C. After the indicated time, the reaction mixture was quenched with NH_4Cl (1.0 M, 5 mL), extracted with EtOAc (3 × 15 mL), the organic layers were combined, washed with water (1 × 20 mL), brine (1 × 20 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated. Purification by flash chromatography using appropriate solvent afforded the title product.

*4.1.6.1. 5-Benzyl-2-(4-cyanophenyl)-N-cyclopentyl-5-methyl-4,5-dihydrofuran-3-carboxamide **(b5)***. Compound **b5** was obtained following the former general procedure, from cyclopentanamine (37 mg, 0.43 mmol, 1.5 equiv.). The reaction mixture was monitored by TLC (eluent: cyclohexane/AcOEt 70/30, Rf 0.37). The crude product was purified by flash chromatography (column PuriFlash® IR-50SI–F0025; eluent: cyclohexane/AcOEt from 100/0 to 80/20 in 25 CVs - Column Volume). Yield 52 %. The product was obtained as a light brown oil. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.82 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.63 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.35–7.21 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 4.98 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.2 Hz, 1H, NH), 4.22–4.14 (m, 1H, CH), 3.04 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.02 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.1 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.99 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.1 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.83 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 1.97–1.90 (m, 2H, CH_2), 1.61–1.54 (m, 4H, $2CH_2$), 1.49 (s, 3H, CH_3), 1.28–1.20 (m, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 164.5 (C), 158.7 (C), 156.0 (C), 136.6 (C), 131.8 ($2CH_{Ar}$), 130.5 ($2CH_{Ar}$), 129.6 ($2CH_{Ar}$), 128.3 ($2CH_{Ar}$), 127.0 (CH_{Ar}), 118.7 (C), 113.2 (C), 107.4 (C), 87.0 (C), 51.2 (CH), 47.0 (CH_2), 43.1 (CH_2), 33.1 (CH_2), 33.0 (CH_2), 26.9 (CH_3), 23.8 ($2CH_2$). LC/MS ESI + tr, 6.22 min, (*m/z*) calcd for $C_{25}H_{26}N_2O_2$ $[M + H]^+$ 387.22; found 387.50.

*4.1.6.2. 4-(5-Benzyl-5-methyl-3-(morpholine-4-carbonyl)-4,5-dihydrofuran-2-yl)benzonitrile **(b8)***. Compound **b8** was obtained following the former general procedure, from morpholine (38 mg, 0.43 mmol, 1.5 equiv.). The reaction mixture was monitored by TLC (eluent: cyclohexane/AcOEt 40/60, Rf 0.19). The crude product was purified by flash chromatography (column PuriFlash® IR-50SI–F0025; eluent: cyclohexane/AcOEt from 100/0 to 70/30 in 25 CVs - Column Volume). Yield 69 %. The product was obtained as a light brown oil. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.63 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.7 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.58 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.31–7.17 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 3.78–3.26 (m, 4H, $2CH_2$), 3.16 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.99 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 16.5 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.94 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 16.5 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.80 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 1.59 (s, 3H, CH_3), 1.30–1.16 (m, 4H, $2CH_2$). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 166.2 (C), 149.8 (C), 136.9 (C), 134.4 (C), 132.3 ($2CH_{Ar}$), 130.7 ($2CH_{Ar}$), 128.3 ($2CH_{Ar}$), 127.3 ($2CH_{Ar}$), 126.9 (CH_{Ar}), 118.5 (C), 112.8 (C), 106.3 (C), 86.4 (C), 66.6 ($2CH_2$), 47.3

(CH_2), 43.8 (CH_2), 29.8 ($2CH_2$), 28.8 (CH_3). HRMS (ESI +) *m/z* calcd for $C_{24}H_{24}N_2O_3$ $[M+H]^+$ 389.1860; found 389.1858.

4.1.7. General procedure for amidoxime synthesis from nitriles

A suspension of hydroxylamine hydrochloride (10 equiv.) in DMSO was stirred under an inert atmosphere and cooled to 0 °C. Potassium *tert*-butoxide (10 equiv.) was added gradually, and the reaction mixture was stirred for 30 min. Then the corresponding nitrile was added (1 equiv.), and the reaction mixture was stirred for 18 h at room temperature. The resulting mixture was poured into cold water, then the reaction mixture was extracted with EtOAc (3 × 15 mL), the organic layers were combined, washed with water (1 × 20 mL), brine (1 × 20 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated. Purification by flash or column chromatography using the appropriate solvent afforded the title product.

*4.1.7.1. Methyl 5-benzyl-2-(4-(N′-hydroxycarbamimidoyl)phenyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-3-carboxylate **(c1)**.* Compound **c1** was obtained following the former general procedure from **b1** (105 mg, 0.31 mmol, 1 equiv.). The reaction mixture was monitored by TLC (eluent: dichloromethane/MeOH 94/6, Rf 0.72). The crude product was purified by flash chromatography (column PuriFlash® IR-50SI–F0025; eluent: dichloromethane/MeOH 97/3 from 99/1 to 95/5 in 25 CVs - Column Volume). The UV-VIS detector was configured at 242 nm. Yield 65 %. The product was obtained as a light grey oily solid. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.80 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.3 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.65 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.32–7.23 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 4.89 (br s, 2H, NH_2), 3.63 (s, 3H, CH_3), 3.11 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 15.1 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.04 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.01 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.82 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 15.1 Hz, 1H, H-(CH_2)), 1.46 (s, 3H, CH_3). OH not observed. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 165.9 (C), 163.3 (C), 136.6 (C), 134.0 (C), 132.0 (C), 130.6 ($2CH_{Ar}$), 129.7 ($2CH_{Ar}$), 128.3 ($2CH_{Ar}$), 126.9 (CH_{Ar}), 126.1 (C), 125.2 ($2CH_{Ar}$), 102.4 (C), 87.8 (C), 51.1 (CH_3), 46.8 (CH_2), 42.3 (CH_2), 26.7 (CH_3). HRMS (ESI +) *m/z* calcd for $C_{21}H_{22}N_2O_4$ $[M+H]^+$ calculated 367.1652; found 367.1653.

*4.1.7.2. Ethyl 5-benzyl-2-(4-(N′-hydroxycarbamimidoyl)phenyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-3-carboxylate **(c2)**.* Compound **c2** was obtained following the former general procedure from **b2** (60 mg, 0.17 mmol, 1 equiv.). The reaction mixture was monitored by TLC (eluent: dichloromethane/MeOH 94/6, Rf 0.65). The crude product was purified by flash chromatography (column PuriFlash® IR-50SI–F0025; eluent: dichloromethane/MeOH 97/3 from 99/1 to 95/5 in 25 CVs - Column Volume). The UV-VIS detector was configured at 242 nm. Yield 77 %. The product was obtained as an oily white solid. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.75 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.6 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.64 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.6 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.30–7.19 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 6.03 (br s, 2H, NH_2), 4.06 (q, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.1 Hz, 2H, CH_2), 3.07 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 15.3 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.02 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.97 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.78 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 15.3 Hz, 1H, H-(CH_2)), 1.42 (s, 3H, CH_3), 1.17 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.2 Hz, 3H, CH_3). OH not observed. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 165.5 (C), 162.8 (C), 154.8 (C), 136.5 (C), 133.4 (C), 130.7 (C), 130.6 ($2CH_{Ar}$), 129.9 ($2CH_{Ar}$), 128.3 ($2CH_{Ar}$), 126.9 (CH_{Ar}), 126.1 ($2CH_{Ar}$), 103.2 (C), 88.0 (C), 60.1 (CH_2), 46.8 (CH_2), 42.2 (CH_2), 26.6 (CH_3), 14.4 (CH_3). HRMS (ESI +) *m/z* calcd for $C_{22}H_{24}N_2O_4$ $[M+Na]^+$ 403.1624; found 403.1628.

*4.1.7.3. 5-Benzyl-N-cyclohexyl-2-(4-(N′-hydroxycarbamimidoyl)phenyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-3-carboxamide **(c3)**.* Compound **c3** was obtained following the former general procedure from **b3** (200 mg, 0.50 mmol, 1 equiv.). The reaction mixture was monitored by TLC (eluent: dichloromethane/MeOH 94/6, Rf 0.33). The crude product was purified by column chromatography (eluent: dichloromethane/MeOH 97/3). Yield 53 %. The product was obtained as an oily yellow solid. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.66 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.6 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.63 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.6 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.32–7.23 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 5.13 (br s, 2H, NH_2), 4.93 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.2 Hz, 1H, NH), 3.78–3.65 (m, 1H, CH), 3.04 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.00 (s, 2H, CH_2), 2.83 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 1.88–1.68 (m, 2H, CH_2), 1.63–1.52 (m, 2H, CH_2), 1.47 (s, 3H, CH_3), 1.35–1.25 (m, 2H, CH_2), 1.14–1.04 (m, 2H, CH_2), 1.01–0.84 (m, 2H, CH_2). OH not observed. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 164.6 (C), 156.6 (C), 136.8 (2C), 133.5 (C), 132.2 (C), 130.5 ($2CH_{Ar}$), 129.2 ($2CH_{Ar}$), 128.3 ($2CH_{Ar}$), 126.8 (CH_{Ar}), 125.7 ($2CH_{Ar}$), 106.4 (C), 86.7 (C), 48.0 (CH), 47.0 (CH_2), 43.01 (CH_2), 33.0 (CH_2), 32.9 (CH_2), 26.9 (CH_3), 25.6 (CH_2), 24.9 (CH_2), 24.8 (CH_2). HRMS (ESI +) *m/z* calcd for $C_{26}H_{31}N_3O_3$ $[M+H]^+$ 434.2438; found 434.2431.

*4.1.7.4. 5-Benzyl-N,N-diethyl-2-(4-(N′-hydroxycarbamimidoyl)phenyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-3-carboxamide **(c4)**.* Compound **c4** was obtained following the former general procedure from **b4** (250 mg, 0.67 mmol, 1 equiv.). The reaction mixture was monitored by TLC (eluent: dichloromethane/MeOH 94/6, Rf 0.34). The crude product was purified by column chromatography (eluent: dichloromethane/MeOH 97/3). Yield 57 %. The product was obtained as an oily brown solid. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) 9.71 (s, 1H, OH), 7.67 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.6 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.40 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.6 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.33–7.20 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 5.83 (br s, 2H, NH_2), 3.27–3.15 (m, 2H, CH_2), 3.04 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.94 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 15.7 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.90 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.73 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 15.7 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.70–2.61 (m, 2H, CH_2), 1.43 (s, 3H, CH_3), 1.02 (br s, 3H, CH_3), 0.67 (br s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) 166.1 (C), 150.2 (C), 148.1 (C), 136.9 (C), 133.6 (C), 130.4 ($2CH_{Ar}$), 130.3 (C), 128.0 ($2CH_{Ar}$), 126.4 (CH_{Ar}), 125.6 ($2CH_{Ar}$), 125.2 ($2CH_{Ar}$), 105.4 (C), 85.1 (C), 45.8 (CH_2), 43.9 (CH_2), 41.8 (CH_2), 40.4 (CH_2), 38.0 (CH_2), 27.3 ($2CH_3$). HRMS (ESI +) *m/z* calcd for $C_{24}H_{29}N_3O_3$ $[M+H]^+$ 408.2282; found 408.2276.

*4.1.7.5. 5-Benzyl-N-cyclopentyl-2-(4-(N′-hydroxycarbamimidoyl)phenyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-3-carboxamide **(c5)**.* Compound **c5** was obtained following the former general procedure from **b5** (90 mg, 0.24 mmol, 1 equiv.). The reaction mixture was monitored by TLC (eluent: dichloromethane/MeOH 96/4, Rf 0.50). The crude product was purified by column chromatography (eluent: dichloromethane/MeOH 97/3). Yield 62 %. The product was obtained as an oily yellow solid. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.63 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.59 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.32–7.18 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 5.12 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.2 Hz, 1H, NH), 5.03 (br s, 2H, NH_2), 4.17–4.09 (m, 1H, CH), 3.02 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.99 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 13.2 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.95 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 13.2 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.81 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 1.92–1.78 (m, 2H, CH_2), 1.61–1.49 (m, 4H, $2CH_2$), 1.44 (s, 3H, CH_3), 1.29–1.20 (m, 2H, CH_2). OH not observed. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 165.0 (C), 157.1 (C), 157.0 (C), 136.7 (2C), 132.6 (C), 130.5 ($2CH_{Ar}$), 129.3 ($2CH_{Ar}$), 128.3 ($2CH_{Ar}$), 126.9 ($2CH_{Ar}$), 125.9 (CH_{Ar}), 106.2 (C), 86.9 (C), 51.2 (CH), 47.0 (CH_2), 43.0 (CH_2), 33.1 (CH_2), 33.0 (CH_2), 29.8 (CH_2), 26.9 (CH_3), 23.7 (CH_2). HRMS (ESI +) *m/z* calcd for $C_{25}H_{29}N_3O_3$ $[M+H]^+$ 420.2282; found 420.2279.

*4.1.7.6. 5-Benzyl-N-butyl-2-(4-(N′-hydroxycarbamimidoyl)phenyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-3-carboxamide **(c6)**.* Compound **c6** was obtained following the former general procedure from **b6** (30 mg, 0.08 mmol, 1 equiv.). The reaction mixture was monitored by TLC (eluent: dichloromethane/MeOH 94/6, Rf 0.34). The crude product was purified by column chromatography (eluent: dichloromethane/MeOH from 97/3). Yield 56 %. The product was obtained as an oily yellow solid. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.69–7.55 (m, 4H, $4CH_{Ar}$), 7.29–7.21 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 5.41 (br s, 2H, NH_2), 5.22 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 5.9 Hz, 1H, NH), 3.20–3.11 (m, 2H, CH_2), 3.04 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.6 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.99 (s, 2H, CH_2), 2.79 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.7 Hz, 1H, H-(CH_2)), 1.45 (s, 3H, CH_3), 1.40–1.32 (m, 2H, CH_2), 1.28–1.19 (m, 2H, CH_2), 0.86 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.4 Hz, 3H, CH_3). OH not observed. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 165.4 (C), 157.4 (C), 153.3 (C), 136.7 (C), 132.7 (C), 132.3 (C), 130.5 ($2CH_{Ar}$),

129.3 ($2CH_{Ar}$), 128.3 ($2CH_{Ar}$), 126.9 (CH_{Ar}), 126.0 ($2CH_{Ar}$), 106.0 (C), 86.9 (C), 46.9 (CH_2), 42.9 (CH_2), 39.3 (CH_2), 31.6 (CH_2), 26.9 (CH_3), 20.2 (CH_2), 13.9 (CH_3). HRMS (ESI +) *m/z* calcd for $C_{24}H_{29}N_3O_3$ $[M+Na]^+$ 430.2101; found 430.2099.

*4.1.7.7. 5-Benzyl-2-(4-(N′-hydroxycarbamimidoyl)phenyl)-5-methyl-N-(2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl)-4,5-dihydrofuran-3-carboxamide **(c7)***. Compound **c7** was obtained following the former general procedure from **b7** (180 mg, 0.43 mmol, 1 equiv.). The reaction mixture was monitored by TLC (eluent: dichloromethane/MeOH 94/6, Rf 0.30). The crude product was purified by column chromatography (eluent: dichloromethane/MeOH 97/3). Yield 50 %. The product was obtained as an oily yellow solid. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.63 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.4 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.54 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.6 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.30–7.20 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 6.50 (br s, 1H, NH), 4.82 (s, 2H, NH_2), 3.43–3.35 (m, 2H, CH_2), 3.06 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.7 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.98 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 13.7 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.98 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 13.7 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.83 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.7 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.65–2.50 (m, 6H, $3CH_2$), 1.75 (s, 4H, $2CH_2$), 1.40 (s, 3H, CH_3). OH not observed. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 165.8 (C), 157.2 (C), 152.0 (C), 136.9 (C), 133.6 (C), 132.1 (C), 130.6 ($2CH_{Ar}$), 129.2 ($2CH_{Ar}$), 128.2 ($2CH_{Ar}$), 126.8 (CH_{Ar}), 125.2 ($2CH_{Ar}$), 106.0 (C), 86.6 (C), 55.1 (CH_2), 54.0 ($2CH_2$), 46.9 (CH_2), 43.3 (CH_2), 37.9 (CH_2), 26.5 (CH_3), 23.5 ($2CH_2$). HRMS (ESI +) *m/z* calcd for $C_{26}H_{32}N_4O_3$ $[M+H]^+$ 449.2547; found 449.2545.

*4.1.7.8. 4-(5-Benzyl-5-methyl-3-(morpholine-4-carbonyl)-4,5-dihydrofuran-2-yl)-N′-hydroxybenzimidamide **(c8)***. Compound **c8** was obtained following the former general procedure from **b8** (350 mg, 0.90 mmol, 1 equiv.). The reaction mixture was monitored by TLC (eluent: dichloromethane/AcOEt 80/20, Rf 0.21). The crude product was purified by column chromatography (eluent: dichloromethane/MeOH 97/3). Yield 40 %. The product was obtained as an oily white solid. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.60 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.4 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.48 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.32–7.13 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 4.95 (br s, 2H, NH_2), 3.77–3.36 (m, 6H, $3CH_2$), 3.13 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.97 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 15.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.93 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 15.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.80 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.39–2.17 (m, 2H, CH_2), 1.57 (s, 3H, CH_3). OH not observed. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 166.9 (C), 152.0 (C), 151.5 (C), 137.0 (C), 133.3 (C), 131.6 (C), 130.7 ($2CH_{Ar}$), 128.2 ($2CH_{Ar}$), 127.1 ($2CH_{Ar}$), 126.7 (CH_{Ar}), 125.9 ($2CH_{Ar}$), 103.6 (C), 86.0 (C), 66.5 ($2CH_2$), 60.5 (CH_2), 47.3 (CH_2), 43.6 ($2CH_2$), 28.6 (CH_3). HRMS (ESI +) *m/z* calcd for $C_{24}H_{27}N_3O_4$ $[M+H]^+$ 422.2074; found 422.2074.

*4.1.7.9. 4-(5-Benzyl-3-(butylsulfonyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-N′-hydroxybenzimidamide **(c9)***. Compound **c9** was obtained following the former general procedure from **b9** (120 mg, 0.30 mmol, 1 equiv.). The reaction mixture was monitored by TLC (eluent: dichloromethane/MeOH 94/6, Rf 0.38). The crude product was purified by column chromatography (eluent: dichloromethane/MeOH from 97/3). Yield 62 %. The product was obtained as a yellow solid. Mp 155–157 °C. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) 9.81 (s, 1H, OH), 7.72 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.7 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.56 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.7 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.35–7.29 (m, 4H, $4CH_{Ar}$), 7.28–7.23 (m, 1H, CH_{Ar}), 5.89 (br s, 2H, NH_2), 3.11 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.5 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.07 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.0 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.00 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.0 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.89 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.5 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.84–2.74 (m, 2H, CH_2), 1.49 (s, 3H, CH_3), 1.33–1.18 (m, 4H, $2CH_2$), 0.76 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 6.9 Hz, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) 161.2 (C), 150.1 (C), 136.2 (C), 135.3 (C), 130.5 ($2CH_{Ar}$), 128.9 (C), 128.8 ($2CH_{Ar}$), 128.1 ($2CH_{Ar}$), 126.7 (CH_{Ar}), 124.7 ($2CH_{Ar}$), 108.2 (C), 87.8 (C), 53.5 (CH_2), 45.5 (CH_2), 41.6 (CH_2), 26.9 (CH_3), 23.8 (CH_2), 20.7 (CH_2), 13.3 (CH_3). HRMS (ESI +) *m/z* calcd for $C_{23}H_{28}N_2O_4S$ $[M+H]^+$ 429.1843; found 429.1844.

*4.1.7.10. 4-(5-Benzyl-5-methyl-3-(methylsulfonyl)-4,5-dihydrofuran-2-yl)-N′-hydroxybenzimidamide **(c10)***. Compound **c10** was obtained following the former general procedure from **b10** (90 mg, 0.25 mmol, 1 equiv.). The reaction mixture was monitored by TLC (eluent: dichloromethane/MeOH 94/6, Rf 0.43). The crude product was purified by column chromatography (eluent: dichloromethane/MeOH 97/3). Yield 65 %. The product was obtained as a light-yellow solid. Mp 164 °C. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.80–7.55 (m, 4H, $4CH_{Ar}$), 7.32–7.18 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 5.49 (br s, 2H, NH_2), 3.19 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 15.4 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.09 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 13.9 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.99 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 15.4 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.91 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 13.9 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.56 (s, 3H, CH_3), 1.56 (s, 3H, CH_3). OH not observed. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 161.5 (C), 152.9 (C), 135.9 (C), 133.7 (C), 132.0 (C), 130.5 ($2CH_{Ar}$), 129.8 ($2CH_{Ar}$), 128.5 ($2CH_{Ar}$), 127.3 ($2CH_{Ar}$), 125.9 (CH_{Ar}), 110.1 (C), 88.3 (C), 47.0 (CH_2), 43.1 (CH_3), 42.1 (CH_2), 27.5 (CH_3). HRMS (ESI +) *m/z* calcd for $C_{20}H_{22}N_2O_4S$ $[M+H]^+$ 387.1373; found 387.1373.

4.2. Biology

4.2.1. Parasites

Leishmania amazonensis (MHOM/BR/77/LTB0016) was maintained as promastigotes at 26 °C in Schneider's insect medium (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) with 10 % heat-inactivated fetal calf serum (HIFCS), 100 μg/mL streptomycin and 100 U/mL penicillin. Parasites were maintained until the 10th passage; subsequently, new cultures were obtained from infected animals.

4.2.2. Antipromastigote activity

L. amazonensis promastigotes were cultivated in Schneider's insect medium supplemented with 10 % HIFCS as above, in either the absence or presence of different concentrations of the substances. The culture was initiated with 1.0×10^6 cells/mL and maintained at 26 °C for 72 h. Cell viability was estimated by reducing resazurin. The 50 % inhibitory concentration (IC50) was determined by logarithmic regression analysis using GraphPrism 5 software.

4.2.3. Cytotoxicity assay

Murine peritoneal macrophages were harvested by peritoneal washing with 5 ml of RPMI 1640 medium supplemented with 10 % HIFCS, 2 mM L-glutamine, 1 mM pyruvate, 100 μg/mL streptomycin and 100 U/mL penicillin. The peritoneal cell suspension was adjusted to 1.0×10^6 cells/mL and then plated in triplicate in 96-well plates (Falcon Co, Franklin Lakes, USA). Cultures were incubated for 1 h at 37 °C in a 5 % CO_2 atmosphere. Afterwards, the cells were washed to remove non-adherent cells and incubated in either the absence or presence of different concentrations of the substances (0–200 μM) for 72 h. The cell viability was estimated using a resazurin assay. The 50 % cytotoxic concentration (CC_{50}) was determined by logarithmic regression analysis using GraphPrism 5 software.

4.2.4. Antiamastigote assay

Resident peritoneal macrophages were plated in RPMI medium (Sigma-Aldrich) at 1×10^6/mL (0.4 mL/well) in Lab-Tek eight-chamber slides (Nunc) and incubated at 37 °C in 5 % CO_2 for 1 h. After 1 h, the medium containing nonadherent cells was removed. The remaining cells were incubated at 37 °C and 5 % CO_2 with *L. amazonensis* promastigotes in a ratio of 5:1. After 4 h, the monolayers were washed to remove free parasites. The cells were incubated with the substances in different concentrations for 72 h at 37 °C and 5 % CO_2. After the incubation period, the slides were stained using the Instant Prov hematological dye system (Newprov, Curitiba, Brazil) and leishmanicidal activity was evaluated microscopically. The number of amastigotes was determined by counting at least 100 macrophages per sample. The results are expressed as an infection index (II), which was calculated as follows: II = (percentage of infected cells) × (number of amastigotes/total number of macrophages). Concentration-effect curves were fitted for the anti-

amastigote tests by using nonlinear regression analysis within the GraphPad program Prism 5.0, and the 50 % Inhibitory Concentrations (IC_{50} values) were determined.

Funding

PhD Student Oscar Leonardo AVENDANO LEON was funded by COLCIENCIAS - Ministry of Science, Technology and Innovation of Colombia, Government Resolution 071 Janvier 2021 – call for PhD applications 885–2020. The antileishmanial study was supported by the FAPERJ - Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, processo E−26/201.158/2022 – BOLSA.

CRediT authorship contribution statement

Oscar Leonardo Avendaño Leon: Writing – review & editing, Writing – original draft, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Conceptualization. **Fabiana Maia Santos Urbancg Moncorvo:** Writing – review & editing, Investigation, Formal analysis, Conceptualization. **Christophe Curti:** Writing – review & editing, Supervision, Resources, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Conceptualization. **Youssef Kabri:** Writing – review & editing, Methodology, Investigation, Formal analysis, Conceptualization. **Sébastien Redon:** Writing – review & editing, Methodology, Investigation, Formal analysis, Conceptualization. **Patrice Vanelle:** Writing – review & editing, Validation, Supervision, Project administration. **Eduardo Caio Torres-Santos:** Writing – review & editing, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: Oscar Leonardo AVENDANO LEON reports financial support was provided by Colombia Ministry of Science Technology and Innovation. If there are other authors, they declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

Aix Marseille Université and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) are gratefully acknowledged for financial support. E.C.T.-S. thanks CNPq for the research productivity scholarship.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116935.

References

[1] World Health Organization (WHO), World Health Statistics, Monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals, 2023, ISBN 978-92-4-007432-3, p. 43. Available online: www.who.int/data/gho/publications/world-health-statistics.
[2] S. Mann, K. Frasca, S. Scherrer, A.F. Henao-Martínez, S. Newman, P. Ramanan, J. A. Suarez, A review of leishmaniasis: current knowledge and future directions, Curr Trop Med Rep 8 (2021) 121–132, https://doi.org/10.1007/s40475-021-00232-7.
[3] S. Burza, S.L. Croft, M. Boelaert, Leishmaniasis, Lancet 392 (2018) 951–970, https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2.
[4] R. Pal, G. Teli, M.J. Akhtar, G.S.P. Matada, Synthetic product-based approach toward potential antileishmanial drug development, Eur. J. Med. Chem. 263 (2024) 115927, https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115927.
[5] B. J, B.M. M, K. Chanda, An overview on the therapeutics of neglected infectious diseases-leishmaniasis and Chagas diseases, Front. Chem. 9 (2021) 622286, https://doi.org/10.3389/fchem.2021.622286.
[6] L. Paloque, A. Bouhlel, C. Curti, A. Dumètre, P. Verhaeghe, N. Azas, P. Vanelle, Synthesis and evaluation of monoamidoxime derivatives: toward new antileishmanial compounds, Eur. J. Med. Chem. 46 (2011) 2984–2991, https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.04.026.
[7] E.V. Burgaz, M. Yılmaz, A.T. Pekel, A. Öktemer, Oxidative cyclization of 3-oxo-propanenitriles with α,β-unsaturated amides by manganese(III) acetate. Regio- and stereoselective synthesis of 4-cyano-2,3-dihydrofuran-3-carboxamides, Tetrahedron 63 (2007) 7229–7239, https://doi.org/10.1016/j.tet.2007.04.088.
[8] S. Jain, U. Sahu, A. Kumar, P. Khare, Metabolic pathways of Leishmania parasite: source of pertinent drug targets and potent drug candidates, Pharmaceutics 14 (2022) 1590, https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081590.
[9] A.A. Bekhit, E. El-Agroudy, A. Helmy, T.M. Ibrahim, A. Shavandi, A.E.-D.A. Bekhit, Leishmania treatment and prevention: natural and synthesized drugs, Eur. J. Med. Chem. 160 (2018) 229–244, https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.10.022.
[10] G.A. Patani, E.J. LaVoie, Bioisosterism: a rational approach in drug design, Chem. Rev. 96 (1996) 3147–3176, https://doi.org/10.1021/cr950066q.
[11] C. Tabélé, V. Faiões, S. dos, F. Grimaud, E.C. Torres-Santos, O. Khoumeri, C. Curti, P. Vanelle, Original antileishmanial hits: variations around amidoximes, Eur. J. Med. Chem. 148 (2018) 154–164.
[12] R.-J. Lu, J.A. Tucker, T. Zinevitch, O. Kirichenko, V. Konoplev, S. Kuznetsova, S. Sviridov, J. Pickens, S. Tandel, E. Brahmachary, et al., Design and synthesis of human immunodeficiency virus entry inhibitors: sulfonamide as an isostere for the α-ketoamide group, J. Med. Chem. 50 (2007) 6535–6544, https://doi.org/10.1021/jm070650e.
[13] S. Lešnik, J. Konc, Silico laboratory: tools for similarity-based drug discovery, in: N. E. Labrou (Ed.), Targeting Enzymes for Pharmaceutical Development, Methods in Molecular Biology, vol. 2089, Springer US, New York, NY, 2020, pp. 1–28. ISBN 978-1-07-160162-4.
[14] A. Kumar, K.Y.J. Zhang, Advances in the development of shape similarity methods and their application in drug discovery, Front. Chem. 6 (2018) 315, https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00315.
[15] A. Ilari, A. Fiorillo, I. Genovese, G. Colotti, Polyamine-trypanothione pathway: an update, Future Med. Chem. 9 (2017) 61–77, https://doi.org/10.4155/fmc-2016-0180.
[16] K. Singh, G. Garg, V. Ali, Current therapeutics, their problems and thiol metabolism as potential drug targets in leishmaniasis, CDM 17 (2016) 897–919, https://doi.org/10.2174/1389200217666160819161444.
[17] G. Colotti, P. Baiocco, A. Fiorillo, A. Boffi, E. Poser, F.D. Chiaro, A. Ilari, Structural insights into the enzymes of the trypanothione pathway: targets for antileishmaniasis drugs, Future Med. Chem. 5 (2013) 1861–1875, https://doi.org/10.4155/fmc.13.146.
[18] M.N. Rennó, T.C.C. França, D. Nico, C.B. Palatnik-de-Sousa, L.W. Tinoco, J. D. Figueroa-Villar, Kinetics and docking studies of two potential new inhibitors of the nucleoside hydrolase from Leishmania donovani, Eur. J. Med. Chem. 56 (2012) 301–307, https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.07.052.
[19] N.S. Carter, Y. Kawasaki, S.S. Nahata, S. Elikaee, S. Rajab, L. Salam, M. Y. Alabdulal, K.K. Broessel, F. Foroghi, A. Abbas, et al., Polyamine metabolism in Leishmania parasites: a promising therapeutic target, Med. Sci. 10 (2022) 24, https://doi.org/10.3390/medsci10020024.
[20] P.S. Vieira, T.D.A.C.B. Souza, R.V. Honorato, L.M. Zanphorlin, K.U. Severiano, S. A. Rocco, A.H.C. De Oliveira, A.T. Cordeiro, P.S.L. Oliveira, P.O. De Giuseppe, et al., Pyrrole-indolinone SU11652 targets the nucleoside diphosphate kinase from Leishmania parasites, Biochem. Biophys. Res. Commun. 488 (2017) 461–465, https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.05.048.
[21] A.K. Mishra, N. Singh, P. Agnihotri, S. Mishra, S.P. Singh, B.K. Kolli, K.P. Chang, A. A. Sahasrabuddhe, M.I. Siddiqi, J.V. Pratap, Discovery of novel inhibitors for Leishmania nucleoside diphosphatase kinase (NDK) based on its structural and functional characterization, J. Comput. Aided Mol. Des. 31 (2017) 547–562, https://doi.org/10.1007/s10822-017-0022-9.
[22] A. Kumar, B. Saha, S. Singh, Dataset generated for dissection of mechanisms of trypanothione reductase and tryparedoxin peroxidase through dynamic network analysis and simulations in leishmaniasis, Data Brief 15 (2017) 757–769, https://doi.org/10.1016/j.dib.2017.10.031.
[23] Z.N. Karamysheva, S.A. Gutierrez Guarnizo, A.L. Karamyshev, Regulation of translation in the Protozoan parasite Leishmania, Indian J. Manag. Sci. 21 (2020) 2981, https://doi.org/10.3390/ijms21082981.
[24] T.J. Vickers, S.M. Beverley, Folate metabolic pathways in *Leishmania*, Essays Biochem. 51 (2011) 63–80, https://doi.org/10.1042/bse0510063.
[25] M. Duarte, C. Ferreira, G.K. Khandpur, T. Flohr, J. Zimmermann, H. Castro, J. M. Herrmann, B. Morgan, A.M. Tomás, *Leishmania* type II dehydrogenase is essential for parasite viability irrespective of the presence of an active complex I, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 118 (2021) e2103803118, https://doi.org/10.1073/pnas.2103803118.
[26] A. Sabt, W.M. Eldehna, T.M. Ibrahim, A.A. Bekhit, R.Z. Batran, New antileishmanial quinoline linked isatin derivatives targeting DHFR-TS and PTR1: design, synthesis, and molecular modeling studies, Eur. J. Med. Chem. 246 (2023) 114959, https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114959.
[27] C. Lin, I. Karalic, A. Matheeussen, P.-B. Feijens, F. Hulpia, L. Maes, G. Caljon, S. Van Calenbergh, Exploration of 6-methyl-7-(Hetero)Aryl-7-deazapurine ribonucleosides as antileishmanial agents, Eur. J. Med. Chem. 237 (2022) 114367, https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114367.

