HAL
open science

Conception et synthèse d'une sonde à base de cryptophane pour l'exploration de la neuro-inflammation par IRM du Xénon hyperpolarisé

Clement Vigier

▶ **To cite this version:**

Clement Vigier. Conception et synthèse d'une sonde à base de cryptophane pour l'exploration de la neuro-inflammation par IRM du Xénon hyperpolarisé. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2021. Français. NNT : 2021NORMC416 . tel-03934587

HAL Id: tel-03934587

https://theses.hal.science/tel-03934587v1

Submitted on 11 Jan 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Conception et synthèse d'une sonde à base de cryptophane pour l'exploration de la neuro-inflammation par IRM du Xénon hyperpolarisé

Présentée et soutenue par
CLEMENT VIGIER

Thèse à caractère confidentiel soutenue le 01/12/2021 devant le jury composé de		
M. ALEXANDRE MARTINEZ	Professeur des universités, École Centrale de Marseille	Rapporteur du jury
MME OLIVIA REINAUD	Professeur des universités, Université Paris 5 Descartes	Rapporteur du jury
MME EMMANUELLE DUBOST	Maître de conférences, Université Caen Normandie	Membre du jury
MME ISABELLE GOSSE	Professeur des universités, ENS CHIMIE BIOL PHYSIQUE BORDEAUX	Président du jury
M. FREDERIC FABIS	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Directeur de thèse
M. THOMAS CAILLY	Maître de conférences HDR, Université Caen Normandie	Co-directeur de thèse

Thèse dirigée par FREDERIC FABIS et THOMAS CAILLY, Centre d'études et de recherches sur le médicament de normandie (Caen)

UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE

ED 508 NC Normande de Chimie

A Madame Olivia Reinaud

Professeur à l'Université de Paris Descartes

A Monsieur Alexandre Martinez

Professeur à l'Ecole Centrale de Marseille

A Madame Isabelle Gosse

Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie, de Biologie et de Physique de Bordeaux

A Monsieur Frédéric Fabis

Professeur à l'Université de Caen Normandie

A Monsieur Thomas Cailly

Maître de conférences à l'Université de Caen Normandie

A Madame Emmanuelle Dubost

Maître de conférences à l'Université de Caen Normandie

Qui me font l'honneur de lire ce manuscrit

Et de juger mon travail

En témoignage de ma profonde reconnaissance

Remerciements

Je tiens à remercier dans un premier temps tous les membres du jury, le Pr Olivia Reinaud et le Pr Alexandre Martinez qui ont accepté d'être rapporteurs et le professeur Isabelle Gosse qui a bien voulu examiner mon travail, me permettant d'une certaine manière de boucler la boucle commencée par un stage de M2 avec vous. Je remercie également la Région Normandie pour avoir financé ma thèse et le Pr Patrick Dallemagne, directeur du CERMN, pour m'avoir accueilli pendant ces trois années au sein du laboratoire.

Je tiens à adresser ensuite mes plus profonds remerciements au Pr Frédéric Fabis et au Dr Thomas Cailly pour m'avoir fait confiance et m'avoir permis de réaliser cette thèse. Fred, merci d'avoir toujours pris le temps de passer voir comment se passer ma thèse, pour ton aide et tes conseils précieux, pour nos discussions toujours très intéressantes sur et en dehors de la chimie, pour les sessions padel et cette partie de golf à Granville. Thomas merci pour ton aide et ton soutien précieux, pour ta bienveillance et ta disponibilité, pour toutes ces idées que tu as pu me donner pendant ces trois ans, et surtout pour tes talents de barbecue ! A vous je dois également associer Emmanuelle Dubost ou Manu, toujours prête à répondre à toutes mes questions, même les plus bêtes ! Merci pour ton soutien dans et en dehors du labo, ton sourire, ta bonne humeur et ton optimisme à toute épreuve. Tu m'as impressionné par ta connaissance sur le monde des cryptos, merci de m'en avoir transmis une petite partie et j'espère que la team crypto au CERMN ne fait que commencer !

Je remercie également les autres membres permanents de l'équipe, à savoir Christine Fossey, alias Christoche pour avoir toujours veillé à notre sécurité (même si je râlais parfois), Silvia Stiebling pour ton aide précieuse dans la vie de labo de tous les jours et Valérie Collot pour ta bienveillance et tes conseils durant les group meeting.

Je remercie ensuite ceux qui m'ont apporté leur aide dans les différents travaux de ma thèse, notamment Jana pour ton aide sur les structures RX qui t'ont donné du fil à retordre, mais également les personnes extérieures au labo qui se sont impliqués, plus particulièrement Hussein El Siblani qui a réalisé toutes les expériences de xénon hyperpolarisé, qui m'a permis de mieux comprendre son fonctionnement et avec qui nous avons passé une bonne quantité d'heures à bidouiller sur les différents montages pour obtenir des données exploitables. Je pense aussi à Thomas Bonnard qui m'a aidé à réaliser les manips de marquage des anticorps et qui m'aura appris (un peu) à communiquer avec des biologistes.

Evidemment, cette thèse n'aurait pas été la même sans la présence et le soutien quotidien de mes collègues et amis du CERMN. Si on fait dans l'ordre je pense tout d'abord aux « anciens » doc pour leur accueil et m'avoir aidé à m'intégrer aussi facilement. Martina toujours bienveillante, Camille, dite « Camoule » toujours avec le sourire, partante pour

aller boire un verre et nous sortir une camoulade dont tu as le secret et surtout un talent certain pour le golf. Enfin le dernier de cette triplette, Victor, dit « Babinou » qui aura été le premier à m'accueillir dans le CM038 et à m'aider sur mes premières manips, tu m'auras fait découvrir la ville de Caen et surtout les lieux incontournables du port, mention spéciale pour « le temple ». Entre les discussions chimie, foot, sport, les soirées ligue des champions, les « perfect week », les arrêts à « manger la nuit » en rentrant de soirée et les fameux messages « 🤔 ? 😈 » c'est bien dommage (ou pas ?) que je ne sois pas arrivé plus tôt au labo !

Merci ensuite aux moins anciens, FX pour les soirées à la coloc et pour ton stock de bonbons, Windbedema et Alexandra avec qui j'ai partagé un temps le bureau, pour leur accueil et leur gentillesse, mention spéciale pour Alex qui aura supporté ma musique et mes bêtises dans le labo. Je remercie également Reynald pour ta bonne humeur permanente, tes blagues parfois douteuses, les discussions improbables du midi et pour ce fameux congrès à Nottingham. Merci à Pauline/popo/Cindy pour m'avoir aussi bien accueilli, pour le soutien pendant nos colonnes interminables du soir, pour toutes les discussions (tournant souvent autour de la bouffe) pour se remonter le moral en salle de pause et pour ta bonne humeur communicative. Merci à Caro, membre des « gens sûrs » pour m'avoir aidé à m'intégrer, pour toutes ces « pau-pauses » et ces discussions (et quelques prises de têtes parfois), pour les congrès et pour ta capacité à passer du rire aux larmes en un rien de temps ! Merci aussi pour tes coups de folies genre danse bizarre ou cris intempestifs et ta collection de canettes de coca, pour ta motivation toujours intacte pour aller boire un verre, et les nombreuses soirées mémorables (ou pas) qui nous aurons bien fait décompresser, au final on aura bien plus rit qu'autres chose !

Je remercie aussi mes co-doctorant qui se sont embarqués dans ces trois années en même temps que moi. Merci à Mirka qui aura presque appris parfaitement le français mais qui m'aura quand même bien fait travailler mon anglais, tu as toujours eu un mot d'encouragement pour moi et tu m'auras quand même bien fait rire avec tes insultes en Serbe à la balance ! Merci à Johanna, dit Jojo, dit Kéké tunning, pour ces trois années où on aura bien rigolé, pour tous ces délires, pour ces discussions plus ou moins sérieuses, pour ces after-work au V&B et pour ta bienveillance. Merci à Line, dit Linou (ou bien ne serait-ce petite fleur ?), un temps sèche et cassante (j'étais obligé déso !) je suis content qu'on ait pu sympathiser, comme quoi même un bordelais et une toulousaine peuvent être amis ! Merci pour toutes ces discussions au labo, pour toutes ces soirées au Bercail, tous ces bons repas passés avec la quintuplette, pour ces week-ends à Paris, ces vacances à Toulouse, bref pour tous ces bons moments qui permettent de penser à autre chose que la thèse !

Je remercie également les « nouveaux » doctorants, Chloé, Valentin, Damien et Marc, avec qui on aura quand même passé de bons moments malgré le COVID au travers des journées

plage, des week-ends d'intégration, d'une sortie au Mont Saint-Michel et des soirées au bar. Je vous souhaite le meilleur pour la suite de vos thèses.

Et bien sûr je remercie Hugo avec qui on a partagé le même bureau pendant plus de deux ans, il y a eu des hauts et des bas mais je suis ravi d'avoir passé ces deux années avec toi. Merci pour toutes ces discussions, ces pauses café, ces gâteaux du lundi, ces délires, ces rigolades, pour toutes ces soirées au Bercail, pour tous ces trajets retour à pas d'heure (pas dans la direction du Zénith !), pour tous ces cafés/bières/pizzas/repas/soirées chez toi, pour ces sessions squash, bref pour tous ces supers moments qui ont rendus ma thèse plus facile et qui auront certainement contribuer au travail que j'ai pu fournir.

Merci aussi aux anciens du labo, Cédrice le pillier (de bar) du labo, dit 👆 Cécé 👆, toujours là pour une blague mais aussi pour une discussion de chimie, donner un coup de main ou un conseil et qui a tendance à montrer son affection avec le majeur. Merci Rémi pour ton aide en RMN pour mettre en place les expériences de xénon au labo, mais aussi pour ta bonne humeur, tes blagues pas toujours de bon goût et pour m'avoir permis, avec Stéphane et Cécé, de faire du badminton toutes les semaines. Marie, toujours de bonne humeur et prête à aider, qui contribue pour beaucoup à la bonne ambiance au labo. Bertille dont on a squatté le bureau un moment pour les pauses café, toujours joyeuse, bienveillante, prête à discuter et partante pour une sortie le week-end.

Je remercie également les différents post doc que j'ai pu côtoyer durant ma thèse : Gonzalo, Benjamin, Léna, Nico, Amanda et Jason, ainsi que les différents stagiaires. Mention spéciale pour petite Camille capable d'envoyer une punchline avec le sourire, pour Kéké, autre membre des « gens sûrs », toujours partant pour aller boire un verre (de perroquet), aller voir un film au ciné ou tout simplement discuter. Bien sûr un grand merci à Pierre, venu former avec Hugo l'équipe des inséparables du CM038, pour le super boulot que nous avons pu fournir, malgré un confinement, et pour tous ces moments de discussions et de rigolades passés dans le bureau.

Un grand merci à ceux que je n'ai pas encore évoqués, qui m'ont très bien accueilli et ont contribuer à ces trois belles années : la plateforme Sreening & Drugabilité, Aurélie, Anne-Claire, Audrey, Sophie, Marc, Peggy de la chimiothèque, la plateforme chémoinformatique avec Ronan, Alban et Jean-Luc, la team PIPP avec Anne-So et Charline (merci pour ton aide pour les TP) ainsi que Christophe et Pascaline.

Enfin je tiens à remercier ma famille, et plus particulièrement ma sœur et mes parents, qui m'ont toujours soutenu et permis d'en arriver là où je suis aujourd'hui, et bien sûr Claire, pour sa présence au quotidien.

Table des matières

Abréviations **5**

Avant-propos **8**

Chapitre I : De l'imagerie médicale au développement de l'IRM du xénon hyperpolarisé 11

1. L'imagerie médicale 13
   1.1. Historique et définition 13
   1.2. La Tomographie par Emission de Positrons (TEP) 14
   1.3. La Tomographie par Emission Mono-Photonique (TEMP) 16
   1.4. La tomodensitométrie, Rayons X 18
   1.5. Imagerie optique 20
   1.6. Les ultrasons 22
2. L'imagerie par Résonnance Magnétique (IRM) 23
   2.1. Définition et généralités 23
   2.2. Principe 24
      2.2.1. RMN 24
      2.2.2. De la RMN à l'IRM 25
      2.2.3. Images IRM T1 et T2 26
      2.2.4. L'IRM anatomique (IRMa) 27
      2.2.5. L'IRM fonctionnelle (IRMf) 27
   2.3. Les agents de contraste en IRM 28
      2.3.1. Agents de contraste T1 29
      2.3.2. Agents de contraste T2 31
      2.3.3. Traceurs hétéronucléaires 33
      2.3.4. CEST 34
      2.3.5. Espèces hyperpolarisées 36
3. Le Xénon en RMN et IRM 39
   3.1. Propriétés et généralités 39

3.2. Le xénon en IRM 41
3.2.1. Hyperpolarisation par pompage optique 42
3.2.2. Méthodes d'injection 45
3.2.3. HyperCEST 46
3.3. Structures encapsulant le Xénon 48
3.3.1. Cyclodextrines 49
3.3.2. Hémicarcérands et calixarènes 50
3.3.3. Auto-assemblages 51
3.3.4. Pillararènes 52
3.3.5. Cucurbiturils 52
3.3.6. Cryptophanes 53
4. Les cryptophanes 54
4.1. Les cyclotrivératrylènes 54
4.1.1. Synthèse 55
4.1.2. Chiralité 56
4.1.3. Conformation 58
4.2. Les cryptophanes 59
4.2.1. Structure et nomenclature 59
4.2.2. Stéréochimie 60
4.2.3. Conformation 61
4.2.4. Synthèse 62
4.2.5. Fonctionnalisation 65
4.3. Cryptophane et xénon 68
4.4. Biosondes à base de cryptophanes 72
5. Présentation du projet et objectifs 86

Chapitre 2 : Synthèse d'une biosonde pour la détection de neuro-inflammation 87

1. La neuro-inflammation 89
2. Analyse rétrosynthétique 91

3. Synthèse du cryptophanol 93
3.1. Synthèse du CTB 94
3.2. Première voie de synthèse 94
3.3. Deuxième voie de synthèse 96
4. Fonctionnalisation du cryptophane 99
4.1. Cryptophane-NHS 99
4.2. Cryptophane-Maléimide 100
5. Greffage du cryptophane à l'anticorps 101
6. Conclusion 102

Chapitre 3 : Nouvelle voie de synthèse de CTV de symétrie C_1 105

1. Présentation du projet 107
2. CTV de symétrie C_3 109
2.1. Approche rétrosynthétique 109
2.2. Synthèse du CTV-3 OMe 109
3. CTV de symétrie C_1 111
3.1. Analyse rétrosynthétique 111
3.2. Synthèse du CTV C_1 112
4. Synthèse optimisée 115
5. Conclusion 116

Chapitre 4 : synthèse de nouveaux CTV et cryptophanes azotés 119

1. Présentation du projet 121
2. Analyse rétrosynthétique 122
3. Synthèse de CTV azotés 124
3.1. CTV-1N 124
3.2. CTV-2N 127
3.2.1. Azote non protégé 127

3.2.2. Azote protégé 129
3.3. CTV-3N 130
4. Synthèse de cryptophanes azotés 133
4.1. Cryptophane [222] 1N 133
4.1.1. Synthèse 133
4.1.2. Fonctionnalisation 134
4.2. Cryptophane [111] 1N 135
4.3. Cryptophane [222] 2N 137
5. Propriétés du cryptophane [222] 1N 139
5.1. Cristallographie 139
5.2. RMN du xénon 141

Conclusions et perspectives 147
Partie expérimentale 153
Références Bibliographiques 259

Abréviations

AC : Acétate
AVC : Accident Vasculaire Cérébral
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
ATP : Adénosine TriPhosphate

BOLD : Blood Oxygenated Level Dependent
BuLi : ButhylLithium

CB : CucurBituril
CCM : Chromatographie sur Couches Minces
CEST : Chemical Exchange Saturation Transfert
CTB : Cyclotriguaiacylène
CTV : CycloTriVératrylène
CT-Scan : Computerized Tomography Scan

DCM : DiChloroMethane
DHP : DiHydroPyrane
DSC : DiSuccinimidyl Carbonate
DMF : N, N-DiMéthylFormamide
DMSO : DiMéthylSulfOxyde
DNP : Dynamic Nuclear Polarization
DOTA : acide 1,4,7,10-tétraaza cyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique
DTPA : penta(carboxyméthyl)diéthylène triamine
DQP : dipyrrolylquinoxaline

EGF : Epidermal Growth Factor
ESI : ElectroSpray Ionisation
ET : Ethyl

FDG : FluoroDésoxyGlucose

Gd : Gadolinium

HPLC : Chromatographie en phase Liquide Haute Performance

IRM : Imagerie par Résonnance Magnétique
ITC : Titrage Calorimétrique Isotherme

kDa : kiloDalton
kHz : kiloHertz

LC-MS : Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
LCR : Liquide Céphalo-Rachidien

MIBG : MétaIdoBenzylGuanidine
MION : Micron Iron Oxide Nanoparticle
MMP-7 : MétalloProtase Matricielle 7
MPIO : MicroParticules d'Oxyde de fer

NMDA : N-Méthyl-D-Aspartate
NHS : N-HydroxySuccinimide
NTA : Acide NitrilotriAcétique

PBS : Phosphate-Buffered Saline
PFC : PerFluoroCarbure
PHIP : Polarisation Induite par du Para-Hydrogène
ppm : parties par million
PPTS : acide Pyridinium *Para*-ToluèneSulfonique

QTOF : Quadrupole – Time Of Flight

RMN : Résonnance Magnétique Nucléaire
RX : Rayons X

scFV : Fragment Variable d'anticorps à chaîne unique
$ScOTf_3$: Triflate de scandium
SEOP : Spin Exchange Optical Pumping).
SNC : Système Nerveux Central
SPIO : Smal Particle Iron Oxide

TBAF : Tetra-*n*-ButylAmmonium Fluoride
TBDMS : *Tert*-ButylDiMéthylSilyle
TE : Temps d'Echo
TEP : Tomographie par Emission de Positrons
TEMP : Tomographie par Emission Mono Photonique
THF : TetraHydroFurane

THP : TétraHydroPyrane
TIPS : TriIsoPropylSilyle
TMSI : IodoTriMéthylSilyle
TR : Temps de Répétition

UHPLC : Chromatographie Liquide à Ultra Haute Performance
USPIO : Ultra Smal Particle Iron Oxide

VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1

Avant-propos

Ces travaux, financés par la région Normandie par le biais d'un financement RIN, ont été réalisés au sein du Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie de l'Université de Caen Normandie, sous la direction du Professeur Frédéric Fabis et du Dr Thomas Cailly. Ils ont été effectués en collaboration avec le laboratoire PhIND (Physiopathologie et imagerie des troubles neurologiques, INSERM, UMR-S 1237) et le LCS (Laboratoire de Catalyse et Spectrochimie, UMR CNRS 6506).

Depuis plusieurs années, les activités de recherche du CERMN s'orientent autour de deux axes principaux que sont la cancérologie et les neurosciences. Les projets menés dans cette deuxième thématique peuvent se diviser en deux aspects : la conception d'agents thérapeutiques et l'élaboration d'agents diagnostiques et/ou d'imagerie.

Le cadre de recherche de cette thèse se concentre sur la conception de nouveaux agents diagnostiques pour l'imagerie médicale IRM de la neuro-inflammation, phénomène physiopathologique du système nerveux central impliqué dans plusieurs pathologies comme l'AVC, la sclérose en plaque ou encore certaines maladies neurodégénératives. Les outils diagnostic développés ici ont la particularité d'utiliser du xénon hyperpolarisé comme agent de contraste innovant. Principalement focalisé sur la synthèse de cryptophanes, édifices chimiques capables d'encapsuler le xénon, mon projet est le premier de la sorte au sein du laboratoire et fait suite à des résultats préliminaires obtenus par l'équipe du Professeur Denis Vivien du laboratoire PhIND. Ils ont réussi à mettre en évidence la neuro-inflammation à un stade très précoce en utilisant des MPIO couplées à des anticorps spécifiques. Le projet principal de cette thèse consiste donc à remplacer ces MPIO par une alternative plus biocompatible, à savoir le xénon, et donc à synthétiser des biosondes à base de cryptophanes et de les coupler à ces anticorps. En parallèle, des recherches ont été menées pour mettre au point une voie de synthèse permettant l'accès à de nouveaux édifices chimiques, dérivés des cryptophanes, avec une structure inédite.

Ce manuscrit se divise en quatre parties dont la première sera une analyse bibliographique. Elle présentera tout d'abord l'état de l'art dans le domaine de l'imagerie médicale, et notamment la place de l'IRM dans ce contexte, avant de présenter la RMN et l'IRM du xénon hyperpolarisé, puis la synthèse et le développement de biosonde à base de cryptophane sera finalement abordé, afin d'établir une problématique et présenter les projets de cette thèse.

La seconde partie présentera les travaux de synthèse réalisés pour obtenir les cryptophanes visés ainsi que les marquages aux anticorps. La troisième partie portera ensuite sur le développement, la mise au point et l'optimisation d'une nouvelle voie d'accès à des CTV de symétrie C_1. Enfin, la dernière partie montrera l'emploi de cette nouvelle méthode de synthèse pour le design de nouvelles structures de cryptophanes ainsi que l'analyse de leurs caractéristiques par cristallographie et RMN du xénon.

Le travail de thèse réalisé au cours de ces trois années a été valorisé par un brevet, deux publications, une publiée et une en cours de rédaction, trois communications orales et six communications par poster.

Brevet :

Vigier, C., Dubost, E., Fabis, F., Groo, A.-C., Malzert-Fréon, A., Cailly, T.; Aza-cryptophanes, processes for preparation thereof, and their uses. Patent Application EP21305108.9. Filing 28 January **2021**.

Publications :

Vigier, C., Fossé, P., Fabis, F., Cailly, T., Dubost, E.; Controlled Access to C 1 -Symmetrical Cyclotriveratrylenes (CTVs) by Using a Sequential Barluenga Boronic Coupling (BBC) Approach, Adv. Synth. Catal., **2021**, Vol. 363 (15), 3756–3761.

Vigier, C., El Siblani, H., Sopkova De Oliveira Santos, J., Fabis, F., Cailly, T., Dubost E.; *Design and synthesis of cryptophazanes, a C_1-symmetrical cryptophane family bearing an apical nitrogen atom*. To be submited

Communications orales :

Vigier, C., Dubost, E., Vivien D., Fernandez, C., Cailly, T., Fabis, F.; *Exploring neuro-inflammation with hyper-polarised Xenon-129 Magnetic Resonance Imaging*, Journée de l'Ecole Doctorale Normande de Chimie, Caen, novembre **2020**.

Vigier, C., Dubost, E., Vivien D., Fernandez, C., Cailly, T., Fabis, F.; *Exploring brain-immune interaction with hyper-polarised Xenon-129 Magnetic Resonance Imaging*, Journées Jeunes Chercheurs, Caen, janvier **2020**.

Vigier, C., Dubost, E., Vivien D., Fernandez, C., Cailly, T., Fabis, F.; *Hyper-polarised Xenon-129 MRI for neuro-inflammation exploration*, Journée scientifique de la recherche, Institut Normand de Chimie Moléculaire, Médicinale et Macromoléculaire, Rouen, juin **2019**.

Poster :

Vigier, C., Dubost, E., Vivien D., Fernandez, C., Cailly, T., Fabis, F.; *Exploring brain-immune interaction with hyper-polarised Xenon-129 Magnetic Resonance Imaging*, Journées Jeunes Chercheurs, Caen, janvier **2020**.

Vigier, C., Dubost, E., Vivien D., Fernandez, C., Cailly, T., Fabis, F.; *Exploring neuro-inflammation with hyper-polarised Xenon-129 Magnetic Resonance Imaging*, Journées de Chimie Organique, Palaiseau, octobre **2019**.

Vigier, C., Dubost, E., Vivien D., Fernandez, C., Cailly, T., Fabis, F.; *Hyper-polarised Xenon-129 MRI for neuro-inflammation exploration*, Group for the Promotion of Pharmaceutical chemistry in Academia, Nottingham, août **2019**.

Vigier, C., Dubost, E., Vivien D., Fernandez, C., Cailly, T., Fabis, F.; *Exploring brain-immune interaction with hyper-polarised Xenon-129 Magnetic Resonance Imaging*, Journée de l'Ecole Doctorale Normande de Chimie, Caen, juillet **2019**.

Vigier, C., Dubost, E., Vivien D., Fernandez, C., Cailly, T., Fabis, F.; *Hyper-polarised Xenon-129 MRI for neuro-inflammation exploration*, Journée scientifique de la recherche, Institut Normand de Chimie Moléculaire, Médicinale et Macromoléculaire, Rouen, juin **2019**.

Chapitre I : De l'imagerie médicale au développement de l'IRM du xénon hyperpolarisé

1. L'imagerie médicale

1.1. Historique et définition

L'imagerie médicale regroupe l'ensemble des moyens d'acquisition et de restitution d'une image du corps humain vivant à partir de différents phénomènes physiques, et à les interpréter à des fins diagnostiques, thérapeutiques ou de surveillance de l'évolution d'une pathologie.

La découverte et l'utilisation de rayons X (RX) en 1895 par le physicien allemand Wilhelm Röntgen fût le premier exemple de technique d'imagerie médicale. En se basant sur la différence d'absorption des rayons en fonction de la densité des tissus traversés, il réalise le premier cliché « photographique » de la main de sa femme.[1] Depuis, un grand nombre de techniques d'imagerie ont vu le jour suivant la découverte de plusieurs phénomènes physiques.[2] L'utilisation des RX permettra ainsi d'effectuer la première artériographie au début des années 20. Les années 30 verront quant à elle l'apparition du premier microscope électronique grâce à Ernest Ruska et Max Kroll en 1931, ainsi que la découverte par Irène et Frédéric Joliot-Curie de la radioactivité artificielle en 1934. Un an plus tard, le principe de l'imagerie moléculaire fut posé par George de Hevesy en étudiant la circulation sanguine grâce à une solution de sodium radioactif. En découlera en 1962 le premier instrument de tomographie par émission de positions ou TEP-Scan, et la première caméra TEP en 1974.

Le principe de résonnance magnétique nucléaire (RMN) sera découvert par les physiciens Edward Purcell et Felix Bloch à la fin des années 40, dont le professeur Paul Lauterbur se servira pour réaliser la première imagerie par résonnance magnétique (IRM). Les ultrasons, bien que découverts quarante ans plus tôt mais utilisés seulement dans un cadre militaire, ne seront employés qu'au milieu des années 50 dans le domaine médical. D'abord utilisés seulement pour l'observation du corps humain, ils permettront dans les années 70 l'écoute des battements du cœur d'un fœtus. Enfin, dans la même décennie, la tomodensitométrie ou CT-scan pour Computerized Tomography, combinant des images RX transversales d'un corps pour l'obtention d'une image 3D vit le jour. Récemment, c'est le développement de méthodes d'imagerie dites multimodales qui émergent, combinant les techniques d'au moins deux modes d'imagerie pour combiner leurs avantages, s'affranchissant ainsi de leurs limitations respectives.