[28] A. Hofer, Targeting the nucleotide metabolism of *trypanosoma brucei* and other trypanosomatids, FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Rev. 47 (2023) fuad020, https://doi.org/10.1093/femsre/fuad020.
[29] S. Wyllie, M. Thomas, S. Patterson, S. Crouch, M. De Rycker, R. Lowe, S. Gresham, M.D. Urbaniak, T.D. Otto, L. Stojanovski, et al., Cyclin-dependent kinase 12 is a drug target for visceral leishmaniasis, Nature 560 (2018) 192–197, https://doi.org/10.1038/s41586-018-0356-z.
[30] S. Kumari, N. Bodhale, A. Sarode, M.K. Jha, S. Bhadange, S.P. Pandey, S. Selvaraj, A.G. Chande, R. Mukhopadhyaya, S.K. Ghosh, et al., Leishmania major MAPK4 intercepts and redirects CD40 signaling promoting infection, Int. Immunopharm. 134 (2024) 112100, https://doi.org/10.1016/j.intimp.2024.112100.
[31] S. Mukherjee, S. Moitra, W. Xu, V. Hernandez, K. Zhang, Sterol 14-α-Demethylase is vital for mitochondrial functions and stress tolerance in Leishmania major, PLoS Pathog. 16 (2020) e1008810, https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008810.
[32] W.-W. Zhang, L.-I. McCall, G. Matlashewski, Role of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in visceral organ infection by Leishmania donovani, Eukaryot. Cell 12 (2013) 70–77, https://doi.org/10.1128/EC.00263-12.
[33] E.S. Yamamoto, J.A. De Jesus, A. Bezerra-Souza, J.R. Brito, J.H.G. Lago, M. D. Laurenti, L.F.D. Passero, Tolnaftate inhibits ergosterol production and impacts cell viability of Leishmania sp, Bioorg. Chem. 102 (2020) 104056, https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104056.
[34] N. Dinesh, N. Soumya, S. Singh, Antileishmanial effect of mevastatin is due to interference with sterol metabolism, Parasitol. Res. 114 (2015) 3873–3883, https://doi.org/10.1007/s00436-015-4618-5.
[35] A. Azevedo, J.S. Toledo, T. Defina, A.L. Pedrosa, A.K. Cruz, Leishmania major phosphoglycerate kinase transcript and protein stability contributes to differences in isoform expression levels, Exp. Parasitol. 159 (2015) 222–226, https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.09.008.
[36] C.V. Ribeiro, B.F.B. Rocha, D.D.S. Moreira, V. Peruhype-Magalhães, S.M.F. Murta, Mannosyltransferase (GPI-14) overexpression protects promastigote and amastigote forms of Leishmania braziliensis against trivalent antimony, Parasites Vectors 12 (2019) 60, https://doi.org/10.1186/s13071-019-3305-2.
[37] X. Chen, C.H. Reynolds, Performance of similarity measures in 2D fragment-based similarity searching: comparison of structural descriptors and similarity coefficients, J. Chem. Inf. Comput. Sci. 42 (2002) 1407–1414, https://doi.org/10.1021/ci025531g.
[38] S. Hadiby, Y. Mohamed Ben Ali, Deep learning based-virtual screening using 2D pharmacophore fingerprint in drug discovery, Neural Process. Lett. 54 (2022) 5669–5691, https://doi.org/10.1007/s11063-022-10879-6.
[39] P. Willett, J.M. Barnard, G.M. Downs, Chemical similarity searching, J. Chem. Inf. Comput. Sci. 38 (1998) 983–996, https://doi.org/10.1021/ci9800211.
[40] L. Huang, H. Luo, S. Li, F.-X. Wu, J. Wang, Drug–drug similarity measure and its applications, Briefings Bioinf. (2020) bbaa265, https://doi.org/10.1093/bib/bbaa265.
[41] V. Zoete, A. Daina, C. Bovigny, O. Michielin, SwissSimilarity: a web tool for low to ultra high throughput ligand-based virtual screening, J. Chem. Inf. Model. 56 (2016) 1399–1404, https://doi.org/10.1021/acs.jcim.6b00174.
[42] A. Daina, O. Michielin, V. Zoete, SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules, Sci. Rep. 7 (2017) 42717, https://doi.org/10.1038/srep42717.
[43] S. Pathania, P.K. Singh, Analyzing FDA-approved drugs for compliance of pharmacokinetic principles: should there Be a critical screening parameter in drug designing protocols? Expet Opin. Drug Metabol. Toxicol. 17 (2021) 351–354, https://doi.org/10.1080/17425255.2021.1865309.
[44] C. Curti, M.D. Crozet, P. Vanelle, Microwave-assisted manganese(III) acetate based oxidative cyclizations of alkenes with β-ketosulfones, Tetrahedron 65 (2009) 200–205, https://doi.org/10.1016/j.tet.2008.10.080.
[45] D.C. Braddock, J.J. Davies, P.D. Lickiss, Methyltrimethoxysilane (MTM) as a reagent for direct amidation of carboxylic acids, Org. Lett. 24 (2022) 1175–1179, https://doi.org/10.1021/acs.orglett.1c04265.
[46] J. Cossy, A. Thellend, A 4-dimethylaminopyridine-catalyzed aminolysis of β-ketoesters. Formation of β-ketoamides, Synthesis (1989) 753–755, https://doi.org/10.1055/s-1989-27383, 1989.
[47] R.V. Hoffmann, D.J. Huizenga, A simple synthesis of 2,3-diketo amides from 3-keto amides, J. Org. Chem. 56 (1991) 6435–6439, https://doi.org/10.1021/jo00022a040.
[48] C. Allais, F. Liéby-Muller, J. Rodriguez, T. Constantieux, Metal-free michael-addition-initiated three-component reaction for the regioselective synthesis of highly functionalized pyridines: scope, mechanistic investigations and applications, Eur. J. Org. Chem. 2013 (2013) 4131–4145, https://doi.org/10.1002/ejoc.201300246.
[49] F.A. Chowdhury, H. Nishino, A facile synthesis of *n,n′*-Oligomethylenebis(4,5-Dihydrofuran-3-Carboxamide)s using manganese(III)-Based radical cyclization of n,N′-Oligomethylenebis(3-Oxobutanamide)s with 1,1-diarylethenes, J. Heterocycl. Chem. 42 (2005) 1337–1344, https://doi.org/10.1002/jhet.5570420713.
[50] J.K. Vandavasi, C.-T. Hsiao, W.-P. Hu, S.S.K. Boominathan, J.-J. Wang, Silver(I)-Catalyzed tandem approach to β-oxo amides: silver(I)-Catalyzed tandem approach to β-oxo amides, Eur. J. Org. Chem. 2015 (2015) 3171–3177, https://doi.org/10.1002/ejoc.201500224.
[51] L. Perreux, A. Loupy, M. Delmotte, Microwave effects in solvent-free esters aminolysis, Tetrahedron 59 (2003) 2185–2189, https://doi.org/10.1016/S0040-4020(03)00151-0.
[52] G. Li, M. Szostak, Highly selective transition-metal-free transamidation of amides and amidation of esters at room temperature, Nat. Commun. 9 (2018) 4165, https://doi.org/10.1038/s41467-018-06623-1.
[53] A. Ojeda-Porras, D. Gamba-Sánchez, Recent developments in amide synthesis using nonactivated starting materials, J. Org. Chem. 81 (2016) 11548–11555, https://doi.org/10.1021/acs.joc.6b02358.
[54] N.-C. Hsueh, H.-Y. Chen, M.-Y. Chang, Construction of sulfonyl oxabenzo[3.3.1] Bicyclic core via cyclocondensation of β-ketosulfones and *o* -formyl allylbenzenes, J. Org. Chem. 82 (2017) 13324–13332, https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b02425.
[55] K. Katsuno, J.N. Burrows, K. Duncan, R.H. van Huijsduijnen, T. Kaneko, K. Kita, C. E. Mowbray, D. Schmatz, P. Warner, B.T. Slingsby, Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world, Nat. Rev. Drug Discov. 14 (2015) 751–758, https://doi.org/10.1038/nrd4683.
[56] M. Haroon, T. Akhtar, H. Mehmood, A.C. Da Silva Santos, J.M. Da Conceição, G. L. Brondani, R.D. Silva Tibúrcio, D.C. Galindo Bedor, J.W. Viturino Da Silva, P. A. Sales Junior, et al., Synthesis of hydrazinyl–thiazole ester derivatives, *in vitro* trypanocidal and leishmanicidal activities, Future Med. Chem. 16 (2024) 221–238, https://doi.org/10.4155/fmc-2023-0255.
[57] M. Haroon, M.C.H. De Barros Dias, A.C.D.S. Santos, V.R.A. Pereira, L.A. Barros Freitas, R.B. Balbinot, V. Kaplum, C.V. Nakamura, L.C. Alves, F.A. Brayner, et al., The design, synthesis, and *in vitro* trypanocidal and leishmanicidal activities of 1,3-thiazole and 4-thiazolidinone ester derivatives, RSC Adv. 11 (2021) 2487–2500, https://doi.org/10.1039/D0RA06994A.
[58] S. Casey Laizure, V. Herring, Z. Hu, K. Witbrodt, R.B. Parker, The role of human carboxylesterases in drug metabolism: have we overlooked their importance? Pharmacotherapy 33 (2013) 210–222, https://doi.org/10.1002/phar.1194.
[59] K. Okuda, M. Tong, B. Dempsey, K.J. Moore, R.T. Gazzinelli, N. Silverman, Leishmania amazonensis engages CD36 to drive parasitophorous vacuole maturation, PLoS Pathog. 12 (2016) e1005669, https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005669.
[60] I. Vergne, P. Constant, G. Lanéelle, Phagosomal pH determination by dual fluorescence flow cytometry, Anal. Biochem. 255 (1998) 127–132, https://doi.org/10.1006/abio.1997.2466.
[61] F. Real, R.A. Mortara, The diverse and dynamic nature of Leishmania parasitophorous vacuoles studied by multidimensional imaging, PLoS Neglected Trop. Dis. 6 (2012) e1518, https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001518.
[62] J. Young, P.E. Kima, The Leishmania parasitophorous vacuole membrane at the parasite-host interface, Yale J. Biol. Med. 92 (2019) 511–521.
[63] N. Mehio, M.A. Lashely, J.W. Nugent, L. Tucker, B. Correia, C.-L. Do-Thanh, S. Dai, R.D. Hancock, V.S. Bryantsev, Acidity of the amidoxime functional group in aqueous solution: a combined experimental and computational study, J. Phys. Chem. B 119 (2015) 3567–3576, https://doi.org/10.1021/jp512778x.
[64] A. Chylewska, M. Biedulska, A. Głębocka, E.D. Raczyńska, M. Makowski, Drug-like properties and complete physicochemical profile of pyrazine-2-amidoxime: a combined multi-experimental and computational studies, J. Mol. Liq. 276 (2019) 453–470, https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.11.147.
[65] T. Yang, Y. Lin, C. Yang, W. Yu, Iron-catalysed 1,2-acyl migration of tertiary α-azido ketones and 2-azido-1,3-dicarbonyl compounds, Green Chem. 21 (2019) 6097–6102, https://doi.org/10.1039/C9GC02085C.
[66] N.V. Rostovskii, M.S. Novikov, A.F. Khlebnikov, V.A. Khlebnikov, S.M. Korneev, Rh (II)-Carbenoid mediated 2H-azirine ring-expansion as a convenient route to non-fused photo- and thermochromic 2H-1,4-Oxazines, Tetrahedron 69 (2013) 4292–4301, https://doi.org/10.1016/j.tet.2013.03.106.
[67] D.U. Nielsen, S. Korsager, A.T. Lindhardt, T.A. Skrydstrup, Palladium-catalyzed carbonylative-deacetylative sequence to 1,3-keto amides, Adv. Synth. Catal. 356 (2014) 3519–3524, https://doi.org/10.1002/adsc.201400545.
[68] Q. Liu, F. Liu, H. Yue, X. Zhao, J. Li, W. Wei, Photocatalyst-free visible light-induced synthesis of β-oxo sulfones via oxysulfonylation of alkenes with arylazo sulfones and dioxygen in air, Adv. Synth. Catal. 361 (2019) 5277–5282, https://doi.org/10.1002/adsc.201900984.

3.4. Pharmacomodulation : série aromatique

La modification en position 3 du noyau dihydrofurane par divers composés aromatiques dérivés d'amide a généré une activité modérée *in vitro* contre la forme promastigote du parasite, (CI_{50} supérieures à 15 µM). Les meilleures molécules ont cependant été évaluées contre la forme amastigote, conduisant à une activité très satisfaisante de l'ordre de 0,5 µM. Comme cette activité s'accompagne d'une faible toxicité, nous obtenons des indices de sélectivité supérieurs à 300 pour les composés évalués.

Meilleur composé de la série aromatique (Figure 44) :

- Activité contre *L. amazonensis* amastigotes intracellulaires CI_{50} (µM/72 h): 0,3 ± 0,07
- Toxicité -macrophages murins- CC_{50} (µM/72 h) : > 200 µM
- IS > 667

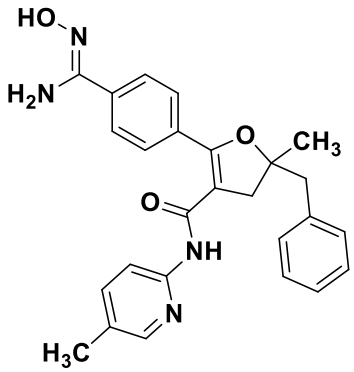


Figure 44. 5-benzyl-2-(4-(*N*'-hydroxycarbamimidoyl)phenyl)-5-methyl-N-(5-methylpyridin-2-yl)-4,5-dihydrofuran-3-carboxamide.

Ce travail a fait l'objet de la publication ci-dessous :

Molecules
Research Article
Enhancing Antileishmanial Activity of Amidoxime-Based Compounds Bearing a 4,5-Dihydrofuran Scaffold: in vitro Screening Against Leishmania amazonensis

Date de soumission : 20/10/2024

molecules

MDPI

Article

Enhancing Antileishmanial Activity of Amidoxime-Based Compounds Bearing a 4,5-Dihydrofuran Scaffold: In Vitro Screening Against *Leishmania amazonensis*

Fabiana Maia Santos Urbancg Moncorvo [1,†], Oscar Leonardo Avendaño Leon [2,†], Christophe Curti [2,3], Youssef Kabri [2], Sébastien Redon [2], Eduardo Caio Torres-Santos [1,*] and Patrice Vanelle [2,3,*]

[1] Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz—FIOCRUZ, Av. Brasil, 4365, Rio de Janeiro 21040-900, Brazil; fabianamaia.santos@gmail.com
[2] Aix Marseille Univ, CNRS, ICR UMR 7273, Equipe Pharmaco-Chimie Radicalaire, Faculté de Pharmacie, 27 Boulevard Jean Moulin, CS30064, CEDEX 05, 13385 Marseille, France; oscar-leonardo.avendano-leon@etu.univ-amu.fr (O.L.A.L.); christophe.curti@univ-amu.fr (C.C.); youssef.kabri@univ-amu.fr (Y.K.); sebastien.redon@univ-amu.fr (S.R.)
[3] Service Central de la Qualité et de l'Information Pharmaceutiques (SCQIP), Pharmacy Department, Assistance Publique—Hôpitaux de Marseille (AP-HM), 147 Bd. Baille, 13006 Marseille, France
* Correspondence: ects@ioc.fiocruz.br (E.C.T.-S.); patrice.vanelle@univ-amu.fr (P.V.); Tel.: +55-21-987476937 (E.C.T.-S.); +33-4-9183-5580 (P.V.)
† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Leishmaniasis, a protozoan disease affecting humans, exposes significant shortcomings in current treatments. In continuation to our previous findings on amidoxime-based antileishmanial compounds bearing a 4,5-dihydrofuran scaffold, twelve new amidoxime derivatives substituted at position 3 with an amide bearing a nitrogen heterocycle were synthesized. This series was designed to replace the sulfone and aryl group on a previously reported HIT. The synthesis of these compounds involved the following three-step pathway: manganese (III) acetate-based cyclization of a β-ketoester, followed by amidation with LiHMDS and a final reaction with hydroxylamine. Three of them, containing either bromine, chlorine, or methyl substitutions and featuring a pyridine moiety, showed an interesting toxicity–activity relationship in vitro. They exhibited IC_{50} values of 15.0 µM, 16.0 µM, and 17.0 µM against the promastigote form of the parasite and IC_{50} values of 0.5 µM, 0.6 µM, and 0.3 µM against the intracellular amastigote form, respectively. A selectivity index (SI) greater than 300 was established between the cytotoxic concentrations (in murine macrophages) and the effective concentrations (against the intracellular form of *Leishmania amazonensis*). This SI is at least seventy times higher than that observed for Pentamidine and twenty-five times higher than that observed for the reference HIT, as previously reported.

Keywords: leishmaniasis; pharmacomodulation; 4,5-dihydrofuran; amidoxime; manganese (III) acetate

check for updates

Citation: Maia Santos Urbancg Moncorvo, F.; Avendaño Leon, O.L.; Curti, C.; Kabri, Y.; Redon, S.; Torres-Santos, E.C.; Vanelle, P. Enhancing Antileishmanial Activity of Amidoxime-Based Compounds Bearing a 4,5-Dihydrofuran Scaffold: In Vitro Screening Against *Leishmania amazonensis*. *Molecules* **2024**, *29*, 5469. https://doi.org/10.3390/molecules29225469

Academic Editor: Federica Belluti

Received: 21 October 2024
Revised: 13 November 2024
Accepted: 18 November 2024
Published: 20 November 2024

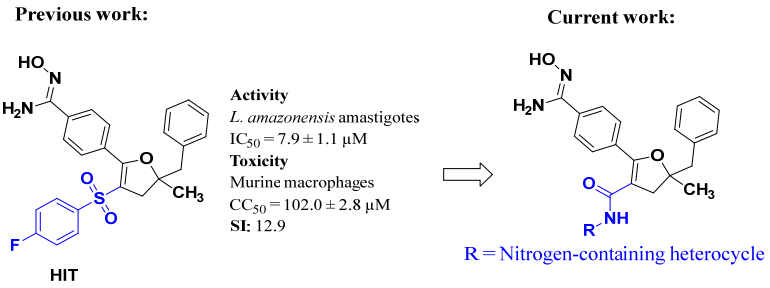
Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Leishmaniases are vector-borne diseases transmitted among mammalian hosts, including humans, via the bites of infected female phlebotomine sandflies [1]. Leishmaniasis groups diseases caused by heteroxenous protozoa from the genus Leishmania [2–4]. There are more than 20 well-recognized Leishmania species known to infect humans, generating three principal clinical manifestations, visceral (VL), cutaneous (CL), and mucocutaneous (ML) forms of the disease, with an important global impact on human health and well-being [5]. According to the World Health Organization (WHO), an estimated 50,000 to 90,000 new cases of VL and more than 1 million new cases of CL occur annually, particularly in tropical and subtropical regions [6]. Pharmacovigilance programs for current antileishmanial medications remain insufficient [7,8]. Thus, the efforts to follow up the safety

and efficacy of treatments are hampered, especially those based on parenteral regimes such as pentavalent antimonials, pentamidine, or amphotericin B [9,10]. Furthermore, miltefosine, the only oral drug for leishmaniasis, exhibits limitations including embryo-fetal toxicity [11,12]. These constraints, including the emergence of drug-resistant strains, highlight an urgent need for new and effective antileishmanial drugs adapted to oral administration [13,14].

Our group is interested in the design of compounds with antiparasitic activity against different species of *Leishmania*. We have developed a 4,5-dihydrofuran scaffold which has been previously evaluated against *L. donovani* and *L. amazonensis*. Furthermore, in light of the consensus that has been reached on the criteria for identifying 'hit' compounds for infectious diseases [15], a hit compound in this project was defined as one with an activity below 10 μM against the promastigote form of *L. donovani* and *L. amazonensis*. In this regard, a HIT compound was identified, 4-(5-benzyl-3-((4-fluorophenyl)sulfonyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-*N*′-hydroxybenzimidamide, IC_{50} = 7.9 ± 1.1 μM, for the intracellular amastigote form of *L. amazonensis*, with an SI = 12.9 on murine macrophages [16,17]. *L. donovani* is the causative agent of visceral leishmaniasis, also known as kala-azar, the most severe form of the disease [18]. Additionally, *L. amazonensis* is a prominent cause of cutaneous and diffuse cutaneous leishmaniasis, particularly in South America [19]. The amidoxime moiety in the HIT compound, featuring both oxime and amino functionalities on the same carbon atom (RC(NH_2)=NOH), proves a pH-responsive behavior that could enhance the potential for drug development [20–22], as shown in Scheme 1.



Scheme 1. Optimization of 4,5-dihydrofuran derivatives bearing an amidoxime group against *L. amazonensis*.

Furthermore, we have previously documented the sensitivity at position 3 of aliphatic derivatives of the 4,5-dihydrofuran scaffold, exhibiting a wide range of activity. Esters, such as ethyl carboxylate derivative, demonstrate better activity (with a promastigote IC_{50} of 6.3 μM) compared to aliphatic amides (with a promastigote IC_{50} > 43 μM) or aliphatic sulphones (with a promastigote IC_{50} > 63 μM) [23].

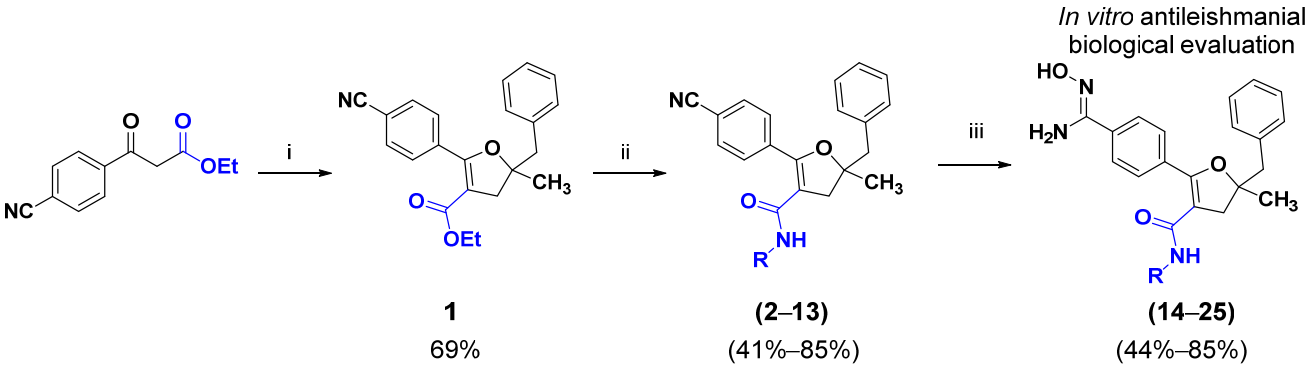
In the present work, we hypothesized that incorporating a nitrogen-containing heterocycle [24], such as pyridine, in place of an aryl moiety might enhance antileishmanial efficacy [25]. Comparatively, other heterocyclic moieties, like pyrazole [26], pyrazine [27], and pyridazine [28], could offer unique advantages to enhance the target selectivity [29]. Consequently, we report the in vitro biological evaluation of a series of 4,5-dihydrofurane-carboxamide against *Leishmania amazonensis* promastigotes. We also assessed the cytotoxicity and activity against the intracellular amastigote form of the most promising compounds.

2. Results and Discussion

2.1. Chemistry

Twelve compounds were synthesized through a three-step process, as shown in Scheme 2. The starting material, ethyl 3-(4-cyanophenyl)-3-oxopropanoate, was cyclized with a terminal alkene, (2-methylallyl)benzene, through an oxidative free-radical reaction mediated by manganese(III) acetate [30]. The 4,5-dihydrofuran-3-carboxylate thus formed, compound **1**, was subjected to a direct amidation reaction mediated by LiHMDS, yielding

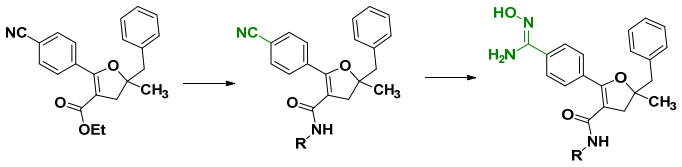
4,5-dihydrofuran-3-carboxamide intermediates, compounds **2** to **13**. LiHMDS has been used for its special selectivity to the C-O bond cleavage of unactivated esters [31].



Scheme 2. Synthetic pathways of antileishmanial compounds bearing the 4,5-dihydrofuran-3-carboxamide scaffold and an amidoxime moiety. Reagent and conditions: (i) $Mn(OAc)_3$ (2.1 equiv.), $Cu(OAc)_2$ (1 equiv.), 2-methyl-3-phenyl-1-propene (2 equiv.), AcOH, MW, 80 °C, 100 W, and 3 h. (ii) Amine (1.5 equiv.), LiHMDS (2.5 equiv.), Toluene, 70 °C, 15 h, and N_2. (iii) KO*t*Bu (10 equiv.), $NH_2OH.HCl$ (10 equiv.), DMSO, 18 h, 0 °C—RT, and N_2.

The yield of intermediates **2**–**13** varied between 41% with the phenyl moiety (compound **7**) and 85% with pyridin-2-yl (compound **5**). Subsequently, using a well-documented reaction with hydroxylamine hydrochloride, the nitrile moieties in the 4,5-dihydrofuran-3-carboxamide intermediates were converted into the corresponding amidoxime [32,33], with yields ranging from 44% to 85%, as shown in Table 1.

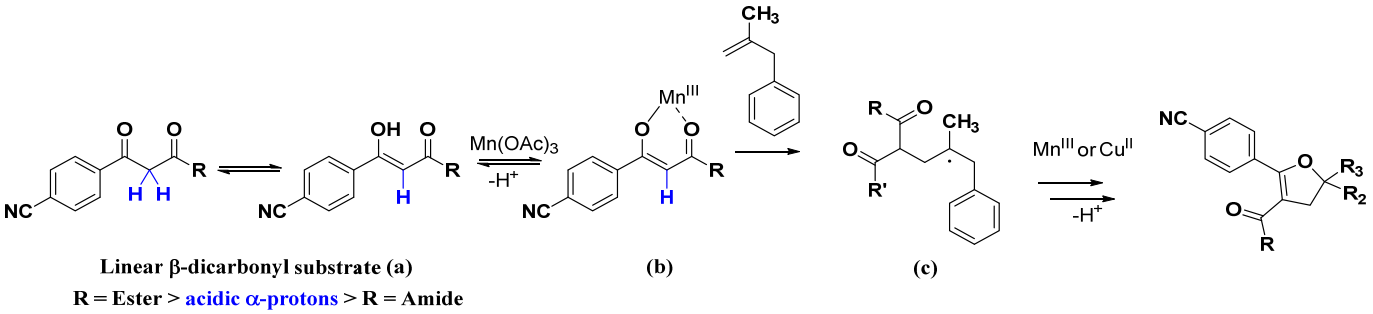
Table 1. Synthesis of 4,5-dihydrofuran-3-carboxamide intermediates and amidoximes from nitriles.



R	Nitrile Intermediate		Amidoxime Product	
	Compound	Yield (%)	Compound	Yield (%)
-5-bromopyridin-2-yl	**2**	45	**14**	68
-5-chloropyridin-2-yl	**3**	48	**15**	55
-5-methylpyridin-2-yl	**4**	66	**16**	85
-pyridin-2-yl	**5**	85	**17**	55
-pyridin-4-yl	**6**	50	**18**	70
-phenyl	**7**	41	**19**	44
-4-fluorophenyl	**8**	68	**20**	49
-4-(trifluoromethyl)benzyl	**9**	47	**21**	57
-pyridazin-3-yl	**10**	43	**22**	60
-6-chloropyridazin-3-yl	**11**	59	**23**	83
-pyrazin-2-yl	**12**	59	**24**	59
-1,5-dimethyl-1*H*-pyrazol-3-yl	**13**	66	**25**	60

The cyclization reaction to access the dihydrofuran moiety was a key step, achieved using a linear β-ketoester rather than a β-ketoamide. Preliminary observations from our team indicated that the reactivity of linear β-ketoamides presents challenges in selectively forming the dihydrofuran-3-carboxamide. Regarding the mechanism of the reaction, the varying capacity to form a Mn(III)-enolate complex affects the reactivity, which is influenced by the acidity of the α-proton(s) in the β-dicarbonyl compounds that affect the rate of enolization, as shown in Scheme 3. For β-ketoester, the enolization of **a** to give **b** is fast and

reversible. Moreover, the electron transfer to give the radical **c** is slow. Thus, the rate of β-ketoester cyclization depends on the alkene concentration [34]. Contrarily, for compounds with less acidic α-protons, such as linear β-ketoamides, the formation of the Mn(III)-enolate complex is slower, making this step rate-determining. Consequently, subsequent steps in the reaction could be altered. β-ketoamides can lead to the dihydrofuran product but often result in many byproducts. The linear β-ketoester allowed for the production of dihydrofuran with a good yield (69%).



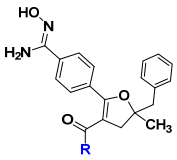
Scheme 3. Electron transfer to generate radicals.

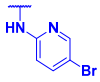
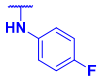
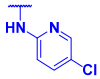
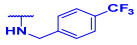
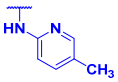
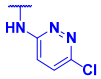
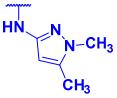
To guide the selection of synthesized compounds, complementary predicted biopharmaceutic parameters were calculated using open-source software such as Swiss-ADMET® (14.9.29, 2013) [35] and another licensed as ADMET-Predictor® (12.0) [36,37]. To our best knowledge, amide modification could serve as a reasonable first substitution of the sulfone moiety with a view toward further oral use in humans. Most of the amidoxime compounds adhering to Lipinski's rule of five, except for compound **21**, which bear the benzyl-trifluoromethyl group exhibited higher LogP and molecular weight values, at 5.3 and 507.39 g/mol, respectively. LogP values were calculated between 2.7 and 5.3. Nitrogen-containing modifications provided better preliminary predicted bioavailability than the sulfone-bearing HIT compound. The reference HIT compound showed a bioavailability of 30%, whereas compound **24** exhibited a bioavailability of over 90%, and the remaining compounds suggested around 80%. Moreover, these nitrogen-based modifications enabled the modulation of dissociation properties with the pH variations. The amidoxime moiety is associated with two pKa, a pKa acid around 13 and a pKa basic around 5, depending on the substituents [38]. Predicted values showed that amide substitutions modulate with additional pKa values around 11 and 2, respectively. This pH-dependent dissociation behavior is interesting, first, for a gastrointestinal solubility/absorption balance and, second, regarding a hypothetical mechanism of antileishmanial action based on the pH modulation. The parasitophorous vacuole of macrophages, which contains the amastigote form of the parasite, exhibits an acidic pH near 4.5 [39,40], in contrast to the cytoplasmic pH of 7.2 [41,42]. The promastigote form usually maintains a pH near 6.5 [43,44].

2.2. Biology

Initially, compounds **14** to **25** were subjected to preliminary in vitro screening against *Leishmania amazonensis* promastigotes, strain MHOM/BR/77/LTB0016. The 50% growth inhibitory concentration (IC_{50}) was measured after 72 h of cultivation with each compound using a resazurin assay conducted in independent triplicate experiments. The results showed that the compounds exhibited antileishmanial activities, with IC_{50} values ranging from 15.0 to 52.5 μM, as presented in Table 2.

Table 2. Antileishmanial activity of the 4,5-dihydrofuran-3-carboxamide derivatives on the promastigote form of *L. amazonensis*.



Compound	Structure	Activity IC_{50} (μM/72 h) [a]	Compound	Structure	Activity IC_{50} (μM/72 h) [a]
14		15.0 ± 1.03	**20**		23.8 ± 1.02
15		16.0 ± 1.03	**21**		26.4 ± 1.02
16		17.0 ± 1.02	**22**		29.9 ± 1.02
17		22.4 ± 1.02	**23**		36.4 ± 1.03
18		23.5 ± 1.04	**24**		39.4 ± 1.02
19		23.8 ± 1.02	**25**		52.5 ± 1.03

[a] The IC_{50} (μM/72 h) values represent the mean ± SD from three independent experiments.

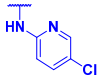
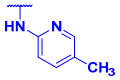
Compounds featuring a pyridin-2-yl moiety were the most active in the series against the promastigote form of the parasite. Derivatives **14**, **15**, and **16**, with bromine, chlorine, or methyl substitutions, respectively, exhibited IC_{50} values of 15.0 μM, 16.0 μM, and 17.0 μM. Moreover, the pyridine ring without substitutions showed a marginal decrease in activity, with an IC_{50} of 22.40 μM for compound **17**. Additionally, the pyridin-4-yl derivative, compound **18**, demonstrated similar potency, with an IC_{50} of 23.5 μM, suggesting that the position of one nitrogen heteroatom in the ring does not significantly influence the activity. In contrast, a significant reduction in activity was observed when comparing the pyridine ring to the pyrazine and pyridazine moieties, compound **22** (29.9 μM) and compound **24** (39.4 μM). These differences highlight the impact of having two nitrogen heteroatoms and their relative positioning on the activity. In addition, the derivative bearing a 6-chloropyridazin-3-yl moiety, compound **23**, showed an IC_{50} of 36.4 μM, and compound **25**, which incorporates a 1,5-dimethyl-1*H*-pyrazol-3-yl group, was the least active in the series, with an IC_{50} of 52.5 μM. Additionally, compounds **19** and **20**, featuring a phenyl moiety and used as comparatives lacking the nitrogen heteroatom substitution, exhibited a moderate activity, with IC_{50} values of 23.8 μM. Compound **21**, with the largest lipophilicity due to the trifluoromethyl group, showed an IC_{50} of 26.4 μM. Thus, a clear relationship between the activity and the influence of the electron density on the assessed modifications remains to be elucidated in further largest series. These variations in activity underscore the importance of substituent effects and the ring structure at position 3 in modulating activity against the promastigote form of the parasite.

Additionally, in comparison to our reference compound HIT, bearing a sulfone moiety, the results indicate a reduced activity of the 4-dihydrofurane-3-carboxamide derivatives against the promastigote form of the parasite. However, compounds **14**, **15**, and **16**, identified as the most active in the series, were selected to perform cytotoxicity testing in murine macrophages. The results notably revealed that these compounds do not exhibit significant toxicity. The bromine derivative showed a CC_{50} of 171.5 μM, while the chlorine and methyl derivatives displayed toxicity values > 200 μM.

Thus, an in vitro biological evaluation against the intracellular amastigote form of *Leishmania amazonensis*, which is involved in the human infection, was performed for these

three compounds. Interesting antileishmanial activities were obtained, with IC_{50} values of 0.5 µM, 0.6 µM, and 0.3 µM, respectively, showing a very favorable toxicity/activity relationship. The improved activity among these compounds showed no significant differences; therefore, the advantage of the broader selectivity index (SI) is primarily due to the differing cytotoxic behaviors associated with the pyridine ring substitutions. Thus, an SI above 300 was established for compounds **14** and **15**, and above 600 for compound **16**. This SI is at least seventy times higher than that observed for Pentamidine and twenty-five times higher than the one observed for the reference HIT, as previously reported in Table 3.

Table 3. Antileishmanial activity, cytotoxicity, and selectivity index of the 4,5-dihydrofuran-3-carboxamide carrying an amidoxime group.

Compound	Structure	Cytotoxicity CC_{50} (µM/72 h) [a]	Intracellular Amastigotes IC_{50} (µM/72 h) [a]	SI = CC_{50}/IC_{50} Intracellular Amastigotes
14		171.5 ± 1.19	0.5 ± 0.15	343
15		>200	0.6 ± 0.20	>333.3
16		>200	0.3 ± 0.07	>666.7

[a] Values represent the mean ± SD from three independent experiments.

As a perspective, development efforts will focus on synthesizing a chiral version of the isomer that demonstrates the most promising antileishmanial activity. In vitro tests will be conducted to evaluate the activity of individual enantiomers. Based on these results, enantioselective synthesis methods could be explored.

3. Experimental Section

3.1. Chemistry

3.1.1. General

Reagents were purchased from Sigma-Aldrich (3050 Spruce Street St. Louis, MO, 63103, USA), Fluorochem (Unit 14 Graphite Way, Hadfield, Glossop SK13 1QH, UK), Fisher Scientific (168 3rd Ave, Waltham, MA 02451, USA), or TCI chemicals (9211 North Harborgate Street, Portland, OR 97203, USA) and used without further purification. Microwave reactions were performed using monomode reactors in a Biotage® Initiator Classic (Uppsala, Sweden) in sealed vials, with output powers ranged up to 400 W.

Reaction monitoring was conducted using thin-layer chromatography on aluminum plates (5 × 5 cm) precoated with silica gel 60 F_{254} nm (Merck-F_{254} or Alugram®: Macherey-Nagel) in an appropriate eluent. Visualization was performed using ultraviolet light under a UV lamp (VL-6.CL) at 254 nm (6 W) or 365 nm (6 W).

The LC-MS analysis was conducted on a Thermo Scientific Accela High-Speed LC System® (168 3rd Ave, Waltham, MA, USA) coupled with a single quadrupole mass spectrometer, the Thermo MSQ Plus® (168 3rd Ave, Waltham, MA, USA), with an HPLC column, the Thermo Hypersil Gold® (168 3rd Ave, Waltham, MA 02451, USA) 50 × 2.1 mm (C_{18}-bonded), with particles of a diameter of 1.9 mm. The samples were injected into the column at a volume of 1 µL. A total of eight minutes was fixed for the chromatographic analysis, which was conducted using a gradient of the following solvents: methanol/water 50:50 at time zero; then, between zero and four minutes, a linear increase in the proportion of methanol to reach a methanol/water ratio of 95:5. Between four and six minutes, the methanol/water ratio was maintained at 95:5, and between six and seven minutes, a linear decrease in the proportion of methanol to return to a methanol/water ratio of 50:50. The water used was buffered with 5 mM ammonium acetate. The mobile phase had a flow

rate of 0.3 mL/min. The LC-MS analysis was performed at the Faculty of Pharmacy in Marseille. The purity of the synthesized compounds was verified by the relative area in the LC chromatogram, with >90% for intermediates and >95% for tested compounds.

The melting points were determined using a Köfler melting point apparatus (Wagner & Munz GmbH, München, Germany) and were not corrected.

The following adsorbent was utilized for the column chromatography: silica gel 60 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany, with a particle size of 0.063–0.200 mm; 70–230 mesh ASTM or Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany, with a particle size of 0.063–0.04 mm).

Flash chromatography was conducted on a PuriFlash® 5.020 apparatus (Interchim, Montluçon, France) using a solid deposit in dry-load PF-DEL-F004, which contained Celite® 545 CAS 68855-54-9 (Celite Corp., Lompoc, CA, USA). The maximum pressure was set at 15 bar and the flow rate was 15 mL/min. The ultraviolet–visible detector was configured at a wavelength of 254 nm.

The NMR spectra were recorded at the Faculty of Pharmacy in Marseille using a Bruker Avance NEO 400 MHz NanoBay spectrometer (Bruker, Billerica, MA, USA). Residual ^{1}H and ^{13}C signals in deuterated solvent ($CDCl_3$) were used to calibrate the chemical shifts, obviating the need for an additional internal standard. The ^{1}H NMR reference values were $CDCl_3$ δ = 7.26 ppm and DMSO-d_6 δ = 2.50 ppm. The ^{13}C NMR reference values were $CDCl_3$ δ = 77.16 ppm and DMSO-d_6 δ = 39.52 ppm. The data for the ^{1}H NMR are reported as follows: chemical shifts (δ) in parts per million (ppm), multiplicity (described as follows: s, singlet; bs, broad singlet; d, doublet; t, triplet; q, quadruplet; dd, doublet of doublet; ddd, doublet of doublet of doublet; m, multiplet), coupling constants (*J*) in Hertz (Hz), and integration. The data for the ^{13}C NMR are reported as follows: chemical shifts (δ) in parts per million (ppm).

See Supplementary Material for NMR spectra.

3.1.2. Procedure for Preparation of Ethyl 5-Benzyl-2-(4-cyanophenyl)-5-methyl-4, 5-dihydrofuran-3-carboxylate (**1**)

In a 20 mL microwave vial equipped with a stirring bar, a solution of manganese (III) acetate dihydrate (2.1 equiv.) and copper(II) acetate (1 equiv.) in 10 mL of glacial acetic acid was heated at 80 °C under microwave irradiation at 100 W for 15 min. Subsequently, the reaction mixture was cooled, and a solution of ethyl 3-(4-cyanophenyl)-3-oxopropanoate (500 mg, 2.3 mmol, and 1 equiv.) and 2-methyl-3-phenyl-1-propene (608 mg, 4.6 mmol, and 2 equiv.) in 7 mL of acetic acid was added. The reaction mixture was monitored by thin-layer chromatography using cyclohexane/AcOEt (70/30), with an Rf value of 0.69. The reaction mixture was heated for 3 h under microwave irradiation using the same conditions. The resulting product was transferred to 50 mL of cold water and extracted with dichloromethane (3 × 40 mL). The organic extracts were subsequently collected and washed with saturated aqueous $NaHCO_3$ (3 × 40 mL) and then dried over Na_2SO_4. The filtrate solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography using a PuriFlash® IR-20SI-F0025 column and cyclohexane/AcOEt as eluent, employing a gradient from 100/0 to 80/20 over 20 column volumes. Furthermore, the UV–VIS detector was additionally configured at 307 nm, 235, nm, and 205 nm. The product was obtained in the form of an oily white solid. Yield: 69%. The analytical data are consistent with those in the previous literature [23]. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 7.85 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.6 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.64 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.6 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.30–7.19 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 4.08 (q, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 7.1 Hz, 2H, CH_2), 3.10 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 15.5 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.02 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 15.3 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.98 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 15.3 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.82 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 15.5 Hz, 1H, H-(CH_2)), 1.45 (s, 3H, CH_3), and 1.17 (t, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 7.1 Hz, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 164.6 (C), 161.0 (C), 136.1 (C), 134.5 (C), 131.1 ($2CH_{Ar}$), 130.2 ($2CH_{Ar}$), 129.8 ($2CH_{Ar}$), 128.0 ($2CH_{Ar}$), 126.6 (CH_{Ar}), 118.3 (C), 113.2 (C), 104.2 (C), 87.8 (C), 59.7 (CH_2), 46.5 (CH_2), 42.1 (CH_2), 26.4 (CH_3), and 14.0 (CH_3). HRMS (ESI +) *m*/*z* calcd for $C_{22}H_{21}NO_3$ $[M + Na]^+$ 370.1414; found 370.1413.

3.1.3. Procedure for Preparation of Compounds **2** to **13** by Amidation Reaction

A single-neck round-bottom flask of 5 mL equipped with a stirring bar was charged with the intermediate product, compound **1** (1.0 equiv.), the respective amine (1.5 equiv.), and then placed under nitrogen. The vial was subjected to three evacuation/backfilling cycles. Toluene (2 mL) and lithium bis(trimethylsilyl)amide (LiHMDS, 1.0 M in THF, and 2.5 equiv.) were added sequentially with vigorous stirring at room temperature. The reaction mixture was then stirred for 15 h at 70 °C. Subsequently, the reaction mixture was quenched with NH_4Cl (1.0 M and 5 mL) and extracted with EtOAc (3 × 15 mL). The organic layers were combined, washed with water (1 × 20 mL) and brine (1 × 20 mL), dried over Na_2SO_4, and concentrated. Purification by flash chromatography using an appropriate solvent afforded the title product.

5-Benzyl-N-(5-bromopyridin-2-yl)-2-(4-cyanophenyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-3-carboxamide (**2**).

The compound **2** was synthesized following the previously described procedure from 5-bromopyridin-2-amine (112 mg, 0.65 mmol, and 1.5 equiv.). The reaction progress was monitored by TLC (eluent: AcOEt/cyclohexane 40/60; Rf of 0.33). The crude product was purified by flash chromatography using a PuriFlash® IR-50SI-F0025 column and eluted with cyclohexane/AcOEt in a gradient from 100/0 to 80/20 over 25 column volumes. Yield: 45%.

The product was obtained as a light-brown oil. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.24 (d, $^4J_{H\text{-}H}$ = 2.4 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.12 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.81 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.7 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.75 (dd, $^4J_{H\text{-}H}$ = 2.4 Hz, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.68 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.7 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.67 (br s, 1H, NH), 7.32–7.22 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 3.23 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.3 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.08 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.04 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.92 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.3 Hz, 1H, H-(CH_2), and 1.54 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 162.7 (C), 160.9 (C), 150.1 (C), 148.3 (CH_{Ar}), 141.1 (CH_{Ar}), 136.0 (C), 134.5 (C), 131.8 ($2CH_{Ar}$), 130.5 ($2CH_{Ar}$), 129.9 ($2CH_{Ar}$), 128.5 ($2CH_{Ar}$), 127.2 (CH_{Ar}), 118.5 (C), 115.5 (CH_{Ar}), 114.5 (C), 113.9 (C), 105.9 (C), 88.3 (C), 46.8 (CH_2), 42.1 (CH_2), and 27.0 (CH_3). LC/MS ESI+ tr, 6.59 min, (*m*/*z*) calcd for $C_{25}H_{20}BrN_3O_2$ $[M + H]^+$: found 474.96. HRMS (ESI +) *m*/*z* calcd for $C_{25}H_{20}BrN_3O_2$ $[M + H]^+$ 476.0795; found 476.0798.

5-Benzyl-N-(5-chloropyridin-2-yl)-2-(4-cyanophenyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-3-carboxamide (**3**).

The compound **3** was synthesized following the previously described procedure from 5-chloropyridin-2-amine (112 mg, 0.86 mmol, and 1.5 equiv.). The reaction progress was monitored by TLC (eluent: cyclohexane/AcOEt/dichloromethane 30/40/30; Rf of 0.51). The crude product was purified by flash chromatography using a PuriFlash® IR-50SI-F0025 column and eluted with cyclohexane/AcOEt in a gradient from 100/0 to 70/30 over 25 column volumes. Yield: 48%.

The product was obtained as a light-yellow oil. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.18 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.14 (d, $^4J_{H\text{-}H}$ = 2.4 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.81 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.73 (br s, 1H, NH), 7.68 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.62 (dd, $^4J_{H\text{-}H}$ = 2.4 Hz, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.33–7.23 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 3.23 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.2 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.08 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.04 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.93 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.2 Hz, 1H, H-(CH_2), and 1.54 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 162.7 (C), 160.9 (C), 149.7 (C), 146.0 (CH_{Ar}), 138.4 (CH_{Ar}), 136.0 (C), 134.5 (C), 131.8 ($2CH_{Ar}$), 130.5 ($2CH_{Ar}$), 129.9 ($2CH_{Ar}$), 128.5 ($2CH_{Ar}$), 127.2 (CH_{Ar}), 126.7 (C), 118.5 (C), 115.0 (CH_{Ar}), 113.9 (C), 105.9 (C), 88.3 (C), 46.8 (CH_2), 42.1 (CH_2), and 27.0 (CH_3). LC/MS ESI+ tr, 6.54 min, (*m*/*z*) calcd for $C_{25}H_{20}ClN_3O_2$ $[M + H]^+$: found 430.06. HRMS (ESI+) *m*/*z* calcd for $C_{25}H_{20}ClN_3O_2$ $[M + H]^+$ 430.1317; found 413.1314.

5-Benzyl-2-(4-cyanophenyl)-5-methyl-N-(5-methylpyridin-2-yl)-4,5-dihydrofuran-3-carboxamide (**4**).

The compound **4** was synthesized following the previously described procedure from 5-methylpyridin-2-amine (74 mg, 0.68 mmol, and 1.5 equiv.). The reaction progress was monitored by TLC (eluent: cyclohexane/AcOEt/dichloromethane 40/30/30; Rf of 0.55). The crude product was purified by flash chromatography using a PuriFlash® IR-50SI-

F0025 column and eluted with cyclohexane/AcOEt in a gradient from 100/0 to 70/30 over 25 column volumes. Yield: 66%. The product was obtained as a light-yellow oil. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.13 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.6 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.01 (m, 2H, NH, CH_{Ar}), 7.82 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.4 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.67 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.4 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.53 (dd, $^{4}J_{H\text{-}H}$ = 2.0 Hz, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.6 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.34–7.20 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 3.27 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.4 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.08 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.04 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2), 2.96 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.4 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.28 (s, 3H, CH_3), and 1.53 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 162.8 (C), 160.9 (C), 149.0 (C), 145.5 (CH_{Ar}), 140.5 (CH_{Ar}), 136.1 (C), 134.7 (C), 131.8 ($2CH_{Ar}$), 130.5 ($2CH_{Ar}$), 130.0 ($2CH_{Ar}$), 129.3 (C), 128.5 ($2CH_{Ar}$), 127.2 (CH_{Ar}), 118.6 (C), 114.4 (CH_{Ar}), 113.8 (C), 106.1 (C), 88.3 (C), 46.8 (CH_2), 42.3 (CH_2), 27.0 (CH_3), and 17.9 (CH_3). LC/MS ESI+ tr, 6.10 min, (*m*/*z*) calcd for $C_{26}H_{23}N_3O_2$ $[M + H]^+$: found 410.11. HRMS (ESI+) *m*/*z* calcd for $C_{26}H_{23}N_3O_2$ $[M + H]^+$ 410.1863; found 410.1870.

5-Benzyl-2-(4-cyanophenyl)-5-methyl-N-(pyridin-2-yl)-4,5-dihydrofuran-3-carboxamide (**5**).

The compound **5** was synthesized following the previously described procedure from pyridin-2-amine (41 mg, 0.43 mmol, and 1.5 equiv.). The reaction progress was monitored by TLC (eluent: cyclohexane/AcOEt/dichloromethane 30/40/30; Rf of 0.80). The crude product was purified by flash chromatography using a PuriFlash® IR-50SI-F0025 column and eluted with cyclohexane/AcOEt in a gradient from 100/0 to 70/30 over 25 column volumes. A UV–VIS detector was configurated additionally at 222 nm and 230 nm. Yield: 85%. The product was obtained as a light-brown oil. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.24–8.17 (m, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.89 (br s, 1H, NH), 7.83 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.6 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.70–7.67 (m, 3H, $3CH_{Ar}$), 7.33–7.23 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 7.05–7.01 (m, 1H, CH_{Ar}), 3.26 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.4 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.09 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.05 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.96 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.4 Hz, 1H, H-(CH_2)), and 1.54 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 162.9 (C), 160.7 (C), 151.3 (C), 146.9 (CH_{Ar}), 139.1 (CH_{Ar}), 136.1 (C), 134.7 (C), 131.8 ($2CH_{Ar}$), 130.5 ($2CH_{Ar}$), 130.0 ($2CH_{Ar}$), 128.5 ($2CH_{Ar}$), 127.2 (CH_{Ar}), 119.7 (CH_{Ar}), 118.6 (C), 114.5 (CH_{Ar}), 113.8 (C), 106.2 (C), 88.2 (C), 46.8 (CH_2), 42.3 (CH_2), and 27.0 (CH_3). Analysis calculated for $C_{25}H_{21}N_3O_2$: HRMS: *m*/*z* $[M + H]^+$ calculated 396.1707; found 396.1703.

5-Benzyl-2-(4-cyanophenyl)-5-methyl-N-(pyridin-4-yl)-4,5-dihydrofuran-3-carboxamide (**6**).

The compound **6** was synthesized following the previously described procedure from and pyridin-4-amine (40 mg, 0.43 mmol, and 1.5 equiv.). The reaction progress was monitored by TLC (eluent: dichloromethane/methanol 96/4; Rf of 0.38). The crude product was purified by flash chromatography using a PuriFlash® IR-50SI-F0025 column and eluted with dichloromethane/methanol in a gradient from 100/0 to 95/5 over 25 column volumes. A UV–VIS detector was configurated additionally at 222 nm and 230 nm. Yield: 50%. The product was obtained as a yellow oil. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.35 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 6.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.78 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.6 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.68 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.6 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.44 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 6.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.39 (br s, 1H, NH), 7.32–7.23 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 3.24 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.5 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.07 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.9 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.04 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.9 Hz, 1H, H-(CH_2), 2.98 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.5 Hz, 1H, H-(CH_2)), and 1.55 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 163.2 (C), 159.9 (C), 150.5 ($2CH_{Ar}$), 145.1 (C), 136.1 (C), 134.4 (C), 132.0 ($2CH_{Ar}$), 130.5 ($2CH_{Ar}$), 129.8 ($2CH_{Ar}$), 128.5 ($2CH_{Ar}$), 127.2 (CH_{Ar}), 118.4 (C), 114.1 (C), 113.5 ($2CH_{Ar}$), 106.5 (C), 88.3 (C), 46.9 (CH_2), 42.3 (CH_2), and 27.1 (CH_3). Analysis calculated for $C_{25}H_{21}N_3O_2$: HRMS: *m*/*z* $[M + H]^+$ calculated 396.1707; found 396.1702.

5-Benzyl-2-(4-cyanophenyl)-5-methyl-N-phenyl-4,5-dihydrofuran-3-carboxamide (**7**).

The compound **7** was synthesized following the previously described procedure from aniline (40 mg, 0.43 mmol, and 1.5 equiv.). The reaction progress was monitored by TLC (eluent: cyclohexane/AcOEt/dichloromethane 3/3/4; Rf of 0.92). The crude product was purified by flash chromatography using a PuriFlash® IR-50SI-F0025 column and eluted with cyclohexane/AcOEt in a gradient from 100/0 to 70/30 over 25 column volumes. A UV–VIS detector was configured at 242 nm, 290 nm and 327 nm. Yield: 41%. The

product was obtained as an oily yellow solid. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 7.81 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.4 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.67 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.4 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.52–7.43 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.34–7.27 (m, 8H, $8CH_{Ar}$), 7.08 (t, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 7.2 Hz, 1H, CH_{Ar}), 6.70 (br s, 1H, NH), 3.19 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.7 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.08 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.03 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2), 2.95 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.7 Hz, 1H, H-(CH_2), and 1.55 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 169.2 (C), 157.9 (C), 137.8 (C), 136.4 (C), 134.6 (C), 132.0 ($2CH_{Ar}$), 130.5 ($2CH_{Ar}$), 129.7 ($2CH_{Ar}$), 129.2 ($2CH_{Ar}$), 128.5 ($2CH_{Ar}$), 127.1 (CH_{Ar}), 124.5 (CH_{Ar}), 120.0 ($2CH_{Ar}$), 118.5 (C), 113.7 (C), 107.3 (C), 87.6 (C), 47.0 (CH_2), 42.8 (CH_2), and 27.1 (CH_3). Analysis calculated for $C_{26}H_{22}N_2O_2$: HRMS: *m*/*z* $[M + H]^+$ calculated 395.1754; found 395.1753.

5-Benzyl-2-(4-cyanophenyl)-N-(4-fluorophenyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-3-carboxamide (**8**).

The compound **8** was synthesized following the previously described procedure from 4-fluoroaniline (45 mg, 0.40 mmol, and 1.5 equiv.). The reaction progress was monitored by TLC (eluent: cyclohexane/AcOEt 50/00; Rf of 0.29). The crude product was purified by flash chromatography using a PuriFlash® IR-50SI-F0025 column and eluted with cyclohexane/ethyl acetate in a gradient from 100/0 to 60/40 over 25 column volumes. A UV–VIS detector configured additionally at 225 nm and 230 nm. Yield: 68%. The product was obtained as a light-brown oil. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 7.81 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.6 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.67 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.6 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.34–7.25 (m, 7H, $7CH_{Ar}$), 7.02–6.95 (m, 2H, $2CH_{Ar}$), 6.66 (br s, 1H, NH), 3.18 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.5 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.08 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.7 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.03 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.7 Hz, 1H, H-(CH_2), 2.93 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.5 Hz, 1H, H-(CH_2), and 1.55 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 162.9 (C), 159.5 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 246.3 Hz, C), 158.3 (C), 136.8 (C), 136.3 (C), 133.7 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 3.1 Hz, C), 130.5 ($2CH_{Ar}$), 129.8 ($2CH_{Ar}$), 128.5 ($2CH_{Ar}$), 127.3 ($2CH_{Ar}$), 127.2 (CH_{Ar}), 121.1 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 8.6 Hz, $2CH_{Ar}$), 118.5 (C), 115.9 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 21.6 Hz, $2CH_{Ar}$), 113.7 (C), 106.9 (C), 87.6 (C), 47.0 (CH_2), 42.8 (CH_2), and 27.1 (CH_3). ^{19}F NMR (376.5 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) −103.3. LC/MS ESI+ tr, 5.10 min, (*m*/*z*) calcd for $C_{26}H_{21}FN_2O_2$ $[M + H]^+$: found 413.06. HRMS (ESI +) *m*/*z* calcd for $C_{26}H_{21}FN_2O_2$ $[M + H]^+$ 413.1660; found 413.1662.

5-Benzyl-2-(4-cyanophenyl)-5-methyl-N-(4-(trifluoromethyl)benzyl)-4,5-dihydrofuran-3-carboxamide (**9**).

The compound **9** was synthesized following the previously described procedure from (4-(trifluoromethyl)phenyl)methanamine (76 mg, 0.4 mmol, and 1.5 equiv.). The reaction progress was monitored by TLC (eluent: cyclohexane/AcOEt 70/30; Rf of 0.19). The crude product was purified by flash chromatography using a PuriFlash® IR-50SI-F0025 column and eluted with cyclohexane/ethyl acetate in a gradient from 100/0 to 70/30 over 25 column volumes. A UV–VIS detector was configured additionally in 225 nm and 230 nm. Yield: 47%. The product was obtained as a light-brown oil. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 7.81 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.4 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.62 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.4 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.58 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.1 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.32 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.1 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.27–7.22 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 5.44 (br s, 1H, NH), 4.50–4.42 (m, 2H, CH_2), 3.07 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.5 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.04 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.99 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.82 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.5 Hz, 1H, H-(CH_2)), and 1.51 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 164.7 (C), 158.0 (C), 142.4 (C), 136.3 (C), 134.7 (C), 131.7 ($2CH_{Ar}$), 130.5 ($2CH_{Ar}$), 130.2 (q, $^{2}J_{C\text{-}F}$ = 34.6 Hz, C), 129.8 ($2CH_{Ar}$), 128.4 ($2CH_{Ar}$), 128.1 ($2CH_{Ar}$), 127.1 (CH_{Ar}), 125.8 (q, $^{3}J_{C\text{-}F}$ = 3.7 Hz, $2CH_{Ar}$), 124.2 (q, $^{1}J_{C\text{-}F}$ = 271.8 Hz, CF_3), 118.6 (C), 113.5 (C), 106.1 (C), 87.4 (C), 47.0 (CH_2), 43.0 (CH_2), 42.7 (CH_2), and 27.1 (CH_3). ^{19}F NMR (376.5 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) −62.5. Analysis calculated for $C_{28}H_{23}F_3N_2O_2$: HRMS: *m*/*z* $[M + H]^+$ calculated 477.1784; found 477.1786.

5-Benzyl-2-(4-cyanophenyl)-5-methyl-N-(pyridazin-3-yl)-4,5-dihydrofuran-3-carboxamide (**10**).

The compound **10** was synthesized following the previously described procedure from pyridazin-3-amine (41 mg, 0.43 mmol, and 1.5 equiv.). The reaction progress was monitored by TLC (eluent: cyclohexane/AcOEt/dichloromethane 2/6/2; Rf of 0.35). The crude product was purified by flash chromatography using a PuriFlash® IR-50SI-F0025 column

and eluted with cyclohexane/ethyl acetate in a gradient from 100/0 to 60/40 over 25 column volumes. A UV–VIS detector was configured to 241 nm, 212 nm, and 315 nm. Yield: 43%. The product was obtained as a yellow oil. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.84 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 12.1 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.68 (br s, 1H, NH), 8.50 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.7 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.81 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.4 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.68 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.4 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.61 (dd, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 12.1 Hz, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.7 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.35–7.20 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 3.32 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.3 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.10 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.06 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.02 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.3 Hz, 1H, H-(CH_2)), and 1.56 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 163.6 (C), 162.1 (C), 155.3 (C), 152.0 (C), 148.2 (CH_{Ar}), 135.9 (C), 134.5 (C), 131.8 ($2CH_{Ar}$), 130.5 ($2CH_{Ar}$), 130.0 ($2CH_{Ar}$), 128.5 ($2CH_{Ar}$), 128.1 (CH_{Ar}), 127.2 (CH_{Ar}), 119.7 (CH_{Ar}), 118.4 (C), 105.7 (C), 88.7 (C), 46.8 (CH_2), 41.9 (CH_2), and 27.0 (CH_3). Analysis calculated for $C_{24}H_{20}N_4O_2$: HRMS: *m*/*z* $[M + H]^+$ calculated 397.1659; found 397.1657.

5-Benzyl-N-(6-chloropyridazin-3-yl)-2-(4-cyanophenyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-3-carboxamide (**11**).

The compound **11** was synthesized following the previously described procedure from 6-chloropyridazin-3-amine (86 mg, 0.67 mmol, and 1.5 equiv.). The reaction progress was monitored by TLC (eluent: cyclohexane/AcOEt/dichloromethane 6/2/2; Rf of 0.41). The crude product was purified by flash chromatography using a PuriFlash® IR-50SI-F0025 column and eluted with cyclohexane/AcOEt in a gradient from 100/0 to 70/30 over 25 column volumes. A UV–VIS detector was configured additionally to 210 nm and 230 nm. Yield: 59%. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.53 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 9.5 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.80 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.6 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.69 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.6 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.48 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 9.5 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.35–7.20 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 3.31 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.3 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.11 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.9 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.05 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.9 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.01 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.3 Hz, 1H, H-(CH_2), and 1.58 (s, 3H, CH_3). NH not observed. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 163.3 (C), 154.4 (C), 152.0 (C), 135.9 (2C), 134.4 (C), 131.9 ($2CH_{Ar}$), 130.6 (CH_{Ar}), 130.5 ($2CH_{Ar}$), 130.0 ($2CH_{Ar}$), 128.5 ($2CH_{Ar}$), 127.3 (CH_{Ar}), 122.0 (CH_{Ar}), 118.4 (C), 114.2 (C), 105.3 (C), 89.0 (C), 46.8 (CH_2), 41.7 (CH_2), and 27.1 (CH_3). Analysis calculated for $C_{24}H_{19}ClN_4O_2$: HRMS: *m*/*z* $[M + Na]^+$ calculated 431.1183; found 431.1184.

5-Benzyl-2-(4-cyanophenyl)-5-methyl-N-(pyrazin-2-yl)-4,5-dihydrofuran-3-carboxamide (**12**).

The compound **12** was synthesized following the previously described procedure from pyrazin-2-amine (41 mg, 0.43 mmol, and 1.5 equiv.). The reaction progress was monitored by TLC (eluent: cyclohexane/AcOEt/dichloromethane 3/4/3; Rf of 0.57). The crude product was purified by flash chromatography using a PuriFlash® IR-50SI-F0025 column and eluted with cyclohexane/AcOEt in a gradient from 100/0 to 70/30 over 25 column volumes. A UV–VIS detector was configured additionally to 210 nm and 230 nm. Yield: 59%. The product was obtained as light-yellow oil. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 9.48 (s, 1H, NH), 8.28 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 2.4 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.17 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 2.4 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.82 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.70 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.49 (br s, 1H, CH_{Ar}), 7.34–7.20 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 3.24 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.3 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.10 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.04 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.95 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.3 Hz, 1H, H-(CH_2)), and 1.56 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 162.5 (C), 161.2 (C), 148.2 (C), 141.9 (CH_{Ar}), 140.0 (CH_{Ar}), 137.2 (CH_{Ar}), 135.9 (C), 134.4 (C), 132.0 ($2CH_{Ar}$), 130.5 ($2CH_{Ar}$), 130.0 ($2CH_{Ar}$), 128.5 ($2CH_{Ar}$), 127.3 (CH_{Ar}), 118.4 (C), 114.2 (C), 105.6 (C), 88.4 (C), 46.8 (CH_2), 42.1 (CH_2), and 27.1 (CH_3). Analysis calculated for $C_{24}H_{20}N_4O_2$: HRMS: *m*/*z* $[M + Na]^+$ calculated 419.1478; found 419.1480.

5-Benzyl-2-(4-cyanophenyl)-N-(1,5-dimethyl-1H-pyrazol-3-yl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-3-carboxamide (**13**).

The compound **13** was synthesized following the previously described procedure from 1,5-dimethyl-1*H*-pyrazol-3-amine (48 mg, 0.43 mmol, and 1.5 equiv.). The reaction progress was monitored by TLC (eluent: cyclohexane/AcOEt/dichloromethane 3/4/3; Rf of 0.29). The crude product was purified by flash chromatography using a PuriFlash® IR-50SI-F0025 column and eluted with cyclohexane/ethyl acetate in a gradient from 100/0 to 70/30 over

25 column volumes. A UV–VIS detector was configured to 238 nm and 320 nm. Yield: 66%. The product was obtained as a light-brown oil. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 7.84 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.4 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.64 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.4 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.60 (br s, 1H, NH), 7.30–7.18 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 6.43 (s, 1H, CH_{Ar}), 3.62 (s, 3H, CH_3), 3.15 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.4 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.04 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.2 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.00 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.2 Hz, 1H, H-(CH_2), 2.85 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.4 Hz, 1H, H-(CH_2), 2.21 (s, 3H, CH_3), and 1.49 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 161.7 (C), 159.2 (C), 145.3 (C), 139.9 (C), 136.1 (C), 134.7 (C), 131.7 ($2CH_{Ar}$), 130.4 ($2CH_{Ar}$), 129.8 ($2CH_{Ar}$), 128.4 ($2CH_{Ar}$), 127.0 (CH_{Ar}), 118.6 (C), 113.4 (C), 106.0 (C), 97.4 (CH_{Ar}), 87.6 (C), 46.7 (CH_2), 42.4 (CH_2), 35.6 (CH_3), 26.9 (CH_3), and 11.4 (CH_3). Analysis calculated for $C_{25}H_{24}N_4O_2$: HRMS: *m*/*z* $[M + H]^+$ calculated 413.1972; found 413.1972.

3.1.4. General Procedure for Amidoxime Synthesis

Hydroxylamine hydrochloride (10 equiv.) in a solvent mixture of dimethyl sulfoxide was stirred under an inert atmosphere of nitrogen while being cooled to 0 °C. Gradual addition of potassium *tert*-butoxide (10 equiv.) followed, and was subsequently stirred for 30 min. Then, one equivalent of the required nitrile was added, and the reaction mixture was stirred to reach room temperature for 18 h. Upon completion of the reaction, the mixture was poured into cold water and extracted with EtOAc (3 × 15 mL). The combined organic phases were washed sequentially with water (1 × 20 mL) and brine (2 × 20 mL), then dried over Na_2SO_4 and concentrated. The final product was obtained through purification via flash or column chromatography, employing an appropriate solvent.

5-Benzyl-N-(5-bromopyridin-2-yl)-2-(4-(N′-hydroxycarbamimidoyl)phenyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-3-carboxamide (**14**).

The compound **14** was synthesized following the previously described procedure from 2 (82 mg, 0.17 mmol, and 1 equiv.). The reaction progress was monitored by TLC (eluent: cyclohexane/AcOEt/dichloromethane 4/3/3; Rf of 0.26). The crude product was purified by flash chromatography using a PuriFlash® IR-50SI-F0025 column and eluted with cyclohexane/AcOEt in a gradient from 100/0 to 70/30 over 25 column volumes. A UV–VIS detector was configured additionally to 222 nm and 230 nm. Yield: 68%. The product was obtained as a light brown oil. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.21 (d, $^{4}J_{H\text{-}H}$ = 2.5 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.12 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.80 (br s, 1H, NH), 7.72 (dd, $^{4}J_{H\text{-}H}$ = 2.5 Hz, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.69 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.7 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.66 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.7 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.33–7.19 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 5.10 (br s, 2H, NH_2), 3.17 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.3 Hz, 1H, H-(CH_2), 2.99 (s, 2H, CH_2), 2.87 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.3 Hz, 1H, H-(CH_2), and 1.46 (s, 3H, CH_3). OH not observed. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 163.4 (C), 161.5 (C), 152.6 (C), 150.4 (C), 148.6 (CH_{Ar}), 140.8 (CH_{Ar}), 136.3 (C), 133.9 (C), 131.9 (C), 130.5 ($2CH_{Ar}$), 129.6 ($2CH_{Ar}$), 128.4 ($2CH_{Ar}$),127.1 (CH_{Ar}), 126.0 ($2CH_{Ar}$), 115.5 (CH_{Ar}), 114.2 (C), 105.2 (C), 87.8 (C), 46.8 (CH_2), 42.3 (CH_2), and 26.8 (CH_3). Analysis calculated for $C_{25}H_{23}BrN_4O_3$: HRMS: *m*/*z* $[M + H]^+$ calculated 509.1010; found 509.1010.

5-Benzyl-N-(5-chloropyridin-2-yl)-2-(4-(N′-hydroxycarbamimidoyl)phenyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-3-carboxamide (**15**).

The compound **15** was synthesized following the previously described procedure from 3 (90 mg, 0.21 mmol, and 1 equiv.). The reaction progress was monitored by TLC (eluent: cyclohexane/AcOEt/dichloromethane 4/3/3; Rf of 0.59). The crude product was purified by flash chromatography using a PuriFlash® IR-50SI-F0025 column and eluted with cyclohexane/AcOEt in a gradient from 100/0 to 70/30 over 25 column volumes. A UV–VIS detector was configured additionally to 222 nm and 230 nm. Yield: 55%. The product was obtained as a light-yellow oil. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.17 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.12 (d, $^{4}J_{H\text{-}H}$ = 2.6 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.88 (br s, 1H, NH), 7.69 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.9 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.66 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.9 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.58 (dd, $^{4}J_{H\text{-}H}$ = 2.6 Hz, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.31–7.18 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 5.06 (br s, 2H, NH_2), 3.15 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.4 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.00 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.2 Hz, 1H, H-(CH_2), 2.95 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.2 Hz, 1H, H-(CH_2),

2.86 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.4 Hz, 1H, H-(CH_2), and 1.43 (s, 3H, CH_3). OH not observed. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 163.4 (C), 161.4 (C), 152.5 (C), 150.3 (C), 146.3 (CH_{Ar}), 138.1 (CH_{Ar}), 136.3 (C), 134.0 (C), 131.8 (C), 130.5 ($2CH_{Ar}$), 129.6 ($2CH_{Ar}$), 128.4 ($2CH_{Ar}$),127.0 (CH_{Ar}), 126.4 (C), 125.9 ($2CH_{Ar}$), 115.5 (CH_{Ar}), 105.1 (C), 87.8 (C), 46.8 (CH_2), 42.3 (CH_2), and 26.8 (CH_3). Analysis calculated for $C_{25}H_{23}ClN_4O_3$: HRMS: *m*/*z* [M + H]$^+$ calculated 463.1531; found 463.1531.

5-Benzyl-2-(4-(N′-hydroxycarbamimidoyl)phenyl)-5-methyl-N-(5-methylpyridin-2-yl)-4,5-dihydrofuran-3-carboxamide (**16**).

The compound **16** was synthesized following the previously described procedure from 5 (85 mg, 0.21 mmol, and 1 equiv.). The reaction progress was monitored by TLC (eluent: cyclohexane/AcOEt/dichloromethane 4/3/3; Rf of 0.23). The crude product was purified by flash chromatography using a PuriFlash® IR-50SI-F0025 column and eluted with cyclohexane/AcOEt in a gradient from 100/0 to 70/30 over 25 column volumes. A UV–VIS detector was configured additionally to 222 nm and 230 nm. Yield: 85%. The product was obtained as a light-yellow oil. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.22–8.10 (m, 2H, $2CH_{Ar}$), 8.04 (br s, 1H, NH), 7.74 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.68 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.49 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.8 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.32–7.18 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 4.98 (br s, 2H, NH_2), 3.15 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.4 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.96 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.88 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.4 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.86 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.4 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.28 (s, 3H, CH_3), and 1.36 (s, 3H, CH_3). OH not observed. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 163.6 (C), 160.9 (C), 152.3 (C), 149.5 (C), 147.1 (CH_{Ar}), 139.3 (CH_{Ar}), 136.4 (C), 134.2 (C), 131.9 (C), 130.5 ($2CH_{Ar}$), 129.5 ($2CH_{Ar}$), 128.8 (C), 128.3 ($2CH_{Ar}$), 126.9 (CH_{Ar}), 125.8 ($2CH_{Ar}$), 114.2 (CH_{Ar}), 105.3 (C), 87.4 (C), 46.7 (CH_2), 42.6 (CH_2), 26.5 (CH_3), and 17.9 (CH_3). Analysis calculated for $C_{26}H_{26}N_4O_3$: HRMS: *m*/*z* [M + H]$^+$ calculated 443.2078; found 443.2076.