Ce n'est finalement qu'au début des années 1990 que le terme d'imagerie médicale sera réellement employé grâce aux évolutions technologiques réalisées dans les domaines des mathématiques et informatiques, ainsi que par la généralisation de ces méthodes dans les milieux médicaux. Aujourd'hui, différentes méthodes complémentaires d'imagerie sont

---

[1] Webb, S., *The Contribution, History, Impact and Future of Physics in Medicine*, Acta Oncol. (Madr), **2009**, Vol. 48 (2), 169–177.

[2] Schultz-Sikma, E. A. et al., *Supramolecular Chemistry in Biological Imaging In Vivo*, Supramol. Chem., **2012**, (i), 1–26.

utilisées dans les hôpitaux pour réaliser des diagnostics *in vivo* et peuvent être classées en deux catégories :

- Les méthodes d'imagerie moléculaire fonctionnelle qui permettent de visualiser un processus biologique ou le fonctionnement d'un organe. Cette catégorie regroupe les techniques d'imagerie nucléaire que sont la Tomographie par Emission de Positrons (TEP) et la Tomographie Par Emission Mono-Photonique (TEMP), l'IRM fonctionnelle pour le cerveau ainsi que l'imagerie optique.
- Les méthodes d'imagerie moléculaire ou anatomique qui permettent la visualisation d'os, d'organes ou de tissus. On compte notamment parmi elles la tomodensitométrie, l'échographie ou encore l'IRM.

Etant à la jonction de 5 disciplines que sont la médecine, la physique, la chimie, les mathématiques et l'informatique, l'imagerie médicale n'a cessé d'évoluer et de se perfectionner pour devenir toujours plus efficace et précise. Dans ce domaine le chimiste intervient dans le développement d'un outil fiable, spécifique de la cible étudiée, efficace et sans toxicité. Après une rapide présentation des principales techniques existantes nous nous attarderons plus en détails sur l'IRM avant de nous focaliser plus particulièrement sur le xénon hyperpolarisé et son utilisation en imagerie.

1.2. La Tomographie par Emission de Positrons (TEP)

La Tomographie par Emission de Positrons est une technique d'imagerie nucléaire fondée sur le phénomène d'annihilation caractéristique des isotopes radioactifs émetteurs β^+. Le radionucléide est introduit sur une molécule vectrice afin d'obtenir un radiotraceur injecté *in vivo*. Par désintégration, le radioisotope émet une particule β^+, appelée positron. Après dissipation d'une partie de son énergie par déplacement à travers les tissus (on appelle le chemin parcouru par cette particule, libre parcours moyen), il s'annihile avec un électron pour générer deux photons γ, de même énergie (511 keV), de même direction mais de sens opposés détectables par une couronne de caméras TEP entourant le patient. Ainsi lorsqu'une caméra détecte un signal il est possible de reconstruire le lieu de la désintégration par coïncidence lorsque la caméra TEP située à l'opposé reçoit le signal après un intervalle de temps adéquat. Les paires de photons détectées sont alors analysées et, suite à un traitement informatique, une image tridimensionnelle peut être recréée (Figure 1).

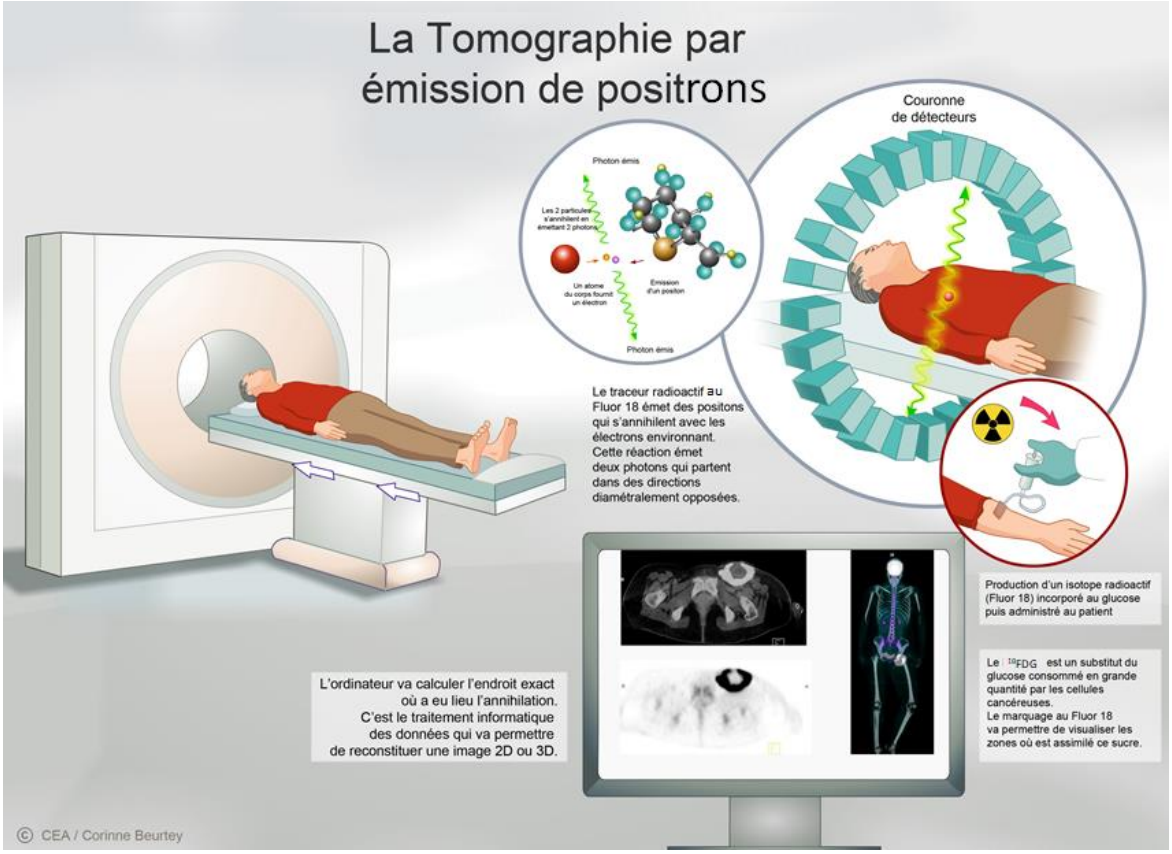


Figure 1 : Schéma de l'imagerie TEP[3]

Les radionucléides émetteurs β^+ sont généralement préparés à l'aide d'un cyclotron et on trouve principalement le carbone 11 (demi-vie : 20 min), l'azote 13 (10 min), l'oxygène 15 (2 min) et le fluor 18 (110 min).[4] Pour ces radioisotopes disposant d'un temps de demi-vie court, ils doivent être produit à proximité du lieu d'analyse et la présence de personnel spécialisé et formé.

Moins d'une dizaine de radiotraceurs possèdent une AMM pour un usage diagnostic en TEP. L'une des molécules les plus communément utilisée est le [^{18}F] Fluorodésoxyglucose (^{18}FDG), analogue du glucose comportant un fluor-18, notamment pour la détection de tumeurs, grandes consommatrices de sucre.[5] On peut aussi citer le [^{18}F]Flutemetamol[6] pour la détection de plaques amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer ou la [^{11}C]Choline[7] pour la détection des cancers de la prostate (Figure 2).

---

[3] https://cea.fr

[4] Delacroix, D. et al., *Guide Pratique Radionucléides et Radioprotection*Guid. Prat. radionucléides Radioprot., **2020**.

[5] Kelloff, G. J. et al., *Progress and Promise of FDG-PET Imaging for Cancer Patient Management and Oncologic Drug Development*, Clin. Cancer Res., **2005**, Vol. 11 (8), 2785–2808.

[6] Wong, D. F. et al., *An in Vivo Evaluation of Cerebral Cortical Amyloid with [18F]Flutemetamol Using Positron Emission Tomography Compared with Parietal Biopsy Samples in Living Normal Pressure Hydrocephalus Patients*, Mol. Imaging Biol., **2013**, Vol. 15 (2), 230–237.

[7] Castellucci, P. et al., *Is There a Role for 11C-Choline PET/CT in the Early Detection of Metastatic Disease in Surgically Treated Prostate Cancer Patients with a Mild PSA Increase <1.5 Ng/Ml?*, Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging, **2011**, Vol. 38 (1), 55–63.

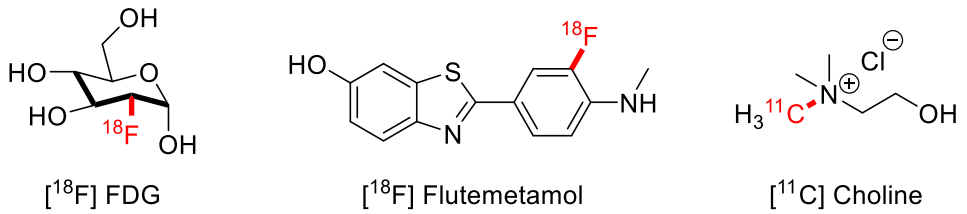


Figure 2 : Exemple de radioligands au fluor-18 et carbone-11

L'imagerie TEP est une technique plus sensible, mais également plus chère que la TEMP, qui est très utilisée en oncologie en clinique. Le développement de radiotraceurs et facilité par le fait qu'elle se base sur l'utilisation d'éléments bien connus en chimie organique pouvant être liés le plus souvent de manière covalente à la molécule d'intérêt. Enfin la principale limitation de cette méthode reste sa faible résolution spatiale (entre 4 et 7 mm),[8] et qui conduit à son utilisation couplée à un scanner RX.

1.3. La Tomographie par Emission Mono-Photonique (TEMP)

La TEMP ou SPECT en anglais (Single Photon Emision Computed Tomography) est une autre technique d'imagerie nucléaire qui se base sur le principe de scintigraphie, et qui nécessite des radioisotopes émetteurs γ. C'est une technique qui produit une image fonctionnelle par l'administration d'un radiopharmaceutique dont on détecte le rayonnement une fois qu'il a été capté par l'organe ou la cible à analyser. Elle est utilisée pour la visualisation de molécules, de métabolisme ou des fonctions biochimiques de cellules ou d'organes.

L'isotope radioactif est introduit sur une molécule vectrice formant un radiotraceur capable de se fixer sur une cible prédéfinie. Ce dernier est ensuite injecté dans l'organisme du patient et va se fixer sur sa cible après distribution dans l'ensemble du corps. Il émet alors par décroissance radioactive un rayonnement gamma détectable grâce à une gamma-caméra tournant à 360° autour du patient, permettant une acquisition de multiple projections 3D sous différents angles (Figure 3). Cette caméra est composée d'un collimateur qui agit comme un filtre vis-à-vis des rayonnements étudiés, et d'un scintillateur qui est un cristal d'iodure de sodium dopé au thallium ou de tellurure de cadmium-zinc capable d'absorber l'énergie du rayonnement et de réémettre par désexcitation un nouveau faisceau de photon. Enfin ce rayonnement lumineux et converti en signal électrique grâce à un photomultiplicateur, puis un algorithme complexe prenant en compte la position et la bio distribution du radionucléide permet l'obtention d'une image en trois dimensions. [9]

[8] Pichler, B. J. et al., *Latest Advances in Molecular Imaging Instrumentation*, J. Nucl. Med., **2008**, Vol. 49 (SUPPL.6), 5–23.
[9] Anger, H. O., *Scintillation Camera with Multichannel Collimators*, J. Nucl. Med., **1964**, Vol. 31 70–86.

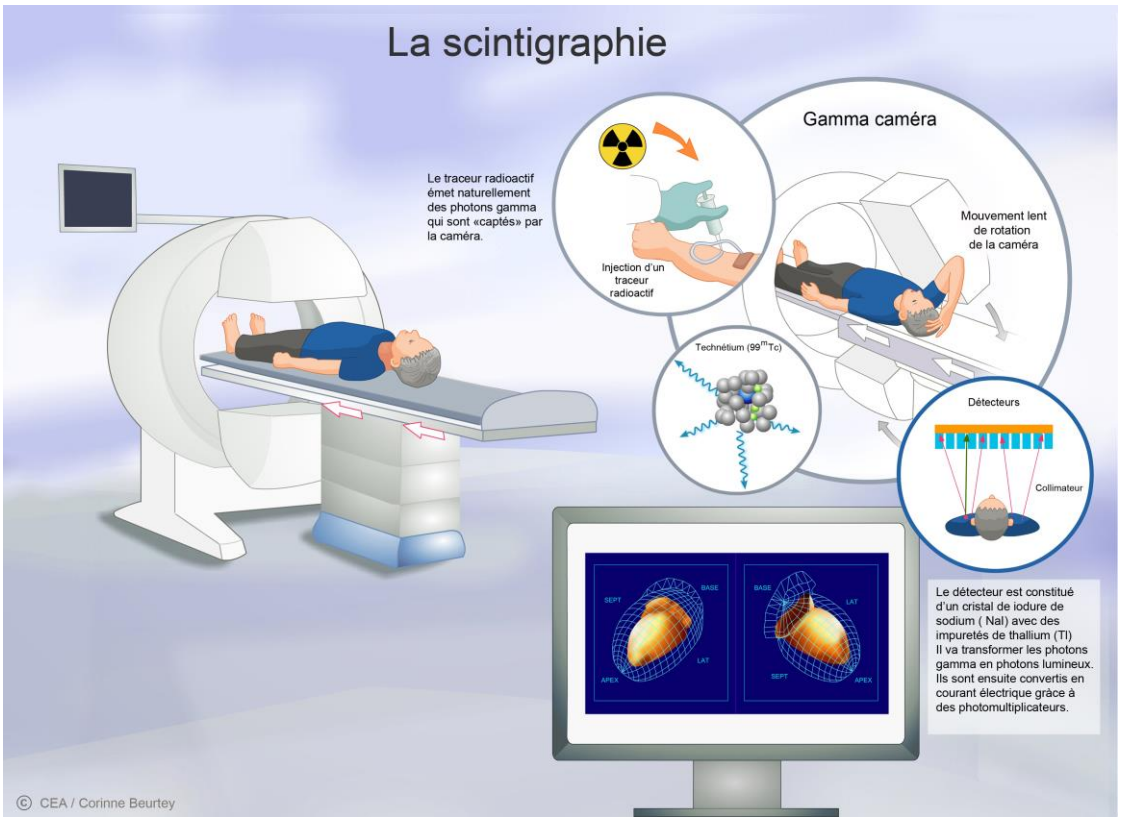


Figure 3 : Principe de l'imagerie TEMP[3]

Il existe un certain nombre de radionucléides émetteurs γ comme l'indium-111 (demi-vie : 2.8 jours) ou le xénon-133 (5.2 jours) mais les deux plus utilisés en clinique sont le technécium-99 (6 jours) et l'iode-123 (13.2 heures) et à ce jour une trentaine de composés radiopharmaceutiques disposent d'une AMM en France. Parmi ceux utilisant l'iode, on peut citer le [^{123}I] MIBG [10] pour la détection de tumeurs comme le neuroblastome et le phéochromocytome et qui est le plus utilisé pour la TEMP, ainsi que le [^{123}I] Ioflupane[11] pour le diagnostic de la maladie de Parkinson. A l'inverse de l'iode, le technétium, étant un métal de transition, ne peut pas être lié par une liaison covalente a une molécule d'intérêt et nécessite l'utilisation d'une molécule vectrice capable de le chélater. On peut par exemple citer le [^{99m}Tc] HMPAO[12] ou le [^{99m}Tc] Bicisate[13] pour visualiser les flux sanguins cérébraux et les possibles lésions (Figure 4).

[10] Sharp, S. E. et al., *MIBG in Neuroblastoma Diagnostic Imaging and Therapy*, Radiographics, **2016**, Vol. 36 (1), 258–278.

[11] Benamer, H. T. S. et al., *Accurate Differentiation of Parkinsonism and Essential Tremor Using Visual Assessment of [123I]-FP-CIT SPECT Imaging: The [123I]-FP-CIT Study Group*, Mov. Disord., **2000**, Vol. 15 (3), 503–510.

[12] Moretti, J. L. et al., *"Luxury Perfusion" With99mTc-HMPAO And123I-IMP SPECT Imaging during the Subacute Phase of Stroke*, Eur. J. Nucl. Med., **1990**, Vol. 16 (1), 17–22.

[13] Packard, A. B. et al., *Ictal and Interictal Technetium-99m-Bicisate Brain SPECT in Children with Refractory Epilepsy*, J. Nucl. Med., **1996**, Vol. 37 (7), 1101–1106.

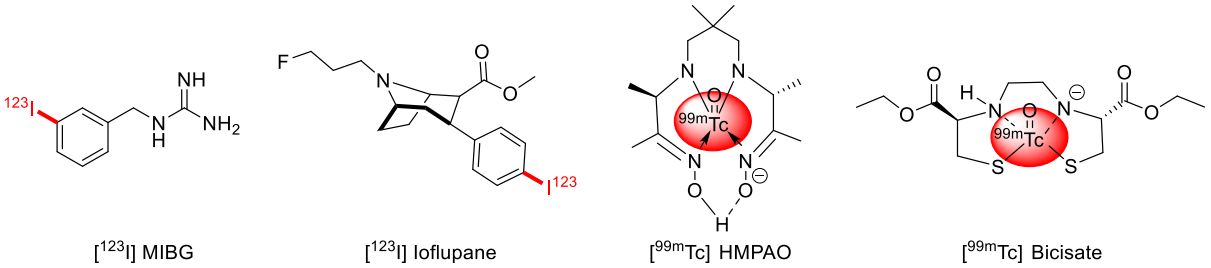


Figure 4 : Exemples de radioligands marqués à l'iode-123 ou au technétium-99

La TEMP offre un bon contraste entre les différentes régions d'un organe avec une bonne résolution spatiale. Cependant elle reste une technique couteuse avec un temps d'acquisition long (30 à 60 minutes).

1.4. La tomodensitométrie, Rayons X

La tomodensitométrie ou CT-scan (computed tomography) en anglais est une technique d'imagerie qui utilise un équipement spécifique des rayons X et permet l'obtention d'images transversales du corps humain. Elle est utilisée pour visualiser en détail les organes, os et tissus en jouant sur leur différence d'absorption des rayons X et est souvent couplée avec une autre méthode d'imagerie. L'appareillage constitué à la fois d'une source émettrice de rayons X et de récepteurs situés en face effectue le balayage du corps du patient à 360° pour obtenir des coupes transverses puis, après reconstruction par un traitement informatique, à donner une image 3D (Figure 5). Il est également possible d'obtenir des images montrant les évolutions d'un tissu ou d'un organe au cours du temps par une technique de reconstruction spatiale dynamique.[14]

[14] Sinak, L. J. et al., *The Dynamic Spatial Reconstructor: Investigating Congenital Heart Disease in Four Dimensions*, Cardiovasc. Intervent. Radiol., **1984**, Vol. 7 (3-4), 124-137.

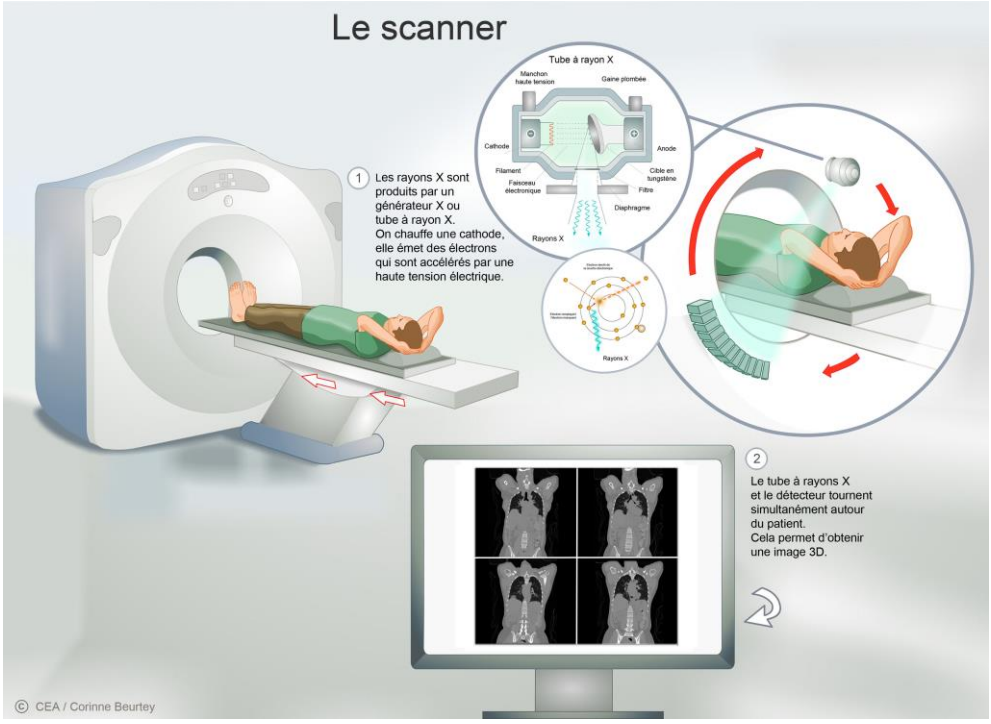


Figure 5 : Principe de la tomodensitométrie[3]

Afin d'avoir un meilleur contraste entre les différents tissus ou pour vérifier la présence d'une lésion particulière il est également possible d'utiliser des agents de contraste. Injectés par voie veineuse ou artérielle, ils vont avoir une forte capaciter à absorber les rayons X et vont ressortir comme une « tâche blanche » sur l'image. Ce sont pour la plupart des composés iodés hydrosolubles comme de diatrizoate et ses dérivés[15] pour la visualisation des vaisseaux sanguins, le système urologique et les cavités intra-articulaires. Il est également utilisé en clinique des suspensions de sulfates de baryum,[16] pour un meilleur contraste des os et poumons ainsi que lors d'un examen du tube digestif.

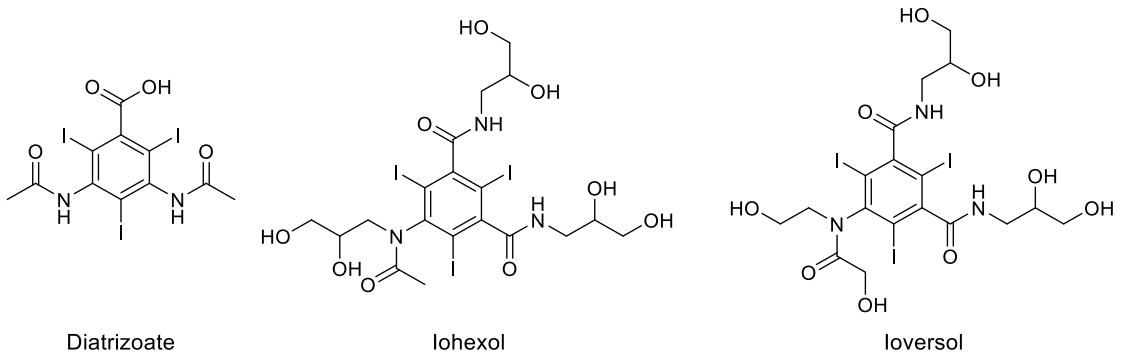


Figure 6 : Structure du Diatrizoate et de deux dérivés

[15] Katzberg, R. W., *Urography into the 21st Century: New Contrast Media, Renal Handling, Imaging Characteristics, and Nephrotoxicity.*, Radiology, **1997**, Vol. 204 (2), 297–312.
[16] Li, K. C. P. et al., *Barium Sulfate Suspension as a Negative Oral MRI Contrast Agent: In Vitro and Human Optimization Studies*, Magn. Reson. Imaging, **1991**, Vol. 9 (2), 141–150.

Le scanner fournit des images avec une haute résolution spatiale permettant de visualiser jusqu'aux détails anatomiques. En tant qu'imagerie diagnostic, elle est beaucoup utilisée pour détecter ou confirmer la présence de tumeurs cancéreuse, en donnant notamment des informations sur sa taille et sa localisation, aidant grandement la planification d'une intervention chirurgicale. Elle peut également être couplée à d'autres techniques comme la TEP ou l'IRM pour obtenir d'autres informations comme des données métaboliques. Cependant elle ne permet pas de visualiser les tissus mous comme les muscles et tendons.

1.5. Imagerie optique

L'imagerie optique exploite la lumière et ses différentes propriétés comme l'absorption, l'émission, la diffusion, la bioluminescence ou bien encore la fluorescence comme source de contraste, crée par l'interaction de photons avec différents tissus ou composants cellulaires. Dans le cas de l'imagerie médicale, les deux plus utilisées sont l'imagerie par fluorescence et par bioluminescence et sont extrêmement utiles pour étudier les structures, les fonctions et les voies cellulaires ainsi que les interactions moléculaires dans les systèmes biologiques. Elles utilisent des systèmes de microscopie pour observer et imager des phénomènes à des niveaux microscopiques et macroscopiques, ainsi que des agents de contraste.

La bioluminescence correspond à la production et l'émission de lumière par un organisme vivant via une réaction chimique. Le composé à l'origine de la luminescence est la luciférine, qui émet de la lumière lorsqu'elle est oxydée par une enzyme, la luciférase, en présence d'oxygène. Pour l'imagerie médicale, des bactéries ou des protéines possédant une propriété d'intérêt, comme la reconnaissance de cellules tumorales par exemple, sont génétiquement modifiées pour exprimer le gène de la luciférase et ainsi devenir luminescentes et visibles.[17] Cependant cette technique en est toujours au stade de la recherche.

La fluorescence résulte d'un phénomène qui se produit lorsque certaines molécules, souvent polyaromatiques, appelées fluorophores absorbent la lumière. Elles vont alors se retrouver dans un état excité, puis par fluorescence revenir à un état fondamental, en émettant un photon possédant une certaine longueur d'onde. C'est ces photons émis qui vont être observés et permettre une analyse. Chaque fluorophore est caractérisé par un certain nombre de caractéristiques physiques comme le rendement quantique qui correspond au pourcentage de photons réémis par rapport à ceux absorbés, ou le déplacement de Stokes qui correspond à la différence de longueur d'onde du photon émis par rapport à celui absorbé (Figure 7).

[17] Yao, Z. et al., *Advances in Bioluminescence Imaging: New Probes from Old Recipes*, Curr. Opin. Chem. Biol., **2018**, Vol. 45 148–156.