5-Benzyl-2-(4-(N′-hydroxycarbamimidoyl)phenyl)-5-methyl-N-(pyridin-2-yl)-4,5-dihydrofuran-3-carboxamide (**17**).

The compound **17** was synthesized following the previously described procedure from 5 (74 mg, 0.19 mmol, and 1 equiv.). The reaction progress was monitored by TLC (eluent: dichloromethane/MeOH 97/3; Rf of 0.23). The crude product was purified by flash chromatography using a PuriFlash® IR-50SI-F0025 column and eluted with dichloromethane/MeOH in a gradient from 100/0 to 98/2 over 25 column volumes. A UV–VIS detector was configured additionally to 222 nm and 230 nm. Yield: 55%. The product was obtained as a light-gray oil. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.46 (br s, 1H, NH), 7.23 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.6 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.17–8.14 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.75–7.62 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 7.31–7.19 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 7.04–6.97 (m, 1H, CH_{Ar}), 5.65 (br s, 2H, NH_2), 3.24 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.4 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.01 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.2 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.98 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.2 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.96 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.4 Hz, 1H, H-(CH_2)), and 1.45 (s, 3H, CH_3). OH not observed. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 163.8 (C), 161.9 (C), 157.3 (C), 151.2 (C), 141.7 (C), 139.3 (CH_{Ar}), 136.3 (C), 132.3 (C), 130.6 ($2CH_{Ar}$), 129.7 ($2CH_{Ar}$), 128.4 ($2CH_{Ar}$), 127.0 (CH_{Ar}), 126.8 (CH_{Ar}), 126.3 ($2CH_{Ar}$), 119.5 (CH_{Ar}), 115.1 (CH_{Ar}), 105.2 (C), 88.1 (C), 46.8 (CH_2), 42.3 (CH_2), and 26.8 (CH_3). Analysis calculated for $C_{25}H_{24}N_4O_3$: HRMS: *m*/*z* [M + H]$^+$ calculated 429.1921; found 429.1925.

5-Benzyl-2-(4-(N′-hydroxycarbamimidoyl)phenyl)-5-methyl-N-(pyridin-4-yl)-4,5-dihydrofuran-3-carboxamide (**18**).

The compound **18** was synthesized following the previously described procedure from 6 (67 mg, 0.17 mmol, and 1 equiv.). The reaction progress was monitored by TLC (eluent: dichloromethane/methanol 95/5; Rf of 0.19). The crude product was purified by flash chromatography using a PuriFlash® IR-50SI-F0025 column and eluted with dichloromethane/MeOH in a gradient 100/0 to 96/4 over 25 column volumes. A UV–VIS detector was configured to 254 nm, 375 nm, and 327 nm. Yield: 70%. The product was obtained as a white oil. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.34 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 6.4 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.72 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.59 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.34–7.22

(m, 5H, 5CH_{Ar}), 7.17 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 6.4 Hz, 2H, 2CH_{Ar}), 7.08 (br s, 1H, NH), 4.95 (br s, 2H, NH_2), 3.19 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.8 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.06 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.01 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2), 2.93 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), and 1.52 (s, 3H, CH_3). OH not observed. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 163.8 (C), 160.0 (C), 151.7 (C), 150.3 (2CH_{Ar}), 145.3 (C), 136.4 (C), 135.1 (C), 131.3 (C), 130.6 (2CH_{Ar}), 129.3 (2CH_{Ar}), 128.4 (2CH_{Ar}), 127.0 (CH_{Ar}), 126.2 (2CH_{Ar}), 113.3 (2CH_{Ar}), 106.5 (C), 88.1 (C), 46.9 (CH_2), 42.3 (CH_2), and 27.0 (CH_3). Analysis calculated for $C_{25}H_{24}N_4O_3$: HRMS: *m*/*z* $[M + H]^+$ calculated 429.1921; found 419.1920.

5-Benzyl-2-(4-(N′-hydroxycarbamimidoyl)phenyl)-5-methyl-N-phenyl-4,5-dihydrofuran-3-carboxamide (**19**).

The compound **19** was synthesized following the previously described procedure from 7 (60 mg, 0.15 mmol, and 1 equiv.). The reaction progress was monitored by TLC (eluent: dichloromethane/MeOH 96/4; Rf of 0.47). The crude product was purified by column chromatography (eluent: dichloromethane/MeOH 98/2). Yield: 44%. The product was obtained as an oily yellow solid. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 7.69 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.4 Hz, 2H, 2CH_{Ar}), 7.67 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.4 Hz, 2H, 2CH_{Ar}), 7.32–7.22 (m, 9H, 9CH_{Ar}), 7.04 (t, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 6.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 6.83 (br s, 1H, NH), 4.96 (s, 2H, NH_2), 3.19 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.8 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.06 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.03 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2), 2.95 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.8 Hz, 1H, H-(CH_2), and 1.53 (s, 3H, CH_3). OH not observed. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 163.5 (C), 158.3 (C), 152.1 (C), 138.0 (C), 136.6 (C), 134.1 (C), 131.8 (C), 130.6 (2CH_{Ar}), 129.4 (2CH_{Ar}), 129.1 (2CH_{Ar}), 128.3 (2CH_{Ar}), 126.9 (CH_{Ar}), 126.0 (2CH_{Ar}), 124.0 (CH_{Ar}), 119.6 (2CH_{Ar}), 106.7 (C), 87.4 (C), 47.0 (CH_2), 42.7 (CH_2), and 27.0 (CH_3). Analysis calculated for $C_{26}H_{25}N_3O_3$: HRMS: *m*/*z* $[M + H]^+$ calculated 428.1969; found 428.1967.

5-Benzyl-N-(4-fluorophenyl)-2-(4-(N′-hydroxycarbamimidoyl)phenyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-3-carboxamide (**20**).

The compound **20** was synthesized following the previously described procedure from 8 (70 mg, 0.17 mmol, and 1 equiv.). The reaction progress was monitored by TLC (eluent: dichloromethane/MeOH 96/4; Rf of 0.47). The crude product was purified by column chromatography (eluent: dichloromethane/MeOH 98/2). Yield: 49%. The product was obtained as an oily brown solid. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 7.70–7.59 (m, 4H, 4CH_{Ar}), 7.29–7.17 (m, 7H, 7CH_{Ar}), 6.91 (t, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.6 Hz, 2H, 2CH_{Ar}), 6.73 (br s, 1H, NH), 4.92 (br s, 2H, NH_2), 3.15 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.8 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.04 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.9 Hz, 1H, H-(CH_2), 2.99 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.9 Hz, 1H, H-(CH_2), 2.91 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.8 Hz, 1H, H-(CH_2), and 1.50 (s, 3H, CH_3). OH not observed. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 163.4 (C), 159.3 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 243.0 Hz, C), 158.6 (C), 158.1 (C), 136.6 (C), 134.2 (C), 134.0 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 2.8 Hz, C), 131.8 (C), 130.6 (2CH_{Ar}), 129.4 (2CH_{Ar}), 128.4 (2CH_{Ar}), 127.0 (CH_{Ar}), 126.0 (2CH_{Ar}), 121.4 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 7.7 Hz, 2CH_{Ar}), 115.7 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 22.5 Hz, 2CH_{Ar}), 106.4 (C), 87.5 (C), 47.0 (CH_2), 42.7 (CH_2), and 27.0 (CH_3). ^{19}F NMR (376.5 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) −104.5. Analysis calculated for $C_{26}H_{24}FN_3O_3$: HRMS: *m*/*z* $[M + H]^+$ calculated 446.1874; found 446.1874.

5-Benzyl-2-(4-(N′-hydroxycarbamimidoyl)phenyl)-5-methyl-N-(4-(trifluoromethyl)benzyl)-4,5-dihydrofuran-3-carboxamide (**21**).

The compound **21** was synthesized following the previously described procedure from 9 (70 mg, 0.15 mmol, and 1 equiv.). The reaction progress was monitored by TLC (eluent: cyclohexane/AcOEt 70/30; Rf of 0.21). The crude product was purified by flash chromatography using a PuriFlash® IR-50SI-F0025 column and eluted with cyclohexane/AcOEt in a gradient from 100/0 to 70/30 over 25 column volumes. A UV–VIS detector configured additionally to 225 nm and 230 nm. Yield: 57%. The product was obtained as a brown oil. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 7.65–7.52 (m, 6H, 6CH_{Ar}), 7.33–7.16 (m, 7H, 7CH_{Ar}), 5.42 (t, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 5.8 Hz, 1H, NH), 4.87 (br s, 2H, NH_2), 4.46–4.35 (m, 2H, CH_2), 3.09 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.7 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.03 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.99 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.85 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.7 Hz, 1H, H-(CH_2)), and 1.49 (s, 3H, CH_3).

OH not observed. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 165.4 (C), 158.5 (C), 152.0 (C), 142.6 (C), 136.6 (C), 134.1 (C), 131.9 (C), 130.5 ($2CH_{Ar}$), 129.3 ($2CH_{Ar}$), 129.7 (q, $^2J_{C\text{-}F}$ = 32.5 Hz, C), 128.3 ($2CH_{Ar}$), 128.1 ($2CH_{Ar}$), 126.9 (CH_{Ar}), 125.7 ($2CH_{Ar}$), 125.6 (q, $^3J_{C\text{-}F}$ = 3.7 Hz, $2CH_{Ar}$), 124.5 (q, $^1J_{C\text{-}F}$ = 271.5 Hz, CF_3), 105.4 (C), 82.7 (C), 46.9 (CH_2), 42.9 (CH_2), 42.7 (CH_2), and 26.9 (CH_3). ^{19}F NMR (376.5 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) -63.1. Analysis calculated for $C_{28}H_{26}F_3N_3O_3$: HRMS: *m*/*z* $[M + H]^+$ calculated 510.1999; found 510.1997.

5-Benzyl-2-(4-(N′-hydroxycarbamimidoyl)phenyl)-5-methyl-N-(pyridazin-3-yl)-4,5-dihydrofuran-3-carboxamide (**22**).

The compound **22** was synthesized following the previously described procedure from 10 (62 mg, 0.16 mmol, and 1 equiv.). The reaction progress was monitored by TLC (eluent: dichloromethane/MeOH 95/5; Rf of 0.32). The crude product was purified by flash chromatography using a PuriFlash® IR-50SI-F0025 column and eluted with dichloromethane/MeOH in a gradient from 100/0 to 98/2 over 25 column volumes. A UV–VIS detector was configured to 241 nm, 212 nm, and 315 nm. Yield: 60%. The product was obtained as a light-yellow oil. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.80 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 5.2 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.53 (br s, 1H, NH), 8.40 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 9.6 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.67 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.8 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.67 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.8 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.38 (dd, $^3J_{H\text{-}H}$ = 9.6 Hz, $^3J_{H\text{-}H}$ = 5.2 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.28–7.19 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 5.17 (br s, 2H, NH_2), 3.19 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.4 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.00 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.3 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.96 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.3 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.90 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.4 Hz, 1H, H-(CH_2)), and 1.43 (s, 3H, CH_3). OH not observed. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 164.0 (C), 162.2 (C), 155.5 (C), 152.4 (C), 148.1 (CH_{Ar}), 136.2 (C), 134.5 (C), 131.5 (C), 130.5 ($2CH_{Ar}$), 129.4 ($2CH_{Ar}$), 128.4 ($3CH_{Ar}$), 127.0 (CH_{Ar}), 126.1 ($2CH_{Ar}$), 119.2 (CH_{Ar}), 104.9 (C), 88.0 (C), 46.7 (CH_2), 42.1 (CH_2), and 27.6 (CH_3). Analysis calculated for $C_{24}H_{23}N_5O_3$: HRMS: *m*/*z* $[M + H]^+$ calculated 430.1874; found 430.1875.

5-Benzyl-N-(6-chloropyridazin-3-yl)-2-(4-(N′-hydroxycarbamimidoyl)phenyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-3-carboxamide (**23**).

The compound **23** was synthesized following the previously described procedure from 11 (55 mg, 0.33 mmol, and 1 equiv.). The reaction progress was monitored by TLC (eluent: AcOEt/cyclohexane/dichloromethane 4/3/3; Rf of 0.19). The crude product was purified by flash chromatography using a PuriFlash® IR-50SI-F0025 column and eluted with AcOEt/cyclohexane in a gradient from 10/90 to 60/40 over 25 column volumes. A UV–VIS detector was configured to 241 nm, 212 nm, and 315 nm. Yield: 83%. The product was obtained as a light-brown oil. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.65 (s, 1H, NH), 8.47 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 9.2 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.66 (s, 4H, $4CH_{Ar}$), 7.42 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 9.2 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.30–7.20 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 5.08 (br s, 2H, NH_2), 3.19 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.4 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.00 (s, 2H, CH_2), 2.90 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.4 Hz, 1H, H-(CH_2)), and 1.46 (s, 3H, CH_3). OH not observed. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 163.8 (C), 162.6 (C), 154.6 (C), 151.9 (C), 148.2 (C), 136.2 (C), 134.0 (C), 132.0 (C), 130.7 ($2CH_{Ar}$), 130.0 (CH_{Ar}), 129.6 ($2CH_{Ar}$), 128.5 ($2CH_{Ar}$), 127.2 ($2CH_{Ar}$), 126.4 (CH_{Ar}), 121.5 (CH_{Ar}), 105.0 (C), 88.4 (C), 46.8 (CH_2), 42.0 (CH_2), and 26.9 (CH_3). Analysis calculated for $C_{24}H_{22}ClN_5O_3$: HRMS: *m*/*z* $[M + H]^+$ calculated 464.1484; found 464.1484.

5-Benzyl-2-(4-(N′-hydroxycarbamimidoyl)phenyl)-5-methyl-N-(pyrazin-2-yl)-4,5-dihydrofuran-3-carboxamide (**24**).

The compound **24** was synthesized following the previously described procedure from 12 (77 mg, 0.19 mmol, and 1 equiv.). The reaction progress was monitored by TLC (eluent: cyclohexane/AcOEt/dichloromethane 30/40/30; Rf of 0.15). The crude product was purified by column chromatography (eluent: cyclohexane/ethyl acetate/dichloromethane 30/40/30). Yield: 59%. The product was obtained as an oily yellow solid. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 9.50 (s, 1H, NH), 8.27 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 2.7 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.14 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 2.7 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.78 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.70 (s, 4H, $4CH_{Ar}$), 7.31–7.24 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 5.14 (br s, 2H, NH_2), 3.20 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.4 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.02 (s, 2H, CH_2), 2.91 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.4 Hz, 1H, H-(CH_2)), and 1.48 (s, 3H, CH_3). OH not observed. ^{13}C NMR

(100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 163.2 (C), 161.9 (C), 152.4 (C), 148.4 (C), 141.9 (CH_{Ar}), 139.7 (CH_{Ar}), 137.3 (CH_{Ar}), 136.2 (C), 134.2 (C), 131.7 (C), 130.5 ($2CH_{Ar}$), 129.6 ($2CH_{Ar}$), 128.4 ($2CH_{Ar}$), 127.1 (CH_{Ar}), 126.1 ($2CH_{Ar}$), 104.9 (C), 88.0 (C), 46.8 (CH_2), 42.3 (CH_2), and 26.8 (CH_3). Analysis calculated for $C_{24}H_{23}N_5O_3$: HRMS: m/z $[M + H]^+$ calculated 430.1874; found 430.1871.

5-Benzyl-N-(1,5-dimethyl-1H-pyrazol-3-yl)-2-(4-(N′-hydroxycarbamimidoyl)phenyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-3-carboxamide (**25**).

The compound **25** was synthesized following the previously described procedure from 13 (88 mg, 0.21 mmol, and 1 equiv.). The reaction progress was monitored by TLC (eluent: dichloromethane/MeOH 30/40/30; Rf of 0.31). The crude product was purified by flash chromatography using a PuriFlash® IR-50SI-F0025 column and eluted with dichloromethane/MeOH in a gradient from 100/0 to 90/10 over 25 column volumes. A UV–VIS detector was configured at 238 nm and 320 nm. Yield: 60%. The product was obtained as a light-brown oil. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 7.90 (s, 1H, NH), 7.71 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.4 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.64 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.4 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.30–7.18 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 6.47 (s, 1H, CH_{Ar}), 5.00 (br s, 2H, NH_2), 3.63 (s, 3H, CH_3), 3.06 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.5 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.93 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 13.7 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.86 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 13.7 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.78 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.5 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.21 (s, 3H, CH_3), and 1.33 (s, 3H, CH_3). OH not observed. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 162.5 (C), 159.7 (C), 152.2 (C), 145.8 (C), 139.5 (C), 136.5 (C), 134.2 (C), 131.7 (C), 130.5 ($2CH_{Ar}$), 129.3 ($2CH_{Ar}$), 128.2 ($2CH_{Ar}$), 126.8 (CH_{Ar}), 125.7 ($2CH_{Ar}$), 105.0 (C), 97.5 (CH_{Ar}), 87.0 (C), 46.6 (CH_2), 42.7 (CH_2), 35.5 (CH_3), 26.5 (CH_3), and 11.4 (CH_3). Analysis calculated for $C_{25}H_{27}N_5O_3$: HRMS: m/z $[M + H]^+$ calculated 446.2187; found 446.2187.

3.2. Biology

3.2.1. Parasite Cultivation

Leishmania amazonensis (MHOM/BR/77/LTB0016) was cultured as promastigotes at 26 °C using Schneider's insect medium (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (HIFCS), 100 μg/mL streptomycin, and 100 U/mL penicillin. The parasites were sustained up to the 10th passage, after which fresh cultures were derived from infected host animals.

3.2.2. Antipromastigote Activity Assay

L. amazonensis promastigotes were cultured in Schneider's insect medium with 10% HIFCS, as described above, with or without various concentrations of test substances. The initial cell density was 1.0×10^6 cells/mL, and the culture was kept at 26 °C for 72 h. Resazurin reduction was used to evaluate the cell viability. The concentration required to inhibit 50% of the promastigote activity (IC_{50}) was calculated using logarithmic regression analysis via GraphPrism 5 software.

3.2.3. Cytotoxicity Assay

Murine peritoneal macrophages were collected by flushing the peritoneal cavity with 5 mL of RPMI 1640 medium containing 10% HIFCS, 2 mM L-glutamine, 1 mM pyruvate, 100 μg/mL streptomycin, and 100 U/mL penicillin. The macrophage suspension was adjusted to 1.0×10^6 cells/mL and then plated in triplicate in 96-well plates (Falcon Co., Franklin Lakes, NJ, USA). Cultures were incubated at 37 °C in a 5% CO_2 environment for 1 h. Nonadherent cells were subsequently removed, and the remaining cells were exposed to varying concentrations of test compounds (0–200 μM) for 72 h. Viability was assessed using a resazurin assay, and the concentration that caused 50% cytotoxicity (CC_{50}) was determined using logarithmic regression analysis with GraphPrism 5 software.

3.2.4. Antiamastigote Activity Assay

Resident peritoneal macrophages were seeded in RPMI medium (Sigma-Aldrich) at 1×10^6 cells/mL (0.4 mL/well) on Lab-Tek eight-chamber slides (Nunc) and incubated at

37 °C in 5% CO_2 for 1 h. After this period, nonadherent cells were removed, and the adherent macrophages were co-cultured with *L. amazonensis* promastigotes at a 5:1 parasite-to-cell ratio. After 4 h, the monolayers were washed to eliminate free parasites. Cells were then treated with different concentrations of the compounds and incubated for 72 h at 37 °C in 5% CO_2. Following incubation, the slides were stained using the Instant Prov hematological dye (Newprov, Curitiba, Brazil), and antileishmanial activity was assessed microscopically. Amastigote numbers were determined by counting at least 100 macrophages per sample, and the results were expressed as an infection index (II), calculated as: II = (percentage of infected cells) × (number of amastigotes/total macrophages). Dose–response curves for the antiamastigote activity were generated using nonlinear regression in GraphPad Prism 5.0, and IC_{50} values were calculated.

4. Conclusions

A Hit-to-Lead process enhanced the antileishmanial properties of the 4,5-dihydrofuran derivatives bearing an amidoxime group. While the activity against the promastigote form of the parasite was moderate (with IC_{50} values ranging from 15 to 52 μM), three of the assessed 4,5-dihydrofuran-3-carboxamide derivatives displayed significantly improved activity against the intracellular amastigote form of the parasite (with IC_{50} values between 0.3 and 0.6 μM), which is relevant given that it is the infective form of the parasite. Notably, pyridine-type derivatives demonstrated greater enhancement of the antileishmanial activity compared to the other nitrogen-containing assessed compounds. The improved antiamastigote activity may suggest a hypothetical balance between lipophilicity and solubility, modulated by the varying pH environments of the parasite–macrophage interaction, thus warranting further investigation. Moreover, the incorporation of the pyridine moiety not only enhanced the biological activity but also provided a promising toxicity/activity ratio, with a selectivity index (SI) greater than 300. The wide range of concentrations at which these new potential lead compounds remain non-toxic makes them interesting for further modulations and in vivo testing, especially compound **16**, with better predicted parameters for biological activity and biopharmaceuticals.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules29225469/s1, NMR spectra.

Author Contributions: O.L.A.L. wrote the preliminary draft; O.L.A.L. and F.M.S.U.M. wrote the final manuscript; O.L.A.L., C.C., Y.K., and S.R. carried out the design and synthetic chemistry efforts; F.M.S.U.M. and E.C.T.-S. carried out the biological experiments; O.L.A.L., F.M.S.U.M., C.C., Y.K., S.R., P.V., and E.C.T.-S. reviewed and edited the paper; C.C., P.V., and E.C.T.-S. conceived and planned the project; C.C., O.L.A.L., P.V., and E.C.T.-S. were responsible for resources; C.C., P.V., and E.C.T.-S. provided supervision and project administration. All authors contributed to the manuscript writing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: PhD Student Oscar Leonardo AVENDANO LEON was funded by COLCIENCIAS—Ministry of Science, Technology and Innovation of Colombia, Government Resolution 071 Janvier 2021—call for PhD applications 885-2020. The antileishmanial study was supported by the FAPERJ—Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, processo E-26/201.158/2022—BOLSA.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are contained within the article and Supplementary Materials.

Acknowledgments: Aix Marseille Université and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) are gratefully acknowledged for financial support. E.C.T.-S. thanks CNPq for the research productivity scholarship.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Hong, A.; Zampieri, R.A.; Shaw, J.J.; Floeter-Winter, L.M.; Laranjeira-Silva, M.F. One Health Approach to Leishmaniases: Understanding the Disease Dynamics through Diagnostic Tools. *Pathogens* **2020**, *9*, 809. [CrossRef] [PubMed]
2. De Rycker, M.; Wyllie, S.; Horn, D.; Read, K.D.; Gilbert, I.H. Anti-Trypanosomatid Drug Discovery: Progress and Challenges. *Nat. Rev. Microbiol.* **2023**, *21*, 35–50. [CrossRef] [PubMed]
3. das Chagas, B.D.; Pereira, T.M.; Cantanhêde, L.M.; da Silva, G.P.; Boité, M.C.; Pereira, L.d.O.R.; Cupolillo, E. Interspecies and Intrastrain Interplay among *Leishmania* spp. Parasites. *Microorganisms* **2022**, *10*, 1883. [CrossRef] [PubMed]
4. Reguera, R.M.; Calvo-Álvarez, E.; Alvarez-Velilla, R.; Balaña-Fouce, R. Target-Based vs. Phenotypic Screenings in Leishmania Drug Discovery: A Marriage of Convenience or a Dialogue of the Deaf? *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **2014**, *4*, 355–357. [CrossRef] [PubMed]
5. Mann, S.; Frasca, K.; Scherrer, S.; Henao-Martínez, A.F.; Newman, S.; Ramanan, P.; Suarez, J.A. A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. *Curr. Trop. Med. Rep.* **2021**, *8*, 121–132. [CrossRef]
6. World Health Organization WHO. Leishmaniasis, Key Facts. Update 12 January 2023. Available online: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis (accessed on 16 August 2024).
7. Hossain, M.S.; Kumar, A.; Hossain, A.F.M.A.; Mahshin, M.; Sharma, A.; Hossain, M.A.; Sharma, V.; Haque, R.; Shamsuzzaman, A.K.M.; Maruf, S.; et al. Using Focused Pharmacovigilance for Ensuring Patient Safety against Antileishmanial Drugs in Bangladesh's National Kala-Azar Elimination Programme. *Infect. Dis. Poverty* **2018**, *7*, 80. [CrossRef]
8. Singh-Phulgenda, S.; Dahal, P.; Ngu, R.; Maguire, B.J.; Hawryszkiewycz, A.; Rashan, S.; Brack, M.; Halleux, C.M.; Alves, F.; Stepniewska, K.; et al. Serious Adverse Events Following Treatment of Visceral Leishmaniasis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2021**, *15*, e0009302. [CrossRef]
9. Pinheiro, A.C.; De Souza, M.V.N. Current Leishmaniasis Drug Discovery. *RSC Med. Chem.* **2022**, *13*, 1029–1043. [CrossRef]
10. Roatt, B.M.; De Oliveira Cardoso, J.M.; De Brito, R.C.F.; Coura-Vital, W.; De Oliveira Aguiar-Soares, R.D.; Reis, A.B. Recent Advances and New Strategies on Leishmaniasis Treatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104*, 8965–8977. [CrossRef]
11. Palić, S.; Beijnen, J.H.; Dorlo, T.P.C. An Update on the Clinical Pharmacology of Miltefosine in the Treatment of Leishmaniasis. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2022**, *59*, 106459. [CrossRef]
12. Ware, J.M.; O'Connell, E.M.; Brown, T.; Wetzler, L.; Talaat, K.R.; Nutman, T.B.; Nash, T.E. Efficacy and Tolerability of Miltefosine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.* **2021**, *73*, e2457–e2562. [CrossRef] [PubMed]
13. Registre, C.; Soares, R.D.O.A.; Rubio, K.T.S.; Santos, O.D.H.; Carneiro, S.P. A Systematic Review of Drug-Carrying Nanosystems Used in the Treatment of Leishmaniasis. *ACS Infect. Dis.* **2023**, *9*, 423–449. [CrossRef]
14. eBioMedicine. Leishmania: An Urgent Need for New Treatments. *eBioMedicine* **2023**, *87*, 104440. [CrossRef]
15. Katsuno, K.; Burrows, J.N.; Duncan, K.; Van Huijsduijnen, R.H.; Kaneko, T.; Kita, K.; Mowbray, C.E.; Schmatz, D.; Warner, P.; Slingsby, B.T. Hit and Lead Criteria in Drug Discovery for Infectious Diseases of the Developing World. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14*, 751–758. [CrossRef] [PubMed]
16. Paloque, L.; Bouhlel, A.; Curti, C.; Dumètre, A.; Verhaeghe, P.; Azas, N.; Vanelle, P. Synthesis and Evaluation of Monoamidoxime Derivatives: Toward New Antileishmanial Compounds. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 2984–2991. [CrossRef]
17. Bouhlel, A.; Curti, C.; Dumètre, A.; Laget, M.; Crozet, M.D.; Azas, N.; Vanelle, P. Synthesis and Evaluation of Original Amidoximes as Antileishmanial Agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7310–7320. [CrossRef] [PubMed]
18. Lypaczewski, P.; Hoshizaki, J.; Zhang, W.-W.; McCall, L.-I.; Torcivia-Rodriguez, J.; Simonyan, V.; Kaur, A.; Dewar, K.; Matlashewski, G. A Complete Leishmania Donovani Reference Genome Identifies Novel Genetic Variations Associated with Virulence. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 16549. [CrossRef]
19. Scott, P.; Novais, F.O. Cutaneous Leishmaniasis: Immune Responses in Protection and Pathogenesis. *Nat. Rev. Immunol.* **2016**, *16*, 581–592. [CrossRef]
20. Mehio, N.; Lashely, M.A.; Nugent, J.W.; Tucker, L.; Correia, B.; Do-Thanh, C.-L.; Dai, S.; Hancock, R.D.; Bryantsev, V.S. Acidity of the Amidoxime Functional Group in Aqueous Solution: A Combined Experimental and Computational Study. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 3567–3576. [CrossRef]
21. Swarbrick, C.; Zogali, V.; Chan, K.W.K.; Kiousis, D.; Gwee, C.P.; Wang, S.; Lescar, J.; Luo, D.; Von Itzstein, M.; Matsoukas, M.-T.; et al. Amidoxime Prodrugs Convert to Potent Cell-Active Multimodal Inhibitors of the Dengue Virus Protease. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *224*, 113695. [CrossRef]
22. Indorf, P.; Kubitza, C.; Scheidig, A.J.; Kunze, T.; Clement, B. Drug Metabolism by the Mitochondrial Amidoxime Reducing Component (mARC): Rapid Assay and Identification of New Substrates. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 6538–6546. [CrossRef] [PubMed]
23. Avendaño Leon, O.L.; Santos Urbancg Moncorvo, F.M.; Curti, C.; Kabri, Y.; Redon, S.; Vanelle, P.; Torres-Santos, E.C. Hit-to-Lead Optimization of 4,5-Dihydrofuran-3-Sulfonyl Scaffold against Leishmania Amazonensis. Effect of an Aliphatic Moiety. *Eur. J. Med. Chem.* **2024**, *280*, 116935. [CrossRef] [PubMed]
24. Kourbeli, V.; Chontzopoulou, E.; Moschovou, K.; Pavlos, D.; Mavromoustakos, T.; Papanastasiou, I.P. An Overview on Target-Based Drug Design against Kinetoplastid Protozoan Infections: Human African Trypanosomiasis, Chagas Disease and Leishmaniases. *Molecules* **2021**, *26*, 4629. [CrossRef] [PubMed]
25. Bekhit, A.A.; El-Agroudy, E.; Helmy, A.; Ibrahim, T.M.; Shavandi, A.; Bekhit, A.E.-D.A. Leishmania Treatment and Prevention: Natural and Synthesized Drugs. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *160*, 229–244. [CrossRef]

26. Pawar, S.; Kumawat, M.K.; Kundu, M.; Kumar, K. Synthetic and Medicinal Perspective of Antileishmanial Agents: An Overview. *J. Mol. Struct.* **2023**, *1271*, 133977. [CrossRef]
27. Albino, S.L.; Da Silva, J.M.; Nobre, M.S.D.C.; Silva, Y.M.S.D.M.E.; Santos, M.B.; De Araújo, R.S.A.; De Lima, M.D.C.A.; Schmitt, M.; De Moura, R.O. Bioprospecting of Nitrogenous Heterocyclic Scaffolds with Potential Action for Neglected Parasitosis: A Review. *Curr. Pharm. Des.* **2020**, *26*, 4112–4150. [CrossRef]
28. Abbasi Shiran, J.; Kaboudin, B.; Panahi, N.; Razzaghi-Asl, N. Privileged Small Molecules against Neglected Tropical Diseases: A Perspective from Structure Activity Relationships. *Eur. J. Med. Chem.* **2024**, *271*, 116396. [CrossRef]
29. Domagalska, M.A.; Barrett, M.P.; Dujardin, J.-C. Drug Resistance in Leishmania: Does It Really Matter? *Trends Parasitol.* **2023**, *39*, 251–259. [CrossRef]
30. Mondal, M.; Bora, U. Recent Advances in Manganese(Iii) Acetate Mediated Organic Synthesis. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 18716. [CrossRef]
31. Li, G.; Ji, C.-L.; Hong, X.; Szostak, M. Highly Chemoselective, Transition-Metal-Free Transamidation of Unactivated Amides and Direct Amidation of Alkyl Esters by N–C/O–C Cleavage. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 11161–11172. [CrossRef]
32. Vörös, A.; Mucsi, Z.; Baán, Z.; Timári, G.; Hermecz, I.; Mizsey, P.; Finta, Z. An Experimental and Theoretical Study of Reaction Mechanisms between Nitriles and Hydroxylamine. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 8036–8047. [CrossRef] [PubMed]
33. Tabélé, C.; Faiões, V.D.S.; Grimaud, F.; Torres-Santos, E.C.; Khoumeri, O.; Curti, C.; Vanelle, P. Original Antileishmanial Hits: Variations around Amidoximes. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *148*, 154–164. [CrossRef]
34. Snider, B.B. Mechanisms of Mn(OAc)3-Based Oxidative Free-Radical Additions and Cyclizations. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 10738–10744. [CrossRef] [PubMed]
35. Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42717. [CrossRef] [PubMed]
36. Ter Laak, A.; Hillig, R.C.; Ferrara, S.J.; Korr, D.; Barak, N.; Lienau, P.; Herbert, S.; Fernández-Montalván, A.E.; Neuhaus, R.; Gorjánácz, M.; et al. Discovery and Characterization of BAY-184: A New Potent and Selective Acylsulfonamide-Benzofuran In Vivo-Active KAT6AB Inhibitor. *J. Med. Chem.* **2024**, *67*, 19282–19303. [CrossRef]
37. Dulsat, J.; López-Nieto, B.; Estrada-Tejedor, R.; Borrell, J.I. Evaluation of Free Online ADMET Tools for Academic or Small Biotech Environments. *Molecules* **2023**, *28*, 776. [CrossRef]
38. Chylewska, A.; Biedulska, M.; Głębocka, A.; Raczyńska, E.D.; Makowski, M. Drug-like Properties and Complete Physicochemical Profile of Pyrazine-2-amidoxime: A Combined Multi-Experimental and Computational Studies. *J. Mol. Liq.* **2019**, *276*, 453–470. [CrossRef]
39. Pal, D.S.; Abbasi, M.; Mondal, D.K.; Varghese, B.A.; Paul, R.; Singh, S.; Datta, R. Interplay between a Cytosolic and a Cell Surface Carbonic Anhydrase in pH Homeostasis and Acid Tolerance of *Leishmania*. *J. Cell Sci.* **2017**, *130*, 754–766. [CrossRef]
40. Antoine, J.C.; Prina, E.; Jouanne, C.; Bongrand, P. Parasitophorous Vacuoles of Leishmania Amazonensis-Infected Macrophages Maintain an Acidic pH. *Infect. Immun.* **1990**, *58*, 779–787. [CrossRef]
41. Frick, L.; Hinterland, L.; Renner, K.; Vogl, M.; Babl, N.; Heckscher, S.; Weigert, A.; Weiß, S.; Gläsner, J.; Berger, R.; et al. Acidic Microenvironments Found in Cutaneous Leishmania Lesions Curtail NO-Dependent Antiparasitic Macrophage Activity. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 789366. [CrossRef]
42. Canton, J.; Khezri, R.; Glogauer, M.; Grinstein, S. Contrasting Phagosome pH Regulation and Maturation in Human M1 and M2 Macrophages. *MBoC* **2014**, *25*, 3330–3341. [CrossRef] [PubMed]
43. Zilberstein, D.; Philosoph, H.; Gepstein, A. Maintenance of Cytoplasmic pH and Proton Motive Force in Promastigotes of Leishmania Donovani. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1989**, *36*, 109–117. [CrossRef] [PubMed]
44. Clos, J.; Grünebast, J.; Holm, M. Promastigote-to-Amastigote Conversion in *Leishmania* spp.—A Molecular View. *Pathogens* **2022**, *11*, 1052. [CrossRef] [PubMed]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

3.5. Pharmacomodulation : série complémentaire, effet de l'hétéroatome azote en différentes positions et effet du groupement nitro.

Compte tenu des deux composés identifiés de manière préliminaire en modifiant la position 3 du dihydrofurane, à savoir le dérivé ester éthylique et le dérivé amide avec une pyridine substituée en position *para* par un groupement méthyle, une "série complémentaire" (Figure 45) a été synthétisée.

Celle-ci vise à évaluer l'activité combinée, notamment l'emplacement des hétérocycles azotés en position 2 (composés **17**, **18**), 3 (composé **11**) ou 5 (composé **5**, **7**), ainsi qu'un dérivé cétone (composé **3**).

Cette série nous a également permis d'obtenir des données préliminaires sur l'effet d'un groupement nitro, afin d'observer si un effet électronique pouvait modifier l'activité (composés **12**, **13**) et le possible effet du groupement amide (composé **12**).

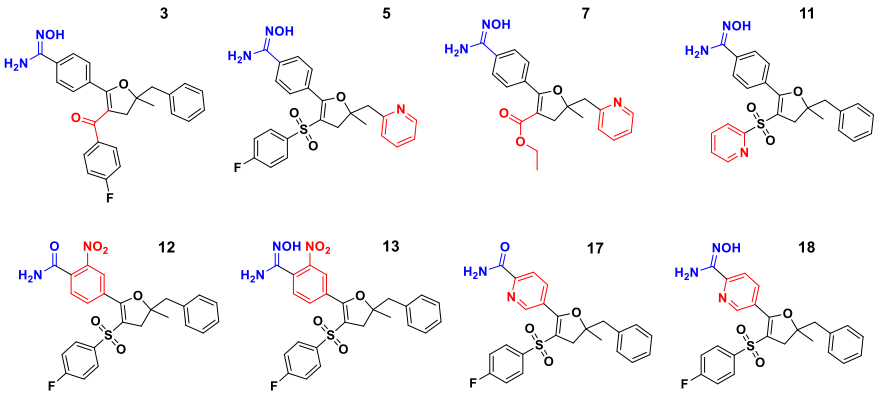


Figure 45. Série complémentaire.

Ces huit composés synthétisés selon différents protocoles (Figure 46) ont été envoyés pour des tests biologiques. Les premiers résultats sur la forme promastigote ont montré des résultats intéressants pour les molécules **3**, **13** et **17**, mais ils restent à confirmer sur la forme amastigote, et la toxicité *in vitro* de ces composes reste à évaluer.

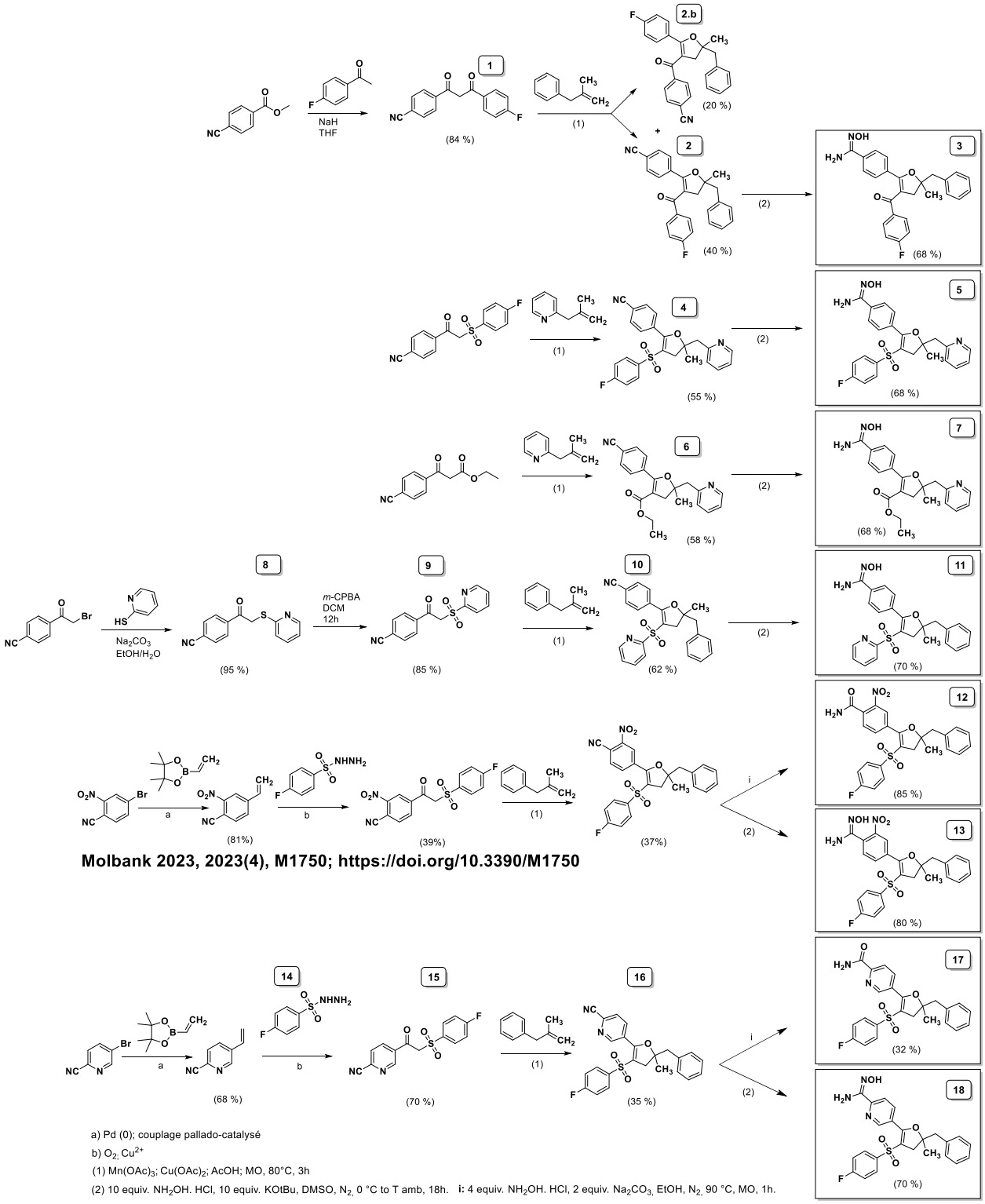
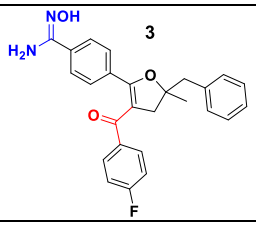
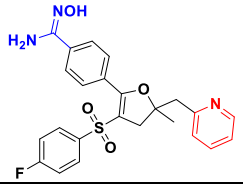
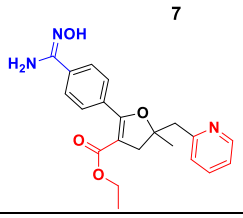
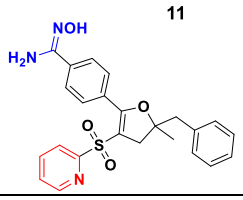
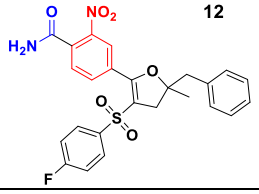
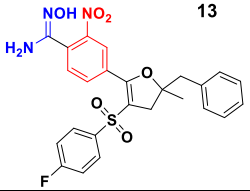
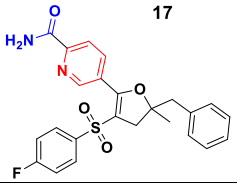
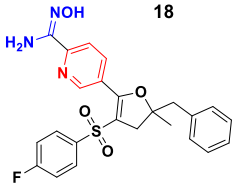


Figure 46. Voies de synthèse de la série complémentaire.

Une publication de ces résultats pourrait également être envisagée en fonction des résultats de l'évaluation biologique. Les premiers résultats sur la forme promastigote sont rapportés dans le Tableau 12.

Tableau 12. Activité biologique de la série complémentaire **:**

#	CI_{50} (µM) in *L. amazonensis* promastigotes	Compound
3	**9,3 ±2,3**	
5	**11,8 ±1,3**	
7	**24,4 ±0,6**	
11	**30,7 ±3,3**	
12	**11,3 ±1,6**	
13	**7,4 ±0,9**	
17	**9,4 ±0,6**	
18	**39,7 ±9,6**	

Les valeurs d'activité varient de 7,4 à 39,7 µM contre la forme promastigote du parasite. Les dérivés ont tous montré une activité moins bonne que le Hit de référence (CI_{50} *L. amazonensis* promastigote = 5,4 ± 1,0 µM).

Nous pouvons donc en déduire que le remplacement de la sulfone par un carboxyle (composé **3**) n'est pas forcément judicieuse. De même, la nature des substituants portés par la sulfone (composé **11**) et en position 5 du dihydrofurane (composé **5**) a une nette influence sur l'activité.

Les composés **13** et **18** ont été synthétisés pour évaluer l'influence de groupements électroattracteurs proches de l'amidoxime. En effet, une hypothèse mécanistique suggérait que la libération de NO par l'amidoxime pourrait être facilitée pour ces composés. Cette hypothèse n'est visiblement pas valable compte tenu des activités obtenues avec les composés **13** et **18** par rapport à celle du Hit.

Le plus surprenant, la bonne activité biologique des composés amides **12** et **17**. Ces résultats restent à compléter (contre la forme amastigote), des travaux précédents (non publiés) ayant montré que le remplacement de l'amidoxime du Hit de référence par une amide supprimait totalement l'activité biologique.

La forme intracellulaire (amastigotes) ainsi que des essais de toxicité sont en cours pour les composés les plus intéressants (**3**, **12**, **13** et **17** notamment). Des analyses pourront être effectuées à l'issue de ces tests, par exemple en étudiant l'effet de la position des hétéroatomes azotés ou en comparant l'activité des amidoximes à celle des dérivés de type amide.

3.6. Série supplémentaire demandée par l'équipe partenaire.

Le laboratoire de biochimie des trypanosomatidés (LBQT) de l'Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) se consacre depuis 1998 à l'étude de la chimiothérapie des trypanosomatidés par le biais de différentes approches.

Leur principal but est la recherche de nouvelles cibles pharmacologiques, l'étude des voies métaboliques, des mécanismes d'action et de résistance, et au criblage de bibliothèques de composés. Une des lignes de recherche est consacrée à la compréhension des mécanismes d'action des dérivés nitrés et l'importance des nitroréductases chez *Leishmania.*

Dans le cadre de notre collaboration, nous avons synthétisé une série de composés portant le groupement nitro sur le cycle furane et le thiophène,[468] et contenant également le groupement fonctionnel amidoxime. Les résultats pourront faire l'objet d'une publication lorsque les évaluations biologiques et mécanistiques seront terminées.

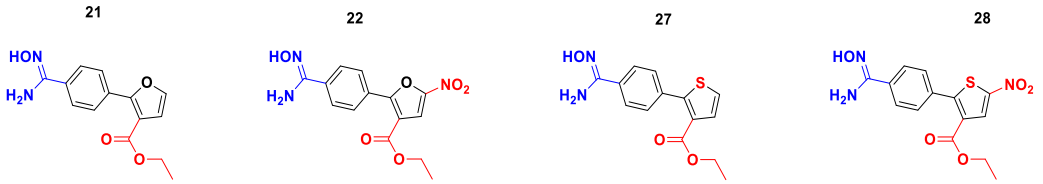


Schéma 2. Molécules de la série supplémentaire.

La synthèse de ces composés est décrite ci-dessous (Figure 47) :

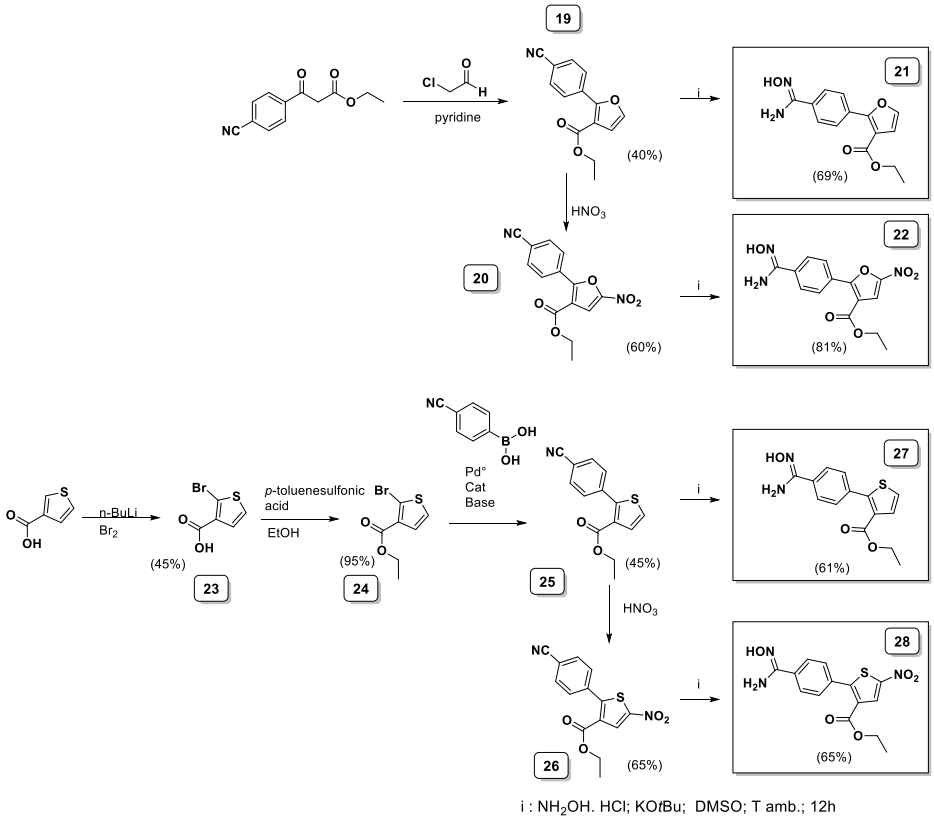


Figure 47. Synthèse de la série complémentaire, demandée par IOC / FIOCRUZ.

La réaction entre un β-cétoester avec une α-halogénocétone en milieu basique génère la formation du furane **4**. La base déprotone le 3-cétoester, générant un énolate nucléophile qui réagit ensuite avec l'α-halogénocétone. Une déshydratation permet ensuite la cyclisation en furane. La nitration en position 5 est effectué *via* un protocole habituel.

[468] [Luiz C. S. Pinheiro, Searching for new antileishmanial lead drug candidates: Synthesis, biological and theoretical evaluations of promising thieno[2,3-b] pyridine derivatives, J. Microbiol. Antimicrob. 4 (2012). https://doi.org/10.5897/JMA11.109.

Dans le cas du thiophène, une ortho-lithiation suivie d'une bromation permet d'introduire un atome de brome en position 2. Une estérification en milieu acide est effectuée avec un rendement quasi quantitatif.

Ensuite, le motif benzonitrile a été incorporé par une réaction de Suzuki-Miyaura à partir de l'acide boronique correspondant. La nitration en position 5 est ensuite effectuée.

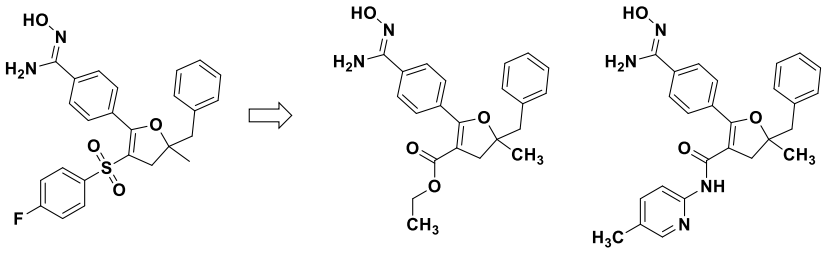
Ensuite, la formation des groupements amidoximes a été effectuée selon les protocoles décrits précédemment dans ce travail.

3.7. Conclusion du chapitre

Un travail de pharmacomodulation a été effectué sur le composé de référence Hit, portant un groupement *p*-fluorophénylsulfonyle en position 3 sur le noyau dihydrofurane.

Cela a permis d'identifier deux composés intéressants non seulement pour leur activité biologique contre la forme amastigote intracellulaire du parasite *L. amazonensis*, mais aussi pour leur toxicité relativement faible conduisant à des IS importantes (Figure 48).

En outre, certaines données de biodisponibilité ont été évaluées *via* un logiciel de modélisation et de simulations de propriétés (Gastroplus®), et il semblerait que ces molécules présentent de bonnes propriétés d'absorption gastro-intestinale.



	Sulfone - HIT	Dérivé carboxylate	Dérivé carboxamide
Amastigote CI_{50} (µM) intramacrophagique	7,9 ± 1,1	1,3 ± 0,2	0,3 ± 0,07
Toxicité CC_{50} (µM) (Macrophages murins)	102,0 ± 2,8	112,4 ± 9,3	>200
Index de sélectivité	**12,9**	**86,4** (6 fois plus grand)	**> 666,7** (50 fois plus grand)
logP calculé	4,2	3,9	3,9

Figure 48. Résultat du projet d'optimisation, un dérivé de type amide et un dérivé de type ester dans la position 3 du dihydrofurane.

Les dérivés carboxyliques sont des alternatives intéressantes sur le plan structural. Comme l'évaluation de l'activité biologique des dérivés portant un hétérocycle azoté est en cours,

l'influence de la position du noyau pyridine reste à vérifier : une perte d'activité est observée en position 5, alors qu'en position 3 ou 2, l'activité est préservée.

3.8. Travaux complémentaires

Méthodes d'analyse *in silico* - coefficient de similarité

En parallèle de ces travaux, nous avons initié une seconde collaboration avec une équipe de recherche en Colombie afin d'analyser les relations structure-activité. Nous avons tenté d'identifier un modèle corrélant structure et activité en étudiant les données des amidoximes de ma thèse et celles des projets antérieurs (120 molécules au total).

Deux idées générales ont été explorées, et résumées ci-dessous :

- Premièrement, certains calculs de similarité structurelle ont été effectués basés sur la structure des composés, suivis d'une exploration supplémentaire afin de trouver des profils de corrélation par rapport aux informations de résonance magnétique nucléaire (en tant que descripteur moléculaire).
- Deuxièmement, une proposition de travail collaboratif a été faite à une équipe de recherche en Colombie qui génère des modèles de *machine learning* pour des études QSAR.

Nous collaborons dans ce travail avec 2 équipes de recherche : celle dirigée par le Dr James Guevara de l'équipe INQA (Universidad El Bosque, Bogotá D.C., Colombia), et celle du Dr Cristian Buendía-Atencio (Facultad de Ciencias, Universidad Antonio Nariño Bogotá D.C., Colombia).

(https://investigaciones.unbosque.edu.co/inqa)

L'équipe INQA a pour mission d'identifier des composés organiques à haute valeur ajoutée et d'approfondir les méthodes d'analyse *in silico*.

Le travail de modélisation préliminaire nous oblige à exclure un grand nombre de composés. Un modèle préliminaire a été conçu pour l'activité biologique observée contre le parasite *L. donovani* (excluant les données d'activité sur *L. amazonensis*), étant donné que c'est celui pour lequel nous disposons du plus grand nombre de données numériques concrètes. Les valeurs sous la typologie "activité supérieure ou inférieure à (CI_{50}> *x* µM)" ne peuvent pas être incorporées au modèle. L'annexe 2 du document précise les molécules sélectionnées pour le modèle de prédiction, qui est en cours de réalisation.

De plus, une autre alternative a été explorée. Certains calculs de similarité structurelle ont été explorés afin de trouver des profils de corrélation entre l'activité observée et les données de résonance magnétique nucléaire des composés. La RMN ^{1}H et ^{13}C ont été utilisées en tant que descripteurs moléculaires. Certains tests préliminaires ont été effectués avec des données 1D mais des données 2D pourront éventuellement être étudiées par la suite.

4. Conclusion générale

- **Chimie**

La réaction de cyclisation radicalaire oxydative de substrats *β*-dicarboxyliques, médiée par le manganèse, a permis d'accéder au noyau 4,5-dihydrofurane. Ainsi, le composé Hit substitué par une sulfone aromatique en position 3 du noyau dihydrofurane a été modifié en remplaçant la sulfone par une fonction carbonyle, telle que l'amide, l'ester ou la cétone.

De manière complémentaire, un dérivé de type phosphonate en position 3 a été synthétisé et évalué, mais il montre une faible activité. Ces travaux ont fait l'objet d'une première publication :

O.L. Avendaño Leon, C. Curti, F.M. Santos Urbancg Moncorvo, Y. Kabri, S. Redon, E.C. Torres-Santos, R. Paoli-Lombardo, P. Vanelle, Diethyl (5-Benzyl-2-(4-(*N*′-hydroxycarbamimidoyl)phenyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-3-yl)phosphonate, Molbank 2023 (**2023**) M1736. https://doi.org/10.3390/M1736.

Une meilleure efficacité de cyclisation en dihydrofurane a été observée selon l'ordre suivant : *β*-céto-ester, *β*-dicétone et *β*-céto-amide. Avec les *β*-céto-amides, la réaction est moins spécifique et, par conséquent, la formation de produits secondaires nécessite des processus de purification plus importants.

Le rendement de la cyclisation des *β*-dicétones a été affecté par la formation de l'isomère en plaçant le groupement nitrile en position 3 au lieu de de la position 2.

L'accès au 4,5-dihydrofurane carboxylate a permis une méthode alternative de synthèse des produits 4,5-dihydrofurane carboxamide, grâce à une amidation médiée par le LiHMDS. Ces travaux ont fait l'objet d'une seconde publication :

O.L. Avendaño Leon, F.M. Santos Urbancg Moncorvo, C. Curti, Y. Kabri, S. Redon, P. Vanelle, E.C. Torres-Santos, Hit-to-lead optimization of 4,5-dihydrofuran-3-sulfonyl scaffold against *Leishmania amazonensis*. Effect of an aliphatic moiety, European Journal of Medicinal Chemistry 280 (**2024**) 116935. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116935.

Un second protocole de formation de l'amidoxime a été proposé, dans le but de réduire la quantité de réactif et le temps de réaction. Ce protocole est basé sur la substitution de 2 équivalents de carbonate de sodium au lieu de 10 équivalents de *tert*-butoxyde de potassium, et du chauffage par micro-ondes. Cependant, dans ces conditions de réaction, un amide peut être formé au lieu de l'amidoxime en quantités significatives selon le substituant du dérivé benzonitrile. Cela a été observé en présence de composés portant un groupement nitro sur le

benzonitrile ou un hétéroatome d'azote dans le cycle contenant le nitrile. Ces travaux ont fait l'objet d'une troisième publication :

O.L. Avendaño Leon, C. Curti, H. El-Kashef, Y. Kabri, S. Redon, P. Vanelle, 4-(5-Benzyl-3-((4-fluorophenyl)sulfonyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-2-nitrobenzamide, Molbank 2023 (**2023**) M1750. https://doi.org/10.3390/M1750.

- **Biologie**

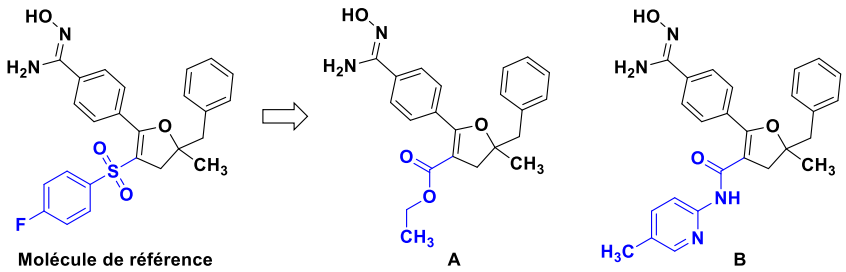
La plupart des composés synthétisés a été testé pour leur activité biologique sur *Leishmania amazonensis*.

La substitution en position 3 du noyau 4,5-dihydrofurane a pu être étudiée. Les composés de type 4,5-dihydrofurane-3-carboxamide ont donné une activité biologique modérée. Dans cette série de composés, les amides portant un aromatique pyridine et substitué en position *para* (en particulier le composé **B** substitué par un groupement méthyle) ont présenté une meilleure activité sur la forme amastigote de *L. amazonensis* par rapport à la sulfone Hit.

Ces travaux ont fait l'objet d'un quatrième publication rédigée et soumise dans *Molecules* :

F. Maia Santos Urbancg Moncorvo , O. L. Avendaño Leon, C. Curti, Y. Kabri, S. Redon, E.C. Torres-Santos and Patrice Vanelle. Enhancing Antileishmanial Activity of Amidoxime-Based Compounds Bearing a 4,5-Dihydrofuran Scaffold: *in vitro* Screening Against *Leishmania amazonensis*. (Soumis; Molecules; le 20/10/2024).

Les dérivés 4,5-dihydrofurane-3-carboxylate, éthylique (**A**) ou méthylique, ont montré un meilleur rapport activité/toxicité que la sulfone HIT, tout comme que le dérivé amide B contenant une pyridine.



	Référence Sulfone	Dérivé carboxylate A	Dérivé carboxamide B
Amastigote intramacrophagique IC_{50} (µM/72h)	7,9 ± 1,1	1,3 ± 0,2	0,3 ± 0,07
Toxicité (Macrophages murins) CC_{50} (µM/72h)	102,0 ± 2,8	112,4 ± 9,3	>200
Index de sélectivité	12,9	86,4	> 666,7
LogP calculé	4,2	3,9	3,9

Figure 49. Activités biologiques du dérivé amide et du dérivé ester en position 3 du dihydrofurane.

Les dérivés de type trifluorométhylbenzyle et cétone (avec des LogP calculés de 5,5) ont montré une activité biologique réduite par rapport au composé de référence. Cela pourrait indiquer que les molécules hautement lipophiles ne favorisent pas l'activité antileishmanienne.

Les composés portant des sulfones aliphatiques ont été envisagées, mais leur synthèse n'a pas pu être achevée à ce jour.

Les modifications du noyau benzénique par des hétérocycles azotés ont montré un effet défavorable sur l'activité biologique. Une alternative possible pour de futures modulations serait d'incorporer des hétéroatomes d'azote en position 2 du noyau 4,5-dihydrofurane. Une dernière publication sur ces dérivés pourrait être envisagée dès la réception des résultats biologiques.

Enfin, le groupement ester éthylique pourrait être considéré comme un bioisostère des sulfones aromatiques, avec cependant un risque de métabolisation qui reste à évaluer.

4.1. Perspectives

Des études d'activité biologique *in vivo* pourraient fournir des informations importantes pour la poursuite de nos travaux : nous espérons développer ces tests sur les deux molécules sélectionnées, et plus précisément pour les composés **A** et **B** de la Figure 49.

Avec les résultats *in vivo*, la métabolisation pourrait être étudiée, en particulier pour le dérivé ester. Un métabolite possible est le dérivé acide carboxylique (notons que le clopidogrel est une prodrogue contenant une fonction ester, dont le métabolite acide carboxylique est inactif [469]).

Ces données ont été obtenues à partir d'un outil utilisant uniquement les étapes du métabolisme impliquant les cytochromes. Dans le cas d'un ester, il est évident que des estérases seront également impliquées.

[469] Xu, X.; Zhao, X.; Yang, Z.; Wang, H.; Meng, X.; Su, C.; Liu, M.; Fawcett, J.; Yang, Y.; Gu, J. Significant Improvement of Metabolic Characteristics and Bioactivities of Clopidogrel and Analogs by Selective Deuteration. Molecules 2016, 21, 704, doi:10.3390/molecules21060704.

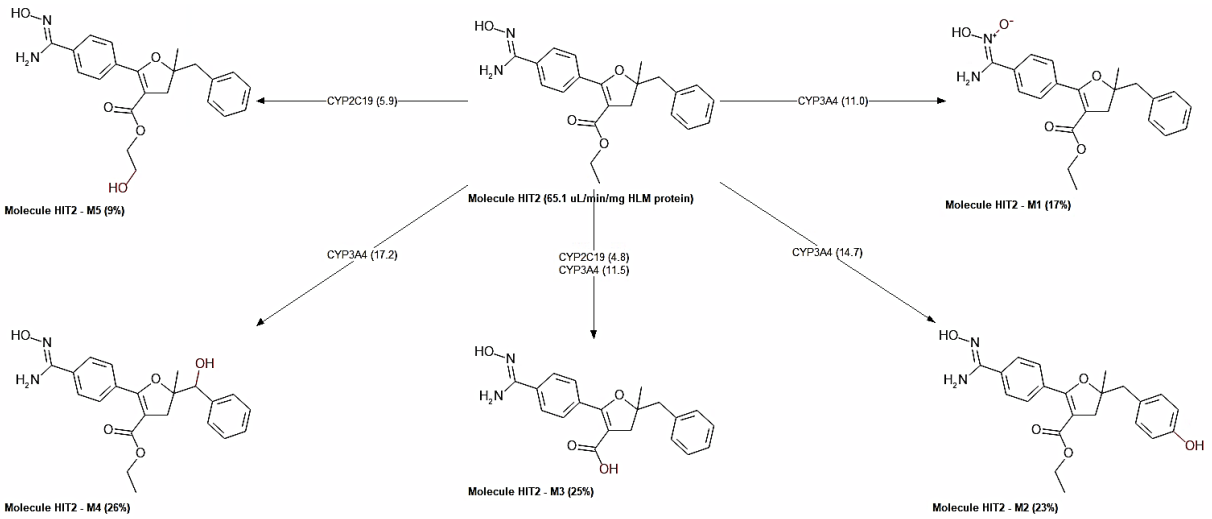


Figure 50. Données de prédiction : métabolisme du dérivé carboxylate d'éthyle.[470]

L'évaluation de chacun des énantiomères R et S, des composés **A** et **B** de la Figure 49, peut également fournir des informations importantes pour la poursuite de la recherche. La séparation des énantiomères a été effectuée par l'équipe Chiropole, Campus Scientifique de Saint Jérôme - Marseille. La configuration absolue (R ou S) est en cours d'analyse, par l'équipe de Spectroscopies Chiroptiques de la Fédération Sciences Chimiques Marseille.

Une fois la configuration absolue connue, l'évaluation biologique des deux énantiomères sera réalisée. En fonction des résultats, la possibilité d'une voie de synthèse énantiosélective serait un bon défi chimique.

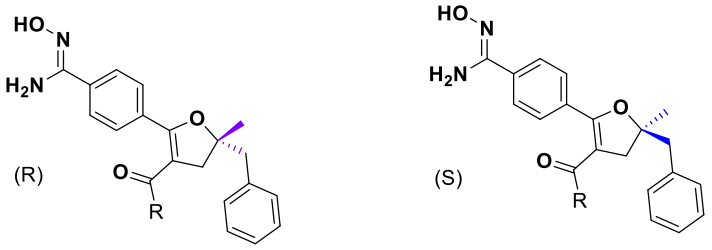


Figure 51. Énantiomères des dérivés de dihydrofurane.

D'un point de vue synthétique, une diversification supplémentaire de la position 3 permettrait d'appuyer les hypothèses de travail de pharmacomodulation, notamment en utilisant une fonction sulfonamide (Schéma 3) :

[470] Simulations Plus University – MedChem 8.0 Simulation Software.

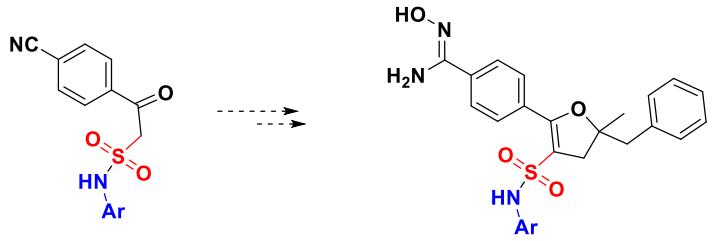


Schéma 3. La fonction sulfonamide comme une diversification supplémentaire.

De même, une modification de la position 2 de la structure du hit pourrait être apportée facilement à partir de dérivé de dicétone (Schéma 4). L'énol devrait pouvoir cycliser avec un alcène terminal avec le protocole classique utilisant $Mn(OAc)_3$. Le produit formé avec une cétone apporterait ainsi une plus grande flexibilité à la structure finale.

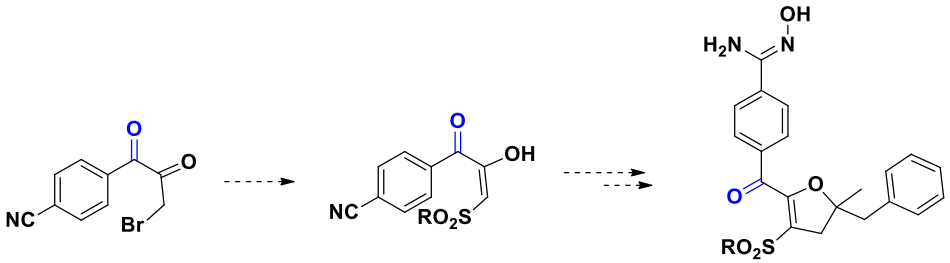


Schéma 4. Exemple de modification de la position 2

Il serait également intéressant de remplacer le dihydrofurane par un autre hétérocycle à 5 chaînons. Une cyclisation intramoléculaire très utilisée ces dernières années permettrait d'avoir accès au dihydro-oxazole **C** avec un carbone quaternaire en position 5. L'alcène **a**, pourrait être activé par l'addition d'un électrophile puis l'amide cycliserait en produit **b** créant un dihydro-oxazole portant des substituants similaires à ceux de nos dérivés dihydrofuranes. L'atome d'halogène pourrait par la suite être substitué facilement par un grand nombre de nucléophiles (Schéma 5).

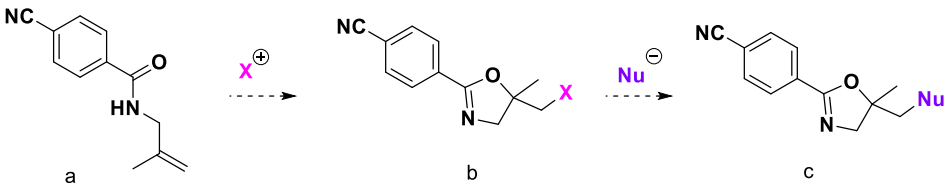


Schéma 5. Exemple de modification du dihydrofurane en d'autre hétérocycles

D'autre part, d'un point de vue de l'activité biologique, le mécanisme d'action des amidoximes reste à établir. Des hypothèses de mécanisme ont été envisagées :

- La grande capacité du groupement amidoxime à générer un effet de chélation des métaux qui pourrait être essentiel pour la viabilité des cellules du parasite et non pour les cellules de l'hôte.

- Un mécanisme de type pro-drogue : une voie d'activation possible liée à sa voie métabolique, le système du composant réducteur d'amidoxime mitochondrial (mARC) a été identifié chez l'homme, donnant un dérivé actif, généralement un amide ou une amidine.[471] Dans les études en cours, un dérivé amide (au lieu de l'amidoxime) a montré une activité *in vitro* significative.
- Les amidoximes peuvent avoir la capacité de produire des oxydes nitriques *via* des NO synthases. [472] La production de ces oxydes nitriques dans le milieu intracellulaire pourrait constituer un mécanisme d'action supplémentaire.

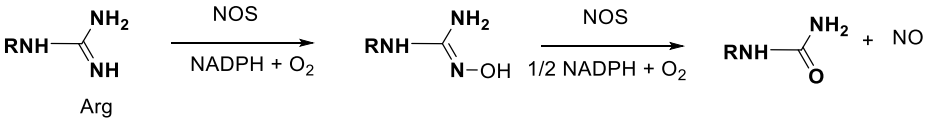


Schéma 6. Oxydes nitriques *via* le métabolisme des amidoximes.