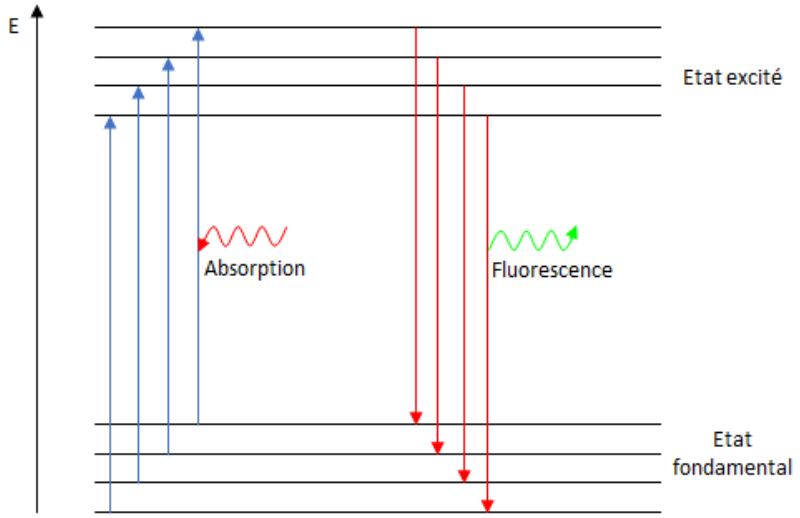


Figure 7 : Diagramme de Jablonski expliquant le principe de fluorescence

Il existe une grande quantité de fluorophores développés (Figure 8) pour une utilisation aussi bien en préclinique qu'en clinique comme la cartographie vasculaire, la détection de tumeur, la visualisation de biomarqueurs ou encore les marquages immunologiques. Mêmes si les premiers agents de contraste utilisés en clinique étaient non spécifiques d'une cible comme le bleu de méthylène ou le carmin d'indigo, il est très vite devenu nécessaire de les rendre spécifique en les greffant à une molécule d'intérêt pour de la détection ciblée.[18] On les retrouve donc le plus souvent greffés à des objets biologiques comme des vitamines, des peptides ou des anticorps.[19]

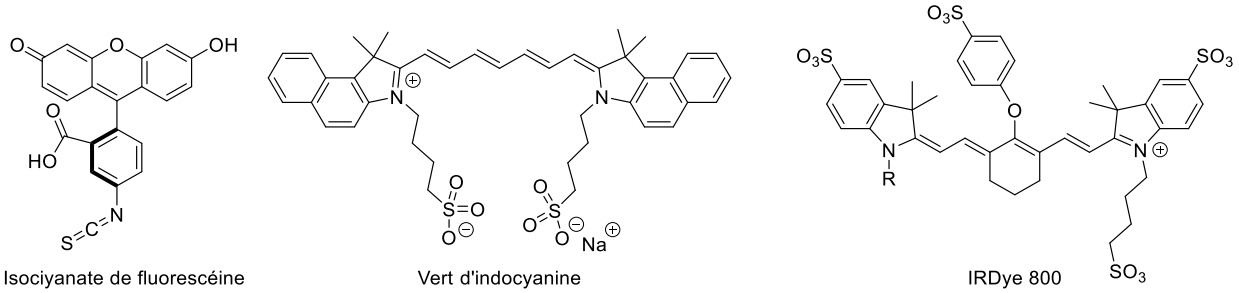


Figure 8 : Exemple de structures de fluorophores

L'imagerie optique a l'avantage d'être non invasive, non ionisante, très sensible, avec une réponse quasi instantanée et dispose d'un coût relativement faible. Son utilisation reste tout de même un vrai challenge du fait de l'absorption de la lumière par les tissus et fluides biologiques ainsi que leur auto-fluorescence ce qui conduit à une atténuation, une dispersion et une réduction du signal optique. Elle est aussi limitée par sa faible pénétration (quelques millimètres) dans les tissus et une faible résolution spatiale. Aujourd'hui le développement

[18] Joshi, B. P. et al., *Targeted Optical Imaging Agents in Cancer: Focus on Clinical Applications*, Contrast Media Mol. Imaging, **2018**, Vol. 2018
[19] Haque, A. et al., *Next Generation NIR Fluorophores for Tumor Imaging and Fluorescence-Guided Surgery: A Review*, Bioorganic Med. Chem., **2017**, Vol. 25 (7), 2017–2034.

de nouvelles méthodes de microscopie comme la spectroscopie proche infra-rouge permettent une amélioration de cette technique mais elle reste encore trop limitée pour une utilisation plus prononcée en clinique. Elle reste cependant de plus en plus utilisée pour les études mécanistiques et cellulaires.

1.6. Les ultrasons

L'imagerie ultrasonore utilise les ondes ultrasonores, ayant une fréquence supérieure aux sons audibles (20 kHz à 10THz contre 20 à 20000Hz). Ces ondes engendrent l'oscillation autour de leur point d'équilibre des molécules qu'elles traversent et qui se diffuse de proche en proche, suivant une direction donnée à partir du point de départ. Selon la densité du milieu traversé, les ultrasons se propagent à une vitesse plus ou moins importante. On qualifie la résistance d'un matériau par son impédance acoustique, qui influence cette vitesse. De plus les ondes traversant un milieu donné rebondissent et reviennent en écho lorsqu'elles arrivent à l'interface entre deux milieux d'impédances différentes. Ainsi les échos analysés peuvent être analysés pour obtenir des informations sur les matériaux traversés (Figure 9).

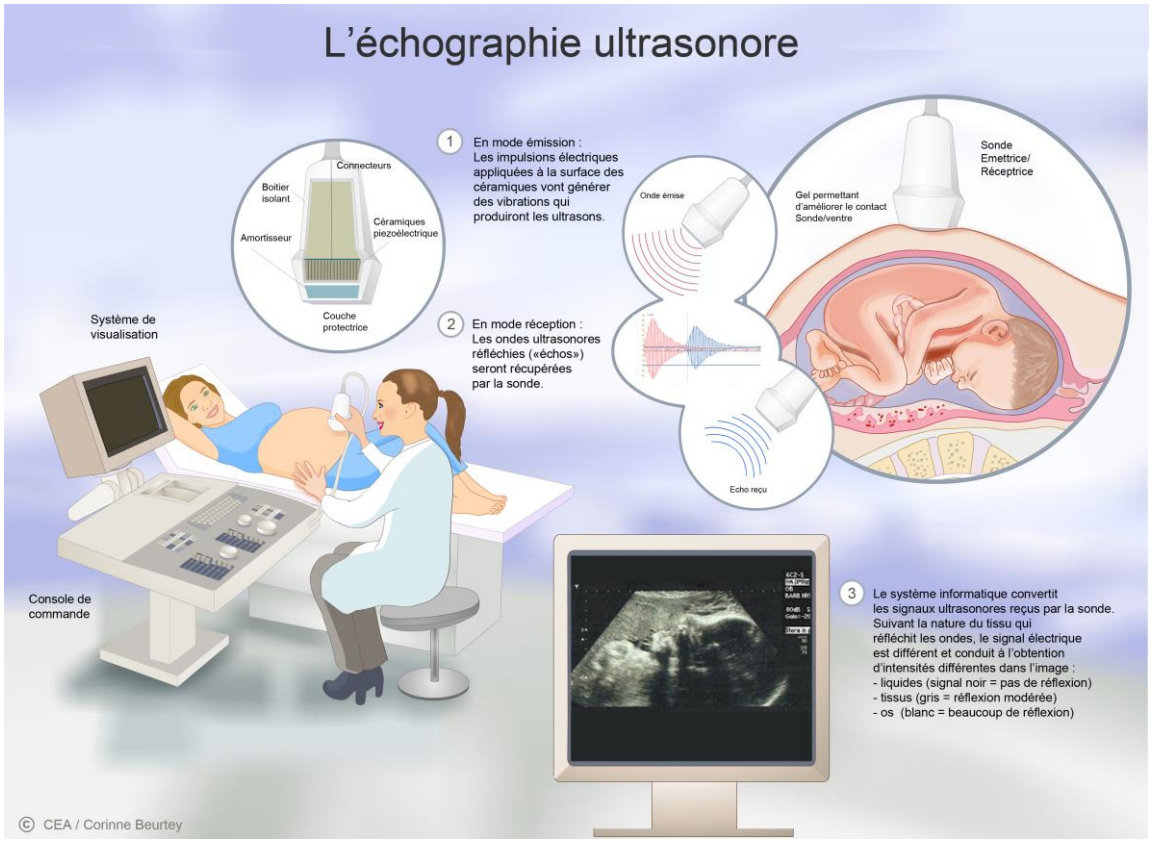


Figure 9 : Principe de l'échographie[3]

Dans le cadre de l'imagerie diagnostique, les ultrasons sont évidemment utilisés pour les échographies et suivre l'évolution d'un fœtus ainsi que pour l'échographie Doppler qui permet l'examen des vaisseaux sanguins. L'emploi d'un agent de contraste appelé le Sonovue, composé de microbulles de gaz d'hexafluorure de soufre, permet une analyse du

cœur et ses vaisseaux[20] mais aussi la visualisation de tumeurs.[21] L'utilisation de ce type de microbulles est également de plus en plus employé dans une visée thérapeutique et théranostique dans le traitement de certains cancers, fibromes utérins et glaucome en détruisant des lésions par échauffement thermique.[22]

Les ultrasons ont l'avantage de pouvoir être utilisés de façon répétitive sans exposition à des rayons ionisants et d'être mis en œuvre grâce à des appareillages peu volumineux et peu onéreux. Cependant le contraste reste globalement assez faible du fait que le corps soit composé en grande partie d'eau, avec une faible sensibilité et un pouvoir de pénétration assez faible, les ultrasons ayant du mal à traverser les os.

En conclusion on peut résumer les avantages et inconvénients de chaque technique par le tableau suivant (Tableau 1), ces techniques étant aujourd'hui utilisées en complément les unes des autres.

Imagerie	TEP/TEMP	RX	Optique	Ultrasons	IRM
Résolution	1-10 nm	100 µm	1-5 mm	10-100 µm	10-50 µm
Pénétration	+++	+++	+	+++	++
Radiation	++	++	Non	Non	Non
Sensibilité	pM	µM	fM-nM	µM-mM	µM-mM
Coût	+++	++	+	+++	+

Tableau 1 : Caractéristiques des différentes techniques d'imagerie

L'imagerie par résonnance magnétique (IRM) n'a pour l'instant pas été abordée. Etant l'un des sujets de cette thèse cette méthode fera l'objet du prochain chapitre de cette introduction.

2. L'imagerie par Résonnance Magnétique (IRM)

2.1. Définition et généralités

L'Imagerie par Résonnance Magnétique (IRM) est une technique d'imagerie basée sur le principe de la Résonnance Magnétique Nucléaire (RMN) du proton, qui permet d'obtenir des informations microscopiques physique et chimique sur les molécules. Au lieu d'obtenir des informations sur le déplacement chimique et les constantes de couplages comme en RMN, l'IRM va donner la distribution spatiale du signal des protons de l'eau dans le corps.

[20] Bokor, D., *Diagnostic Efficacy of SonoVue*, Am. J. Cardiol., **2000**, Vol. 86 (4), 19–24.
[21] Bertolotto, M. et al., *Blood Flow Changes in Hepatocellular Carcinoma After the Administration of Thalidomide Assessed by Reperfusion Kinetics During Microbubble Infusion*, Invest. Radiol., **2006**, Vol. 41 (1), 15–21.
[22] Kiessling, F. et al., *Ultrasound Microbubbles for Molecular Diagnosis, Therapy, and Theranostics*, J. Nucl. Med., **2012**, Vol. 53 (3), 345–348.

Développée par Lauterbur en 1973[23] et utilisée pour la première fois chez l'Homme en 1977,[24] il s'agit d'une technique non invasive et non radiative permettant l'observation des tissus mous comme le cerveau, les poumons et les muscles. L'IRM est donc un outil idéal pour le diagnostic en clinique et la recherche biomédicale et est devenu un examen médical classique avec plus de 100 millions d'IRM dans le monde et 4.5 millions en France.

2.2. Principe

2.2.1. RMN

La Résonnance Magnétique Nucléaire est une technique d'analyse chimique et structurale non destructive utilisée surtout en chimie, biochimie et physique. Elle utilise la capacité des noyaux de certains atomes (^{1}H, ^{13}C, ^{17}O, ^{19}F…) possédant un moment magnétique de spin agissant comme un petit aimant, à interagir avec un champ magnétique externe. Elle mesure la relaxation des noyaux d'hydrogène libres lorsqu'ils se réalignent à leur état d'origine dans la direction du champ magnétique après avoir été excité par une fréquence radio. Différents contrastes d'image peuvent être obtenus en jouant sur la séquence de pulsation ou les temps de relaxation longitudinaux (T1) et transversaux (T2). Des agents de contraste modifiant le champ magnétique entourant les protons peuvent également être employés.

Dans l'exemple de la RMN du proton, les moments magnétiques des spins des protons s'alignent parallèlement à un champ magnétique préalablement appliqué B_0 et donne ainsi une aimantation globale M selon la direction B_0. On parle d'aimantation longitudinale M_z. En appliquant ensuite une onde électromagnétique oscillante à une fréquence choisie précisément, les noyaux d'hydrogène (fréquence de résonnance de 42 MHz) peuvent interagir avec elle, ce qui aura pour conséquence de faire basculer l'aimantation M de manière perpendiculaire à B_0. On parle alors d'aimantation transversale M_{xy} (Figure 10).

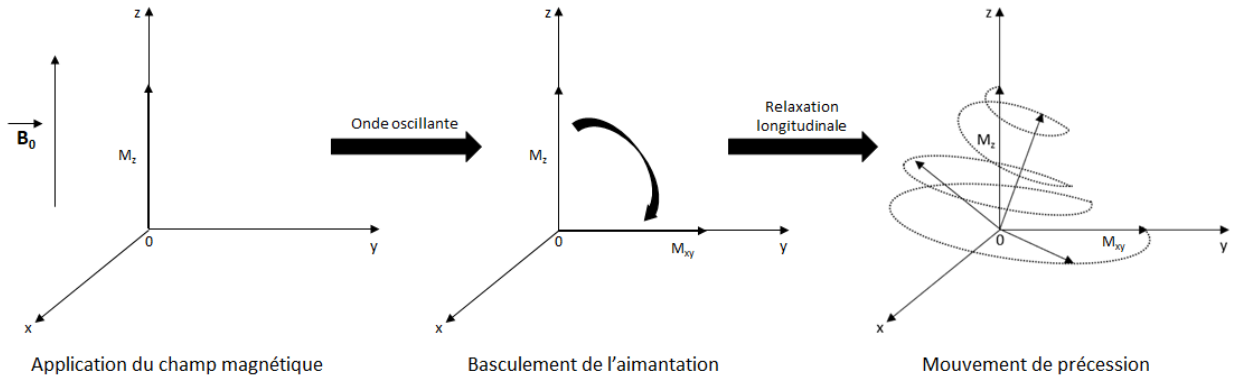


Figure 10 : Schéma du principe d'interaction des protons avec un champ magnétique en RMN

[23] Lauterbur, P. C., *Image Formation by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance*, Nature, **1973**, Vol. 242 (5394), 190–191.
[24] Hinshaw, W. S. et al., *Radiographic Thin-Section Image of the Human Wrist by Nuclear Magnetic Resonance*, Nature, **1977**, Vol. 270 (5639), 722–723.

Une fois l'application de l'onde oscillante interrompue, les moments magnétiques de spin vont commencer à se relaxer dans un mouvement dit de précession autour de l'axe z jusqu'au retour à l'équilibre du système. Le temps mis par les moments magnétiques pour retrouver leur alignement suivant l'axe z est appelé le temps de relaxation T1. Il est défini comme le temps pour que 63% de l'aimantation M_z soit retrouvée. Enfin le temps nécessaire pour la disparition de 37% de l'aimantation transversale M_{xy} correspond au temps de relaxation T2. C'est ce mouvement de rotation qui a lieu lors du retour à l'équilibre qui est enregistré à l'aide d'un récepteur et correspond au signal mesuré (FID) en RMN.

L'atome d'hydrogène ^1H est présent en grande quantité dans l'organisme puisqu'on le retrouve sous forme d'eau, principal constituant du corps, mais aussi dans les molécules organiques. Son noyau de spin ½ possède un rapport gyromagnétique γ (rapport entre moment magnétique et moment cinétique) très élevé par rapport aux autres noyaux présents dans les organismes vivants, ce qui explique sa grande sensibilité lors des expériences RMN. Ainsi, le proton étant très abondant et sensible à un champ magnétique, l'utilisation de sa RMN s'est naturellement imposée comme technique de référence en IRM pour l'étude du vivant.

2.2.2. De la RMN à l'IRM

Le fonctionnement de l'IRM est basé sur le principe général de la RMN du proton, mais la différence entre les deux réside dans la nature des informations extraites des mesures. Alors que la RMN a pour objectif de distinguer l'ensemble des protons d'un échantillon selon leur environnement chimique, l'IRM se focalise sur les protons de l'eau uniquement, et fournit des informations sur la répartition spatiale de ces molécules au sein d'un échantillon ou d'un être vivant. Elle utilise pour cela les différences de teneur en eau ainsi que les variations des temps de relaxation T1 et T2 des protons contenus dans les tissus pour obtenir des images présentant des différences de contraste.

Lors d'un examen, le patient est soumis à un champ magnétique constant compris entre 1 et 3 Tesla puis l'utilisation de différents gradients de champs magnétiques additionnels permet de balayer l'espace selon deux dimensions.[25] Enfin des traitements du signal basés sur des algorithmes de transformée de Fourrier permettent de visualiser le signal et d'obtenir une image en trois dimensions du patient. Les images IRM en densité de proton obtenues permettent de distinguer différents tissus en fonction de la concentration moyenne en eau, mais le contraste n'est pas toujours suffisant. Pour y remédier, il est possible de nuancer l'image en jouant sur d'autres paramètres caractéristiques du phénomène de relaxation à l'origine du signal IRM.

[25] Merbach, A. et al., *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging: Second Edition*Chem. Contrast Agents Med. Magn. Reson. Imaging Second Ed., **2013**,

2.2.3. Images IRM T1 et T2

En mettant de côté les gradients de champ magnétique, la séquence d'impulsion IRM s'apparente à une succession d'écho de spin basée sur une répétition d'impulsions 90°-180°. Dès la fin de la première impulsion à 90° permettant l'aimantation transversale M_{xy}, le processus de relaxation se met en place et un déphasage des spins entraîne une perte de signal recueilli. L'impulsion à 180° permet alors de rephaser les spins et récupérer la totalité du signal d'aimantation avant l'enregistrement du signal (Figure 11).[26]

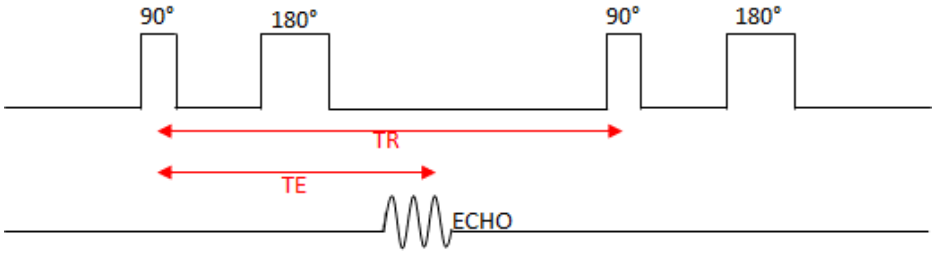


Figure 11: Séquence d'écho de spin et représentation de l'aimantation des spins dans le temps

Le signal IRM enregistré fait intervenir les temps T1 et T2, intrinsèques à chaque tissu, mais aussi deux autres paramètres : le temps de répétition TR correspond au temps entre deux séquences d'impulsions et le temps d'écho TE correspondant au temps entre le début de l'impulsion et le recueil de l'écho de spin. En jouant ainsi sur ces paramètres (TR et TE) il est possible de rendre l'un des deux termes prédominant, donnant lieux à différentes images.

Ainsi dans le cas où un tissu A relaxe moins vite qu'un tissu B, si le TR est court les moments magnétiques de spin seront plus importants pour B au début de la relaxation (TE court) et l'image obtenue montrera un contraste entre les tissus A et B : elle est dite pondérée T1. En revanche si le TR est long, les deux tissus ont le temps de relaxer totalement avant la prochaine impulsion et on s'affranchit donc de la pondération T1. La différence entre les deux signaux est optimale à partir d'un TE long et l'image est alors dite pondérée T2. Le signal est ainsi retranscrit sous forme de nuances de gris (Figure 12) et dans la plupart des cas le contraste est suffisant pour obtenir une image exploitable.

[26] Jung, B. A. et al., *Spin Echo Magnetic Resonance Imaging*, J. Magn. Reson. Imaging, **2013**, Vol. 37 (4), 805-817.

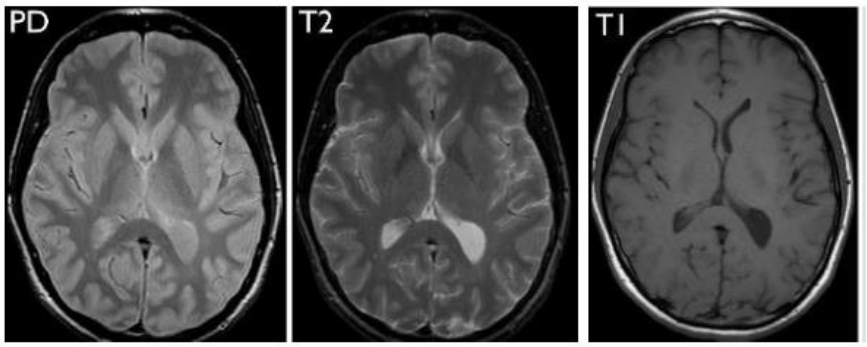


Figure 12 : IRM d'une coupe de cerveau selon 3 pondérations différentes (Proton Density, T1, T2)

Cependant, bien que le corps contienne une grande quantité d'eau, la qualité du signal n'en est pas uniquement dépendante et il est parfois difficile de visualiser de petits changements, notamment dans les tissus mous. L'utilisation d'agents de contraste devient alors nécessaire.

2.2.4. L'IRM anatomique (IRMa)

Aussi appelée imagerie structurelle, l'IRM anatomique permet de visualiser l'anatomie des organes profonds et opaques de manière non invasive avec une précision de l'ordre du millimètre. Les informations obtenues lors de cet examen fournissent des renseignements sur la taille et le volume des organes ainsi que sur les tissus qui les composent. Dans le cas du cerveau on parle de neuro-imagerie structurelle.

En pratique l'IRMa permet essentiellement la détection et localisation de lésions cérébrales et est donc utilisée dans le cadre de diagnostic clinique ou de préparation pour une intervention chirurgicale. Elle se rapproche d'autres méthodes d'imagerie structurelle telles que la radiologie et le scanner utilisant les RX ou encore l'échographie utilisant les ultrasons.

2.2.5. L'IRM fonctionnelle (IRMf)

L'IRM fonctionnelle repose sur les mêmes principes physiques que l'IRMa et permet d'obtenir des informations sur le fonctionnement du cerveau et visualiser l'activité des différentes parties du cerveau. Elle utilise des techniques extrêmement rapides d'acquisition et de traitement afin de réaliser des images en des temps très courts et ainsi de révéler l'activité des différentes parties du cerveau.

La plus utilisée se base sur l'effet de l'aimantation de l'hémoglobine sur les protons des zones environnantes, associée à une augmentation locale du débit sanguin. Elle repose sur le principe selon lequel l'afflux de sang oxygéné augmente dans les zones cérébrales activées. Elle permet ainsi de mesurer en temps réel l'activité neuronale d'un patient soumis à un stimuli cognitif, on parle de la mesure de l'effet BOLD (Blood Oxygenated Level Dependent).[27] Cette technique s'intéresse essentiellement au cerveau et est restée pendant

[27] Detre, J. A. et al., *Technical Aspects and Utility of FMRI Using BOLD and ASL*, Clin. Neurophysiol., **2002**, Vol. 113 (2002), 621–634.

très longtemps du domaine de la recherche en neurologie, neuropsychologie et neuropsychiatrie même si elle est de plus en plus utilisée en clinique, notamment pour la localisation de régions fonctionnelles chez des patients. Cet examen est demandé dans le cadre d'un bilan pré-chirurgical pour savoir où se trouvent les aires du langage ou de la motricité par rapport à une lésion, afin d'aider le chirurgien à évaluer les risques opératoires.

L'IRM à elle seule reste une technique d'imagerie peu sensible et qui nécessite des temps d'acquisition long, ce qui a pour conséquence le développement et l'utilisation toujours plus grande des agents de contraste.

2.3. Les agents de contraste en IRM

En imagerie médicale, un agent de contraste est défini comme une molécule exogène injectée par voie entérale ou parentérale et qui a comme propriété d'augmenter artificiellement le contraste en modifiant localement les propriétés magnétiques du tissu dans lequel il se trouve. Il permet de visualiser une structure anatomique naturelle ou pathologique naturellement peu contrastée, et ainsi aider à améliorer la qualité d'un diagnostic. Le recours à des agents de contraste ou des traceurs en IRM permet d'obtenir, pour l'objet étudié, des images de meilleure qualité, avec un contraste plus marqué et une localisation spatiale plus précise.

Il convient de différencier agents de contraste et traceurs IRM. Les premiers ne sont pas directement observés en IRM, c'est les effets qu'ils induisent sur le temps de relaxation des noyaux d'hydrogène se trouvant dans leur environnement immédiat qui sont observés. Ils regroupent les agents de contraste T1 et T2. A l'inverse les traceurs IRM sont directement détectés par RMN et regroupent l'utilisation d'hétéroatomes et les techniques de CEST (Chemical Exchange Saturation Transfert) et d'hyperpolarisation (Figure 13). Evidemment, ces produits doivent être non toxiques et efficaces à faible concentration.