Cependant, l'activité biologique *in vitro* mise en évidence sur deux dérivés pour lesquelles l'amidoxime était remplacé par un amide semble contredire cette hypothèse.

[471] B. Clement, M. Struwe, The History of mARC, Molecules 28 (2023) 4713. https://doi.org/10.3390/molecules28124713.

[472] A. Jousserandot, J.-L. Boucher, Y. Henry, B. Niklaus, B. Clement, D. Mansuy, Microsomal Cytochrome P450 Dependent Oxidation of N-Hydroxyguanidines, Amidoximes, and Ketoximes: Mechanism of the Oxidative Cleavage of Their CN(OH) Bond with Formation of Nitrogen Oxides, Biochemistry 37 (1998) 17179–17191. https://doi.org/10.1021/bi981175c.

5. Partie expérimentale

- **Généralités**

Réacteurs micro-ondes

Les réactions ont été menées dans un réacteur monomode INITIATOR, MicrowaveSynthesizer Biotage®.

Points de fusion

Les points de fusion (F) des produits cristallisés sont déterminés en tubes capillaires sur un appareil Büchi (Melting Point B-540) et ne sont pas corrigés.

Chromatographie

Les chromatographies sur couches minces (CCM) ont été effectuées sur gel de silice 60 F254, d'épaisseur 0,2 mm, déposé sur feuille d'aluminium (Merck) et révélées par UV.
Les séparations par chromatographie liquide ont été réalisées sur colonne de gel de silice MerckKieselgel 60 (40-63 mesh ASTM) et 60 (70-200 mesh ASTM), ou sur un appareil puriFlash® 5.020 (Interchim, Montluçon, France). PuriFlash® 5.020. Mode injection avec valve et dépôt solide en charge sèche PF-DEL-F004 avec Celite 545 CAS 68855-54-9. Pression maximale 15 bars, débit de 15 mL/min. Détecteur UV-VIS configuré à 254 nm.

Spectrométrie RMN

Les spectres RMN ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker Avance NEO 400 MHz NanoBay, dans du $CDCl_3$ ou DMSO-d_6, à la Faculté de Pharmacie de Marseille pour le proton et le carbone. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm. La référence interne prise pour le $CDCl_3$ est de 7,26 ppm pour le ^{1}H et de 77,0 ppm pour le ^{13}C. Pour le DMSO-d_6 les références sont respectivement 2,50 ppm pour le ^{1}H et 39,7 ppm pour le ^{13}C. Les constantes de couplage *J* sont exprimées en Hertz. La multiplicité des signaux de résonance est indiquée par des abréviations : (s) singulet, (d) doublet, (t) triplet, (q) quadruplet, (m) multiplet.

Analyses élémentaires

Les analyses élémentaires ont été effectuées au Spectropole de la Faculté des Sciences, site de Saint-Jérôme sur un analyseur élémentaire Thermo Finnigan EA 1112.

- **General procedure 1 for preparation of 4,5-dihydrofuran derivatives by microwave-assisted $Mn(OAc)_3$-based cyclization reaction**

In a microwave vial of 20 mL equipped with a stirring bar, a solution of manganese (III) acetate dihydrate (2.1 equiv.) and copper (II) acetate (1 equiv.) in 12 mL of glacial acetic acid was heated at 80 °C under microwave irradiation 100W for 15 min. Then the reaction mixture was cooled, and a solution of *β*-keto derivative (1 equiv.) and the corresponding alkene (2 equiv.) in 15 mL of acetic acid was added. The reaction mixture was heated for 3 h under microwave irradiations under the same conditions. The resulting product was poured into 50 mL of cold water and extracted with CH_2Cl_2 (3 x 40 mL). The organic extracts were collected and washed with saturated aqueous $NaHCO_3$ (3 x 40 mL) and dried over Na_2SO_4. Filtrate solvent was evaporated under reduced pressure and crude product was purified by flash or column chromatography using appropriate solvent, affording the title product.

- **General procedure 2 for amidoxime synthesis from nitriles**

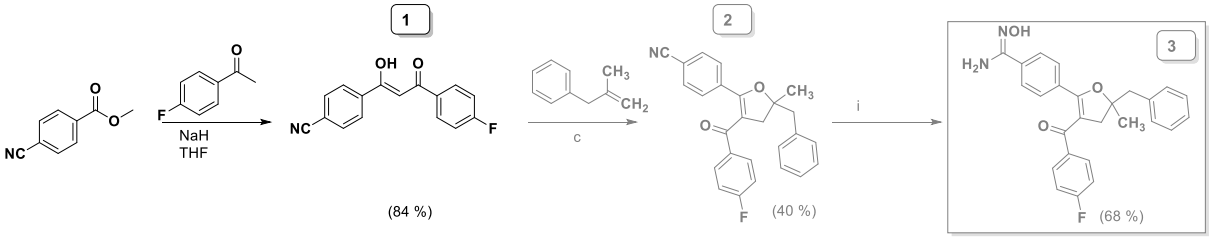
A suspension of hydroxylamine hydrochloride (10 equiv.) in DMSO was stirred under an inert atmosphere and cooled to 0 °C. Potassium *tert*-butoxide (10 equiv.) was added gradually, and the reaction mixture was stirred for 30 min. Then the corresponding nitrile was added (1 equiv.), and the reaction mixture was stirred for 18 h at room temperature. The resulting mixture was poured into cold water, then the reaction mixture was extracted with EtOAc (3 x 15 mL), the organic layers were combined, washed with water (1 x 20 mL), brine (1 x 20 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated. Purification by flash or column chromatography using the appropriate solvent afforded the title product.

- **General procedure 3 for nitration** [473]

A solution of the corresponding substrate (1.0 equiv.) in 5 mL of 70% nitric acid was heated at 60 °C for 4 h.[a] After cooling to room temperature, the solution was poured into ice water, neutralized by the careful addition of sodium carbonate, and extracted with CH_2Cl_2. The combined organic extracts were washed with water, brine, dried over Na_2SO_4, and concentrated under reduced pressure.

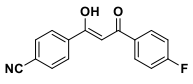
[473] Padwa, A. G. Waterson, *Arkivoc* **2001**, *2001*, 29–42. DOI: 10.3998/ark.5550190.0002.405

- **Synthesis of linear *β*-keto sulfone or carboxylate derivative**



1) 4-(3-(4-Fluorophenyl)-1-hydroxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)benzonitrile [474]

To a suspension of sodium hydride (800 mg, 20 mmol, 1.6 equiv., 60 % dispersion in mineral oil) in 5 mL of anhydrous THF was added methyl 4-cyanobenzoate (2.0 g, 12.4 mmol, 1 equiv.) and 1-(4-fluorophenyl)ethan-1-one (1.7 g, 12.4 mmol, 1 equiv.) in 15 mL of THF. Then, the reaction mixture was stirred and heated under reflux for 1.5 h and monitored by TLC (Rf 0.6 with cyclohexane-AcOEt, 8:1 as eluent). The mixture was cooled at room temperature and acidified with 15 mL of HCl 1N. The mixture was extracted three times with AcOEt, and the combined organic phase was washed with brine, dried over anhydrous Na_2SO_4, filtered and evaporated. The crude product was purified *via* column chromatography (silica gel; eluent: cyclohexane-AcOEt, 8:2) affording the title product as a yellow solid, mp 161 ºC. The compound obtained was observed mainly in enol form. Yield 84 %.



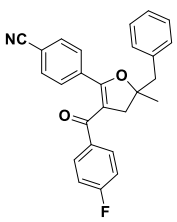
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.06 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.2 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 8.05-7.98 (m, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.79 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.2 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.19 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.4 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 6.81 (s, 1H, CH). OH not observed.^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 186.9 (C), 181.7 (C), 165.9 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 254.8 Hz, C), 139.2 (C), 132.6 ($2CH_{Ar}$), 131.7 (d, J = 2.9 Hz, C), 130.0 (d, J = 9.1 Hz, $2CH_{Ar}$), 127.7 ($2CH_{Ar}$), 118.2 (C), 115.1 (d, J = 21.5 Hz, $2CH_{Ar}$), 113.4 (C), 93.8 (C). ^{19}F NMR (376.5 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) −106.4. Analysis calculated for $C_{16}H_{10}FNO_2$: C 71.91, H 3.77, N 5.24; found 71.94, H 3.71, N 4.79 HRMS: *m/z* $[M+H]^+$ calculated 268.0768; found 268.0772.

2-a) 4-(5-Benzyl-3-(4-fluorobenzoyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)benzonitrile

Compound **2** was obtained following the general procedure 1 with 4-(3-(4-Fluorophenyl)-1-hydroxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)benzonitrile - compound **1**, (640 mg, 2.4 mmol, 1 equiv.) and 2-methyl-3-phenyl-1-propene (2 equiv.) in 13 mL of acetic acid. The reaction mixture was heated for 3 h under microwave irradiation under the same conditions. The TLC monitoring reaction was performed using cyclohexane-AcOEt (8:2) as eluent and visualized with ultraviolet light in a UV-

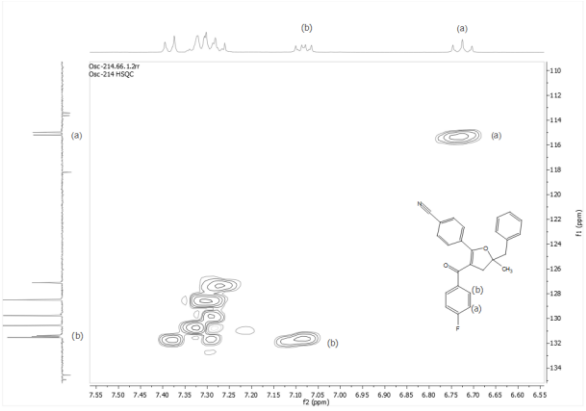
[474] [1] K. Kumpan, A. Nathubhai, C. Zhang, P. J. Wood, M. D. Lloyd, A. S. Thompson, T. Haikarainen, L. Lehtiö, M. D. Threadgill, Bioorganic & Medicinal Chemistry 2015, 23, 3013–3032. [2] C. Dai, D. Yang, X. Fu, Q. Chen, C. Zhu, Y. Cheng, L. Wang, Polym. Chem. 2015, 6, 5070–5076. [3] D. Sun, M. Jiang, J. Liu, Chemistry A European J 2019, 25, 10797–10802.

Lamp VL-6.CL., 254 nm and 365 nm (6 W), with a retardation factor of 0.4. The crude product was purified *via* column chromatography (silica gel; eluent: cyclohexane-AcOEt 8:2) affording the title product as a white oily solid. Yield 40 %.

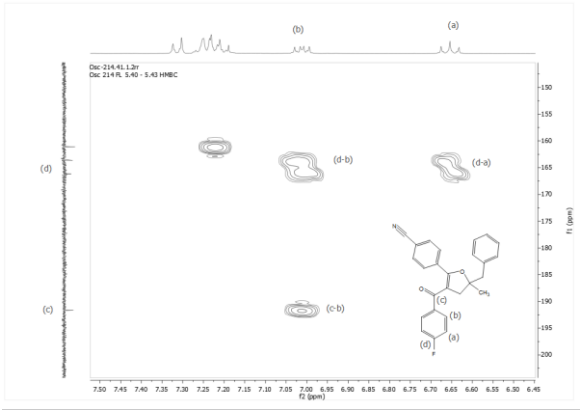


^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 7.40-7.26 (m, 9H, 9CH_{Ar}), 7.12-7.06 (m, 2H, 2CH_{Ar}), 6.73 (t, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.6 Hz, 2H, 2CH_{Ar}), 3.28 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 15.5 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.14 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.11 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 15.5 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.01 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2), 1.62 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 191.6 (C), 164.9 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 250.9 Hz, C), 161.1 (C), 136.4 (C), 134.9 (d, J = 2.9 Hz, C), 134.6 (C), 131.5 (2CH_{Ar}), 131.4 (d, J = 9.1 Hz, 2CH_{Ar}), 130.6 (2CH_{Ar}), 129.8 (2CH_{Ar}), 128.5 (2CH_{Ar}), 127.1 (CH_{Ar}), 118.2 (C), 115.1 (d, J = 21.5 Hz, 2CH_{Ar}), 113.6 (C),113.4 (C), 88.5 (C), 47.3 (CH_2), 43.5 (CH_2), 27.8 (CH_3). ^{19}F NMR (376.5 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) −106.4. Analysis calculated for $C_{26}H_{20}FNO_2$: HRMS: *m/z* [M+Na]$^{+}$ calculated 420.1370; found 420.1369.

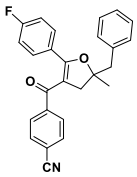
HSQC- 2



HMBC- 2



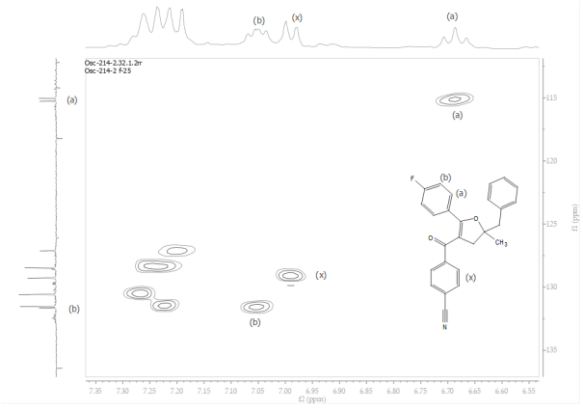
2-b) 4-(5-Benzyl-2-(4-fluorophenyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-3-carbonyl)benzonitrile



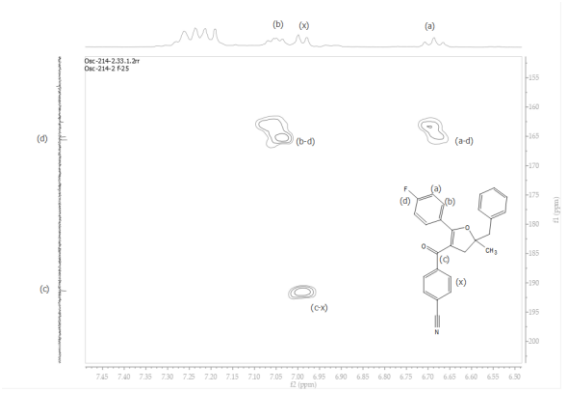
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 7.37-7.26 (m, 7H, 7CH_{Ar}), 7.15-7.10 (m, 2H, 2CH_{Ar}), 7.06 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.4 Hz, 2H, 2CH_{Ar}), 6.76 (t, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.6 Hz, 2H, 2CH_{Ar}), 3.27 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 15.1 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.15 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.09 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 15.1 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.01 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2), 1.62 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 191.4 (C), 165.6 (C), 163.9 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 253.4 Hz, C), 143.1 (C), 136.4 (C), 131.7 (d, J = 8.7 Hz, 2CH_{Ar}), 131.5 (2CH_{Ar}), 130.6 (2CH_{Ar}), 129.3 (2CH_{Ar}), 128.5 (2CH_{Ar}), 127.1 (CH_{Ar}), 126.1 (d, J = 3.5 Hz, C), 118.2 (C), 115.1 (d, J = 21.8 Hz, 2CH_{Ar}), 114.2 (C), 112.2 (C), 88.8 (C), 47.3 (CH_2), 42.7 (CH_2), 27.8 (CH_3). Analysis calculated for $C_{26}H_{20}FNO_2$: HRMS: *m/z* [M+Na]$^{+}$ calculated 420.1370; found 420.1365.

The TLC performed using cyclohexane-AcOEt (8:2) as eluent and visualized with ultraviolet light in a UV-Lamp VL-6.CL., 254 nm and 365 nm (6 W), showed a retardation factor of 0.5. Yield 20 %.

HSQC- 2(b)

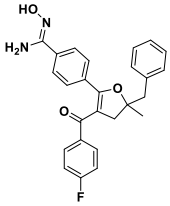


HMBC- 2(b)



3) 4-(5-Benzyl-3-(4-fluorobenzoyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-*N'*-hydroxybenzimidamide

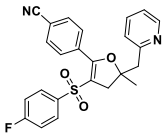
Compound **3** was obtained from compound **2** (200 mg, 0.5 mmol, 1 equiv.) following the general procedure 2. The reaction mixture was monitored by TLC (eluent: cyclohexane/AcOEt, 6:4, Rf 0.36). The crude product was purified by flash chromatography (column PuriFlash® IR-50SI-F0025; eluent: cyclohexane/ AcOEt from 100/0 to 70/30 in 25 CVs - Column Volume). UV-VIS detector was configurated additionally in 222 nm and 230 nm. Yield 68 %. The product was obtained as a light white oily semi-solid, verified *via* HRMS.



^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 7.38-7.19 (m, 9H, 9CH_{Ar}), 7.12-7.06 (m, 2H, 2CH_{Ar}), 6.69 (t, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.6 Hz, 2H, 2CH_{Ar}), 5.11 (br s, 2H, NH_2), 3.26 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 15.2 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.14 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.10 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 15.2 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.02 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2)), 1.60 (s, 3H, CH_3). OH not observed. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 192.0 (C), 164.7 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 251.0 Hz, C), 163.1 (C), 136.6 (2C),135.2 (d, J = 2.8 Hz, C), 132.5 (C), 132.3 (C), 131.4 (d, J = 9.1 Hz, 2CH_{Ar}), 130.6 (2CH_{Ar}), 129.8 (2CH_{Ar}), 128.5 (2CH_{Ar}), 127.0 (CH_{Ar}), 125.5 (2CH_{Ar}), 114.9 (d, J = 21.8 Hz, 2CH_{Ar}), 112.5 (C), 88.2 (C), 47.2 (CH_2), 43.5 (CH_2), 27.7 (CH_3). ^{19}F NMR (376.5 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) −107.4. Analysis calculated for $C_{26}H_{23}FN_2O_3$: HRMS: *m/z* $[M+H]^+$ calculated 431.1765; found 431.1764.

4) 4-(3-((4-Fluorophenyl)sulfonyl)-5-methyl-5-(pyridin-2-ylmethyl)-4,5-dihydrofuran-2-yl)benzonitrile

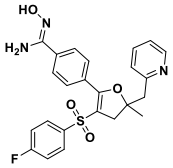
Compound **4** was obtained following the general procedure 1 with 4-(2-((4-fluorophenyl)sulfonyl)acetyl)benzonitrile, (500 mg, 1.65 mmol, 1 equiv.) and 2-(2-methylallyl)pyridine (2 equiv.) in 15 mL of acetic acid. The reaction mixture was heated for 3.5 h under microwave irradiation under the same conditions. The TLC monitoring reaction was performed using cyclohexane-AcOEt (7:3) as eluent and visualized with ultraviolet light in a UV-Lamp VL-6.CL., 254 nm and 365 nm (6 W), with a retardation factor of 0.40. The crude product was purified *via* column chromatography (silica gel; eluent: cyclohexane-AcOEt 2:8) affording the title product as a yellow oily semi-solid and verified *via* HRMS. Yield 55 %.



^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.37-8.33 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.71-7.65 (m, 4H, $4CH_{Ar}$), 7.61-7.50 (m, 3H, $3CH_{Ar}$), 7.15-7.06 (m, 4H, $4CH_{Ar}$), 3.34 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.9 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.18 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.6 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.05 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.6 Hz, 1H, H-(CH_2), 2.87 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.9 Hz, 1H, H-(CH_2), 1.54 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 165.5 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 256.5 Hz, C), 160.3 (C), 156.1 (C), 149.2 (CH_{Ar}), 137.4 (d, J = 3.1 Hz, C), 136.3 (CH_{Ar}), 133.2 (C), 131.6 ($2CH_{Ar}$), 130.3 ($2CH_{Ar}$), 129.8 (d, J = 9.7 Hz, $2CH_{Ar}$), 124.9 (CH_{Ar}), 122.1 (CH_{Ar}), 118.3 (C), 116.5 (d, J = 22.9 Hz, $2CH_{Ar}$), 114.5 (C), 112.1 (C), 88.9 (C), 48.3 (CH_2), 41.6 (CH_2), 27.7 (CH_3). Analysis calculated for $C_{24}H_{19}FN_2O_3S$: HRMS: *m/z* $[M+Na]^+$ calculated 457.0993; found 457.0990.

5) 4-(3-((4-Fluorophenyl)sulfonyl)-5-methyl-5-(pyridin-2-ylmethyl)-4,5-dihydrofuran-2-yl)-*N′*-hydroxybenzimidamide

Compound **5** was obtained from compound **4,** (90 mg, 0.21 mmol, 1 equiv.) following the general procedure 2. The reaction mixture was monitored by TLC (eluent: cyclohexane/AcOEt, 1:9, Rf 0.36). The crude product was purified by flash chromatography (column PuriFlash® IR-50SI-F0025; eluent: cyclohexane/ AcOEt from 100/0 to 50/50 in 25 CVs - Column Volume). UV-VIS detector was configurated additionally in 222 nm and 230 nm. Yield 68 %. The product was obtained as a light yellow oily semi-solid, verified *via* HRMS.

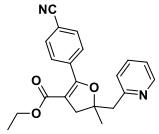


^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.40-8.34 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.65 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.2 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.62-7.52 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 7.14-7.04 (m, 4H, $4CH_{Ar}$), 5.03 (br s, 2H, NH_2), 3.33 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.7 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.19 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.5 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.09 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.5 Hz, 1H, H-(CH_2), 2.87 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.7 Hz, 1H, H-(CH_2), 1.53 (s, 3H, CH_3). OH not observed. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 165.2 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 255.2 Hz, C), 161.9 (C), 156.2

(C), 152.3 (C), 149.1 (CH_{Ar}), 137.9 (d, J = 3.0 Hz, C), 136.5 (CH_{Ar}), 134.4 (C), 130.4 (C), 129.9 ($2CH_{Ar}$), 129.7 (d, J = 9.7 Hz, $2CH_{Ar}$), 125.4 ($2CH_{Ar}$), 125.1 (CH_{Ar}), 122.1 (CH_{Ar}), 116.3 (d, J = 22.9 Hz, $2CH_{Ar}$), 110.6 (C), 88.4 (C), 48.3 (CH_2), 41.7 (CH_2), 27.6 (CH_3). ^{19}F NMR (376.5 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) −105.0. Analysis calculated for $C_{24}H_{22}FN_3O_4S$: HRMS: *m/z* $[M+H]^+$ calculated 468.1388; found 468.1386.

6) Ethyl 2-(4-cyanophenyl)-5-methyl-5-(pyridin-2-ylmethyl)-4,5-dihydrofuran-3-carboxylate

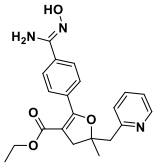
Compound 6 was obtained following the general procedure 1 with ethyl 3-(4-cyanophenyl)-3-oxopropanoate (500 mg, 2.3 mmol, 1 equiv.) and 2-(2-methylallyl)pyridine (2 equiv.) in 5 mL of acetic acid. The reaction mixture was heated for 3.5 h under microwave irradiation under the same conditions. The TLC monitoring reaction was performed using cyclohexane-AcOEt (7:3) as eluent and visualized with ultraviolet light in a UV-Lamp VL-6.CL., 254 nm and 365 nm (6 W), with a retardation factor of 0.19. The crude product was purified *via* column chromatography (silica gel; eluent: cyclohexane-AcOEt 9:1) affording the title product as a white oily semi-solid and verified *via* HRMS. Yield 58 %.



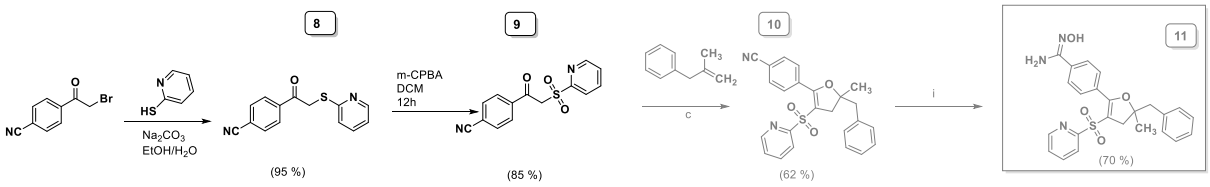
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 7.89 (d, $^3J_{H-H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.68 (d, $^3J_{H-H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.34 -7.23 (m, 4H, $4CH_{Ar}$), 4.12 (q, $^3J_{H-H}$ = 7.1 Hz, 2H, CH_2), 3.15 (d, $^2J_{H-H}$ = 15.5 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.07 (d, $^2J_{H-H}$ = 14.0 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.03 (d, $^2J_{H-H}$ = 14.0 Hz, 1H, H-(CH_2)), 2.87 (d, $^2J_{H-H}$ = 15.5 Hz, 1H, H-(CH_2)), 1.50 (s, 3H, CH_3), 1.22 (t, $^3J_{H-H}$ = 7.1 Hz, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 165.0 (C), 161.4 (C), 136.4 (C), 134.9 (C), 131.5 ($2CH_{Ar}$), 130.5 ($2CH_{Ar}$), 130.1 ($2CH_{Ar}$), 128.4 (CH_{Ar}), 127.0 (CH_{Ar}), 118.7 (C), 113.5 (C), 104.5 (C), 88.2 (C), 60.1 (CH_2), 46.8 (CH_2), 42.3 (CH_2), 26.8 (CH_3), 14.3 (CH_3). Analysis calculated for $C_{21}H_{20}N_2O_3$: HRMS: *m/z* $[M+Na]^+$ calculated 371.1366; found 371.1364.

7) Ethyl 2-(4-(*N*′-hydroxycarbamimidoyl)phenyl)-5-methyl-5-(pyridin-2-ylmethyl)-4,5-dihydrofuran-3-carboxylate

Compound **7** was obtained from **6,** (80 mg, 0.23 mmol, 1 equiv.) following the general procedure 2. The reaction mixture was monitored by TLC (eluent: cyclohexane/AcOEt, 7:3, Rf 0.17). The crude product was purified by flash chromatography (column PuriFlash® IR-50SI-F0025; eluent: cyclohexane/ AcOEt from 100/0 to 70/30 in 25 CVs - Column Volume). UV-VIS detector was configurated additionally in 222 nm and 230 nm. Yield 68 %. The product was obtained as a light grey oily semi-solid, verified *via* HRMS.

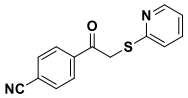


^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 7.77 (d, $^{3}J_{H-H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.63 (d, $^{3}J_{H-H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.60 -7.58 (m, 1H, CH_{Ar}), 728 -7.16 (m, 3H, $3CH_{Ar}$), 5.06 (br s, 2H, NH_2), 4.08 (q, $^{3}J_{H-H}$ = 7.1 Hz, 2H, CH_2), 3.15 (d, $^{2}J_{H-H}$ = 15.4 Hz, 1H, H-(CH_2)), 3.24 (s, 2H, CH_2), 2.87 (d, $^{2}J_{H-H}$ = 15.4 Hz, 1H, H-(CH_2)), 1.52 (s, 3H, CH_3), 1.18 (t, $^{3}J_{H-H}$ = 7.5 Hz, 3H, CH_3). OH not observed. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 165.3 (C), 162.7 (C), 156.9 (C), 148.7 (CH_{Ar}), 136.8 (CH_{Ar}), 133.5 (C), 132.1 (C), 131.1 (C), 129.8 ($2CH_{Ar}$), 125.3 (CH_{Ar}), 125.2 ($2CH_{Ar}$), 122.1 (CH_{Ar}), 103.1 (C), 87.4 (C), 60.5 (CH_2), 48.5 (CH_2), 42.2 (CH_2), 27.0 (CH_3), 14.3 (CH_3). Analysis calculated for $C_{21}H_{23}N_3O_4$: HRMS: *m/z* $[M+Na]^+$ calculated 404.1581; found 404.1581.



8) 4-(2-(Pyridin-2-ylsulfonyl)acetyl)benzonitrile [475]

Sodium carbonate (1.43 g, 13.5 mmol, 1.5 equiv.) was added to a stirred solution of pyridine-2-thiol (1 g, 9 mmol, 1.0 equiv.) in ethanol (20 mL) and water (20 mL) and stirred at room temperature for 30 min. 4-(2-bromoacetyl)benzonitrile (2.01 g, 9 mmol, 1.0 equiv.) was added to the reaction mixture and stirring was continued for 3 h at room temperature. The reaction was monitored by TLC until the complete disappearance of starting materials (Rf 0.7 with AcOEt-CH_2Cl_2, 1:1 as eluent). Then, the reaction mixture was poured into 50 mL of 1 M HCl containing 50 g of crushed ice. The product was filtered under vacuum and the filtrate was washed with 10 mL ice-cold ethanol and 10 mL water. The mixture was extracted three times with CH_2Cl_2, then the organic layer was washed two times with brine and dried over anhydrous Na_2SO_4, filtered and evaporated. Recrystallization from petroleum ether and filtration gave compound **8** (Osc-115), as a beige solid, mp 99 ºC. Yield 95 %.



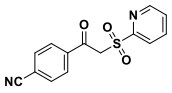
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.31-8.22 (m, 1H, CH_{Ar}), 8.09 (d, $^{3}J_{H-H}$ = 8.4 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.73 (d, $^{3}J_{H-H}$ = 8.4 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.55-7.42 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.24-7.13 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.02-6.91 (m, 1H, CH_{Ar}), 4.61 (s, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 193.9 (C), 156.2 (C), 149.1 (CH_{Ar}), 139.5 (C), 136.6 (CH_{Ar}), 132.6 ($2CH_{Ar}$), 129.1 ($2CH_{Ar}$), 122.4 (CH_{Ar}),

[475] [1] L. Kang, F. Wang, J. Zhang, H. Yang, C. Xia, J. Qian, G. Jiang, Org. Lett. 2021, 23, 1669–1674. [2] H. Loghmani-Khouzani, D. Hajiheidari, Journal of Fluorine Chemistry 2010, 131, 561–569.

120.2 (CH_{Ar}), 118.1 (C), 116.6 (C), 36.9 (CH_2). Analysis calculated for $C_{14}H_{10}N_2OS$ (254.31): C 66.12, H 3.96, N 11.02; found C 66.00, H 3.82, N 11.01.

9) 4-(2-Pyridin-2-ylsulfonyl)acetyl)benzonitrile [476]

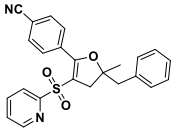
m-CPBA (3 mmol) was added to a solution of 4-(2-(Pyridin-2-ylsulfonyl)acetyl)benzonitrile (1 mmol) in CH_2Cl_2 (20 mL). The mixture was stirred at room temperature for 4 h to complete the reaction. Saturated aqueous Na_2SO_3 solution (50 mL) was added and the mixture was stirred for a further 1 h at room temperature. The reaction was monitored by TLC (Rf 0.23 with CH_2Cl_2 as eluent). The CH_2Cl_2 layer was washed with water (50 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4, filtered, and concentrated under reduced pressure. Column chromatography on silica gel using CH_2Cl_2 afforded compound **9**, as a white solid, mp 138 ºC. Yield 85 %.



^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.75-8.70 (m, 1H, CH_{Ar}), 8.10-8.04 (m, 3H, $3CH_{Ar}$), 8.03-7.96 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.79 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.4 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.63-7.56 (m, 1H, CH_{Ar}), 5.10 (s, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 187.3 (C), 156.6 (C), 150.3 (CH_{Ar}), 138.7 (C), 138.6 (CH_{Ar}), 132.8 ($2CH_{Ar}$), 129.6 ($2CH_{Ar}$), 128.1 (CH_{Ar}), 122.5 (CH_{Ar}), 117.7 (C), 117.6 (C), 59.0 (CH_2). Analysis calculated for $C_{14}H_{10}N_2O_3S$ (286.31): C 58.73, H 3.52, N 9.78; found C 58.78, H 3.40, N 9.69.

10) 4-(5-Benzyl-5-methyl-3-(pyridin-2-ylsulfonyl)-4,5-dihydrofuran-2-yl)benzonitrile

Compound 10 was obtained following the general procedure 1 with 4-(2-Pyridin-2-ylsulfonyl)acetyl)benzonitrile (500 mg, 1.75 mmol, 1 equiv.) and 2-methyl-3-phenyl-1-propene (2 equiv.) were mixed in 15 mL of acetic acid. The reaction mixture was heated for 3 h under microwave irradiation under the same conditions. The TLC monitoring reaction was performed using cyclohexane-AcOEt (8:2) as eluent and visualized with ultraviolet light in a UV-Lamp VL-6.CL., 254 nm and 365 nm (6 W), with a retardation factor of 0.54. The crude product was purified *via* column chromatography (silica gel; eluent: cyclohexane-AcOEt 8:2) affording the title product as a white oily semi-solid and verified *via* HRMS. Yield 62 %.



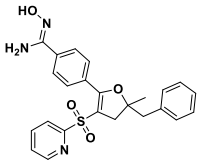
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.66 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 4.6 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.90-7.84 (m, 4H, $4CH_{Ar}$), 7.66 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.4 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.50-7.47 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.23-7.17 (m, 3H, $3CH_{Ar}$), 7.14-7.09 (m, 2H, $2CH_{Ar}$), 3.19 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.8 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.03 (d,

[476] [1] H. Loghmani-Khouzani, D. Hajiheidari, W. T. Robinson, R. Kia, Acta Crystallogr E Struct Rep Online **2010**, 66, o209–o209. [2] S. Abbasi, S. Mirza, S. Rasheed, S. Hussain, J. Khan, K. Khan, S. Perveen, M. Choudhary, MC **2014**, 10, 824–835.

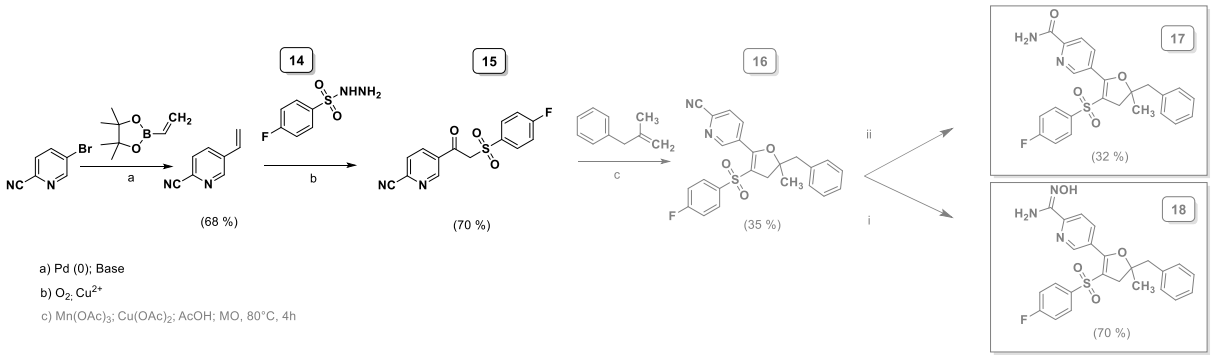
$^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2), 2.95 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.94 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.8 Hz, 1H, H-(CH_2), 1.50 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 162.6 (C), 158.8 (C), 150.3 (CH_{Ar}), 138.1 (CH_{Ar}), 135.6 (C), 133.2 (C), 131.6 ($2CH_{Ar}$), 130.4 ($2CH_{Ar}$), 130.3 ($2CH_{Ar}$), 128.3 ($2CH_{Ar}$), 127.1 (CH_{Ar}), 127.0 (CH_{Ar}), 121.6 (CH_{Ar}), 118.4 (C), 114.3 (C), 109.1 (C), 89.7 (C), 46.5 (CH_2), 42.2 (CH_2), 26.8 (CH_3). Analysis calculated for $C_{24}H_{20}N_2O_3S$: HRMS: *m/z* $[M+Na]^+$ calculated 439.1087; found 439.1087.