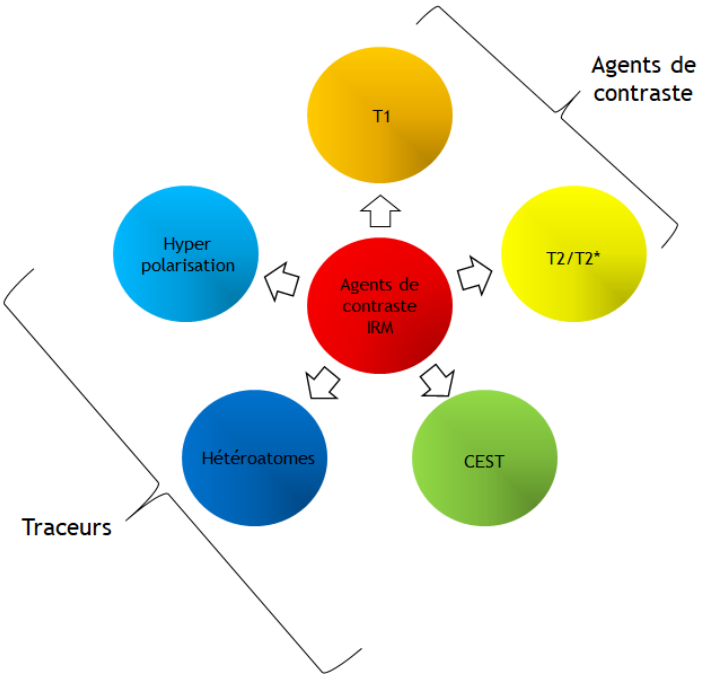


Figure 13 : Principales classes d'agents de contraste pour l'IRM

2.3.1. Agents de contraste T1

Les agents de contraste T1 diminuent le temps de relaxation T1, et T2 avec une moindre influence, des protons et ce sont aujourd'hui les plus utilisés en clinique. Leur présence dans le tissu étudié provoque un hypersignal par rapport aux tissus environnants et permet d'obtenir des images avec des contrastes très marqués (Figure 14). Ils sont composés d'atomes paramagnétiques, c'est-à-dire comportant un moment magnétique élevé du fait de leurs électrons non appariés.

C'est le cas entre autres du manganèse, du fer et du dysprosium mais c'est le gadolinium qui est quasiment exclusivement utilisé. En effet, de par ses 7 électrons non appariés, il possède un spin très élevé (S = 7/2) et un temps de relaxation électronique long. Il a pour configuration électronique [Xe] $5d^1$ $6s^2$ $4f^7$ et existe à l'état trivalent Gd^{3+}.

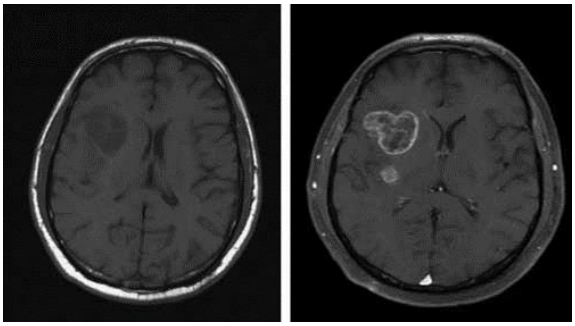


Figure 14 : Détection d'une tumeur au cerveau grâce à un agent de contraste à base de gadolinium[28]

[28] Neuwelt, E. A. et al., *Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxides (USPIOs): A Future Alternative Magnetic Resonance (MR) Contrast Agent for Patients at Risk for Nephrogenic Systemic Fibrosis (NSF)?*, Kidney Int., **2009**, Vol. 75 (5), 465-474.

La modification de l'environnement des protons est due à une interaction dipolaire entre leur moment de spin nucléaire et le moment de spin électronique du métal. Deux types de contributions sont alors responsables de la relaxation en T1 :

- La relaxation de la sphère interne ou « inner-sphere relaxation » qui résulte de la contribution directe des molécules d'eau coordonnées au gadolinium qui propagent son effet paramagnétique aux molécules d'eau contenues dans la première sphère de coordination du métal. Les protons de ces molécules sont alors soumis à un mécanisme de relaxation très efficace. Elles peuvent ensuite s'échanger avec celles de l'eau environnante qui subissent à leur tour cet effet de relaxation.
- La relaxation de la sphère externe ou « outer-sphere relaxation » et résulte de la contribution des molécules d'eau qui diffusent à proximité du gadolinium, perçoivent son effet paramagnétique et relaxent à leur tour.

Ces agents sont très pratiques pour mettre en relief les zones fortement irriguées du corps humain, ce qui est le cas des tumeurs, métastases ou encore des inflammations.

Cependant le gadolinium est nocif pour l'organisme. A pH physiologique, le cation Gd^{3+} a tendance à former des hydroxydes qui précipitent et sont susceptibles d'obstruer les vaisseaux sanguins, et du fait qu'il présente des propriétés proches d'autres cations physiologiques, il reste très toxique sous forme libre. C'est pour cela qu'il est essentiellement employé sous forme de complexe, avec des ligands organiques chélatants qui sont le plus souvent des poly(amino-carboxylates). Ces complexes peuvent être linéaires ou cycliques et leur rôle est donc de masquer la toxicité du gadolinium sans modifier ses propriétés.

La coordinence du Gd^{3+} étant de 8 ou 9, les ligands commerciaux, développés depuis les années 80, sont élaborés de façon à laisser un site vacant pour permettre la relaxation d'une molécule d'eau.[29] Les deux premiers agents chélatants développés furent le DOTA (acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique) [30] et le DTPA (penta(carboxyméthyl)diéthylènetriamine) [31] et les premiers produits commerciaux ne tardèrent pas à suivre. La modification chimique des bras portés par ces molécules a par la suite donné naissance à une grande variété de produits comme l'Omniscan®,[32] l'Optimark®[33]

[29] Caravan, P. et al., *Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications*, Chem. Rev., **1999**, Vol. 99 (9), 2293–2352.
[30] Magerstädt, M. et al., *Gd(DOTA): An Alternative to Gd(DTPA) as a T1,2 Relaxation Agent for NMR Imaging or Spectroscopy*, Magn. Reson. Med., **1986**, Vol. 3 (5), 808–812.
[31] Weinmann, H. et al., *Characteristics of Gadolinium-DTPA Complex: A Potential NMR Contrast Agent*, Am. J. Roentgenol., **1984**, Vol. 142 (3), 619–624.
[32] Wagoner, M. . V. et al., *Nonionic Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents Clinical Trial Experience of Safety, Tolerance, and Efficacy of Gadodiamide Injection*, Invest. Radiol., **1990**, Vol. 25 S39–S41.
[33] Grossman, R. et al., *Multicenter Evaluation of the Safety, Tolerance, and Efficacy of OptiMARK in Magnetic Resonance Imaging of the Brain and Spine*, Acad. Radiol., **1998**, Vol. 5 S154–S155.

ou encore le Gadovist®[34] (Figure 15). Ces agents sont stables en conditions physiologiques, ils sont injectés par voie intraveineuse et ont pour cible l'espace intravasculaire et les cavités extracellulaires. Ils sont donc utilisés en routine pour détecter des lésions vasculaires, abdominales et hépatiques.

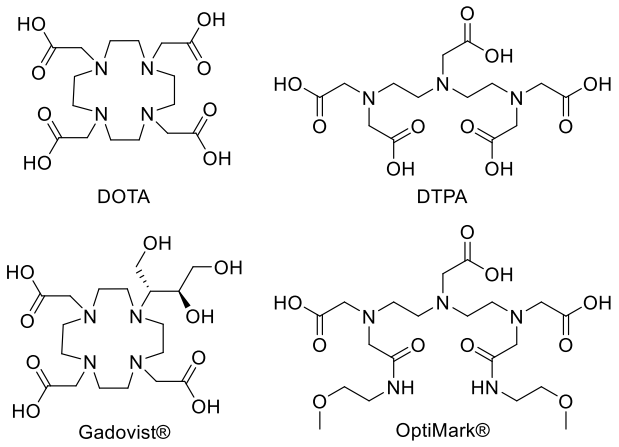


Figure 15 : Structure du DOTA et DTPA et de deux dérivés commerciaux

Les doses requises pour ces complexes varient de 0.1 à 0.3 mmol/kg et les solutions injectées ont une concentration de 0.5 M. Malgré leur très grande efficacité, il a été montré que l'utilisation de ces agents de contraste à base de gadolinium pouvait être associé à l'apparition de fibrose néphrologique systémique chez les patients en insuffisance rénale.[35] De plus ils sont, du fait de leur charge et de leur hydrophilie, lentement et difficilement éliminé de l'organisme et leur exposition à des milieux acides provoque la dissociation du complexe.

2.3.2. Agents de contraste T2

Les agents de contrastes T2 sont des agents super-paramagnétiques qui diminuent le temps de relaxation transversal T2 des protons, ce qui induit une diminution de l'intensité du signal et un contraste dit négatif (Figure 16). Elles sont composées d'un cœur cristallin d'oxydes de fer enrobés dans une matrice de dextrane ou de siloxane, pour empêcher l'agrégation et améliorer leur biocompatibilité. Leur très petite taille (de l'ordre du nanomètre) permet de les injecter par voie intraveineuse et ils sont notamment souvent utilisés pour la détection et caractérisation de lésions hépatiques. Contrairement aux agents T1, sous l'action d'un champ magnétique le moment magnétique entier du cristal est influencé et pas seulement celui de chacun de ses atomes individuellement.

[34] Vogler, H. et al., *Pre-Clinical Evaluation of Gadobutrol: A New, Neutral, Extracellular Contrast Agent for Magnetic Resonance Imaging*, Eur. J. Radiol., **1995**, Vol. 21 (1), 1–10.
[35] Swaminathan, S. et al., *New Insights into Nephrogenic Systemic Fibrosis*, J. Am. Soc. Nephrol., **2007**, Vol. 18 (10), 2636–2643.

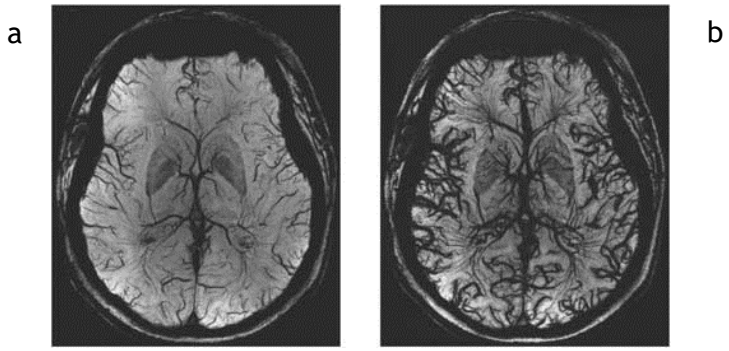


Figure 16 : Vascularisation du cerveau avant (a) et après injection (b) de USPIO[30]

La taille de la particule détermine ainsi sa capacité à relaxer. Il existe trois grandes familles classées suivant leur taille :

- Les MION (Micron Iron Oxide Nanoparticle) dont le diamètre est de l'ordre du micromètre.
- Les SPIO (Smal Particle Iron Oxide) comprise entre 1 µm et 50 nm.
- Les USPIO (Ultra Small Particle Iron Oxide) avec un diamètre inférieur à 50 nm.

L'appellation super-paramagnétique est due à la présence de multi-domaines magnétiques individuels au sein des cristaux d'oxyde de fer. Lorsqu'un champ magnétique leur est appliqué, tous ces micro-domaines s'orientent parallèlement à ce champ, créant ainsi une très forte aimantation au sein de la particule. Cela permet l'obtention d'un signal intense en RMN (Figure 17).

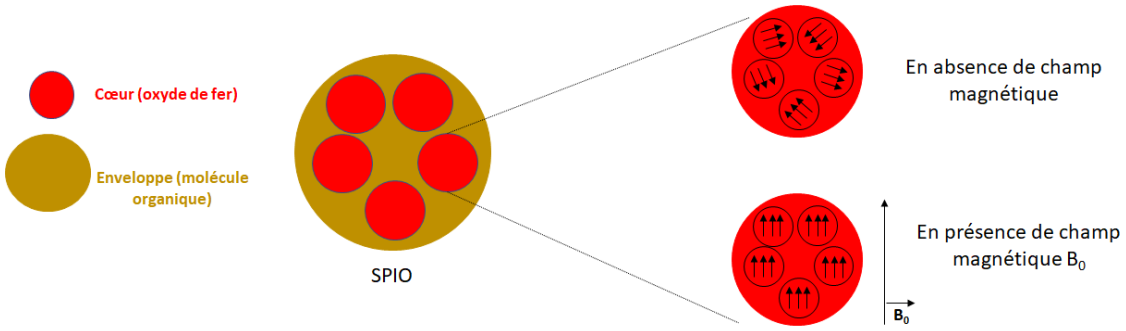


Figure 17 : Structure des SPIO et son aimantation en présence d'un champ magnétique B_0

Cependant les agents super-paramagnétiques présents à fortes concentrations entraînent une toxicité cellulaire et perturbent l'homogénéité du champ magnétique appliqué, diminuant ainsi le signal enregistré. On peut également noter que plusieurs microparticules commercialisées pour une utilisation clinique ont finalement été retirées du marché comme l'Endorem® ou le Lumirem® pour des problèmes d'élimination notamment, ce qui montre que ces produits doivent encore être améliorés pour être parfaitement utilisables *in vivo*.

En résumé, ces deux types d'agents de contraste (T1 et T2), bien que très utilisés en clinique présentent des inconvénients non négligeables comme la stabilité *in vivo* et la toxicité, qui

n'ont pas encore été surmontés. Il y a donc un réel besoin de mettre au point de nouvelles approches d'imagerie IRM plus performantes et biocompatibles.

2.3.3. Traceurs hétéronucléaires

Les avancées dans le développement d'instruments de mesure RMN possédant des champs magnétiques de plus en plus élevés ont conduit à des améliorations dans la RMN du proton mais également pour d'autres noyaux comme le ^{19}F, le ^{31}P, ou bien encore le ^{23}Na. Depuis la première IRM *in vivo* au sodium-23 d'un homme dans les années 80,[36] beaucoup de recherches sont menées dans ce domaine et plusieurs noyaux semblent prometteurs.[37]

Les noyaux de fluor-19 possèdent les spins les plus sensibles après les protons et peuvent ainsi être détectés en IRM sans avoir recours à une méthode d'enrichissement, ayant une abondance isotopique naturelle de 100%. Le fluor a également l'avantage d'être un atome non présent dans l'organisme et permet ainsi de s'affranchir des problèmes liés au bruit de fond. Sa sensibilité est de l'ordre du mM et le signal peut être quantifié directement depuis les images enregistrées.[38] L'utilisation de perfluorocarbures (PFC), contenant un nombre important d'atomes de fluor (entre 4 et 20), est la plus commune dans le cadre des applications de suivi cellulaire (Figure 18) et le marquage de cellules souches neurales.[39]

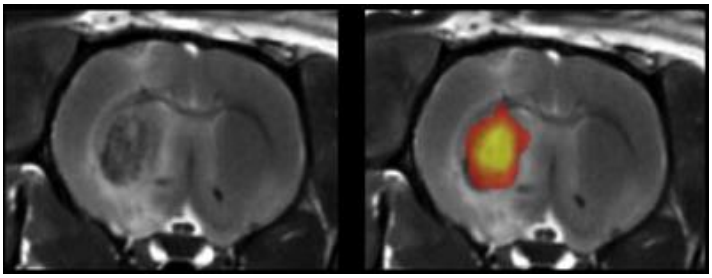
a  b

Figure 18 : Mise en évidence de lésions neurologiques suite à un AVC par combinaison d'IRM T2 (a) et du ^{19}F (b)[39]

Le sodium joue un rôle crucial dans une multitude de processus physiologiques et l'IRM du ^{23}Na représente une méthode directe pour quantifier la concentration de sodium dans les tissus, et donc d'étudier leur viabilité. Le potentiel de cette méthode a été démontré dans des études précliniques et cliniques, en particulier pour l'étude du cerveau[40] et des muscles,[41] et dans le cadre d'études sur la maladie d'Alzheimer et d'Huntington, sur l'AVC mais également pour d'autres régions du corps comme les cartilages, les tendons ou la peau.

---

[36] Hilal, S. K. et al., *In Vivo NMR Imaging of Sodium-23 in the Human Head*, J. Comput. Assist. Tomogr., **1985**, Vol. 9 (1), 1–7.
[37] Niesporek, S. C. et al., *Multinuclear MRI at Ultrahigh Fields*, Top. Magn. Reson. Imaging, **2019**, Vol. 28 (3), 173–188.
[38] Modo, M., *19F Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy in Neuroscience*, Neuroscience, **2021**,
[39] Bible, E. et al., *Non-Invasive Imaging of Transplanted Human Neural Stem Cells and ECM Scaffold Remodeling in the Stroke-Damaged Rat Brain by 19F- and Diffusion-MRI*, Biomaterials, **2012**, Vol. 33 (10), 2858–2871.
[40] Thulborn, K. R., *Quantitative Sodium MR Imaging: A Review of Its Evolving Role in Medicine*, Neuroimage, **2018**, Vol. 168 250–268.
[41] Bangerter, N. K. et al., *Quantitative Sodium Magnetic Resonance Imaging of Cartilage, Muscle, and Tendon*, Quant. Imaging Med. Surg., **2016**, Vol. 6 (6), 699–714.

L'IRM de l'oxygène-17 permet une évaluation directe du métabolisme à un niveau cellulaire et ainsi de mesurer la viabilité cellulaire. Cette technique repose sur l'étude d'un processus physiologique de base : la production d'eau $H_2{}^{17}O$ lors de la phosphorylation oxydative. Le glucose et l'oxygène présent dans le sang sont métabolisés par les mitochondries des cellules pour produire de l'ATP et de l'eau est relâchée en tant que déchet.[42] D'un point de vue biomédical, la quantification de la production de cette eau peut directement être reliée à différentes pathologies comme les cancers (Figure 19),[43] Parkinson et Alzheimer.[44]

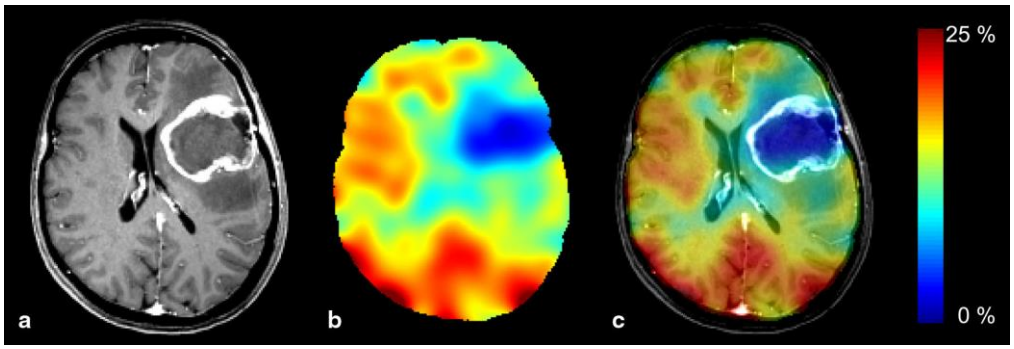


Figure 19 : Détection d'une tumeur (zone bleue) par IRM T1 (a), ^{17}O (b) et la combinaison des deux (c)[43]

Cette méthode nécessite tout de même d'enrichir le milieu en oxygène 17 et donc de faire inhaler au patient de l'$^{17}O_2$ enrichit au-dessus de l'abondance naturelle pour être utilisable.

Il existe d'autre atomes comme le ^{25}Mg, le $^{35/37}Cl$ ou le ^{39}K dont la sensibilité RMN est actuellement étudiée pour de possibles utilisations en IRM mais sont encore au stade de la recherche. L'utilisation d'hétéroatomes pour de l'imagerie IRM reste encore aujourd'hui très marginale bien que de plus en plus décrite dans la littérature. Elle se heurte à des soucis d'abondance naturelle et nécessite l'utilisation d'appareils ultraperfectionnés a haut champ magnétique.

2.3.4. CEST

Une nouvelle classe d'agents pour la RMN appelés agents de CEST (Chemical Exchange Saturation Transfert) a été développé, introduisant un moyen fondamentalement différent d'obtenir des images. Leur action n'est pas basée sur la relaxation des protons mais repose plutôt sur l'hypothèse qu'il existe au moins deux populations de protons différentes. La première est composée des protons labiles (groupe A) de l'agent de contraste et la secondes correspond aux protons de l'eau libres (groupe B) dans l'organisme.[45] Si les protons du groupe

[42] Atkinson, I. C. et al., *Feasibility of Mapping the Tissue Mass Corrected Bioscale of Cerebral Metabolic Rate of Oxygen Consumption Using 17-Oxygen and 23-Sodium MR Imaging in a Human Brain at 9.4T*, Neuroimage, **2010**, Vol. 51 (2), 723–733.
[43] Hoffmann, S. H. et al., *Direct 17O MRI with Partial Volume Correction: First Experiences in a Glioblastoma Patient*, Magn. Reson. Mater. Physics, Biol. Med., **2014**, Vol. 27 (6), 579–587.
[44] Manoharan, S. et al., *The Role of Reactive Oxygen Species in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Huntington's Disease: A Mini Review*, Oxid. Med. Cell. Longev., **2016**, Vol. 2016 1–15.
[45] Ward, K. . et al., *A New Class of Contrast Agents for MRI Based on Proton Chemical Exchange Dependent Saturation Transfer (CEST)*, J. Magn. Reson., **2000**, Vol. 143 (1), 79–87.

A sont saturés par l'émission d'une impulsion continue de saturation, l'échange de protons entre les groupes A et B durant cette saturation entraîne alors une diminution de l'intensité des spins du groupe B. Une superposition du spectre RMN « classique » avec celui obtenu en CEST permet ensuite et une amélioration du contraste (Figure 20).

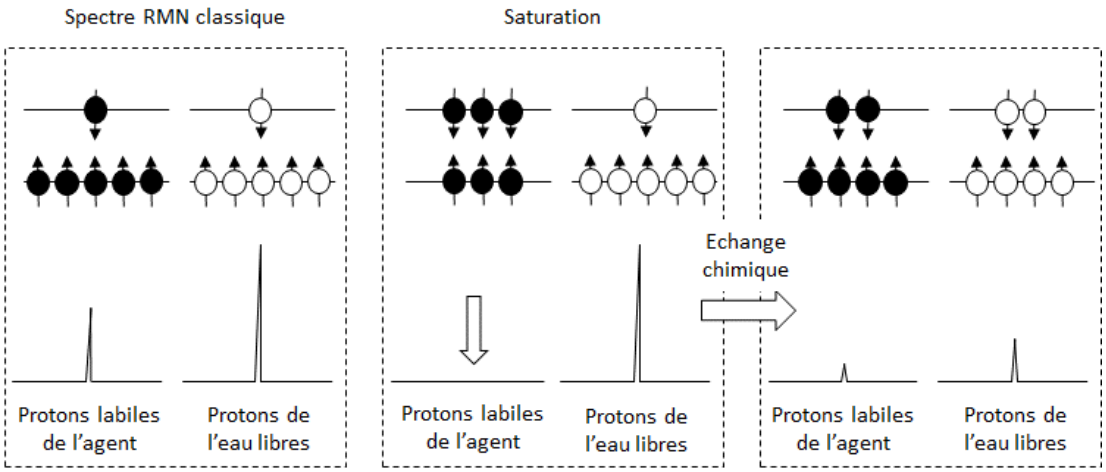


Figure 20 : Illustration du principe RMN de CEST

Il existe deux types d'agents de CEST : diamagnétique et paramagnétique. Les premiers sont à base d'acides aminés, de protéines ou de sucres et reposent sur les protons échangeables des fonctions amine et alcool, dont le signal est généralement séparé de 2-5 ppm par rapport aux protons de l'eau. Ils sont appelés des agents DiaCEST. Ils peuvent être utilisés pour obtenir une image de leur propre présence, de facteurs environnementaux comme le pH, la température ou l'observation de cellules transplantées. Ces agents peuvent être endogènes[46] comme les peptides ou les protéines, mais aussi exogènes comme le glucose.[47]

A l'inverse, les agents dits ParaCEST contiennent des métaux de transition paramagnétiques (cobalt, nickel, fer…) ainsi que les lanthanides trivalents sauf le gadolinium (Eu^{3+}, Tm^{3+}, Yb^{3+}…) possédant un haut moment magnétique qui n'affecte pas le temps de relaxation T1 mais induit plutôt un shift de fréquence entre les protons labiles et les protons de l'eau libre.[48] La structure de ces agents est quasiment exclusivement basée sur des dérivés du DOTA comme agent chélatant et le large shift permet une saturation des protons labiles plus simple sans saturation indirecte d'une partie des protons de l'eau libre. Comme les agents

[46] Zhou, J. et al., *Using the Amide Proton Signals of Intracellular Proteins and Peptides to Detect PH Effects in MRI*, Nat. Med., **2003**, Vol. 9 (8), 1085–1090.
[47] Wang, J. et al., *Magnetic Resonance Imaging of Glucose Uptake and Metabolism in Patients with Head and Neck Cancer*, Sci. Rep., **2016**,
[48] Tóth, éva et al., *Responsive ParaCEST Contrast Agents*, Inorganics, **2019**, Vol. 7 (5), 68.

DiaCEST, les agents ParaCEST ont des caractéristiques dépendantes de paramètres physicochimiques, ce qui permet leur étude, comme la température, le pH[49] ou les cations.[50]

Cependant ce type d'agent est également soumis aux mêmes problèmes rencontrés avec les complexes de gadolinium, à savoir des problèmes de stabilité à pH physiologique et une toxicité en cas d'accumulation.

2.3.5. Espèces hyperpolarisées

L'hyperpolarisation décrit un état hors équilibre dans lequel le rapport de populations des états de spin est fortement augmenté par rapport à l'équilibre thermodynamique (Figure 21).[51] Il existe diverses techniques d'hyperpolarisation comme la DNP (Dynamic Nuclear Polarization),[52] surtout utilisée pour le carbone 13, la polarisation induite par du para-hydrogène (PHIP),[53] ou la méthode SABRE (Signal Amplification By Reversible Exchange).[54] Cependant la méthode la plus utilisée reste la méthode par pompage optique, aussi appelée SEOP (Spin Exchange Optical Pumping). [55]

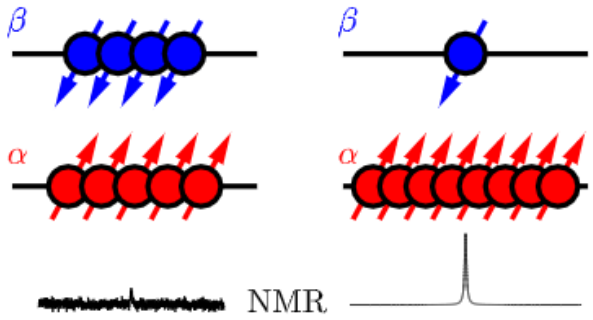


Figure 21 : Etat de spin et RMN correspondante d'une espèce polarisée thermiquement (gauche) et hyperpolarisée (droite)[51]

Etant un état hors équilibre, il n'est par définition pas stable et son retour à l'équilibre thermodynamique se fait sur un temps caractéristique que l'on peut rapprocher du temps de relaxation T1. Ainsi pour bénéficier de cette technique, les acquisitions RMN ou IRM doivent être réalisées dans un temps très court suivant l'hyperpolarisation pour limiter sa

[49] McVicar, N. et al., *Simultaneous in Vivo PH and Temperature Mapping Using a PARACEST-MRI Contrast Agent*, Magn. Reson. Med., **2013**, Vol. 70 (4), 1016–1025.
[50] Angelovski, G. et al., *Calcium-Responsive Paramagnetic CEST Agents*, Bioorg. Med. Chem., **2011**, Vol. 19 (3), 1097–1105.
[51] Ivanov, K. L. et al., *The Role of Level Anti-Crossings in Nuclear Spin Hyperpolarization*, Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc., **2014**, Vol. 81 1–36.
[52] Maly, T. et al., *Dynamic Nuclear Polarization at High Magnetic Fields*, J. Chem. Phys., **2008**, Vol. 128 (5), 052211.
[53] Blazina, D. et al., *Contrasting Photochemical and Thermal Reactivity of Ru(CO)2(PPh3)(Dppe) towards Hydrogen Rationalised by Parahydrogen NMR and DFT Studies*, Dalt. Trans., **2006**, (17), 2072.
[54] Adams, R. W. et al., *Reversible Interactions with Para-Hydrogen Enhance NMR Sensitivity by Polarization Transfer*, Science (80-.)., **2009**, Vol. 323 (5922), 1708–1711.
[55] Khan, A. S. et al., *Enabling Clinical Technologies for Hyperpolarized Xenon-129 MRI and Spectroscopy*, Angew. Chemie, **2021**, ange.202015200.

perte. De plus il n'est pas possible de conserver des espèces hyperpolarisées sur un temps long et l'appareillage permettant l'hyperpolarisation doit être à proximité des lieux d'analyse. Le gain de polarisation étant extrêmement important, la sensibilité de l'analyse en bénéficie énormément, avec un gain de l'ordre de 10^5. Ainsi le temps d'analyse est drastiquement réduit, un scan peut suffire en hyperpolarisation là où plusieurs heures d'enregistrement étaient nécessaires en polarisation thermique. On trouve aujourd'hui dans la littérature essentiellement trois atomes utilisés.[56]

- Le carbone-13 hyperpolarisé est utilisé en imagerie en oncologie et a comme gros avantage d'être déjà présent en faible quantité dans les nombreux métabolites de l'organisme. En effet de précieuses informations peuvent être obtenues en suivant l'évolution de certains de ces métabolites marqués au ^{13}C au cours du temps.[57] L'hyperpolarisation de cet atome est généralement réalisée par DNP et, en pratique, les métabolites sont préalablement hyperpolarisés puis injectés au patient et leur devenir est suivi par imagerie. Parmi ces métabolites le [^{13}C]-pyruvate est particulièrement intéressant car impliqué dans des métabolismes perturbés dans les cellules cancéreuses.[58] Ainsi son suivi, ainsi que les sous-produits formés, est utilisé pour connaître la réaction d'une tumeur à un traitement (Figure 22).[59] On peut également détecter une tumeur en suivant le taux de production de [^{13}C]-lactate, exacerbé en cas de tumeur, ou en évaluant l'échange [^{13}C]-pyruvate-[^{13}C]-lactate.

[56] Berthault, P. et al., *Use of Dissolved Hyperpolarized Species in NMR: Practical Considerations*, Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc., **2020**, Vol. 118–119 74–90.
[57] Kurhanewicz, J. et al., *Analysis of Cancer Metabolism by Imaging Hyperpolarized Nuclei: Prospects for Translation to Clinical Research*, Neoplasia, **2011**, Vol. 13 (2), 81–97.
[58] Golman, K. et al., *Molecular Imaging with Endogenous Substances*, Proc. Natl. Acad. Sci., **2003**, Vol. 100 (18), 10435–10439.
[59] Golman, K. et al., *Metabolic Imaging and Other Applications of Hyperpolarized 13C1*, Acad. Radiol., **2006**, Vol. 13 (8), 932–942.

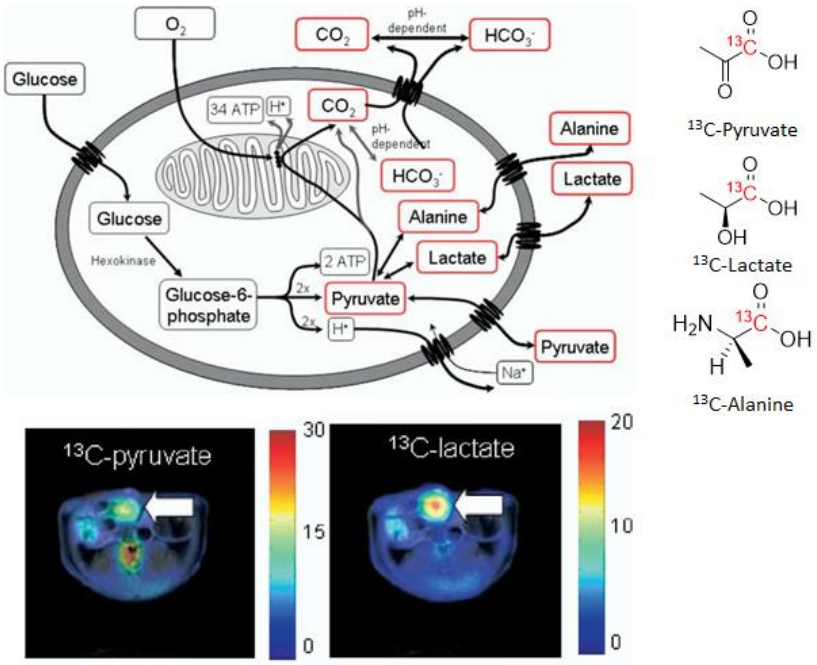


Figure 22 : Métabolisme du pyruvate et RMN ^{13}C hyperpolarisé d'une tumeur chez un rat[57]

De plus, la mesure du rapport des concentrations entre le CO_2 et le HCO_3 donne l'accès à la mesure du pH extracellulaire, particulièrement intéressant pour la détection de certaines tumeurs connues pour avoir un pH acide. [60]

- L'hélium 3 hyperpolarisé, gaz facilement administré par inhalation, est essentiellement utilisé pour l'imagerie des poumons et voies respiratoires (Figure 23).[61] Il possède un rapport gyromagnétique plus important et un meilleur rendement d'hyperpolarisation que le xénon. Il reste à l'heure actuelle le plus utilisé pour les images de poumons humains même si les recherches se tournent de plus en plus vers le xénon-129.

[60] Gallagher, F. A. et al., *Magnetic Resonance Imaging of PH in Vivo Using Hyperpolarized 13C-Labelled Bicarbonate*, Nature, **2008**, Vol. 453 (7197), 940–943.
[61] Tooker, A. C. et al., *Distal Airways in Humans: Dynamic Hyperpolarized 3 He MR Imaging—Feasibility*, Radiology, **2003**, Vol. 227 (2), 575–579.

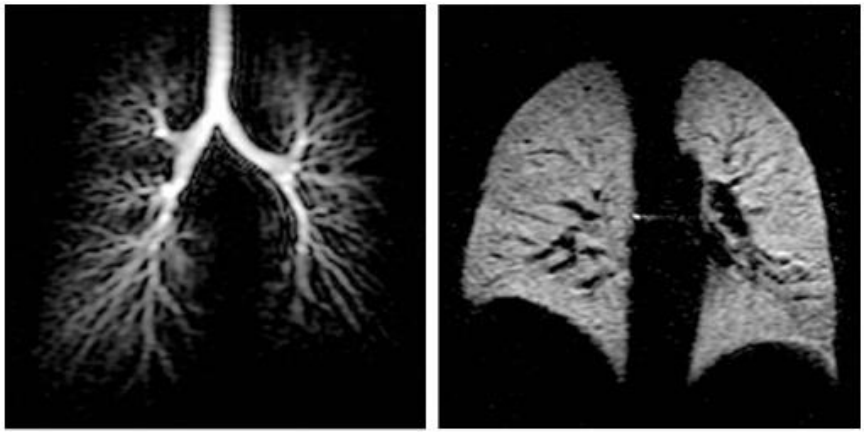


Figure 23 : Images de poumons par ^{3}He pendant l'inhalation (gauche) et en retenant la respiration (droite)[61]

En effet malgré sa facilité d'administration, l'hélium souffre tout de même de son coût et de sa rareté. Enfin il est, au contraire du xénon, pratiquement insoluble dans les milieux biologiques, ce qui limite donc ses applications.

Le xénon étant une part importante de cette thèse, il fera l'objet dans le paragraphe suivant de plus amples développements.

3. Le Xénon en RMN et IRM

3.1. Propriétés et généralités

Le xénon est un gaz noble, incolore, inodore et quatre fois plus dense que l'air découvert en 1898 par William Ramsay et Morris William Travers après analyse spectrale des résidus de l'air.[62] Il en existe 29 isotopes mais seulement deux sont observables en RMN : le ^{129}Xe de spin ½ et le ^{131}Xe de spin 3/2, d'abondances naturelles respectives de 26.4% et 24%.[63] Il a pour configuration électronique [Kr] $4d^{10}\ 5s^{2}\ 5p^{6}$, sa couche de valence étant pleine, le xénon est inerte à la majorité des réactions chimiques sauf en réagissant avec des oxydants très puissants comme l'hexafluorure de platine.

En revanche il possède un large nuage électronique fortement polarisable, ce qui induit une extrême sensibilité du déplacement chimique de son noyau, à son environnement immédiat. C'est cette propriété très intéressante qui est de plus en plus exploitée dans les expériences RMN et IRM, et il existe déjà une large gamme de déplacement chimique en fonction de son environnement (Figure 24).[64]

[62] Ramsay, W. et al., *Argon and Its Companions*, Proc. R. Soc. London, **1901**, Vol. 67 (435–441), 329–333.
[63] Oros, A.-M. et al., *Hyperpolarized Xenon in NMR and MRI*, Phys. Med. Biol., **2004**, Vol. 49 (20), R105–R153.
[64] Goodson, B. M., *Nuclear Magnetic Resonance of Laser-Polarized Noble Gases in Molecules, Materials, and Organisms*, J. Magn. Reson., **2002**, Vol. 155 (2), 157–216.

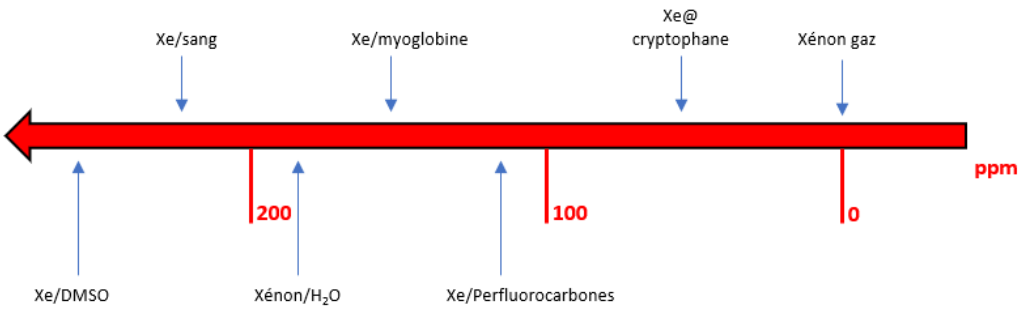


Figure 24 : Quelques déplacements chimique du xénon suivant son environnement[64]

Cette propriété, associée au fait que le xénon est facilement et très vite absorbé par les tissus, permet d'obtenir rapidement des signaux correspondant au xénon dans les différentes zones où il est présent après son administration. Ainsi en connaissant les déplacements chimiques dans chacun de ces tissus, il est possible de sélectionner une fréquence particulière pour obtenir son image et cartographier un échantillon ou un patient (Figure 25).[65]

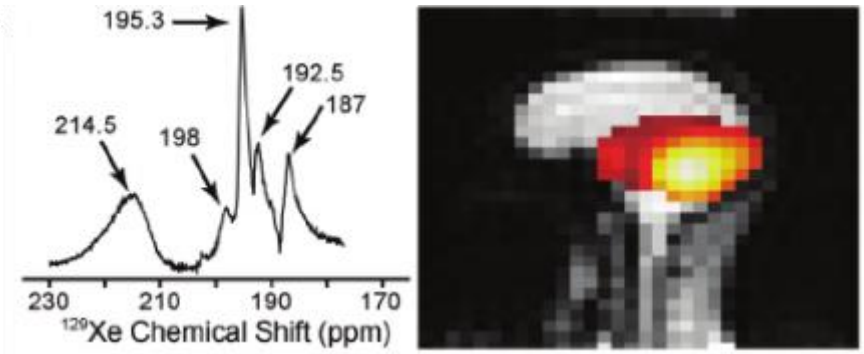


Figure 25 : Déplacement chimique du xénon dans différentes zones du cerveau (gauche) et image de la fréquence à 214.5 ppm sélectionnée (droite)[65]

Le xénon étant un gaz biocompatible et facilement administrable par inhalation et il est utilisé en médecine en tant qu'anesthésiant. Bien que le mécanisme ne soit pas totalement élucidé, c'est surtout dû à son inhibition de la N-méthyl-D-aspartate (NMDA). A l'inverse du protoxyde d'azote, ce n'est pas un gaz à effet de serre, il est deux fois plus puissant en tant qu'anesthésiant et n'est pas toxique pour l'organisme. Cependant bien que cette méthode ait peu d'effets secondaires, le fait de devoir utiliser une concentration importante (60%) en xénon et son coût élevé rend son utilisation en routine très limitée.

Dans le cadre de l'imagerie, on retrouve deux isotopes (129 et 133), chacun pour une application différente :

[65] Nikolaou, P. et al., *NMR Hyperpolarization Techniques for Biomedicine*, Chem. – A Eur. J., **2015**, Vol. 21 (8), 3156–3166.

- Le ^{133}Xe est utilisé en TEMP pour l'imagerie du cœur, du cerveau, des poumons et mesurer les flux sanguins.[66]
- Le ^{129}Xe hyperpolarisé est utilisé en IRM. Faisant l'objet d'une partie de cette thèse cette technique sera décrite dans le paragraphe suivant.

3.2. Le xénon en IRM

Le ^{129}Xe hyperpolarisé est dans un premier temps utilisé en IRM pour l'étude des voies respiratoires, notamment les poumons,[67] et visualiser les flux gazeux dans l'organisme.[68] Il a par exemple très récemment été utilisé pour visualiser les dommages dans les poumons pour des patients ayant contracté la Covid-19.[69] La grande solubilité du xénon dans les milieux biologiques, notamment le sang, a été utilisée pour suivre les flux sanguins et évaluer son taux d'oxygénation, le déplacement chimique du xénon hyperpolarisé en RMN dans du sang oxygéné et non oxygéné étant décalé d'environ 6 ppm.[70] De la même façon le xénon a été utilisé pour étudier le cerveau, le xénon ayant un signal différent suivant le composant du cerveau dans lequel il se trouve, et est aujourd'hui utilisé pour l'étude de maladies comme Alzheimer[71] ou les AVC.[72] Enfin l'IRM du xénon hyperpolarisé a été envisagée pour la visualisation des reins et de leur fonctionnement.[73]

L'étude de la zone d'intérêt est facilitée par le fait que le xénon n'est pas initialement présent dans le corps et il n'y a donc pas ou peu de bruit de fond. Cette méthode suscite aujourd'hui un intérêt grandissant car elle permet de résoudre en grande partie les problèmes de la faible sensibilité de la RMN.

L'utilisation du xénon hyperpolarisé nécessite tout d'abord une hyperpolarisation du xénon, plusieurs méthodes ont précédemment été évoquée et le pompage optique sera par la suite présenté. Puis ce xénon devra être injecté ou inhalé par le patient avant d'être détectée, notamment grâce à une méthode dite d'HyperCEST.

---

[66] Yokoe, K. et al., *Usefulness of 99mTc-Technegas and 133Xe Dynamic SPECT in Ventilatory Impairment*, Nucl. Med. Commun., **2006**, Vol. 27 (11), 887–892.
[67] Mugler, J. P. et al., *Hyperpolarized 129Xe MRI of the Human Lung*, J. Magn. Reson. Imaging, **2013**, Vol. 37 (2), 313–331.
[68] Nikolaou, P. et al., *Near-Unity Nuclear Polarization with an Open-Source 129Xe Hyperpolarizer for NMR and MRI*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **2013**, Vol. 110 (35), 14150–14155.
[69] Grist, J. T. et al., *Hyperpolarized 129 Xe MRI Abnormalities in Dyspneic Participants 3 Months after COVID-19 Pneumonia: Preliminary Results*, Radiology, **2021**, 210033.
[70] Norquay, G. et al., *129 Xe Chemical Shift in Human Blood and Pulmonary Blood Oxygenation Measurement in Humans Using Hyperpolarized 129 Xe NMR*, Magn. Reson. Med., **2017**, Vol. 77 (4), 1399–1408.
[71] Hane, F. et al., *Inhaled Xenon Washout as a Biomarker of Alzheimer's Disease*, Diagnostics, **2018**, Vol. 8 (2), 41.
[72] Rao, M. R. et al., *Assessment of Brain Perfusion Using Hyperpolarized 129 Xe MRI in a Subject with Established Stroke*, J. Magn. Reson. Imaging, **2019**, Vol. 50 (3), 1002–1004.
[73] Chacon – Caldera, J. et al., *Dissolved Hyperpolarized Xenon – 129 MRI in Human Kidneys*, Magn. Reson. Med., **2020**, Vol. 83 (1), 262–270.

3.2.1. Hyperpolarisation par pompage optique

Comme décrit précédemment, l'hyperpolarisation fait référence à un état hors équilibre de la polarisation nucléaire d'un élément, état ayant été obtenu via un transfert de polarisation en provenance d'un système (souvent un métal alcalin pour le pompage optique) dont les différences de population sont plus marquées. Cela revient à accentuer la différence entre les deux populations de spins d'un noyau et conduit à une augmentation du signal de 10^3 à 10^5 comparé à celui obtenu en RMN avec du xénon de polarisation thermique.

Décrite pour la première fois par Kastler dans les années 50,[74] la méthode de pompage optique se décompose en deux parties : le pompage optique menant à la polarisation des spins électroniques d'un métal alcalin (le rubidium dans le cas du xénon) vaporisé à haute température, puis le transfert de cette polarisation aux spins nucléaires du xénon-129 par échange de spin en présence d'un gaz inerte comme le diazote.

- Pompage optique

Le rubidium, de configuration électronique [Kr] $5s^1$, dispose d'un état fondamental $^2S_{1/2}$ composé lui-même de deux sous-états magnétiques (+/- ½). En irradiant un échantillon, préalablement chauffé à 100°C, par un laser de longueur d'onde 794 nm, le rubidium passe dans un état excité $^2P_{1/2}$, lui-même composé de deux sous-états magnétiques. Dans ces conditions, la radiation laser étant polarisée circulairement, et réalisée sous un faible champ magnétique, une seule transition électronique est possible : de $^2S_{-1/2}$ vers $^2P_{+1/2}$. Une fois le niveau excité peuplé, des collisions entre atomes provoquent une équilibration des populations entre les deux sous-états excités, qui se désexcitent par la suite de manière non radiative et équiprobable vers les deux sous-états fondamentaux. Cependant la vitesse d'excitation de spin étant supérieure à la vitesse de relaxation électronique, on obtient au final une forte concentration de rubidium à l'état de spin électronique +½ et donc une polarisation de spin (Figure 26).

[74] Kastler, A., *Quelques Suggestions Concernant La Production Optique et La Détection Optique d'une Inégalité de Population Des Niveaux de Quantifigation Spatiale Des Atomes. Application à l'expérience de Stern et Gerlach et à La Résonance Magnétique*, J. Phys. le Radium, **1950**.

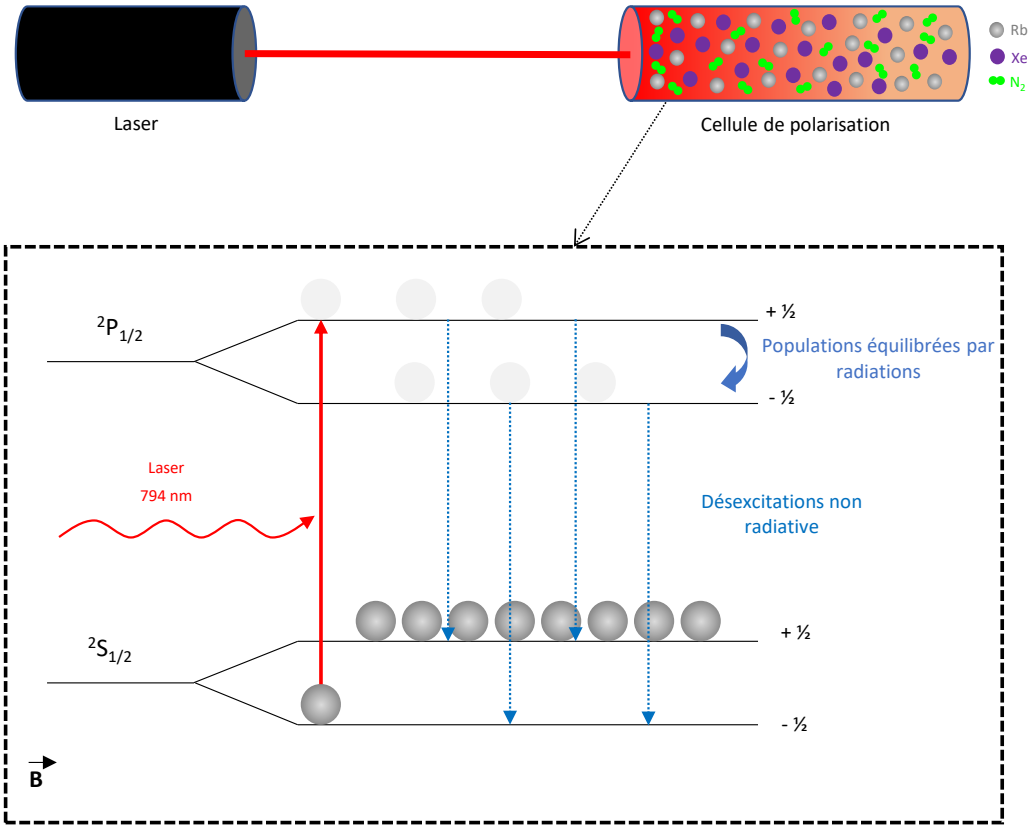


Figure 26 : Schéma du principe de polarisation du rubidium

Pour éviter les désexcitations radiatives qui pourraient avoir lieu et qui risqueraient de détruire une partie de la polarisation, du diazote est également injecté dans la cellule pour quencher la fluorescence du rubidium.

- Transfert de polarisation

La polarisation électronique du rubidium peut ensuite être transférée au spin nucléaire du xénon en phase gaz, suite à son introduction dans la cellule de polarisation (Figure 27). Seulement une petite quantité de ces collisions entraîne une hyperpolarisation du xénon, mais le nombre de ces collisions étant très important et la relaxation nucléaire du xénon étant minime, on arrive rapidement à une importante concentration en xénon hyperpolarisé.

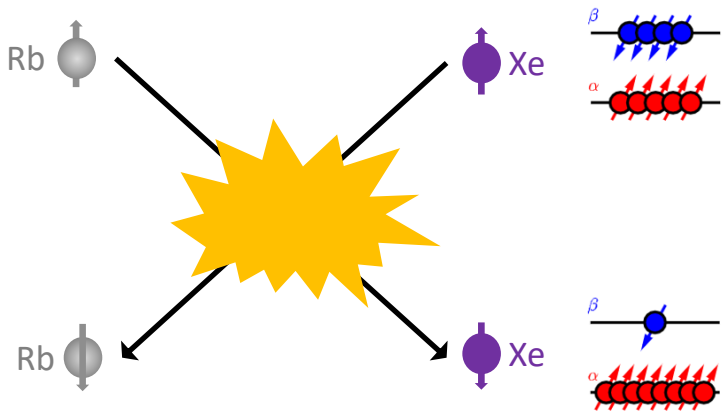


Figure 27 : Processus de transfert de polarisation

En pratique, l'hyperpolarisation a lieu dans une cellule contenant les trois gaz et placée dans un champ magnétique $\overrightarrow{B_0}$ (Figure 28). A la sortie de cette cuve, le xénon peut être récupéré en le condensant à froid dans un tube plongé dans l'azote liquide pour le conserver sous forme liquide en présence d'un champ magnétique, ou peut être directement administré au patient ou injecté dans l'échantillon analysé.

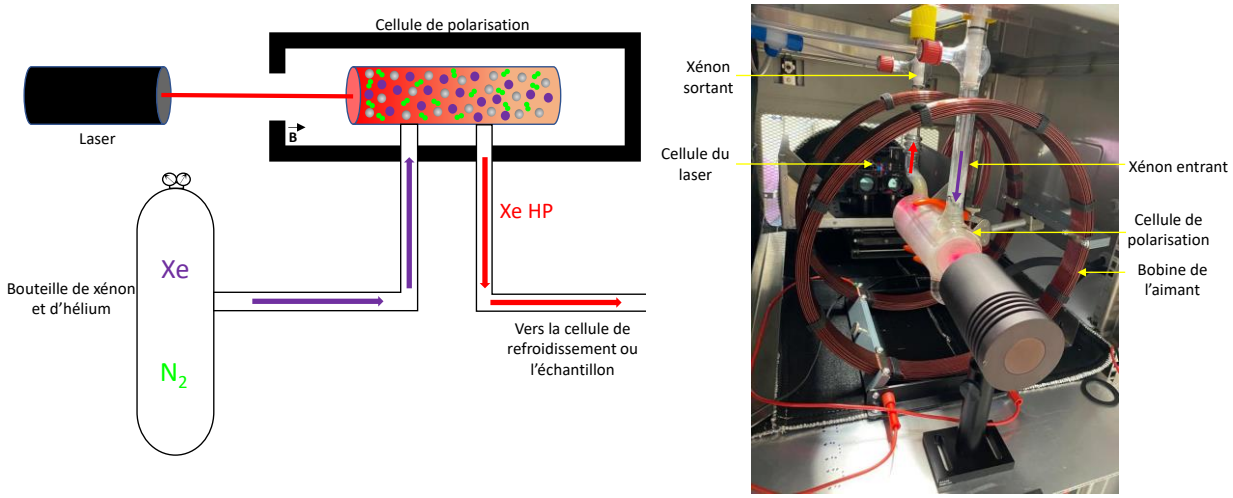


Figure 28 : Schéma simplifié du montage pour la production du xénon hyperpolarisé et photo du montage du laboratoire

Beaucoup de développements sont actuellement menés pour essayer à la fois d'augmenter le ratio de xénon hyperpolarisé (environ 60% actuellement) produit et de limiter la perte de polarisation entre l'appareillage et le sujet étudié. De nouvelles techniques sont mises au point comme la production de xénon hyperpolarisé en flow continu[75] ou la production dite « en batch ».[76]

[75] Hughes-Riley, T. et al., *Cryogenics Free Production of Hyperpolarized 129Xe and 83Kr for Biomedical MRI Applications*, J. Magn. Reson., **2013**, Vol. 237 23-33.
[76] Birchall, J. R. et al., *Batch-Mode Clinical-Scale Optical Hyperpolarization of Xenon-129 Using an Aluminum Jacket with Rapid Temperature Ramping*, Anal. Chem., **2020**, Vol. 92 (6), 4309-4316.