11) 4-(5-Benzyl-5-methyl-3-(pyridin-2-ylsulfonyl)-4,5-dihydrofuran-2-yl)-*N'*-hydroxy-benzimidamide

Compound **11** was obtained from **10,** (69 mg, 0.17 mmol, 1 equiv.) following the general procedure 2. The reaction mixture was monitored by TLC (eluent: cyclohexane/CH_2Cl_2, 4:6, Rf 0.22). The crude product was purified by flash chromatography (column PuriFlash® IR-50SI-F0025; eluent: cyclohexane/AcOEt from 100/0 to 50/50 in 25 CVs - Column Volume). UV-VIS detector was configurated additionally in 222 nm and 230 nm. Yield 70 %. The product was obtained as a light yellow oily semi-solid, verified *via* HRMS.

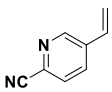


^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.71 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 4.6 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.92-7.83 (m, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.79 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.4 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.68 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.4 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.54-7.47 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.34-7.15 (m, 5H, $5CH_{Ar}$), 5.12 (br s, 2H, NH_2), 3.29 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.6 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.09 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.05 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.6 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.03 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.8 Hz, 1H, H-(CH_2), 1.55 (s, 3H, CH_3). OH not observed. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 164.1 (C), 159.2 (C), 152.4 (C), 150.3 (CH_{Ar}), 138.0 (CH_{Ar}), 135.8 (C), 134.3 (C), 130.5 ($2CH_{Ar}$), 130.4 (C), 130.0 ($2CH_{Ar}$), 128.3 ($2CH_{Ar}$), 127.0 (CH_{Ar}), 126.8 (CH_{Ar}), 125.4 ($2CH_{Ar}$), 121.6 (CH_{Ar}), 107.8 (C), 89.2 (C), 46.5 (CH_2), 42.3 (CH_2), 26.7 (CH_3). Analysis calculated for $C_{24}H_{23}N_3O_4S$: HRMS: *m/z* $[M+Na]^+$ calculated 472.1301; found 472.1300.



14) 5-Vinylpicolinonitrile

A microwave vial of 20 mL was charged with 5-bromopicolinonitrile (990 mg, 1.0 equiv.), vinylboronic acid pinacol ester (1.2 equiv.), tetrakis(triphenylphosphine)palladium (0) (5 mol %) and potassium carbonate (3.0 equiv.). The system was capped and a mixture of 8 mL of dioxane-water (3:1) was introduced under nitrogen atmosphere. The reaction mixture was stirred at 120°C for the appropriate time. The TLC monitoring reaction was performed using Petroleum ether-CH_2Cl_2 (1:1) as eluent and visualized with ultraviolet light in a UV-Lamp VL-6.CL., 254 nm (6 W), with a retardation factor of 0.22, and verified *via* low-resolution LC-MS. The reaction mixture was poured into cold water and extracted with AcOEt (3 × 20 mL). The organic layer was washed with brine, dried over Na_2SO_4 and the solvent was removed *in vacuo*. Then the obtained crude was purified *via* column chromatography on silica gel from 90:10 to 50:50 of petroleum ether- CH_2Cl_2, to afford the title product, as a brown solid, mp 70 ºC. Yield 68 %.

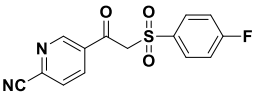


NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.69 (d, $^4J_{H\text{-}H}$ = 2.2 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.82 (dd, $^4J_{H\text{-}H}$ = 2.2 Hz, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.2 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.65 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.2 Hz, 1H, CH_{Ar}), 6.73 (dd, $^3J_{H\text{-}H}$ = 10.9 Hz, $^3J_{H\text{-}H}$ = 17.7 Hz, 1H, CH), 5.97 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 17.7 Hz, 1H, H-(CH_2)), 5.58 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 10.9 Hz, 1H, H-(CH_2)). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 149.4 (CH_{Ar}), 136.4 (C), 133.5 (CH), 132.4 (C), 132.2 (CH_{Ar}), 128.4 (CH_{Ar}), 120.2 (CH_2), 117.4 (C). Anal. calcd for $C_8H_6N_2$ (130.15): C 73.83, H 4.65, N 21.52; found C 73.83, H 4.65, N 21.52. HRMS: *m/z* $[M+H]^+$ calculated 131.0604; found 131.0603.

15) 5-(2-((4-Fluorophenyl)sulfonyl)acetyl)picolinonitrile

A mixture of 5-vinylpicolinonitrile (180 mg, 1.38 mmol, 1.5 equiv.), 4-fluorobenzenesulfonohydrazide (0.92 mmol, 1.0 equiv.), $Cu(OAc)_2$ (5 mol %), and EtOH (6 mL) in a 25 mL round-bottomed flask was put under O_2 (balloon). The reaction vessel was allowed to stir at 80 °C for 72 h. The TLC monitoring reaction was performed using petroleum ether-AcOEt (9:1) as eluent and visualized with ultraviolet light in a UV-Lamp VL-6.CL., 254 nm (6 W), with a

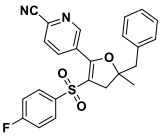
retardation factor of 0.23, and verified *via* low-resolution LC-MS. After the reaction, the resulting mixture was concentrated under vacuum and the residue was purified by flash column chromatography using a mixture of petroleum ether – AcOEt (from 9:1 to 4:6) as eluent to give compound **15**, as a lightly grey solid, mp 157 ºC. Yield 70 %.



^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 9.26 (d, $^{4}J_{H\text{-}H}$ = 2.2 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.44 (dd, $^{4}J_{H\text{-}H}$ = 2.2 Hz, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.2 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.93-7.89 (m, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.88 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.2 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.31-7.27 (m, 2H, $2CH_{Ar}$), 4.75 (s, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 186.3 (C), 166.6 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 258.1 Hz, C), 151.5 (CH_{Ar}), 138.0 (C), 137.9 (CH_{Ar}), 134.1 (d, J = 3.2 Hz, C), 132.8 (C), 131.7 (d, J = 9.7 Hz, $2CH_{Ar}$), 128.5 (CH_{Ar}), 117.1 (d, J = 22.7 Hz, $2CH_{Ar}$), 116.4 (C), 64.2 (CH_2). Anal. calcd for $C_{14}H_9FN_2O_3S$ (304.30): C 55.26, H 2.98, N 9.21, S 10.54; found C 54.52, H 2.88, N 9.15, S 10.43. HRMS: *m/z* $[M+Na]^+$ calculated 327.0210; found 327.0210.

16) 5-(5-Benzyl-3-((4-fluorophenyl)sulfonyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)picolinonitrile

Compound **16** was obtained following the general procedure 1 with 5-(2-((4-fluorophenyl)sulfonyl)acetyl)picolinonitrile (244 mg, 0.8 mmol, 1 equiv.) and 2-methyl-3-phenyl-1-propene (2 equiv.) mixed in 15 mL of acetic acid. The reaction mixture was heated for 3.5 h under microwave irradiation under the same conditions. The TLC monitoring reaction was performed using cyclohexane-AcOEt (7:3) as eluent and visualized with ultraviolet light in a UV-Lamp VL-6.CL., 254 nm and 365 nm (6 W), with a retardation factor of 0.75. The crude product was purified *via* column chromatography (silica gel; eluent: cyclohexane-AcOEt, 9:1) affording the title product as a lightly brown oily semi-solid and verified *via* HRMS. Yield 35 %.

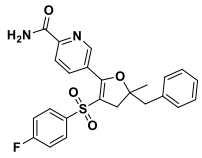


^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.78 (d, $^{4}J_{H\text{-}H}$ = 2.1 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.09 (dd, $^{4}J_{H\text{-}H}$ = 2.1 Hz, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.1 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.73 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.1 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.56-7.47 (m, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.25-7.02 (m, 7H, $7CH_{Ar}$), 3.03 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.9 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.01 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.9 Hz, 1H, H-(CH_2), 2.87 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.9 Hz, 1H, H-(CH_2), 2.83 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.9 Hz, 1H, H-(CH_2), 1.53 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 165.5 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 256.3 Hz, C), 157.7 (C), 150.8 (CH_{Ar}), 138.3 (CH_{Ar}), 136.8 (d, J = 3.3 Hz, C), 135.2 (C), 135.1 (C), 130.3 ($2CH_{Ar}$), 129.7 (d, J = 9.2 Hz, $2CH_{Ar}$), 128.5 ($2CH_{Ar}$), 128.2 (C), 127.5 (CH_{Ar}), 127.3 (CH_{Ar}), 116.8 (C), 116.7 (d, J = 22.1 Hz, $2CH_{Ar}$), 113.4 (C), 89.8 (C), 46.7 (CH_2), 41.5 (CH_2), 27.7 (CH_3). ^{19}F NMR (376.5 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) −103.8. Analysis calculated for $C_{24}H_{19}FN_2O_3S$: HRMS: *m/z* $[M+Na]^+$ calculated 457.0993; found 457.0990.

- **Procedure for amide derivative from nitrile**

17) 5-(5-Benzyl-3-((4-fluorophenyl)sulfonyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)picolinemide[477]

In a microwave vial of 20 mL equipped with a stirring bar, compound 5-(5-benzyl-3-((4-fluorophenyl)sulfonyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)picolinonitrile - compound 16, (200 mg, 0.46 mmol), was solubilized in water (2 mL) and ethanol (9 mL). Hydroxylamine hydrochloride (128 mg, 1.84 mmol, 4 equiv.) and sodium carbonate (98 mg, 0.92 mmol) were added. The mixture was heated at 90 °C under N_2 and microwave irradiation for 1h. The TLC monitoring reaction was performed using cyclohexane/AcOEt 7:3 as eluent, Rf 0.38, and visualized with ultraviolet light in a UV-Lamp VL-6.CL., 254 nm (6 W). The reaction was cooled, and the ethanol was removed under reduced pressure. The aqueous layer was extracted with AcOEt (3×5 mL), the combined organic fractions were dried over anhydrous Na_2SO_4 and the solvent removed under reduced pressure. The crude product was purified *via* column chromatography (silica gel; eluent: CH_2Cl_2/MeOH from 2 % to 4 %) affording the title product as a white oily solid and verified *via* HRMS. Yield 32 %.



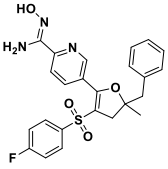
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.73 (d, $^4J_{H\text{-}H}$ = 2.1 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.23 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.1 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.05 (dd, $^4J_{H\text{-}H}$ = 2.1 Hz, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.1 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.85 (br s, 1H, NH), 7.54-7.48 (m, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.24-7.16 (m, 3H, $3CH_{Ar}$), 7.12-7.03 (m, 4H, $4CH_{Ar}$), 6.04 (br s, 1H, NH), 3.03 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 13.9 Hz, 2H, CH_2), 2.87 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 14.8 Hz, 1H, H-(CH_2), 2.85 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 13.9 Hz, 1H, H-(CH_2), 1.52 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 166.0 (C), 165.3 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 254.3 Hz, C), 159.1 (C), 150.7 (C), 148.7 (CH_{Ar}), 138.3 (CH_{Ar}), 137.2 (d, J = 3.3 Hz, C), 135.4 (C), 130.4 ($2CH_{Ar}$), 129.7 (d, J = 9.4 Hz, $2CH_{Ar}$), 128.5 ($2CH_{Ar}$), 127.8 (C), 127.2 (CH_{Ar}), 121.6 (CH_{Ar}), 116.5 (d, J = 22.7 Hz, $2CH_{Ar}$), 112.4 (C), 89.4 (C), 46.6 (CH_2), 41.6 (CH_2), 27.6 (CH_3). ^{19}F NMR (376.5 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) −104.4. Analysis calculated for $C_{24}H_{21}FN_2O_4S$: HRMS: *m/z* $[M+Na]^+$ calculated 475.1098; found 475.1094.

18) 5-(5-Benzyl-3-((4-fluorophenyl)sulfonyl)-5-methyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-*N*′-hydroxypicolinimidamide

Compound **18** was obtained from **16,** (100 mg, 0.23 mmol, 1 equiv.) following the general procedure 2. The reaction mixture was monitored by TLC (eluent: cyclohexane/ AcOEt,, 1:1, Rf 0.38). The crude product was purified by flash chromatography (column PuriFlash® IR-50SI-

[477] T. B. Mete, A. Singh, R. G. Bhat, Tetrahedron Letters 2017, 58, 4709–4712. S. Mandal, S. Chatterjee, S. K. Tarai, A. Pan, R. Bhaduri, C. Das, S. Ch. Moi, Inorganica Chimica Acta **2024**, 569, 122119.

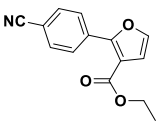
F0025; eluent: cyclohexane/AcOEt from 100/0 to 50/50 in 25 CVs - Column Volume). UV-VIS detector was configurated additionally in 222 nm and 230 nm. Yield 70 %. The product was obtained as a light yellow oily semi-solid, verified *via* HRMS.



^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.73 (d, $^{4}J_{H\text{-}H}$ = 2.1 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.23 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.1 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.05 (dd, $^{4}J_{H\text{-}H}$ = 2.1 Hz, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.1 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.54-7.47 (m, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.24-7.16 (m, 3H, $3CH_{Ar}$), 7.12-7.02 (m, 4H, $4CH_{Ar}$), 5.62 (br s, 2H, NH_2), 3.03 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.9 Hz, 1H, H-(CH_2), 3.02 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.8 Hz, 1H, H-(CH_2), 2.87 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 14.8 Hz, 1H, H-(CH_2), 2.85 (d, $^{2}J_{H\text{-}H}$ = 13.9 Hz, 1H, H-(CH_2), 1.53 (s, 3H, CH_3). OH not observed. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 165.2 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 256.3 Hz, C), 159.6 (C), 150.7 (2C), 148.8 (CH_{Ar}), 137.6 (d, J = 3.0 Hz, C), 137.4 (CH_{Ar}), 135.5 (C), 130.4 ($2CH_{Ar}$), 129.6 (d, J = 9.5 Hz, $2CH_{Ar}$), 128.5 ($2CH_{Ar}$), 127.2 (CH_{Ar}), 125.6 (C), 119.0 (CH_{Ar}), 116.4 (d, J = 22.9 Hz, $2CH_{Ar}$), 111.7 (C), 89.0 (C), 46.6 (CH_2), 41.7 (CH_2), 27.6 (CH_3). ^{19}F NMR (376.5 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) −104.6. Analysis calculated for $C_{24}H_{22}FN_3O_4S$: HRMS: *m/z* $[M+Na]^+$ calculated 490.1207; found 490.1207.

19) Ethyl 2-(4-cyanophenyl)furan-3-carboxylate[478]

A mixture of ethyl 3-(4-cyanophenyl)-3-oxopropanoate (250 mg, 1.15 mmol, 1 equiv) and pyridine (3 equiv) was stirred on ice, while a solution of 45% aqueous chloroacetaldehyde (0.15 mL, 2 equiv) was slowly added over a period of 30 min. This was allowed to stir at room temperature for 24 h and completion of the reaction was confirmed by TLC (Rf 0.3 with cyclohexane/AcOEt, 8:2 as eluent) [a]. The product was extracted with diethyl ether and organic layers were washed with 25% $NaHSO_4$ (4 x 15 mL), followed by two 2M HCl washes and a brine wash. Combined organic layers were dried with Na_2SO_4 and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (silica gel; eluent: AcOEt/Petroleum ether, 2:8) affording a white solid, mp 126 °C. Yield 40%. The analytical data are consistent with those in the literature.

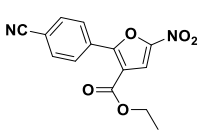


^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 8.15 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.6 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.68 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.6 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.48 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 1.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 6.88 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 1.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 4.31 (q, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 7.5 Hz, 2H, CH_2), 1.34 (t, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 7.2 Hz, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 163.1 (C), 154.7 (C), 142.4 (CH_{Ar}), 133.7 (C), 131.9 ($2CH_{Ar}$), 128.6 ($2CH_{Ar}$), 118.7 (C), 116.3 (C), 113.7 (CH_{Ar}), 112.4 (C), 61.0 (CH_2), 14.2 (CH_3). Analysis calculated for $C_{14}H_{11}NO_3$: HRMS: *m/z* $[M+Na]^+$ calculated 264.0631; found 264.0632.

[478] [1] N. Nazef, R. D. M. Davies, M. F. Greaney, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 3720–3723. [2] C. You, Z. Zhang, Y. Tu, H. Tang, Y. Wang, D. Long, J. Zhao, *J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 3902–3910.

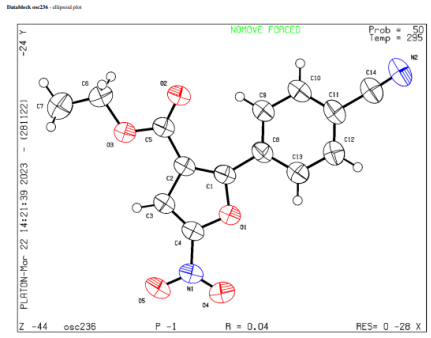
(20) Ethyl 2-(4-cyanophenyl)-5-nitrofuran-3-carboxylate

Compound **20** was obtained following the general procedure 3 (for nitration) with a solution containing **19** (100 mg, 0.46 mmol, 1.0 equiv.). The crude product was purified by column chromatography (silica gel; eluent: AcOEt/Petroleum ether, 2:8) affording a pale yellow solid, mp 118 °C. Yield 60%.



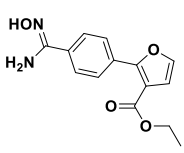
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 8.28 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.7 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.78 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.7 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.72 (s, 1H, CH_{Ar}), 4.38 (q, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 7.2 Hz, 2H, CH_2), 1.39 (t, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 7.2 Hz, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 161.0 (C), 155.7 (C), 132.4 ($2CH_{Ar}$), 131.2 (C), 129.8 ($2CH_{Ar}$), 118.4 (C), 118.1 (2C), 115.0 (C), 113.8 (CH_{Ar}), 62.2 (CH_2), 14.3 (CH_3). Analysis calculated for $C_{14}H_{10}N_2O_5$: HRMS: *m/z* $[M+Na]^+$ calculated 309.0482; found 309.0482.

A structural crystallographic of compound **28** was performed to confirm the nitration in position 5. Deposition Number in The Cambridge Crystallographic Data Centre: 2383662.



(21) Ethyl 2-(4-(*N'*-hydroxycarbamimidoyl)phenyl)furan-3-carboxylate

Compound **21** was obtained following the general procedure 2 (for amidoxime) from **19** (100 mg, 0.41 mmol, 1 equiv.). The reaction mixture was monitored by TLC (eluent: CH_2Cl_2/MeOH 96/4, Rf 0.31). The crude product was purified by column chromatography (silica gel; eluent: CH_2Cl_2/MeOH 96/4). The product was obtained as a faint beige solid, mp 115 °C. Yield 69%.

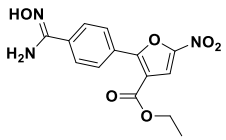


^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 8.02 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.6 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.69 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.6 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.43 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 1.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 6.85 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 1.9 Hz, 1H, CH_{Ar}), 5.01 (br s, 2H, NH_2), 4.29 (q, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 7.2 Hz, 2H, CH_2), 1.33 (t, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 7.2 Hz, 3H, CH_3). OH not observed. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 163.8 (C), 156.5 (C), 152.4 (C), 141.6 (CH_{Ar}), 132.9 (C), 131.3 (C), 126.8 ($2CH_{Ar}$), 125.7 ($2CH_{Ar}$), 114.7 (C), 113.3 (CH_{Ar}), 60.8 (CH_2),

14.3 (CH_3). Analysis calculated for $C_{14}H_{14}N_2O_4$: HRMS: *m/z* $[M+H]^+$ calculated 275.1026; found 275.1024.

(22) Ethyl 2-(4-(*N'*-hydroxycarbamimidoyl)phenyl)-5-nitrofuran-3-carboxylate

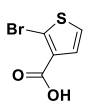
Compound **22** was obtained following the former general procedure 2 (for amidoxime) from **20** (40 mg, 0.13 mmol, 1 equiv.). The reaction mixture was monitored by TLC (eluent: CH_2Cl_2/MeOH 96/4, Rf 0.29). The crude product was purified by column chromatography (silica gel; eluent: CH_2Cl_2/MeOH 96/4). Yield 81%. The product was obtained as a light white oily semi-solid.



^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 8.23 (d, $^3J_{H-H}$ = 8.3 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.94 (d, $^3J_{H-H}$ = 8.3 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.73 (s, 1H, CH_{Ar}), 6.09 (br s, 2H, NH_2), 4.38 (q, $^3J_{H-H}$ = 7.1 Hz, 2H, CH_2), 1.39 (t, $^3J_{H-H}$ = 7.1 Hz, 3H, CH_3). OH not observed. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 168.8 (C), 161.3 (C), 157.0 (C), 135.5 (C), 130.6 (2C), 129.6 ($2CH_{Ar}$), 127.7 ($2CH_{Ar}$), 117.7 (C), 113.9 (CH_{Ar}), 62.1 (CH_2), 14.3 (CH_3). Analysis calculated for $C_{14}H_{13}N_3O_6$: HRMS: *m/z* $[M+H]^+$ calculated 320.0877; found 320.0877.

(23) 2-Bromothiophene-3-carboxylic acid [479]

Compound **23** was obtained from commercially available thiophene-3-carboxylic acid (1 g, 7.8 mmol, 1.0 equiv.) dissolved in 20 mL of tetrahydrofuran and then the solution was cooled to -78 °C and *n*-butyllithium, 2.5 M, (6.25 mL, 2 equiv.) was gradually added dropwise. The reaction mixture was stirred for 30 min at -78 °C and bromine (0.42 mL, 1.05 equiv.) was slowly added into the mixture. The reaction was allowed to continue overnight after warming up to 25 °C. After stirring the mixture overnight, 15mL of 1 M HCl was added to quench the reaction. The product was extracting with AcOEt; the organic layer was washed with water, then dried with Na_2SO_4. The solvent was evaporated under reduced pressure, and the crude product was purified by column chromatography (silica gel; eluent: AcOEt/Cyclohexane 2:8) affording a faint grey solid. Yield 45%. The NMR data are consistent with those in the literature.

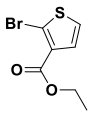


^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.44 (d, $^3J_{H-H}$ = 5.7 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.26 (d, $^3J_{H-H}$ = 5.7 Hz, 1H, CH_{Ar}). OH not observed. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 167.0 (C), 130.4 (C), 130.4 (CH_{Ar}), 126.3 (CH_{Ar}), 122.1 (C).

[479] C. G. Park, S. H. Park, Y. Kim, T. L. Nguyen, H. Y. Woo, H. Kang, H. J. Yoon, S. Park, M. J. Cho, D. H. Choi, *J. Mater. Chem. A* **2019**, *7*, 21280–21289.

(24) Ethyl 2-bromothiophene-3-carboxylate [480]

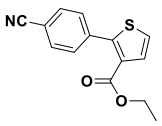
A solution of 2-bromothiophene-3-carboxylic acid **23** (500 mg, 2.41 mmol, 1.0 equiv.) and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (505 mg, 2.66 mmol, 1.1 equiv.) in ethanol (15 mL) was refluxed overnight. After cooling to room temperature, the solvent was removed *in vacuo* and the residue was dissolved in AcOEt (10 mL). The solution was washed with water (3 x 10 mL) and dried over Na_2SO_4. The solvent was evaporated under reduced pressure, and the crude product was purified by column chromatography (silica gel; eluent: AcOEt/Cyclohexane 4:6) affording a faint beige oil. Yield 95%. The analytical data are consistent with those in previous literature.



^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.35 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 5.6 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.20 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 5.6 Hz, 1H, CH_{Ar}), 4.33 (q, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.2 Hz, 2H, CH_2), 1.37 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.2 Hz, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 162.1 (C), 131.3 (C), 129.5 (CH_{Ar}), 125.9 (CH_{Ar}), 119.8 (C), 61.1 (CH_2), 14.3 (CH_3).

(25) Ethyl 2-(4-cyanophenyl)thiophene-3-carboxylate

A round bottom flask of 50 mL was charged with ethyl 2-bromothiophene-3-carboxylate (500mg, 2.13 mmol, 1.0 Equiv.), (4-cyanophenyl)boronic acid (1.2 equiv.), potassium carbonate (3.0 equiv.) and tetrakis(triphenylphosphine)palladium (0) (5 mol%). The system was capped and a mixture of 10 mL of dioxane-water (3:1) was added, and then put under nitrogen atmosphere. The mixture was stirred at 100°C for 12 h. The reaction mixture was poured into cold water and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine, dried over Na_2SO_4 and solvents were removed in vacuo. Then the obtained crude product was purified by column chromatography (silica gel; eluent: AcOEt/Cyclohexane 4:6) affording a light-yellow pasty solid, mp 72 °C. Yield 45%.

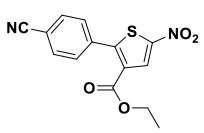


^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.68 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.60 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.55 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 5.4 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.34 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 5.4 Hz, 1H, CH_{Ar}), 4.21 (q, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.2 Hz, 2H, CH_2), 1.21 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.2 Hz, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 162.9 (C), 148.1 (C), 138.3 (C), 131.7 ($2CH_{Ar}$), 130.8 ($2CH_{Ar}$), 130.5 (CH_{Ar}),129.5 (C), 125.5 (CH_{Ar}), 118.7 (C), 112.3 (C), 60.9 (CH_2), 14.2 (CH_3). Analysis calculated for $C_{14}H_{11}NO_2S$: HRMS: *m/z* $[M+Na]^+$ calculated 280.0403; found 280.0400.

[480] H. Bronstein, R. S. Ashraf, Y. Kim, A. J. P. White, T. Anthopoulos, K. Song, D. James, W. Zhang, I. McCulloch, *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32*, 1664–1668.

(26) Ethyl 2-(4-cyanophenyl)-5-nitrothiophene-3-carboxylate

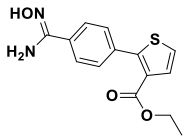
Compound **26** was obtained following the general procedure 3 (for nitration) with a solution containing (**25**) (100 mg, 0.15 mmol, 1.0 equiv.). The crude product was purified by column chromatography (silica gel; eluent: AcOEt/Petroleum ether, 1:9) affording a pale pink solid, mp 154 °C. Yield 65%.



^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 8.32 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.76 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.63 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 4.26 (q, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 7.1 Hz, 2H, CH_2), 1.26 (t, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 7.1 Hz, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 161.1 (C), 153.2 (C), 135.5 (C), 132.2 ($2CH_{Ar}$), 130.7 ($2CH_{Ar}$), 130.5 (CH_{Ar}), 128.8 (C), 118.1 (2C), 114.2 (C), 62.0 (CH_2), 14.1 (CH_3). Analysis calculated for $C_{14}H_{10}N_2O_4S$: HRMS: *m/z* $[M+Na]^+$ calculated 325.0254; found 325.0252.

(27) Ethyl 2-(4-(*N*′-hydroxycarbamimidoyl)phenyl)thiophene-3-carboxylate

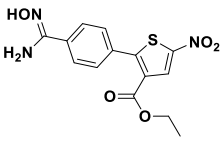
Compound **27** was obtained following the general procedure 2 (for amidoxime) from (**25**) (120 mg, 0.47 mmol, 1 equiv.). The reaction mixture was monitored by TLC (eluent: CH_2Cl_2/MeOH 95/5, Rf 0.22). The crude product was purified by column chromatography (silica gel; eluent: CH_2Cl_2/MeOH 95/5). Yield 61%. The product was obtained as a light brown oily solid.



^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.66 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.53 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.51 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 5.4 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.27 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 5.4 Hz, 1H, CH_{Ar}), 5.00 (br s, 2H, NH_2), 4.19 (q, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 7.1 Hz, 2H, CH_2), 1.20 (t, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 7.1 Hz, 3H, CH_3). OH not observed. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 163.4 (C), 152.5 (C), 149.8 (C), 135.3 (C), 132.4 (C), 130.3 ($2CH_{Ar}$), 130.2 (CH_{Ar}), 128.7 (C), 125.5 ($2CH_{Ar}$), 124.6 (CH_{Ar}), 60.8 (CH_2), 14.2 (CH_3). Analysis calculated for $C_{14}H_{14}N_2O_3S$: HRMS: *m/z* $[M+H]^+$ calculated 291.0798; found 291.0798.

(28) Ethyl 2-(4-(*N*′-hydroxycarbamimidoyl)phenyl)-5-nitrothiophene-3-carboxylate

Compound **28** was obtained following the general procedure 2 (for amidoxime) from **26** (70 mg, 0.23 mmol, 1 equiv.). The reaction mixture was monitored by TLC (eluent: CH_2Cl_2/MeOH 97/3, Rf 0.22). The crude product was purified by column chromatography (silica gel; eluent: CH_2Cl_2/MeOH 97/3). The product was obtained as a light yellow solid, mp 169 °C. Yield 65%.



^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 8.29 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.72 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.3 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$), 7.56 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 8.3 Hz, 2H, $2CH_{Ar}$),5.24 (br s, 2H, NH_2), 4.25 (q, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 7.1 Hz, 2H, CH_2), 1.39 (t, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 7.1 Hz, 3H, CH_3). OH not observed. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 161.5 (C), 155.2 (C), 152.4 (C), 149.6 (C), 133.7 (C), 132.9 (C), 130.7 (CH_{Ar}), 130.3 ($2CH_{Ar}$), 128.0 (C), 126.1 ($2CH_{Ar}$), 62.8 (CH_2), 14.2 (CH_3). Analysis calculated for $C_{14}H_{13}N_3O_5S$: HRMS: *m/z* $[M+H]^+$ calculated 336.0649; found 336.0647.

6. Annexes

1. Formulaire de projet Tres cantos OPEN LAB.
2. Calcul de similarité

enabling innovation for under-researched infectious diseases | tres cantos OPEN LAB FOUNDATION

PRE-SUBMISSION INQUIRY

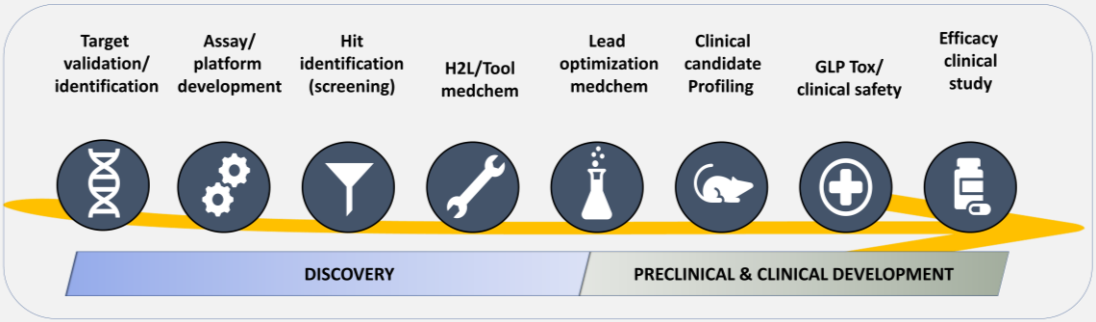
TITLE: Innovative structures at the service of neglected diseases: original amidoximes as antileishmanial agents.

APPLICANT/S DETAIL/S (NAME,INSTITUTION AND EMAIL)

Oscar Leonardo Avendaño L[1]., Dr. Christophe Curti[2], Pr. Patrice Vanelle[3].
Laboratoire de Pharmaco-Chimie Radicalaire (LPCR), Institut de Chimie Radicalaire, Aix-Marseille Université.
Faculté de Pharmacie, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 05, France.

1. oscar-leonardo.avendano-leon@etu.univ-amu.fr, PhD Student.
2. christophe.curti@univ-amu.fr, PhD supervisor.
3. patrice.vanelle@univ-amu.fr, PhD co-supervisor and LPCR Director.

1. PROJECT MODALITY



The project that we would like to submit to TCOLF for consideration is placed on **Discovery step** and specifically in the modality of **Target identification**. An H2L / tool optimization would also be considered.

2. DISEASE



Our project is focused on Leishmaniasis.

3. DESCRIBE YOUR CONCEPT

Our project concerns the synthesis of compounds that can be considered as original structures with antileishmanial properties, which involves amidoxime derivatives presenting a 2,3-dihydrofuran heterocyclic scaffold (Figure 1, a and b). Leishmaniasis, as a neglected disease, require new oral treatments, safer and less expensive. In the reference below [a, b, c, d, e, f] all our literature linked to the project is reported.

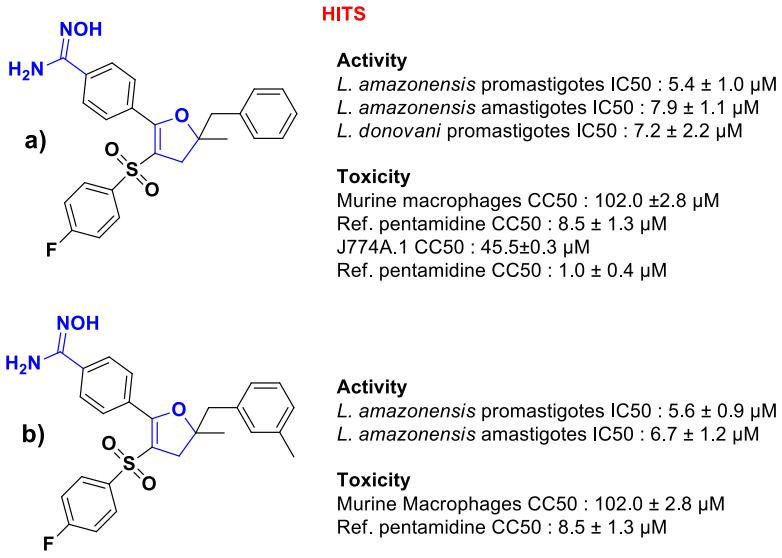


Figure 1. Dihydrofuran amidoximes with interesting biological results on Leishmania strains.

We performed the principal scaffold modifications in a ligand-based approach through an efficient and easily reproducible three-step synthesis (Figure 2).

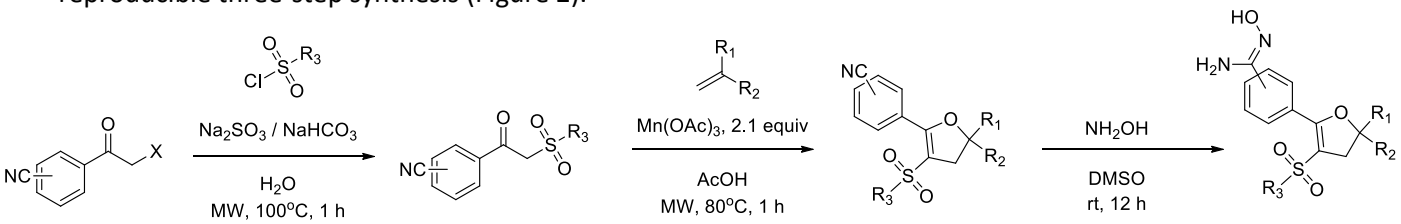


Figure 2. Synthesis of dihydrofuran amidoximes.