3.2.2. Méthodes d'injection

Les pertes de polarisation peuvent être lourdes et il est important de bien choisir le mode d'injection du xénon hyperpolarisé dans les échantillons. Ces méthodes peuvent différer suivant qu'on travaille *in vitro* ou *in vivo*.

- *In vitro* : le xénon peut essentiellement être administré par deux voies différentes suivant le type de solution de l'échantillon. Pour les solutions non sensibles au froid il est possible de le récupérer en sortie du système d'hyperpolarisation sous forme liquide en le faisant passer dans de l'azote liquide. Il peut ensuite être injecté directement dans l'échantillon, dont les traces d'oxygène pouvant perturber la qualité des spectres sont préalablement éliminées par des cycles gel/dégel, puis sera agité vigoureusement pour accélérer la dissolution du xénon.

Pour les solutions sensibles au froid, elles sont d'abord dégazées en faisant buller de l'azote ou de l'argon puis le xénon est directement ajouté en étant lui aussi bullé. Des systèmes d'approvisionnement de l'échantillon en xénon hyperpolarisé par flux constant ont été mis au point[77] bien que le flux doive être interrompu le temps de l'analyse pour ne pas perdre de la résolution. L'ajout de système de membranes au montage permet de limiter la formation de bulles et ainsi d'avoir un flux constant même durant l'analyse.[78] Dans tous les cas, l'injection doit être réalisée proche de l'appareillage d'hyperpolarisation pour limiter au maximum la perte de cette polarisation.

- *In vivo* : comme précédemment il existe essentiellement deux façons différentes d'injecter le xénon. La voie privilégiée et la plus simple est l'inhalation directe du gaz, évidemment pour l'observation des poumons mais également dans certains cas directement le cerveau[79] du fait de la rapide biodistribution du gaz.

La deuxième voie est l'injection, certes plus invasive mais également plus directe que l'inhalation. Le xénon doit pour cela être dissous dans un solvant biocompatible et où sa vitesse de relaxation est faible. Il peut être injecté directement dans des solutions salines ou à l'aide de nanoémulsions de perfluorocarbones[80] ou de liposomes.[81] Un système a également été mis au point dans lequel le xénon est injecté directement dans le sang, préalablement pompé hors du corps de souris, pour être ensuite réinjecté dans une artère.[82]

---

[77] Han, S.-I. et al., *NMR-Based Biosensing with Optimized Delivery of Polarized 129 Xe to Solutions*, Anal. Chem., **2005**, Vol. 77 (13), 4008–4012.
[78] Truxal, A. E. et al., *Nondisruptive Dissolution of Hyperpolarized 129 Xe into Viscous Aqueous and Organic Liquid Crystalline Environments*, Angew. Chemie Int. Ed., **2016**, Vol. 55 (15), 4666–4670.
[79] Rao, M. R. et al., *Imaging Human Brain Perfusion with Inhaled Hyperpolarized 129 Xe MR Imaging*, Radiology, **2018**, Vol. 286 (2), 659–665.
[80] Stevens, T. K. et al., *Nanoemulsion Contrast Agents with Sub-Picomolar Sensitivity for Xenon NMR*, J. Am. Chem. Soc., **2013**, Vol. 135 (26), 9576–9579.
[81] Schnurr, M. et al., *Functionalized Lipopeptide Micelles as Highly Efficient NMR Depolarization Seed Points for Targeted Cell Labelling in Xenon MRI*, Adv. Biosyst., **2020**, Vol. 4 (3), 1900251.
[82] Cleveland, Z. I. et al., *In Vivo MR Imaging of Pulmonary Perfusion and Gas Exchange in Rats via Continuous Extracorporeal Infusion of Hyperpolarized 129Xe*, PLoS One, **2012**, Vol. 7 (2), e31306.

3.2.3. HyperCEST

Le gain de sensibilité obtenu par l'hyperpolarisation du xénon est important mais n'est parfois pas encore suffisante, surtout pour des applications biologiques où les doses de xénon utilisées sont de l'ordre du subnanomolaire. La technique de l'HyperCEST a alors été mise au point par l'équipe de A. Pines en 2006,[83] qui est une amélioration de la méthode d'acquisition du signal et permet d'augmenter encore la sensibilité.

Elle tire profit de l'échange rapide entre le xénon encapsulé et le xénon en solution et est basée sur une technique précédemment décrite (cf 2.3.5) et déjà utilisée pour les agents de contraste pour l'IRM du proton : le CEST. Le principe est que, compte tenu que les concentrations de xénon encapsulé sont très faibles, il est plus simple de détecter le xénon libre, qui est en plus grande proportion, et plus particulièrement les variations de son signal. En effet l'échange du xénon entre son hôte et la solution est très lent par rapport à l'échelle de temps de la RMN du xénon, mais très rapide par rapport au temps d'acquisition, et peut donc être mis à profit pour détecter le xénon encapsulé.

Pour cela un premier spectre RMN du xénon hyperpolarisé est réalisé dans lequel on observe le pic du xénon en solution. Puis on soumet l'échantillon à une impulsion de fréquence correspondant au xénon encapsulé, qui a pour conséquence de le dépolarisé. Ensuite, par échange avec le milieu ce xénon va diffuser dans l'échantillon, l'effet de saturation va être transféré au xénon libre et son signal sera atténué. Ainsi en enregistrant un nouveau spectre RMN puis en le soustrayant au premier, on détermine la dépolarisation partielle des atomes de xénon relargués et on obtient un spectre dit HyperCEST qui est un indicateur de la présence du xénon encapsulé (Figure 29). Le spectre HyperCEST sera non nul après soustraction en présence de xénon encapsulé alors qu'il sera nul s'il est absent.[84]

[83] Schroder, L. et al., *Molecular Imaging Using a Targeted Magnetic Resonance Hyperpolarized Biosensor*, Science (80-.)., **2006**, Vol. 314 (5798), 446–449.
[84] Schröder, L., *Xenon Biosensor HyperCEST MRI*, Hyperpolarized Inert Gas MRI, **2017**, 263–277.

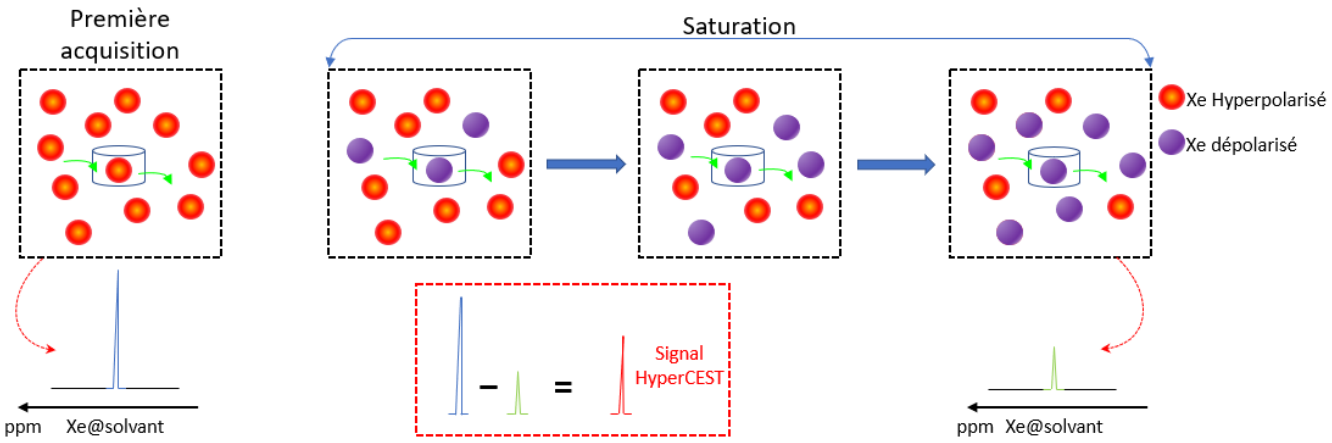


Figure 29: Schéma du principe de la technique HyperCEST

Dans la pratique cette technique est extrêmement intéressante dans le cadre d'obtention d'image car elle permet de localiser une biosonde dans une zone précise. Ainsi une zone contenant la biosonde sera visible grâce à une perte de signal du xénon en solution alors qu'une zone n'en contenant pas ne donnera pas de signal. De cette façon l'équipe de Pines a utilisé une biosonde à base de cryptophane pour détecter la présence de la protéine d'avidine (Figure 30).

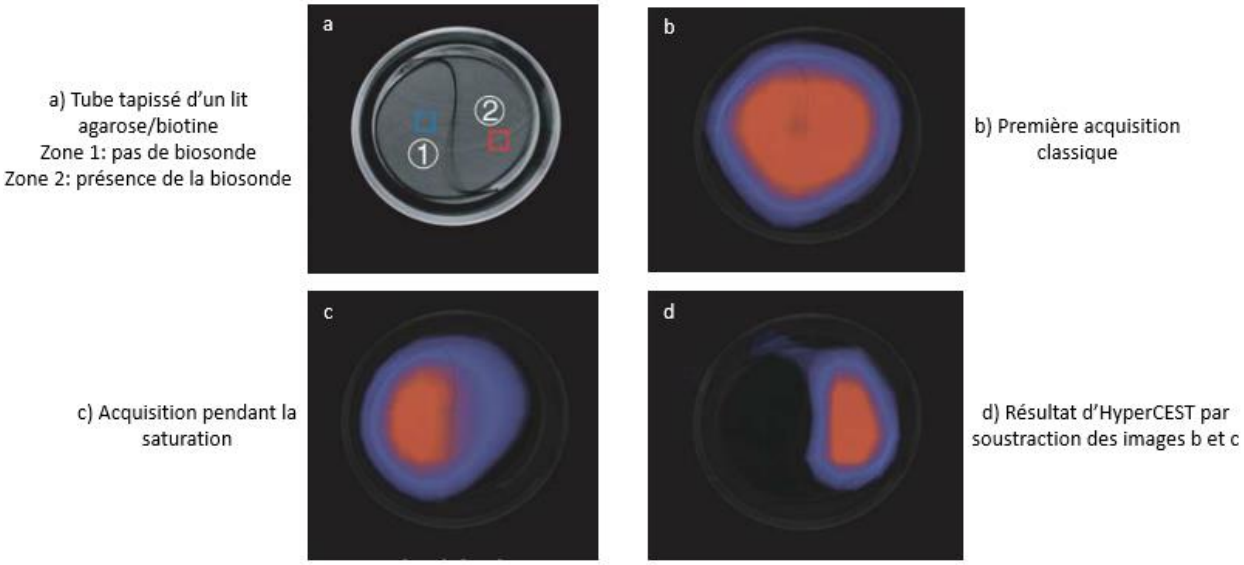


Figure 30 : Résultat d'une expérience HyperCEST pour la détection d'avidine[84]

Cette méthode permet donc de détecter une biosonde a des concentrations extrêmement faibles et qui n'auraient été que peu ou pas détectée autrement. Cependant elle demande des temps d'acquisition assez long comprenant notamment plusieurs périodes de saturation, ce qui nécessite d'être en mesure d'alimenter régulièrement l'échantillon en xénon hyperpolarisé.

Le xénon est donc un élément de choix pour de possibles applications en imagerie médicale. Cependant il n'est pas spécifique d'une cible biologique, et se diffuse de façon homogène

dans tout le corps en se fixant préférentiellement sur des zones hydrophobes. Il est donc évident que, pour en faire un agent de contraste utile autrement que pour l'imagerie du système respiratoire, il convient de concevoir des biosondes capables d'encapsuler le xénon et de le transporter vers la cible biologique à visualiser.

3.3. Structures encapsulant le Xénon

Les biosondes à xénon doivent être composées d'un système hôte capable de capturer le xénon, un bras espaceur et un site de reconnaissance de la cible visée. La forte sensibilité du xénon à son environnement peut alors être exploitée puisqu'elle entrainera l'apparition de différents signaux RMN ou IRM, correspondant au xénon libre, au xénon dans la biosonde et au xénon dans la biosonde fixée à sa cible (Figure 31). Ainsi en sélectionnant la fréquence de cette dernière on est capable de déterminer la présence ou l'absence de la cible et de la localiser.

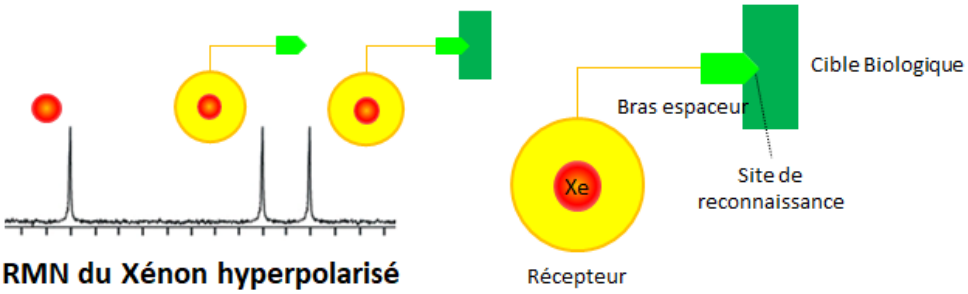


Figure 31 : Concept d'une biosonde à xénon hyperpolarisé

Pour être efficace le récepteur doit remplir plusieurs critères :

- Posséder une forte affinité pour le xénon, mesurée par la constante d'affinité. Elle est définie comme la force de l'interaction entre la macromolécule hôte et le gaz ou cation invité. Pour cela on peut notamment se référer aux critères énoncés par Rebek[85] qui a montré qu'il existe un ratio optimal entre la taille de la molécule invitée et la taille de la molécule hôte de 55%. Ainsi dans le cas du xénon, son volume de Van der Waals étant de 42 $Å^3$, le volume idéal d'une molécule hôte est donc de 76 $Å^3$. De plus la nature des interactions entre l'hôte et le gaz joue aussi un rôle comme l'effet hydrophobe par exemple.
- Posséder une vitesse d'échange d'entrée/sortie du xénon adapté : lent à l'échelle de la RMN pour maintenir une bonne résolution, mais assez rapide pour alimenter suffisamment la sonde en xénon hyperpolarisé. Dans le cas d'une application médicale avec un appareil utilisant un champ magnétique classique, la limite haute de constante de vitesse d'échange est de 21 kHz.

[85] Mecozzi, S. et al., *The 55 % Solution: A Formula for Molecular Recognition in the Liquid State*, Chem. - A Eur. J., **1998**, Vol. 4 (6), 1016–1022.

- Avoir une différence de déplacement chimique en RMN du xénon par rapport au xénon libre suffisante pour pouvoir être distingué.
- Minimiser la relaxation du xénon au sein de le système hôte. Il faut s'assurer que le passage du xénon dans le récepteur n'accélère pas trop la relaxation de ses spins, sous peine de perdre trop rapidement la polarisation et diminuer le signal. Cette atténuation est principalement due aux interactions xénon-protons à l'intérieur du récepteur. Un temps de résidence de 10 secondes est défini comme permettant encore de réaliser des mesures avec un signal suffisant.
- Être suffisamment soluble en milieu aqueux et facilement adressable pour des applications *in vivo*.

Le premier exemple de sonde utilisant du xénon a été décrite par l'équipe de Pines en 2001.[86] Elle est composée de trois parties : un cryptophane comme molécule cage, un bras espaceur composé d'acides aminés pour la rendre hydrosoluble et une biotine comme site de reconnaissance de l'avidine (Figure 32).

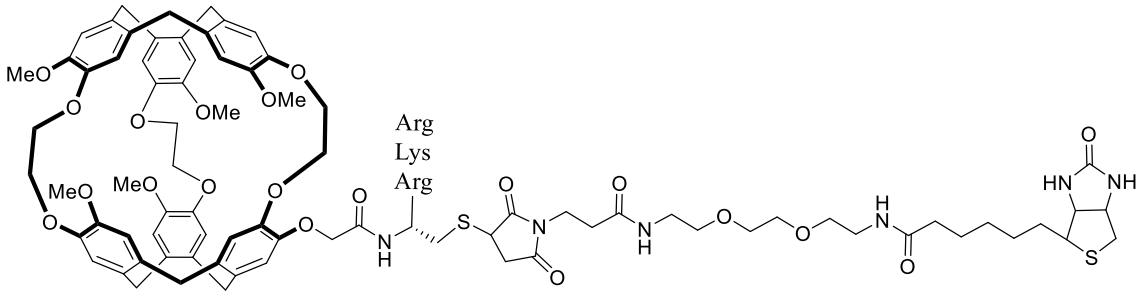


Figure 32 : Structure de la première biosonde à xénon

Depuis, de nombreuses biosondes ont été développées, utilisant différentes structures supramoléculaires comme agent complexant, possédant toutes des avantages et inconvénients.[87,88] Nous allons ici présenter les structures les plus communes connues pour encapsuler du xénon.

3.3.1. Cyclodextrines

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques composés classiquement de 6 à 8 chaînons glucopyranose, reliés par des liaisons α-1,4. Molécules cages d'origine naturelle, les composés les plus étudiés sont les α, β et γ cyclodextrines (Figure 33).[89]

[86] Spence, M. M. et al., *Functionalized Xenon as a Biosensor*, Proc. Natl. Acad. Sci., **2001**, Vol. 98 (19), 10654–10657.
[87] Berthault, P. et al., *Biosensing Using Laser-Polarized Xenon NMR/MRI*, Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc., **2009**, Vol. 55 (1), 35–60.
[88] Wang, Y. et al., *An Expanded Palette of Xenon-129 NMR Biosensors*, Acc. Chem. Res., **2016**, Vol. 49 (10), 2179–2187.
[89] Shepelytskyi, Y. et al., *Cyclodextrin-Based Contrast Agents for Medical Imaging*, Molecules, **2020**, Vol. 25 (23), 5576.

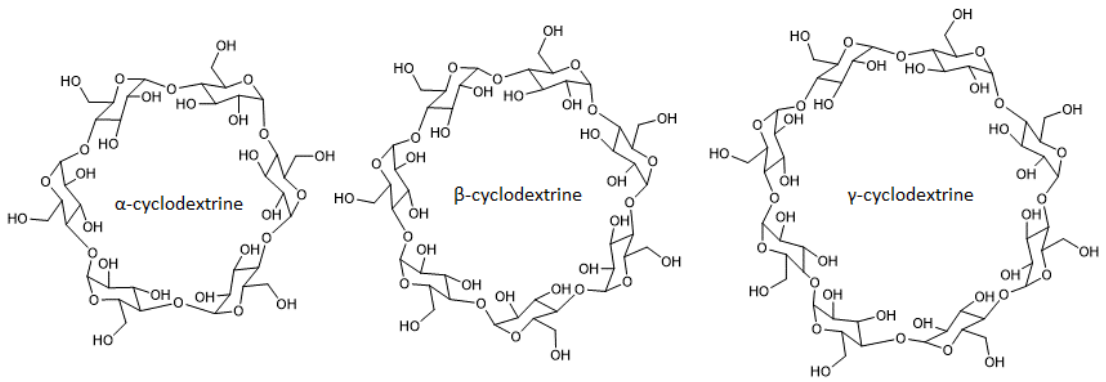


Figure 33 : Structure des α, β et γ cyclodextrines

Des essais d'encapsulation du xénon ont été réalisés sur la plus petite structure d'entre elles, l'α-cyclodextrine, qui encapsule bien le xénon,[90] avec une constante d'affinité estimée à 20 M^{-1} à 298 K. Cependant, cette constante est jugée trop faible pour des applications en tant que biosonde, cela étant dû à son trop grand volume (entre 140 et 170 $Å^3$).[91]

Récemment, la γ-cyclodextrine a été utilisée pour réaliser un pseudorotaxane décrit comme capable d'encapsuler du xénon dans le cadre d'application en imagerie du xénon hyperCEST.[92] Cette structure ne peut cependant pas être appliquée pour une application de biosonde pour l'instant car ayant des problèmes de stabilité.

3.3.2. Hémicarcérands et calixarènes

Les hémicarcérands ou calixarènes sont composés d'unités phénoliques (de 4 à 20) reliées entre elles par des ponts méthyléniques (Figure 34). Ils sont obtenus par condensation d'un phénol avec le formaldéhyde en milieu basique, présentent une cavité hydrophobe entre leurs noyaux benzéniques et une zone hydrophile au niveau des groupements hydroxyle.

[90] Bartik, K. et al., *Probing Molecular Cavities in a-Cyclodextrin Solutions by Xenon NMR*, J. Magn. Reson. Ser. B, **1995**, Vol. 109 (2), 164–168.
[91] Song, Y.-Q. et al., *Selective Enhancement of NMR Signals Fora-Cyclodextrin with Laser-Polarized Xenon*, Angew. Chemie Int. Ed. English, **1997**, Vol. 36 (21), 2368–2370.
[92] Hane, F. T. et al., *Cyclodextrin-Based Pseudorotaxanes: Easily Conjugatable Scaffolds for Synthesizing Hyperpolarized Xenon-129 Magnetic Resonance Imaging Agents*, ACS Omega, **2018**, Vol. 3 (1), 677–681.

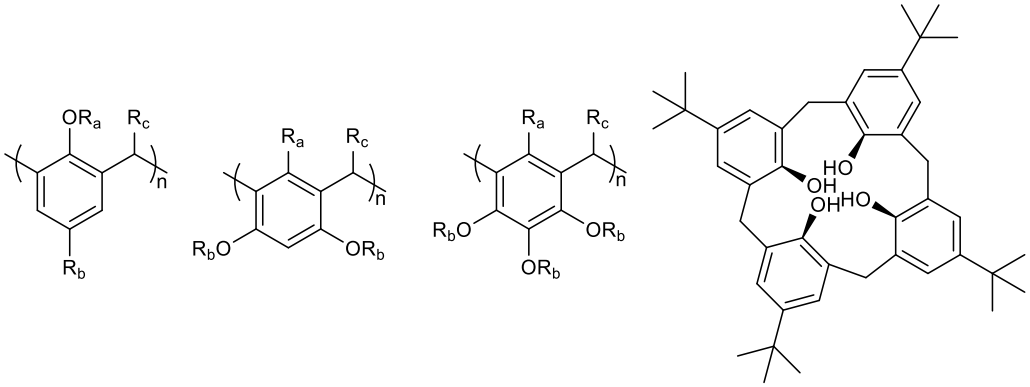


Figure 34 : Motifs classiques des calixarènes et structure d'un calix[4]arène avec des para-*tert*-butyle

Décrits pour la première fois par l'équipe de Cram,[93] ils ont une forme de bol en trois dimensions et ont notamment montré des propriétés d'encapsulation du xénon.[94] Cependant, comme pour les cyclodextrines, la vitesse d'entrée et de sortie du xénon dans la cage est beaucoup trop rapide et les constantes d'affinités sont trop faibles pour une application en imagerie.

Les calixarènes sont aussi utilisés pour synthétiser des carcérands,[95] mais ces structures ne peuvent pas être utilisées pour l'encapsulation du xénon car la complexation est irréversible.

3.3.3. Auto-assemblages

Notamment développés par l'équipe de Rebek,[96] ces structures ont la particularité d'être formées grâce à des liaisons non covalentes lors de l'encapsulation du gaz (Figure 35).

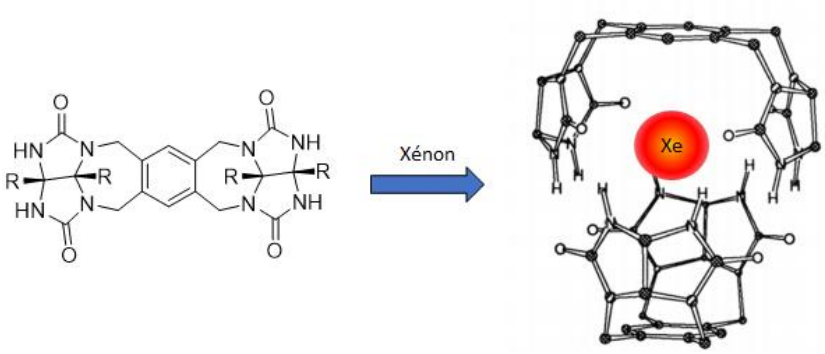


Figure 35 : Schéma du principe de l'auto-assemblage

Des liquides poreux composés d'assemblages d'éther couronnes ont également été décrits comme capables d'encapsuler du xénon.[97] Ce xénon peut ensuite être relargué par ajout de

[93] Cram, D. J. et al., *Host-Guest Complexation. 58. Guest Release and Capture by Hemicarcerands Introduces the Phenomenon of Constrictive Binding*, J. Am. Chem. Soc., **1991**, Vol. 113 (20), 7717–7727.
[94] Fukutomi, J. et al., *Inclusion Complex Formation of Thiacalix[4]Arene and Xe in Aqueous Solution Studied by Hyperpolarized 129Xe NMR*, J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem., **2007**, Vol. 58 (1–2), 115–122.
[95] Robbins, T. A. et al., *Host-Guest Complexation. 67. A Highly Adaptive and Strongly Binding Hemicarcerand*, J. Am. Chem. Soc., **1994**, Vol. 116 (1), 111–122.
[96] Branda, N. et al., *Control of Self-Assembly and Reversible Encapsulation of Xenon in a Self-Assembling Dimer by Acid-Base Chemistry*, J. Am. Chem. Soc., **1995**, Vol. 117 (1), 85–88.
[97] Giri, N. et al., *Liquids with Permanent Porosity*, Nature, **2015**, Vol. 527 (7577), 216–220.

molécules de solvant de petite taille (chloroforme par exemple). Récemment de nouvelles structures composées de deux macrocycles bisurée-bisthiourée ont également été décrites.[98] Elles possèdent généralement des très bonnes constantes d'affinité pour les gaz encapsulés mais ne peuvent pas être envisagées pour une application biologique du fait de leur faible stabilité dans les milieux biologiques.