Currently, with our PhD student, we are modulating a variety of chemical substituents at position 4, mainly with the aim of improving activity without significantly increasing toxicity and improving physicochemical properties such as solubility (Figure 3).

Today, we receive the support from the Institute Oswaldo Cruz in Brazil to perform the test *in vitro,* however we would like to progress towards understanding the mechanism of action and the target identification which are still unknown.

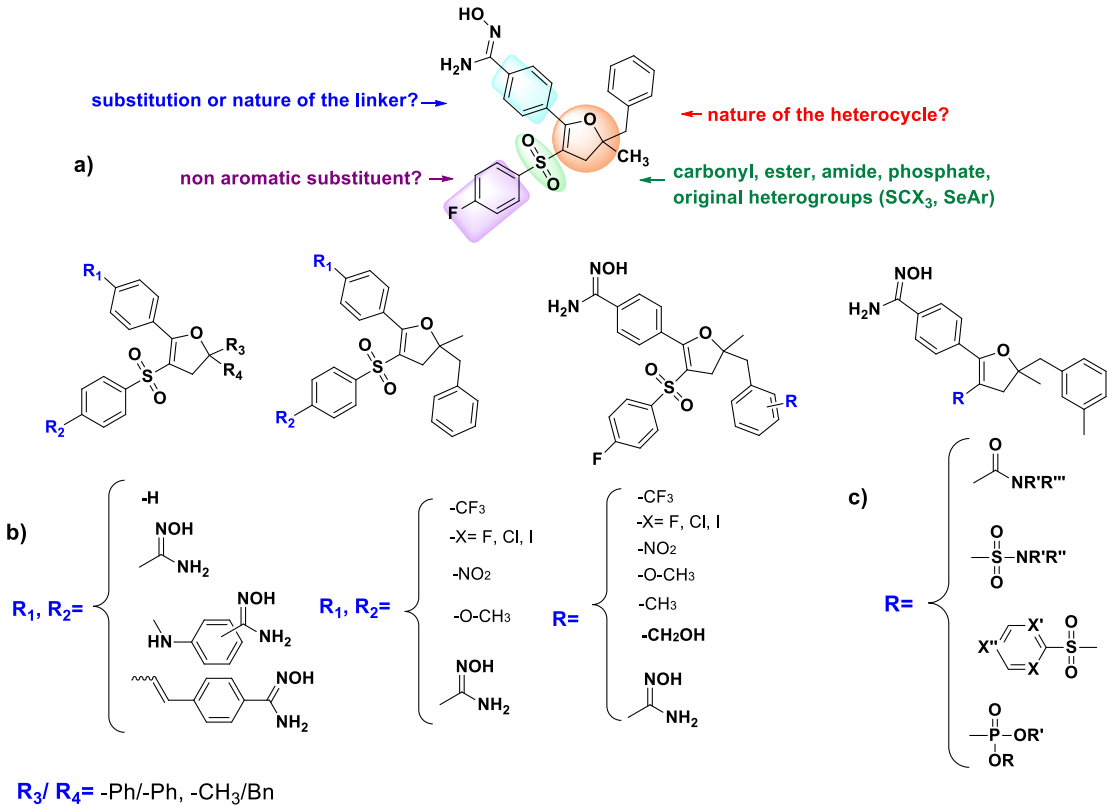


Figure 3. ***Modulation of dihydrofuran amidoximes with antileishmanial properties. a) principal scaffold, b) previous modulation, c) current work.***

A promising selectivity index has been identified in different strains of Leishmania compared to pentamidine. For this reason, mechanistic studies are desirable to elucidate the pharmacological mechanism of amidoximes and thus understand the observed activity. We then hope to evaluate different hypothesis such as Nitric Oxide (NO) production, the pro-drug mechanism and the potential of amidoximes to prevent the emergence of drug resistance, all with the goal of opening new frontiers for drug development and Leishmania treatment. In this context, the target identification would provide access to a structure-based approach and potentially accelerate our project.

References:

a) *Microwave improved manganese (III) acetate based oxidative cyclizations of alkenes with β-ketosulfones.* Christophe Curti, Maxime D. Crozet, Patrice Vanelle. *Tetrahedron*, **2009**, 65, 200-205.

b) *Synthesis and evaluation of original amidoximes as antileishmanial agents.* Ahlem Bouhlel, Christrophe Curti, Aurélien Dumètre, Michèle Laget, Maxime D. Crozet, Nadine Azas, Patrice Vanelle. *Bioorg. Med. Chem*., **2010**, 18, 7310-7320.

c) *Efficient one-pot double Buchwald-Hartwig coupling reaction on 5-phenyl-4-phenylsulfonyl-2,3-dihydrofuran derivatives*. Ahlem Bouhlel, Christophe Curti, Omar Khoumeri, Patrice Vanelle. *Tetrahedon Lett*., **2011**, 52, 1919-1923.

d) *Synthesis and evaluation of monoamidoxime derivatives: Toward new antileishmanial compounds*. Lucie Paloque, Ahlem Bouhlel, Christophe Curti, Aurélien Dumètre, Pierre Verhaeghe, Nadine Azas, Patrice Vanelle. *Eur. J. Med. Chem*., **2011**, 46, 2984-2991.

e) *New series of monoamidoxime derivatives displaying versatile antiparasitic activity.* Clémence Tabelé, Anita Cohen, Christophe Curti, Ahlem Bouhlel, Sébastien Hutter, Vincent Rémusat, Nicolas Primas, Thierry Terme, Nadine Azas, Patrice Vanelle. *Eur.J. Med. Chem*., **2014**, 87, 440-453.

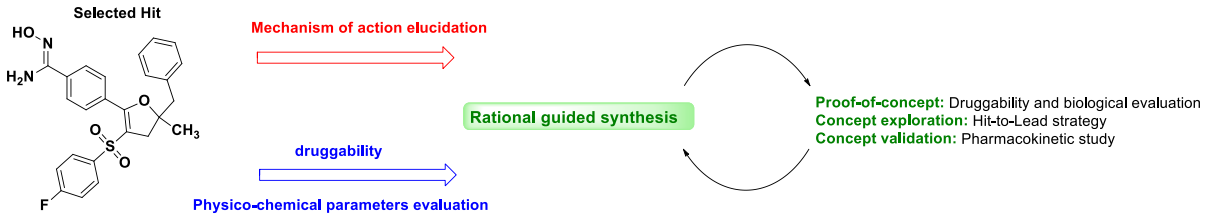
f) *Original antileishmanial hits: Variations around amidoximes.* Clémence Tabélé, Viviane dos S. Faiões, Fabien Grimaud, Eduardo Caio Torres-Santos, Omar Khoumeri, Christophe Curti, Patrice Vanelle. *Eur, J Med Chem*., **2018**, 148, 154-164.

4. EXPECTED PROJECT IMPACT

Leishmaniasis remains a neglected disease, therefore the resource optimization is very important to continue the research toward new medicines.

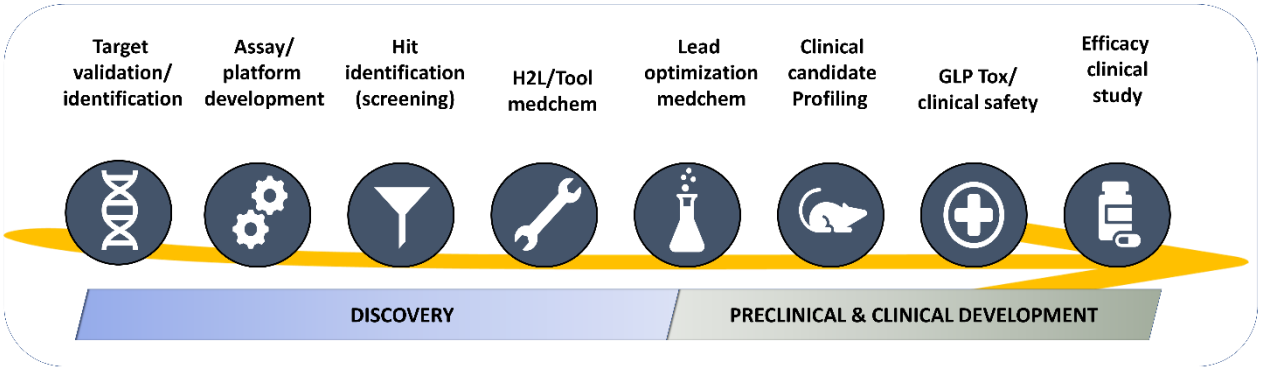
Our project main objective is to develop a **novel and original drug candidate** active against different strains of *Leishmania*, and with moderate to low toxicity. Such a new innovative treatment will have a **high societal impact** especially *via* the **enrichment of the therapeutic arsenal** (fight against resistance, combination therapy).

Moreover, the discovery of an amidoxime mediated original mechanism of action has **an important global scientific impact.** Results will be **valuated** by scientific international publications of high impact factor, and if the project can identify a lead in amidoxime series, the data will be **patented.**



PROJECT MODALITIES

Projects on scope include innovative approaches in the field of endemic infectious diseases that could offer a new solution to an existing gap that can benefit from collaboration with the pharma industry in the fields of gut health (including bacterial enteric infections and environmental enteric dysfunction, EED), malaria, tuberculosis, and kinetoplastid mediated infections. In addition to discovery projects, since April 2019 TCOLF is accepting applications in the translational and clinical (up to Ph2a) space.



- Discovery Projects: Co-location is a key factor for eligibility. The maximum budget is expected to be ≤ £200K.

- Preclinical and Clinical Development projects: Co-location is not expected. Due to the greater anticipated cost of these projects, the scope will be restricted to: advanced lead molecules (robust *in vivo* activity on relevant models with a clear developable profile), clinical candidates, and repurposing opportunities. The maximum budget is expected to be ≤ £500K.

Target validation / identification: Projects on scope include generation of chemical probes for chemical validation of novel genetically validated targets and the use of chemoproteomic approaches for target identification/engagement.

Assay / platform development: Development and miniaturization of quantitative assays for screening (LTS, MTS, HTS) or medicinal chemistry programs.

Hit Identification: Screening campaigns of focus compound sets and / or diversity compound sets from the GSK collection.

H2L / tool optimization: Program focused on optimizing a molecule (*in vitro active* with none or poor *in vivo* activity) to deliver a selective (in the case of target base programs) advance analogue with a Pharmacokinetic compatible with an oral dosing for proof of concept in animal model (lead compound).

Lead optimization: Medicinal chemistry program focused on optimizing a lead/s molecule/s (*in vivo active*) to deliver a new analogue with a robust in-vivo efficacy subjected to full *in vivo* pharmacological profiling for the target indication and a tailored toxicological safety assessment to finally qualify as a clinical candidate. Depending on the candidate-likeness of the lead molecule, the project can be considered Discovery Projects or Preclinical & Clinical Development Projects

Clinical candidate profiling: Tailored plan to evaluate potential clinical candidates (small molecules, biologicals, etc). Projects on scope include non-GMP scale-up, tailored non-GLP *in vivo* preclinical safety and/or efficacy studies.

GLP Tox / clinical safety: Tailored plan to evaluate clinical safety of novel candidates (small molecules, biologicals, etc). Projects on scope include GMP scale-up, tailored GLP *in vitro* and *in vivo* safety studies and Clinical safety (Phase 1 studies)

Efficacy clinical studies: Tailored clinical Probe of Concept (Phase 2 studies).

Annexe 2

***Open source* Python**

Pour le présent projet, nous avons travaillé avec deux des méthodes les plus utilisées : la méthode de Tanimoto qui dépend des descripteurs moléculaires du logiciel utilisés pour les calculs, et la méthode euclidienne basée sur des données expérimentales. La méthode de Tanimoto a été explorée avec des logiciels open source comme R ainsi que la bibliothèque RDKit, que nous pouvons programmer sur Python en utilisant les SMILES de chaque composé. Pour le modèle Euclidien, nous avons effectué les calculs en utilisant les données expérimentales de RMN du proton et du carbone.

Similarité de Tanimoto : La similarité de Tanimoto, mesure utilisée dans la comparaison des empreintes moléculaires, évalue la similarité entre deux composés chimiques. Dans le contexte des composés chimiques, elle mesure le chevauchement des caractéristiques structurelles. Elle calcule le ratio des caractéristiques communes dans leurs empreintes binaires par rapport aux caractéristiques totales présentes dans l'un ou l'autre ou les deux composés. Un coefficient de Tanimoto plus élevé, allant de 0 à 1, indique une plus grande similarité structurelle. Par exemple, un coefficient de 0,7 signifie un chevauchement de 70 % des caractéristiques, suggérant une ressemblance moléculaire substantielle. Cette métrique est essentielle en chimiométrie pour comparer les composés en fonction de leurs caractéristiques structurelles.

Similarité Euclidienne : La similarité euclidienne est calculée comme l'inverse de la distance euclidienne, qui mesure la distance en ligne droite entre deux points dans cet espace multidimensionnel. Elle indique à quel point deux molécules sont proches en fonction des paramètres utilisés comme unité de mesure. Pour les empreintes moléculaires ou descripteurs, la similarité euclidienne calcule la racine carrée de la somme des différences au carré entre les valeurs descriptrices correspondantes de deux molécules. Une distance euclidienne plus petite implique une plus grande similarité, indiquant des molécules avec des caractéristiques similaires.

Résultats préliminaires

Tanimoto : Le coefficient de similarité a été calculé par rapport au composé de référence sulfone Hit, l'algorithme de Tanimoto étant disponible dans le package Open-source R, *cmp,similarity*,

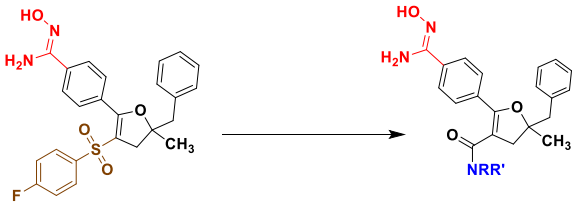
Le calcul de similarité a utilisé les descripteurs de la bibliothèque {Chem-mineR}. L'ensemble des données avec l'information des structures chimiques a été créé en dessinant les molécules dans ChemDraw® et exporté sous forme de fichier *sdf.*

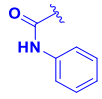
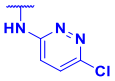
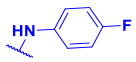
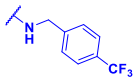
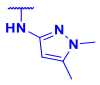
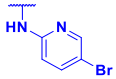
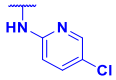
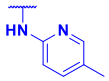
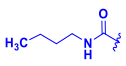
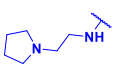
i: Similarité de Tanimoto

En explorant les résultats de similarité, nous observons une difficulté et une limitation d'importance :

- la difficulté réside dans le processus de validation de l'analyse ;
- la limitation vient du fait que le modèle ne permet pas de générer des prototypes de nouvelles molécules. Ainsi, une composante supplémentaire basée sur l'apprentissage automatique sera donc nécessaire mais ne sera pas envisagée dans le cadre de ce projet de doctorat.

Cependant, certaines observations présentées ci-dessous, peuvent être émises.

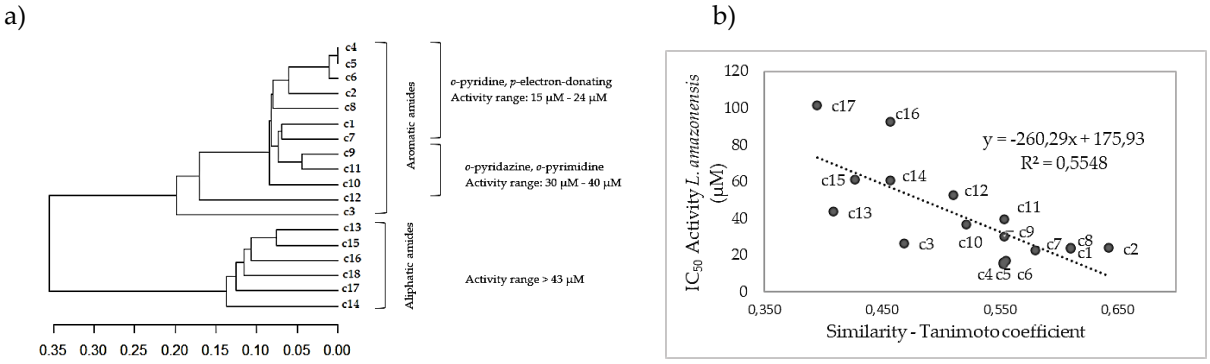


Molécule	CI_{50} (µM/72h) [a]	Coefficient de similarité[b]	Molécule	CI_{50} (µM/72h) [a]	Coefficient de similarité[b]
	23,8 ± 1,02	0,610		36,4 ± 1,03	0,522
	23,8 ± 1,02	0,642		39,4 ± 1,02	0,554
	26,4 ± 1,02	0,469		52,5 ± 1,03	0,511
	15,0± 1,03	0,553		43,6 ± 1,02	0,409
	16,0± 1,03	0,553		60,4 ± 1,01	0,457
	17,0± 1,02	0,555		61,1 ± 1,00	0,427
	22,4± 1,02	0,580		92,6 ± 1,04	0,457
	23,5± 1,04	0,610		101,7± 1,03	0,395
	29,9± 1,02	0,554		>128	0,435

a Promastigotes de *L, amazonensis*, les valeurs représentent les moyennes ± SD de trois expériences indépendantes,
b Mesure de similarité basée sur l'indice de Tanimoto entre les dérivés amides et le Hit sulfone,

Premièrement, le score de similarité a été obtenu en référence au Hit (avec le groupement sulfone), ce qui nous a permis de générer le graphique activité-similarité présenté ci-dessous. Avec une régression linéaire présentant un coefficient de détermination (R^2) de 0,5548, les données suggèrent une relation modérée entre les variables explorées.

Deuxièmement, les dérivés dihydrofuran-3-carboxamide peuvent être divisés en deux groupes : les dérivés aliphatiques qui perdent leur activité, et les amides aromatiques qui conservent une activité modérée. De plus, avec cette méthode, il est possible de rassembler les composés avec une activité légèrement meilleure (portant un noyau pyridine).



a) dendrogramme avec les donnes de similarité, b) analyses de régression entre les variables activité-similarité pour les dérivés d'amidoximes dihydrofuran-3-carboxamide.

ii : Similarité Euclidienne

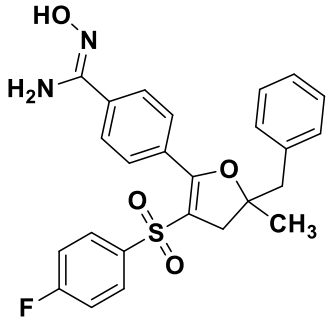
Dans le contexte de l'analyse RMN, chaque déplacement chimique (chemical shift) pour un composé donné peut être considéré comme une dimension dans l'espace. Par conséquent, chaque composé est représenté comme un vecteur contenant ses déplacements chimiques. Pour comparer deux composés, on calcule la distance euclidienne entre leurs vecteurs respectifs. Une petite distance indique que les composés ont des déplacements chimiques similaires, et donc des structures probablement proches. Une grande distance indique une dissimilarité.

Ce QR code est utilisé pour la visualisation du code de programmation sur Python.

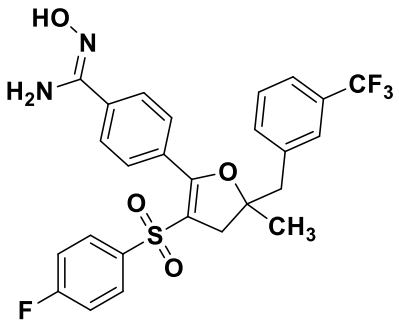
Un indice de similarité avec le composé de référence a été établi (C, Tabélé et al, / European Journal of Medicinal Chemistry 148 (2018) 154-164). Les calculs sont effectués directement à partir des résultats expérimentaux de RMN ^{1}H et ^{13}C.

Les résultats des distances euclidiennes pour le composé de référence en ^{1}H RMN montrent des composés très proches : les composés **51**, **57** et **63** affichent une distance de 0,00. Cela signifie qu'ils sont pratiquement identiques au composé de référence en termes de déplacements chimiques des protons.

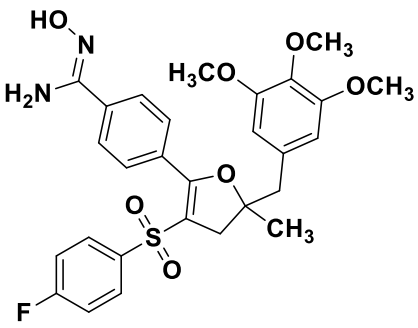
Les numéros d'identification des composés, ci-dessous, sont les mêmes que dans la publication susmentionnée pour faciliter l'identification.



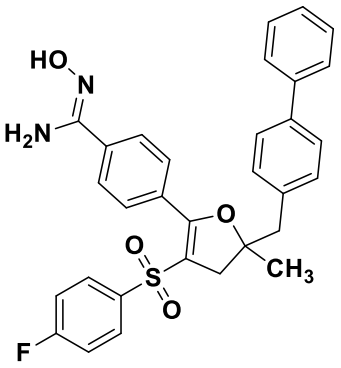
composé de référence (CI_{50} = 6,7 ± 0,2 µM)
Activité contre *L. amazonensis* promastigotes



51



57



63

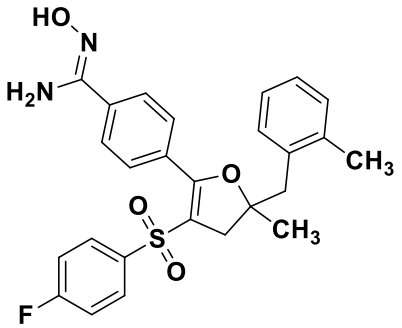
Activité contre *L. amazonensis* promastigotes :

CI_{50} = 6,7 ± 0,2 µM CI_{50} = 45,6 ± 2,2 µM CI_{50} = 14,8 ± 0,3 µM

Deux observations sont à retenir en utilisant ce modèle : 1) malgré une similarité élevée, la variable « activité » (contre la forme promastigote) peut varier en incluant des composés moins actifs par

rapport à la référence ; 2). D'autres composés ont montré des indices de similarité plus faibles, comme le composé **60**, alors qu'il présente une meilleure activité que le composé de référence.

Le composé **60** montre des distances de 2,32 selon la référence.



60

Activité contre *L. amazonensis* promastigotes :
CI_{50} = 2,1 ± 0,4 µM

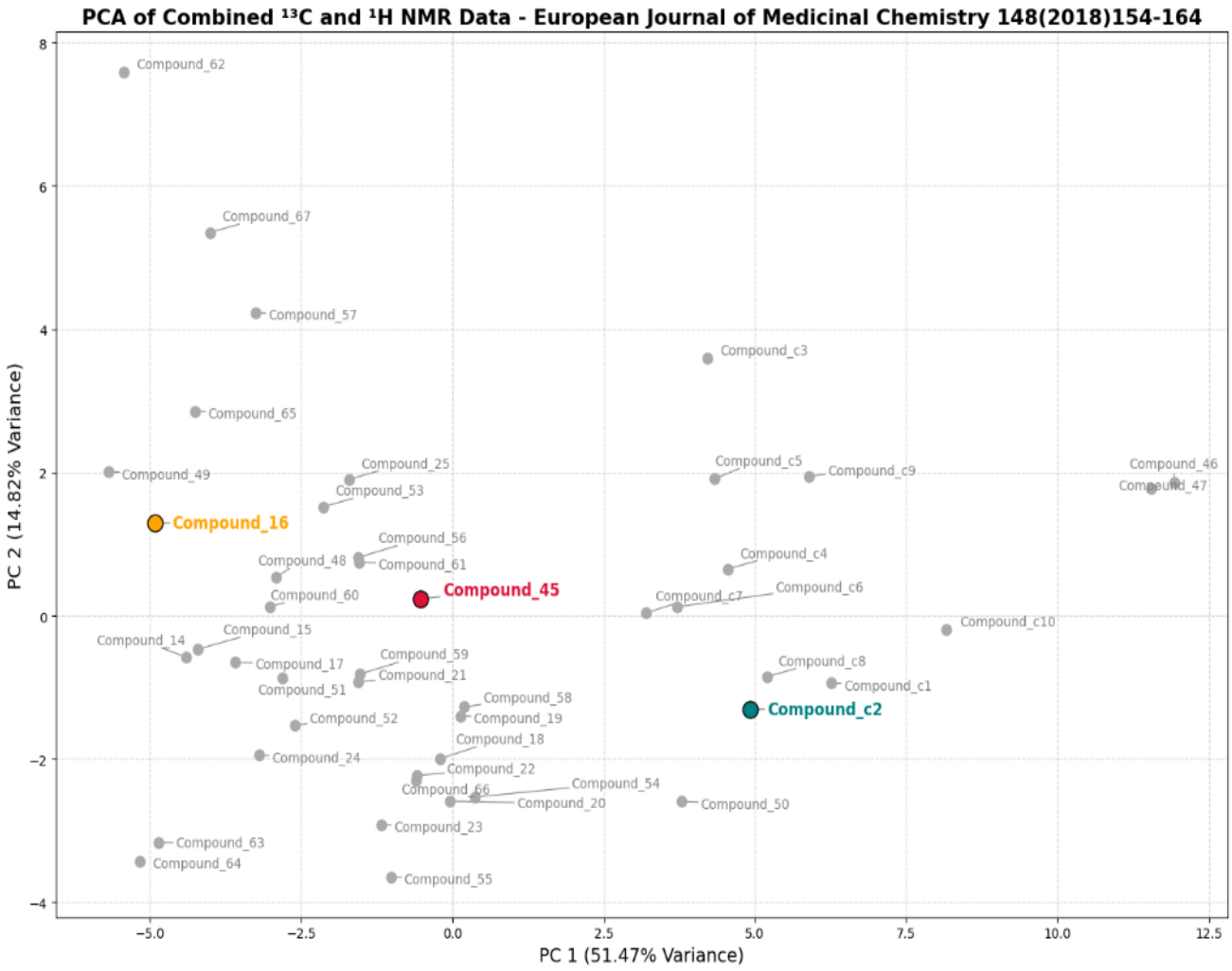
Bien que ces données ne soient pas concluantes, elles permettent cependant d'explorer des alternatives pour l'analyse des molécules d'amidoxime.

Ces distances bien que similaires prouvent l'existence d'autres variations dans les déplacements chimiques des protons, probablement dus à des différences mineures dans les groupes fonctionnels ou l'environnement chimique. Notons cependant que le composé **60** s'éloigne davantage de la molécule de référence que celle avec le biphényle, ce qui ne semble pas très intuitif à première vue.

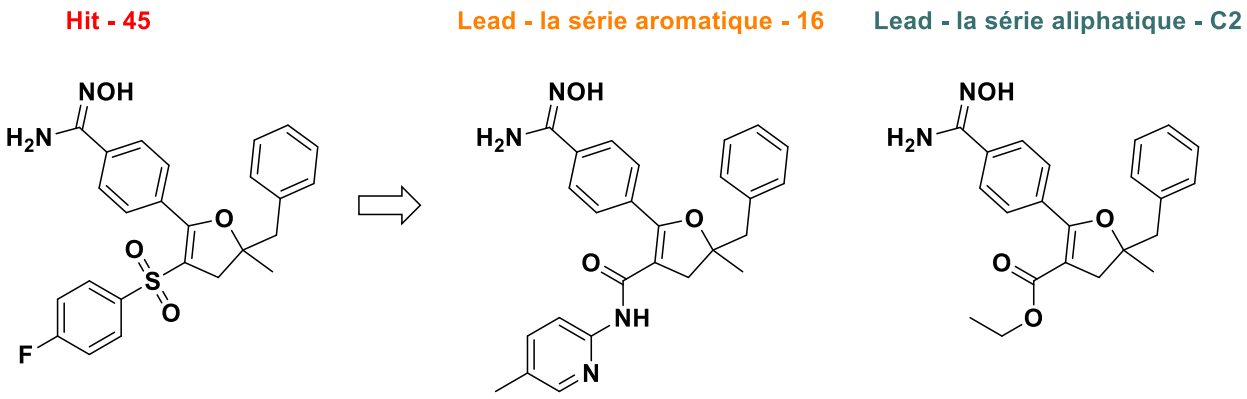
Ainsi, une exploration plus profonde pourrait déboucher sur de nouveaux moyens pour mesurer les changements apportés dans le project « Hit-to-Lead ».

Un test complémentaire a été réalisé avec la méthode PCA concernant les molécules identifiées tout au long de la présente recherche, le composé **C2** de la publication *EJMC* et le composé **16** inclus dans la publication soumise à *Molecules*.

Avec cette analyse PCA (Analyse en Composantes Principales), il est possible de regrouper, et donc de différencier, les composés évalués dans le présent projet en 2 groupes :, la série aliphatique (en verte, **C2**), et la série aromatique (en jaune, composé **16**) :



Précisons que le composé **45** (en rouge) est le composé sulfone ou Hit de référence, et en gris, les composés générés lors de l'identification du Hit de référence **45** (travail préliminaire pour ce projet).



Nous pouvons conclure que les molécules ayant des valeurs de similarité analogues ne conduisent pas nécessairement à des activités biologiques équivalentes. L'observation d'une activité biologique contre des souches de *L. amazonensis* ou *L. donovani*, ainsi que contre les formes promastigote et amastigote, sont des variables qui ajoutent de la complexité au modèle. Néanmoins, le caractère innovant pris en compte pour cette méthode de calcul de similarité est l'utilisation de données RMN expérimentales. Il s'agit d'une première approximation, car les données correspondent à la RMN 1D du proton et du carbone, et des informations complémentaires pourront être exploitées avec la RMN 2D, pouvant conduire à de nouveaux travaux.

Résumé

Structures innovantes au service de maladies tropicales négligées : amidoximes antileishmaniennes

Ce travail de thèse, portant sur la découverte de nouveaux candidats médicaments contre la leishmaniose chez l'homme, a pour objectif de poursuivre les analyses de pharmacomodulation sur des composés Hits précédemment identifiés au sein du laboratoire LPCR. Ces molécules, caractérisées par un noyau hétérocyclique 4,5-dihydrofurane, et le groupement amidoxime, sont des structures originales. Afin de guider cette étape d'optimisation, divers critères ont été pris en compte : la possibilité d'administration par voie orale, l'utilisation de méthodes de synthèse les plus simples possibles, la recherche d'un meilleur profil activité-toxicité. Du fait du manque d'informations sur le mécanisme d'action ou la cible spécifique de ces molécules, les modifications structurelles proposées ont adopté une approche basée sur le ligand (*Ligand-Based Drug Design*). Des réactions de cyclisation radicalaire oxydative médiées par l'acétate de manganèse ont permis d'accéder à de nouveaux composés 4,5-dihydrofuranes substitués en position 3 principalement par des dérivés carboxyliques de type amide ou ester. Le criblage phénotypique *in vitro* a été effectués avec le soutien de l'Institut Oswaldo Cruz au Brésil, mesurant l'activité contre une souche de *Leishmania amazonensis* promastigote, ainsi que pour les molécules les plus prometteuses, la toxicité dans des cellules de macrophages murins et l'activité contre la forme amastigote intracellulaire. Ce travail a permis d'identifier des composés avec des index de sélectivité très favorables.

Mots clés : Amidoxime, *Leishmania*, Pharmacomodulation, 2,3-dihydrofurane, acétate de manganèse.

Innovative structures serving neglected tropical diseases: antileishmanial amidoximes

This thesis, focused on discovering new drug candidates against human leishmaniasis, aimed to continue the pharmacomodulation analyses of Hit compounds previously identified at the LPCR laboratory. These molecules, characterized by a 4,5-dihydrofurane heterocyclic scaffold bearing an amidoxime group, are original structures. Various criteria were considered to guide this Hit-to-Lead project: the possibility of oral administration, the use of the simplest possible synthesis methods, and the pursuit of a better activity-toxicity profile. Due to the lack of information on the mechanism of action or specific target of these molecules, the proposed structural modifications adopted a Ligand-Based Drug Design approach. Oxidative radical cyclisation reactions mediated by manganese acetate allowed access to new 4,5-dihydrofurane compounds, substituted at position 3 by carboxylic derivatives, such as amide or ester type. The *in vitro* phenotypic screening was carried out with the support of the Oswaldo Cruz Institute in Brazil, measuring activity against *Leishmania amazonensis* promastigote strains, as well as, among the molecules selected with the best activity, toxicity in murine macrophage cells and activity against the intracellular amastigote form was performed.

Keywords: Amidoxime, *Leishmania*, Pharmacomodulation, 2,3-dihydrofuran, manganese acetate.

Résumé

Structures innovantes au service de maladies tropicales négligées : amidoximes antileishmaniennes

Ce travail de thèse, portant sur la découverte de nouveaux candidats médicaments contre la leishmaniose chez l'homme, a pour objectif de poursuivre les analyses de pharmacomodulation sur des composés Hits précédemment identifiés au sein du laboratoire LPCR. Ces molécules, caractérisées par un noyau hétérocyclique 4,5-dihydrofurane, et le groupement amidoxime, sont des structures originales. Afin de guider cette étape d'optimisation, divers critères ont été pris en compte : la possibilité d'administration par voie orale, l'utilisation de méthodes de synthèse les plus simples possibles, la recherche d'un meilleur profil activité-toxicité. Du fait du manque d'informations sur le mécanisme d'action ou la cible spécifique de ces molécules, les modifications structurelles proposées ont adopté une approche basée sur le ligand (*Ligand-Based Drug Design*). Des réactions de cyclisation radicalaire oxydative médiées par l'acétate de manganèse ont permis d'accéder à de nouveaux composés 4,5-dihydrofuranes substitués en position 3 principalement par des dérivés carboxyliques de type amide ou ester. Le criblage phénotypique *in vitro* a été effectués avec le soutien de l'Institut Oswaldo Cruz au Brésil, mesurant l'activité contre une souche de *Leishmania amazonensis* promastigote, ainsi que pour les molécules les plus prometteuses, la toxicité dans des cellules de macrophages murins et l'activité contre la forme amastigote intracellulaire. Ce travail a permis d'identifier des composés avec des index de sélectivité très favorables.

Mots clés : Amidoxime, *Leishmania*, Pharmacomodulation, 2,3-dihydrofurane, acétate de manganèse.

Innovative structures serving neglected tropical diseases: antileishmanial amidoximes

This thesis, focused on discovering new drug candidates against human leishmaniasis, aimed to continue the pharmacomodulation analyses of Hit compounds previously identified at the LPCR laboratory. These molecules, characterized by a 4,5-dihydrofurane heterocyclic scaffold bearing an amidoxime group, are original structures. Various criteria were considered to guide this Hit-to-Lead project: the possibility of oral administration, the use of the simplest possible synthesis methods, and the pursuit of a better activity-toxicity profile. Due to the lack of information on the mechanism of action or specific target of these molecules, the proposed structural modifications adopted a Ligand-Based Drug Design approach. Oxidative radical cyclisation reactions mediated by manganese acetate allowed access to new 4,5-dihydrofurane compounds, substituted at position 3 by carboxylic derivatives, such as amide or ester type. The *in vitro* phenotypic screening was carried out with the support of the Oswaldo Cruz Institute in Brazil, measuring activity against *Leishmania amazonensis* promastigote strains, as well as, among the molecules selected with the best activity, toxicity in murine macrophage cells and activity against the intracellular amastigote form was performed.

Keywords: Amidoxime, *Leishmania*, Pharmacomodulation, 2,3-dihydrofuran, manganese acetate.