3.3.4. Pillararènes

Les pillararènes sont des structures macrocycliques composées d'unités hydroxyquinones (para-dihydroxybenzène) reliés par des ponts méthylènes (Figure 36). Synthétisés pour la première fois en 2008, notés pillar[n]arènes, leurs fonctions hydroxy peuvent être fonctionnalisées suivant l'application recherchée.[99]

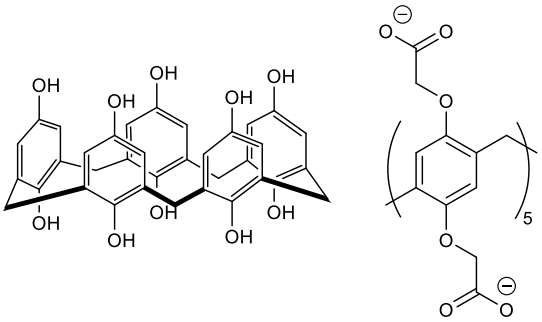


Figure 36 : Structure classique des pillar[5]arènes et motif de ceux utilisés pour l'encapsulation du xénon

Beaucoup utilisés comme plateformes pour de la chimie hôte-invité, le composé possédant 5 unités hydroxyquinones a été testé pour l'encapsulation du xénon[100] Il a également été comparé au cryptophane A, montrant une meilleure constante d'affinité pour le xénon.[101] Cependant ce type de structure n'a toujours pas été décrite dans le cadre d'une application de biosonde pour la RMN du xénon.

3.3.5. Cucurbiturils

Les cucurbiturils sont des structures moléculaires macrocycliques composées de n motifs glycolurils reliés par des ponts méthylènes, notés CB[n], dont le nombre de motifs peut varier pour donner naissance à toute une famille de composés (Figure 37). Les composés allant de 5 à 10 unités ont des volumes de cavité interne allant de 82 à 870 Å^3.[102]

---

[98] Nie, S.-X. et al., *Xenon Binding by a Tight yet Adaptive Chiral Soft Capsule*, Nat. Commun., **2020**, Vol. 11 (1), 6257.
[99] Ogoshi, T. et al., *Para -Bridged Symmetrical Pillar[5]Arenes: Their Lewis Acid Catalyzed Synthesis and Host-Guest Property*, J. Am. Chem. Soc., **2008**, Vol. 130 (15), 5022–5023.
[100] Adiri, T. et al., *Potential 129Xe-NMR Biosensors Based on Secondary and Tertiary Complexes of a Water-Soluble Pillar[5]Arene Derivative*, Chem. Commun., **2013**, Vol. 49 (63), 7082.
[101] Fernando, P. U. A. I. et al., *Decacationic Pillar[5]Arene: A New Scaffold for the Development of 129 Xe MRI Imaging Agents*, ACS Omega, **2020**, Vol. 5 (43), 27783–27788.
[102] Miyahara, Y. et al., *"Molecular" Molecular Sieves: Lid-Free Decamethylcucurbit[5]Uril Absorbs and Desorbs Gases Selectively*, Angew. Chemie Int. Ed., **2002**, Vol. 41 (16), 3020.

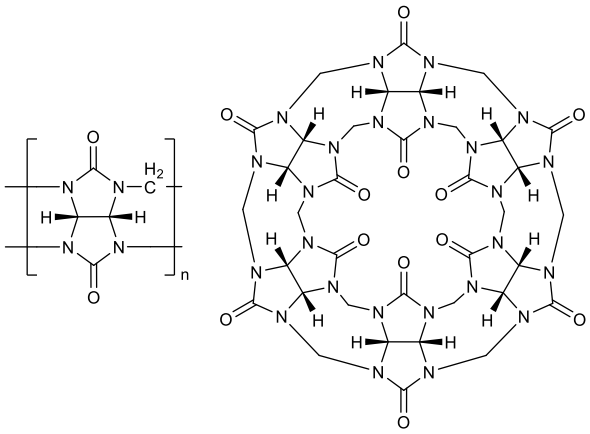


Figure 37 : Motif glycoluril et structure du CB[6]

Ils sont capables d'encapsuler une grande variété de gaz, notamment le CB[5] et CB[6], dont une constante d'affinité avec le xénon de 3000 M^{-1} à 295 K a été mesurée pour le second.[103] Le composé avec 5 unités, malgré sa taille idéale, n'est pas utilisé pour l'encapsulation du xénon, car ayant une structure trop rigide, l'échange du xénon est trop lent. Plus récemment un cucurbituril avec 7 unités a été utilisé pour la détection sélective d'interactions de protéines par RMN du xénon hyperCEST.[104] Ils ont également été utilisés comme constituants de rotaxanes pour la détection de protéases par RMN du xénon hyperpolarisé.[105]

Ces molécules semblent très prometteuses pour une application en tant que biosonde pour le xénon, offrant notamment de larges plages de déplacements chimiques, bien que des réserves soient émises sur une possible compétition pour les sites de complexation avec des espèces endogènes dans les milieux biologiques. [106]

3.3.6. Cryptophanes

Les cryptophanes ont été obtenus pour la première fois par l'équipe de Collet en 1981.[107] Ils sont composés de deux sous unités cyclotrivératrylènes (CTV) reliés entre elles par des chaînes pontantes de type alkyldioxy. La longueur de ces chaînes peut varier ainsi que la nature des substituants des sous unités, conduisant à une très large gamme de composés (Figure 38).[108]

---

[103] Kim, B. S. et al., *Water Soluble Cucurbit[6]Uril Derivative as a Potential Xe Carrier for 129Xe NMR-Based Biosensors*, Chem. Commun., **2008**, (24), 2756.
[104] Truxal, A. E. et al., *Directly Functionalized Cucurbit[7]Uril as a Biosensor for the Selective Detection of Protein Interactions by 129 Xe HyperCEST NMR*, Chem. – A Eur. J., **2019**, Vol. 25 (24), 6108–6112.
[105] Slack, C. C. et al., *Rotaxane Probes for Protease Detection by 129 Xe HyperCEST NMR*, Chem. Commun., **2017**, Vol. 53 (6), 1076–1079.
[106] Wang, Y. et al., *Cucurbit[6]Uril Is an Ultrasensitive 129 Xe NMR Contrast Agent*, Chem. Commun., **2015**, Vol. 51 (43), 8982–8985.
[107] Gabard, J. et al., *Synthesis of a (D3)-Bis(Cyclotriveratrylenyl) Macrocage by Stereospecific Replication of a (C3)-Subunit*, J. Chem. Soc. Chem. Commun., **1981**, (21), 1137–1139.
[108] Zemerov, S. D. et al., *Cryptophane-Xenon Complexes For129Xe MRI Applications*, RSC Adv., **2021**, Vol. 11 (13), 7693–7703.

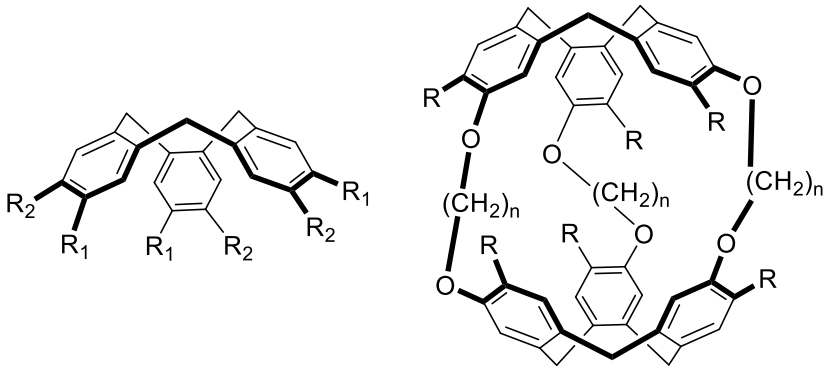


Figure 38 : Structure globale des CTV et cryptophanes

Ils présentent une cavité hydrophobe adaptée à l'encapsulation du xénon et présentent à ce jour les meilleures constantes d'affinité (10 000 M^{-1} à 300 K) pour le [111],[109] et des constantes de vitesse d'échange tout à fait adaptées (entre 1 et 50 Hz). Les cryptophanes étant l'objet de cette thèse leurs structures et applications seront présentées en détail dans le prochain chapitre.

En résumé on peut dire que les cucurbiturils et les cryptophanes sont les deux molécules cages les plus susceptibles d'être utilisées pour concevoir une biosonde pour la RMN du xénon hyperpolarisé. Cela s'explique notamment par leur taille de cavité adaptée et la grande diversité structurale possible.

4. Les cryptophanes

Les cryptophanes sont composés de deux sous unités cyclotrivératrylènes reliées entre elles par des chaînes pontantes. Leur structure et chimie étant intimement liée à celle des CTV qui les composent, il convient dans un premier temps de les présenter.

4.1. Les cyclotrivératrylènes

Synthétisés pour la première fois en 1915,[110] ce n'est pas avant 1965 que la structure des CTV a été clairement identifiée.[111] L'appellation générale de ces molécules comportant trois noyaux aromatiques est tribenzo(a, d, g)cyclononatriène (Figure 39).

[109] Fogarty, H. A. et al., *A Cryptophane Core Optimized for Xenon Encapsulation*, J. Am. Chem. Soc., **2007**, Vol. 129 (34), 10332–10333.
[110] Robinson, G. M., *A Reaction of Homopiperonyl and of Homoveratryl Alcohols*, J. Chem. Soc., Trans., **1915**, Vol. 107 267–276.
[111] Lindsey, A. S., *The Structure of Cyclotriveratrylene (10,15-Dihydro-2,3,7,8,12,13-Hexamethoxy-5H-Tribenzo[a,d,g]Cyclononene) and Related Compounds*, J. Chem. Soc., **1965**, 1685–1692.

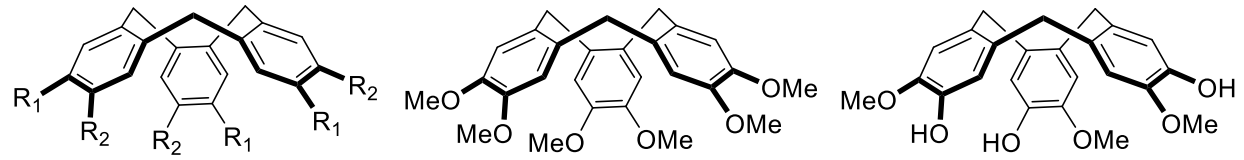


Figure 39 : Structure générique et structures du CTV et CTB

Par abus de langage et dans un souci de simplicité, tous les dérivés de cyclotrivératrylènes seront appelés CTV.

4.1.1. Synthèse

Il existe deux grandes voies d'obtention des CTV, les deux basées sur une triple réaction de Friedel et Crafts (Figure 40).[112]

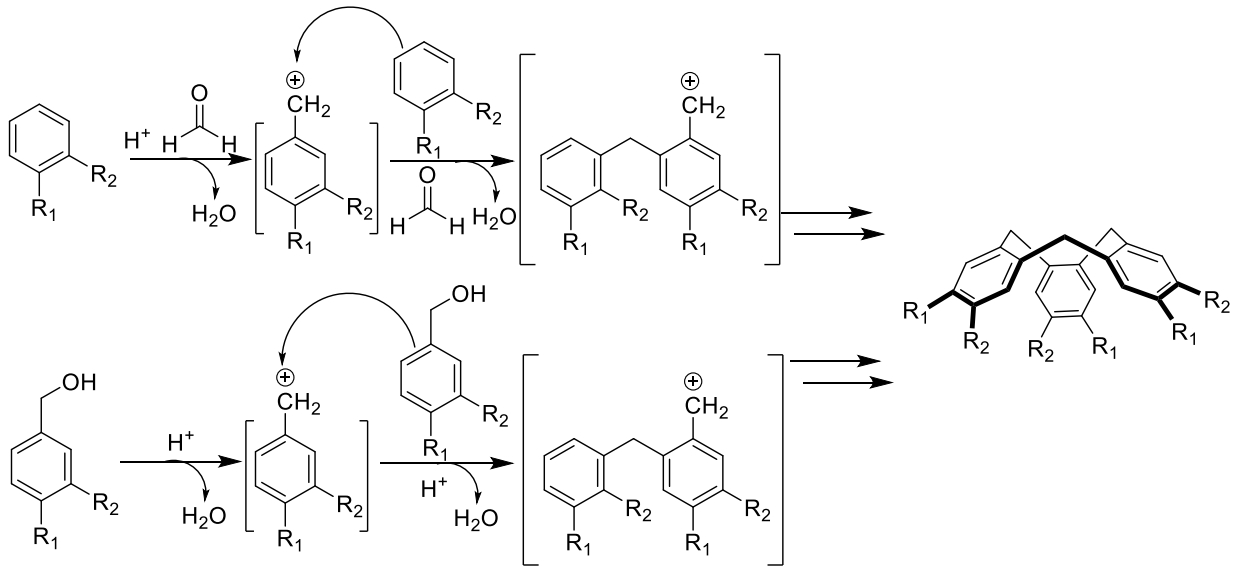


Figure 40 : Voies de synthèse du CTV

La première consiste à mettre en présence des dérivés du vératrole avec du formaldéhyde en milieu acide. La réaction passe par un intermédiaire de type carbocation benzylique après réaction avec le formaldéhyde et déshydratation en milieu acide. Cet intermédiaire est ensuite attaqué par une seconde unité vératrole par substitution électrophile aromatique puis l'enchaînement est répété. La dernière étape d'attaque par une unité vératrole est effectuée en intramoléculaire et non en intermoléculaire pour ainsi fermer la molécule et obtenir le CTV. L'ensemble de cet enchaînement est appelé une cyclotrimérisation.

La deuxième consiste à introduire préalablement une espèce générant le carbocation intermédiaire, grâce à un alcool benzylique. Le cation formé est alors attaqué par un autre cycle aromatique par substitution électrophile aromatique. Cette méthode est actuellement la plus utilisée et certaines conditions doivent être remplies pour fonctionner. Le

[112] Collet, A., *Cyclotriveratrilenes and Cryptophanes*, Tetrahedron, **1987**, Vol. 43 (24), 5725–5759.

groupement R_2 joue un rôle dans l'activation de la nucléophilie en position para, on privilégie donc des groupements à effet mésomère donneur. Le groupement R_1 permet lui seulement de protéger la position des substitutions secondaires en ortho de R_2. Enfin ce type de réaction est catalysée en milieu acide, de Brönsted (HCOOH, $HClO_4$) ou de Lewis ($ScOTf_3$, P_2O_5) et doit être réalisée en milieu dilué pour limiter la formation de polymères possédant plus de trois cycles aromatiques.[113]

4.1.2. Chiralité

Le CTV est une molécule achirale tant que ses substituants sont identiques. En revanche si R_1 et R_2 sont différents, la molécule devient chirale et la symétrie des composés dépend de la méthode de synthèse employée. La première voie, créant deux carbocations différents conduit à un mélange d'énantiomères de symétries C_3 et C_1(Figure 41).

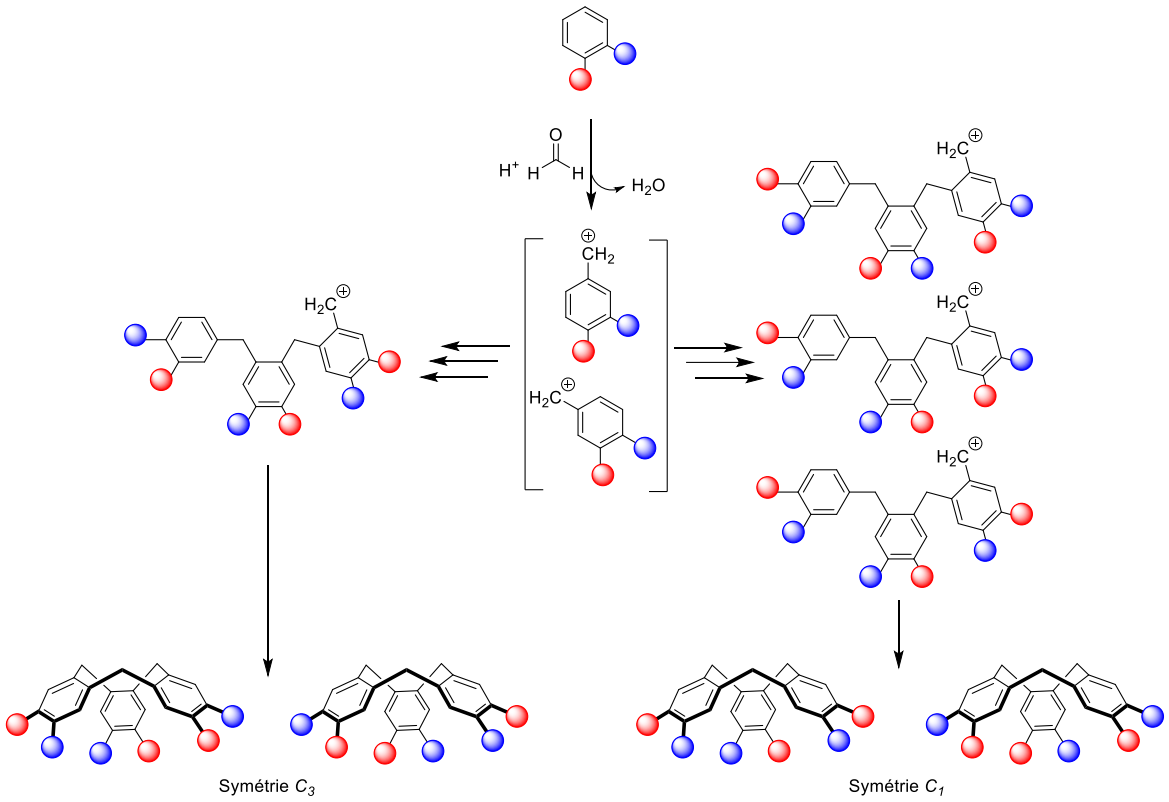


Figure 41 : Première voie de synthèse des CTV en partant d'un vératrole

La deuxième voie, ne créant qu'un seul type de carbocation, ne conduit qu'à un mélange racémique de deux énantiomères de symétrie C_3 (Figure 42).

[113] White, J. D. et al., *Cyclotetraveratrylene : Characterisation and Conformational Properties*, Tetrahedron, **1974**, Vol. 30 (15), 2273-2277.

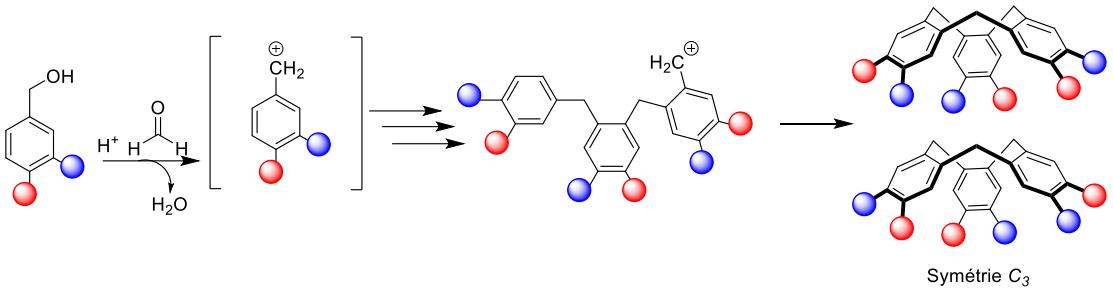


Figure 42 : Deuxième voie de synthèse des CTV à partir d'un alcool benzylique

L'obtention de CTV énantiomériquement purs est possible par l'introduction d'un substituant chiral avant[114] ou après cyclisation,[115] par séparation des diastéréoisomères obtenus par chromatographie puis par clivage des groupements chiraux.

Les CTV de symétrie C_3 ont trouvé un large champ d'application suivant leur fonctionnalisation. Ils sont utilisés en tant que sonde à ions et molécules organiques en étant fonctionnalisés par des molécules fluorescentes sensibles à leur environnement.[116] En étant fonctionnalisés par des molécules de type triphénylène ils adoptent les propriétés de cristaux liquides.[117] Ils ont également été décrits comme systèmes de purification et d'extraction d'actinides.[118] Ils sont aussi connus pour être les précurseurs d'assemblages moléculaires plus complexes comme des capsules,[119] les cryptophanes[120] et hémicryptophanes (Figure 43).[121]

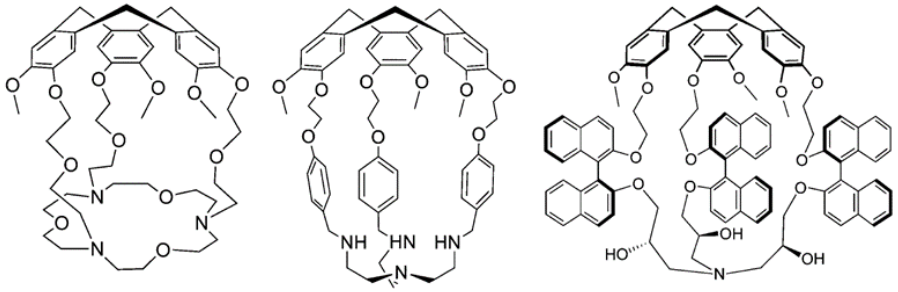


Figure 43 : Exemples de structures d'hémicryptophanes[121]

[114] Collet, A. et al., *Chromophores Chiraux Possedant La Symetrie C3. Synthese de Derives Optiquement Actifs Du Cyclotriveratrylene*, Tetrahedron Lett., **1978**, Vol. 19 (15), 1265-1268.
[115] Canceill, J. et al., *Exciton Approach to the Optical Activity of C3-Cyclotriveratrylene Derivatives*, J. Am. Chem. Soc., **1985**, Vol. 107 (5), 1299-1308.
[116] Fernandes, P. F. et al., *A Novel Sensor from Cyclotriveratrylene Derivative for Rapid Detection of 4-Nitrophenol Based on Fluorescence*, Asian J. Chem., **2020**, Vol. 32 (9), 2139-2142.
[117] Chen, S. et al., *Bowl Liquid Crystal Based on Cyclotriveratrylene Derivatives with Multiple Triphenylene Units: The Influences of the Numbers of Triphenylene Units on Mesomorphic Behaviors*, J. Mol. Liq., **2018**, Vol. 252 145-150.
[118] Dam, H. H. et al., *Influence of the Platform in Multicoordinate Ligands for Actinide Partitioning*, New J. Chem., **2007**, Vol. 31 (9), 1620.
[119] Kai, S. et al., *How Does Chiral Self-Sorting Take Place in the Formation of Homochiral Pd 6 L 8 Capsules Consisting of Cyclotriveratrylene-Based Chiral Tritopic Ligands?*, Chem. Sci., **2018**, Vol. 9 (17), 4104-4108.
[120] Brotin, T. et al., *Cryptophanes and Their Complexes - Present and Future*, Chem. Rev., **2009**, Vol. 109 (1), 88-130.
[121] Zhang, D. et al., *Emergence of Hemicryptophanes: From Synthesis to Applications for Recognition, Molecular Machines, and Supramolecular Catalysis*, Chem. Rev., **2017**, Vol. 117 (6), 4900-4942.

A l'inverse, les CTV de symétrie C_1 sont beaucoup moins décrits dans la littérature, du fait de la difficulté de leur synthèse et purification. A ce jour l'approche la plus efficace pour leur obtention est de désymétriser un CTV C_3, soit grâce à une monohalogénation directe,[122] soit en modifiant la nature de l'un des substituant du CTV.[123] Une modification de la position apicale a également été décrite.[124] Plus récemment l'équipe de Martinez a mis au point une voie de synthèse optimisée pour obtenir un mélange de CTV C_1 et C_3 à partir d'un mélange 1 :1 de deux alcools benzylique isomères de position (Figure 44).[125] Le mélange de 4 stéréoisomères est, par la suite, purifié par HPLC chirale.

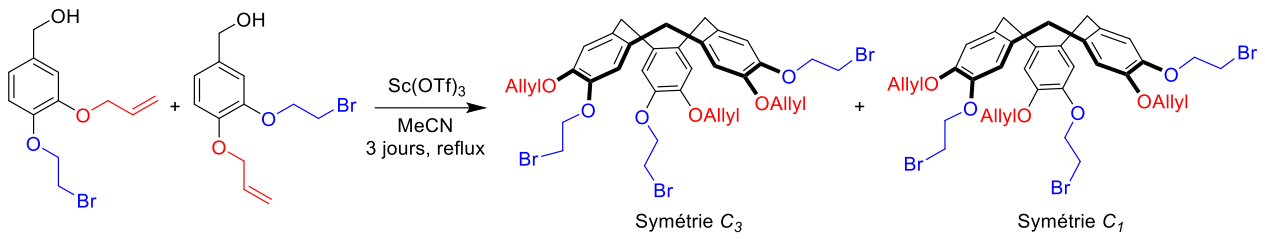


Figure 44 : Voie d'obtention de CTV C_1 mis au point par Martinez *et al.*[125]

Cependant l'ensemble de ces stratégies conduit le plus souvent à des rendements faibles et des purifications difficiles.

4.1.3. Conformation

Il a été montré que les CTV existent sous deux conformations différentes : une plus stable de couronne ou crown et une moins stable de selle de cheval ou « saddle ». La forme couronne est observée, dans la majorité des structures, grâce aux interactions répulsives entre un groupement méthylène et un cycle aromatique. Chaque CTV aura donc deux configurations couronnes dites M et P. Ainsi même un CTV énantiomériquement pur peut « racémiser » par une interconversion « crown to crown » en passant par la forme saddle, en étant chauffé à haute température (Figure 45).

[122] Milanole, G. et al., *A Straightforward Access to Cyclotriveratrylene Analogues with C1 Symmetry: Toward the Synthesis of Monofunctionalizable Cryptophanes*, European J. Org. Chem., **2017**, Vol. 2017 (47), 7091–7100.
[123] Song, J. R. et al., *Synthesis of Functionalized Cyclotriveratrylene Analogues with C 1-Symmetry and the Application for 1,4-Michael Addition of Alcohols to Unsaturated Aryl Ketone*, Tetrahedron, **2013**, Vol. 69 (35), 7308–7313.
[124] Lutz, M. R. et al., *Beckmann Rearrangement of Cyclotriveratrylene (CTV) Oxime: Tandem Beckmann-Electrophilic Aromatic Addition*, Tetrahedron Lett., **2008**, Vol. 49 (34), 5003–5005.
[125] Long, A. et al., *Enantiopure C 1 -Cyclotriveratrylene with a Reversed Spatial Arrangement of the Substituents*, Org. Lett., **2019**, Vol. 21 (1), 160–165.

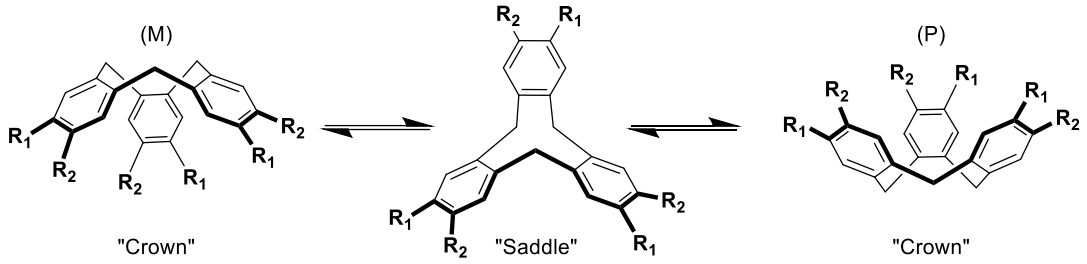


Figure 45 : Interconversion crown to crown d'un CTV

L'interconversion est très lente à température ambiante et il a été possible récemment d'isoler la forme saddle par différents moyens : soit par la modification de la position apicale,[124] soit en chauffant un CTV très encombré par des substituants à 200°C puis en le refroidissant extrêmement vite à -20°C.[126] Plus récemment l'utilisation de HPLC chirale a également permis l'observation de la forme saddle.[127]

Les CTV ayant une chiralité et une conformation dépendantes de sa synthèse et de ses substituants, la structure des cryptophanes qui en découlent en sera forcément impacté.

4.2. Les cryptophanes

4.2.1. Structure et nomenclature

Développés depuis les années 80, il existe aujourd'hui une grande variété de structures des cryptophanes.[120] La nomenclature étant longue et complexe, les premiers cryptophanes ont été appelé par une lettre (A, B, C…) mais très vite, devant la grande diversité de composés, une autre nomenclature arbitraire est trouvée. Elle précise le nombre de carbone présent sur chaque chaîne alkyldioxy et le type de substituants présents sur le cryptophane. Par exemple le cryptophane A devient ainsi le cryptophane [222]-6 OMe et le cryptophane E le cryptophane [333]-6 OMe (Figure 46).

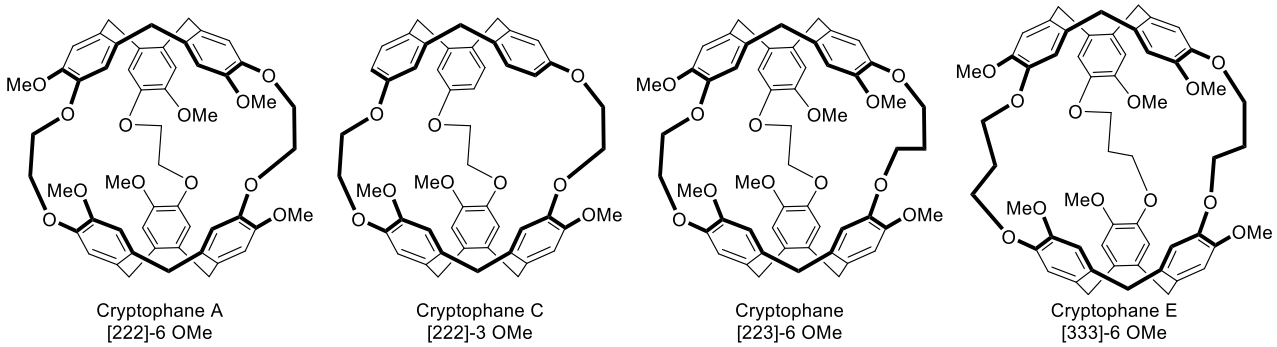


Figure 46 : Structure et nomenclature de quelques cryptophanes

[126] Zimmermann, H. et al., *The Saddle Form of Cyclotriveratrylene*, J. Phys. Chem. B, **2004**, Vol. 108 (48), 18772–18778.
[127] Götz, S. et al., *Efficient Resolution of Racemic Crown-Shaped Cyclotriveratrylene Derivatives and Isolation and Characterization of the Intermediate Saddle Isomer*, Beilstein J. Org. Chem., **2019**, Vol. 15 1339–1346.

De la même façon que les CTV, les cryptophanes disposent également d'une stéréochimie dépendante de leur structure.

4.2.2. Stéréochimie

La stéréochimie des cryptophanes découlant de celle des CTV, eux-mêmes chiraux, deux configurations sont donc possibles pour les cryptophanes. Si les deux unités CTV sont identiques (MM ou PP) on obtient la configuration *anti*. Si les deux unités sont énantiomères, le cryptophane sera *syn*. Il existe donc au final trois stéréoisomères de configuration (Figure 47).

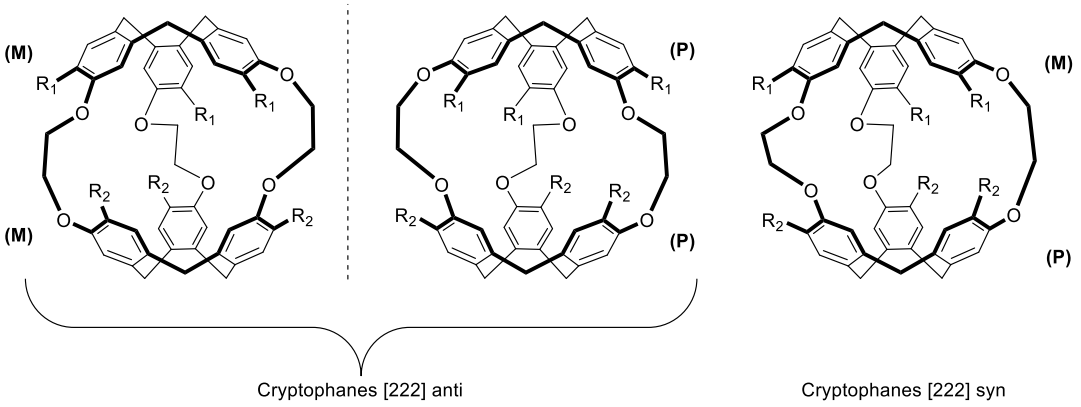


Figure 47 : Exemple des structures *anti* et *syn* dans le cas du cryptophane [222]

Les deux cryptophanes *anti* sont toujours chiraux et énantiomères l'un de l'autre, alors que le cryptophane syn est achiral si R1=R2 et chiral si R1≠R2.

En termes de symétrie, on distingue plusieurs cas en fonction de la nature des substituants et la taille des chaînes pontantes (Tableau 2).

R1 et R2	Chaînes pontantes	Symétrie	
		Forme *Anti*	Forme *Syn*
Identiques	Identiques	C_{3h}	D_3
Identiques	Différentes	C_2	C_s
Différents	Identiques	C_3	C_3
Différents	Différentes	C_1	C_1

Tableau 2 : Différentes symétrie possibles pour les cryptophanes[120]

Enfin, comparé à l'isomère *syn*, les composés *anti* sont plus flexibles et ont donc généralement de meilleures vitesses d'échange.

4.2.3. Conformation

Pour des cryptophanes de grande taille ([333] au minimum), il est possible de voir des changements de conformation, dû à des inversions au niveau des CTV, conduisant à quatre topoisomères différents (Figure 48) :

- Une conformation « out-out » quand les deux CTV sont en forme crown, c'est la plus classique et la plus souvent représentée.
- Une conformation « in-out » quand l'un des CTV en forme couronne pointe ses ponts méthylènes vers la cavité de la molécule.[128]
- Une conformation « in-in » quand les deux CTV pointent leurs ponts méthylènes vers la cavité de la molécule.[129]
- Une conformation « out-saddle » quand l'un des CTV est en conformation saddle.[130,131]

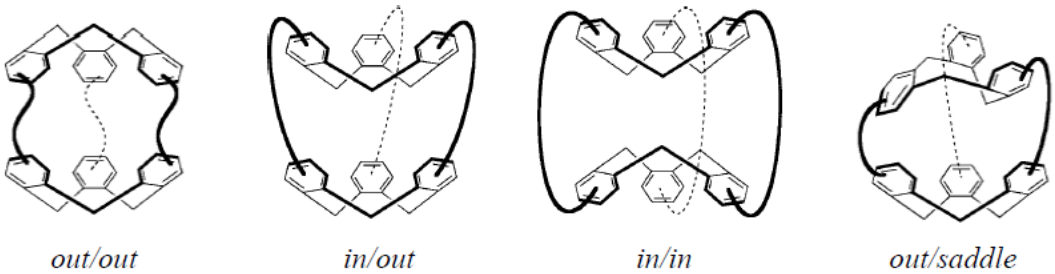


Figure 48 : Différentes conformations du cryptophane[130]

[128] Haberhauer, G. et al., *Strongly Underestimated Dispersion Energy in Cryptophanes and Their Complexes*, Nat. Commun., **2014**, Vol. 5 (1), 3542.
[129] Thorp – Greenwood, F. L. et al., *Fully Collapsed Imploded Cryptophanes in Solution and in the Solid State*, Chem. – A Eur. J., **2019**, Vol. 25 (14), 3536–3540.
[130] Mough, S. T. et al., *Isolation and Structure of an "Imploded" Cryptophane*, Angew. Chemie Int. Ed., **2004**, Vol. 43 (42), 5631–5635.
[131] Taratula, O. et al., *Crystallographic Observation of "induced Fit" in a Cryptophane Host-Guest Model System*, Nat. Commun., **2010**, Vol. 1 (1), 148.

Il est possible de repasser à la forme out-out depuis les autres formes en solubilisant le produit, puis en le chauffant ou en le mettant en présence de gaz pouvant être encapsulé par le cryptophane.

4.2.4. Synthèse

Il existe dans la littérature trois grandes voies d'obtention de cryptophane, toutes partant de l'alcool vanillique ou de ses dérivés, et ayant chacune ses avantages et inconvénients (Figure 49).

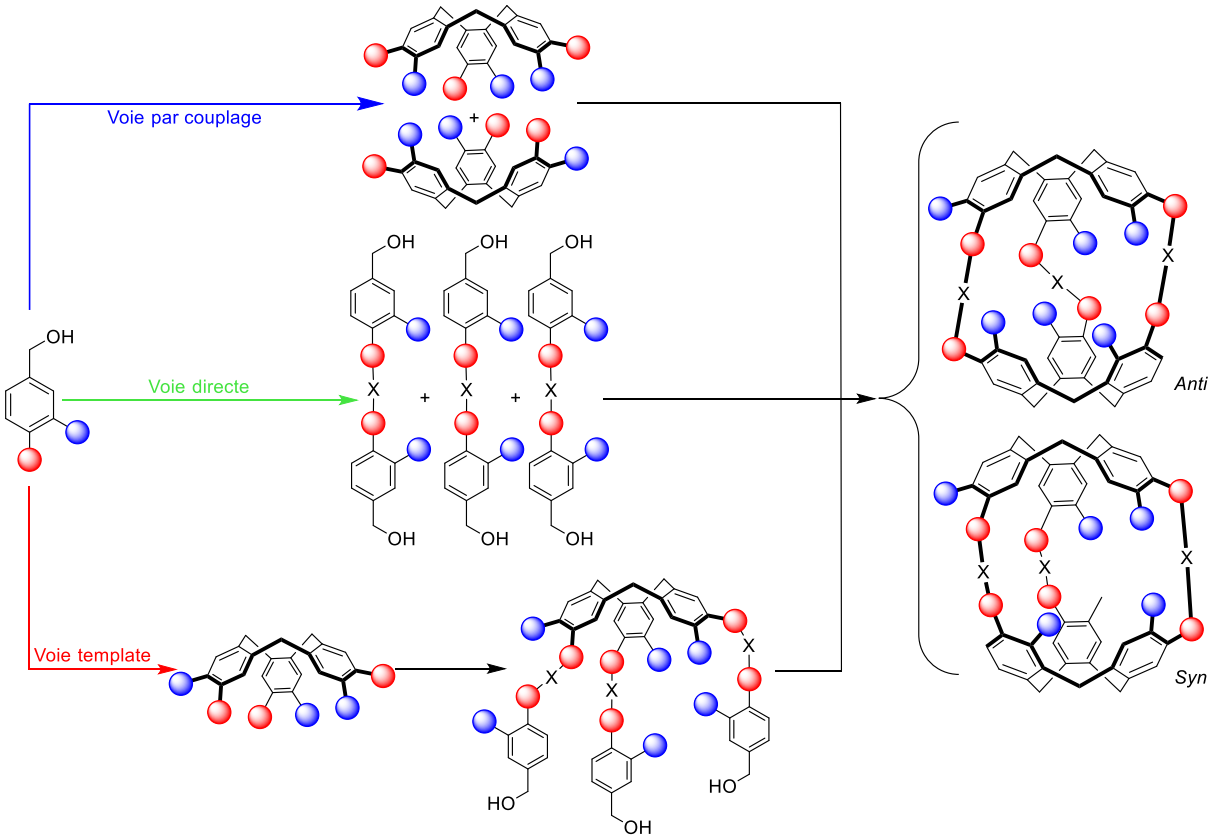


Figure 49 : Principales voies de synthèse des cryptophanes

- Méthode par couplage

La méthode par couplage consiste à assembler deux unités CTV préalablement formées. Elle est relativement directe mais présente souvent des rendements assez faibles, dû à la formation de nombreux sous-produits de type polymères. Elle est essentiellement utilisée pour la synthèse de cryptophanes de petite taille [111] (Figure 50)[120,132] et [000],[133] et ne conduit quasi exclusivement qu'à des composés *anti*, le composé *syn* étant seulement visible à l'état de trace.

[132] Joseph, A. I. et al., *Rim-Functionalized Cryptophane-111 Derivatives via Heterocapping, and Their Xenon Complexes*, Chem. Commun., **2014**, Vol. 50 (100), 15905–15908.
[133] Little, M. A. et al., *Synthesis and Methane-Binding Properties of Disulfide-Linked Cryptophane-0.0.0*, Angew. Chemie Int. Ed., **2012**, Vol. 51 (3), 764–766.

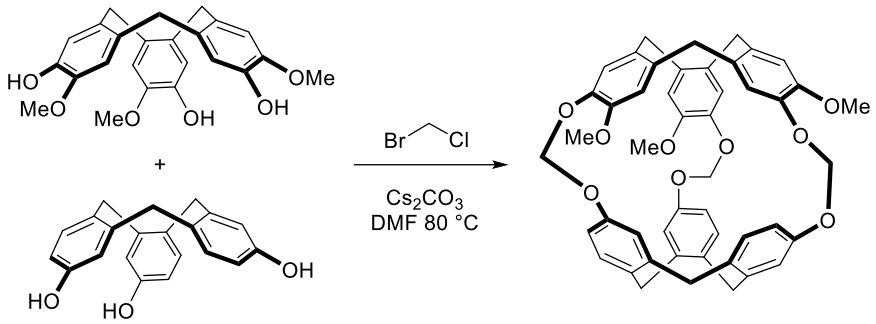


Figure 50 : Synthèse d'un cryptophane [111] par hétérocouplage[120]

Il est intéressant de souligner que cette méthode peut également permettre la synthèse de cryptophane dissymétrique, ayant des chaînes alkyldioxy de longueurs différentes. Par exemple une première étape de couplage vient lier les deux unités CTV par une ou deux chaînes pontantes semblables, ce qui laisse la possibilité de fermer le cryptophane avec une ou plusieurs chaînes pontantes différentes dans les étapes suivantes (Figure 51).[134]

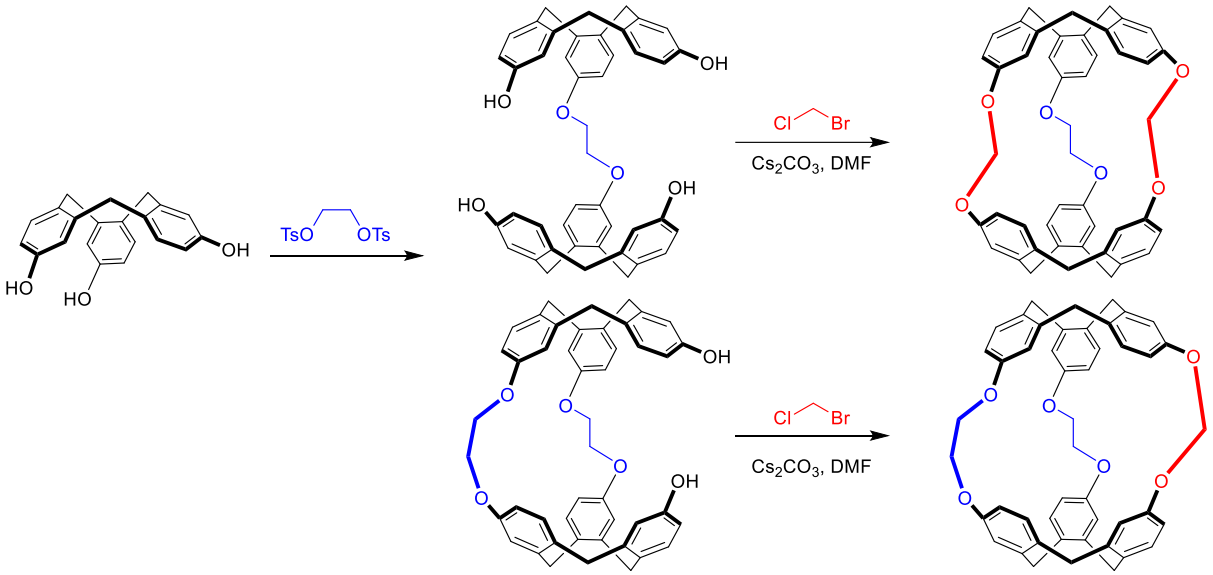


Figure 51 : Synthèse de cryptophanes [211] et [221] par couplage[134]

- Méthode directe

La méthode directe constitue la manière la plus simple et rapide d'obtenir les cryptophanes puisqu'elle est réalisée en une seule étape à partir d'un dimère préalablement préparé (Figure 52).[135] La réaction a lieu en milieu acide, le plus souvent de l'acide formique, et met en jeu le couplage de trois dimères. Elle est utilisée pour des cryptophanes comportant des ponts jusqu'à 7 carbones. Cette méthode conduit également à des composés quasi exclusivement *anti*, le composé *syn* n'étant visible qu'à l'état de trace dans certains cas.

[134] Kotera, N. et al., *Design and Synthesis of New Cryptophanes with Intermediate Cavity Sizes*, Org. Lett., **2011**, Vol. 13 (9), 2153-2155.
[135] Collet, A. et al., *Cyclotriveratrylenes and Cryptophanes: Their Synthesis and Applications to Host-Guest Chemistry and to the Design of New Materials*Top. Curr. Chem., **1993**, Vol. 165

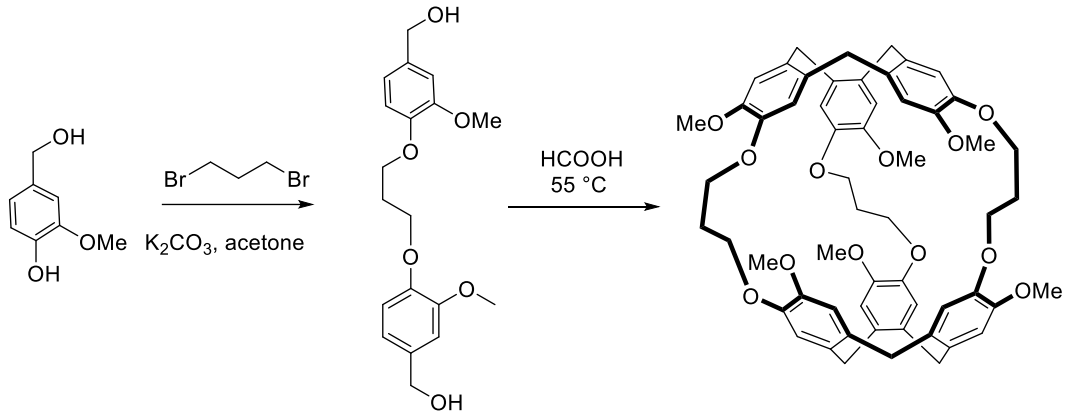


Figure 52 : Synthèse du cryptophane E par voie directe[135]

Elle présente néanmoins le gros désavantage de mener à des rendements particulièrement faibles (5% pour le cryptophane A, et 20% au mieux pour le cryptophane [333]), là aussi dû à la formation de nombreux polymères et oligomères. Il est tout de même intéressant de noter que cette voie favorise l'obtention de cryptophane anti.

- Méthode template

Il s'agit de la méthode la plus largement utilisée et la première ayant permis l'obtention de cryptophane.[120] Elle consiste en la fonctionnalisation d'un premier CTV préalablement formé par trois alcools benzyliques, précurseurs du second CTV. Enfin une étape de cyclotrimérisation en milieu acide très dilué (10^{-3} M) est réalisée, la pré-organisation de la molécule permettant de favoriser la réaction par un effet dit template (Figure 53).[107]

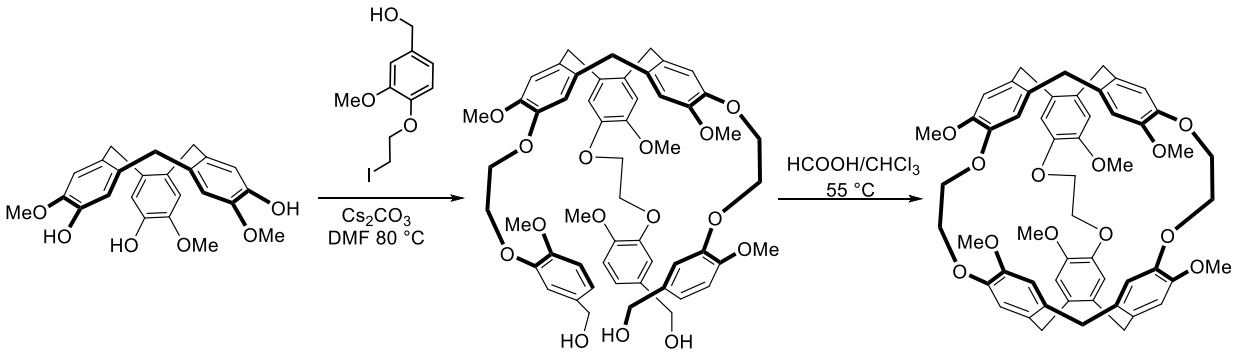


Figure 53 : Synthèse du cryptophane A par méthode template[107]

On peut noter que dans le cas du cryptophane A, le produit *anti* est majoritaire (*syn*/*anti* = 15/85). Ce ratio varie en fonction de la longueur des chaînes mais reste toujours favorable au composé *anti*. Cette méthode comporte de nombreux avantages, en plus de présenter de très bons rendements, elle ouvre l'accès à une très large gamme de composés (Figure 54).

Elle permet par exemple d'accéder à des cryptophanes avec deux CTV différents,[136,137] des cryptophanes de symétrie C1,[138] des cryptophanes avec des longueurs de pont différentes,[139] des ponts comportant des fonctions réactives[140,141] ou des phényles.[142]

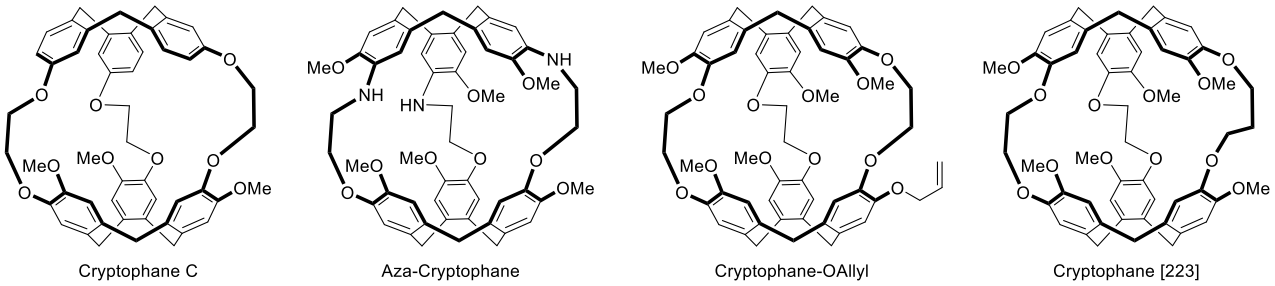


Figure 54 : Exemple de structures réalisées par méthode template

Dans le cadre d'une application de biosonde à base de cryptophane, cette voie s'avère très utilisée puisqu'elle permet, en jouant sur les précurseurs, d'obtenir un cryptophane comportant une fonction réactive permettant une mono fonctionnalisation.

Les cryptophanes ne pouvant pas être utilisés comme tel en tant que biosondes il est nécessaire de les fonctionnaliser avec une molécule d'intérêt.

4.2.5. Fonctionnalisation

Les cryptophanes n'étant pas hydrosolubles et non spécifiques d'une cible biologique, il convient, pour en faire une biosonde valable, de les fonctionnaliser avec une molécule d'intérêt pour les rendre spécifiques et hydrosolubles ou, à minima, biocompatibles. Cependant, les cryptophanes possédant une grande symétrie, l'introduction d'une fonction réactive ou le greffage à une molécule d'intérêt peut s'avérer complexe car il faudra alors « casser » cette symétrie, étape clé et souvent compliquée de la synthèse car conduisant à de nombreux produits secondaires et des purifications difficiles. On distingue pour cela trois grands types de fonctionnalisations.

- La mono fonctionnalisation

---

136 Canceill, J. et al., *Selective Recognition of Neutral Molecules: 1H n.m.r. Study of the Complexation of CH2Cl2 and CH2Br2 by Cryptophane-D in Solution and Crystal Structure of Its CH2Cl2 Cavitate*, J. Chem. Soc. Chem. Commun., **1986**, (4), 339.

137 Doll, M. et al., *Are the Physical Properties of Xe@Cryptophane Complexes Easily Predictable? The Case of Syn - and Anti -Tris-Aza-Cryptophanes*, J. Org. Chem., **2021**, Vol. 86 (11), 7648–7658.

138 Darzac, M. et al., *Cryptophanols, New Versatile Compounds for the Synthesis of Functionalized Cryptophanes and Polycryptophanes*, Chem. Commun., **2002**, Vol. 2 (1), 48–49.

139 Brotin, T. et al., *Xe@cryptophane Complexes with C2 Symmetry: Synthesis and Investigations by 129Xe NMR of the Consequences of the Size of the Host Cavity for Xenon Encapsulation*, European J. Org. Chem., **2003**, Vol. 2003 (6), 973–984.

140 Chapellet, L.-L. et al., *Synthesis of Cryptophanes with Two Different Reaction Sites: Chemical Platforms for Xenon Biosensing*, J. Org. Chem., **2015**, Vol. 80 (12), 6143–6151.

141 Baydoun, O. et al., *Synthesis of Cryptophane-223-Type Derivatives with Dual Functionalization*, J. Org. Chem., **2019**, Vol. 84 (14), 9127–9137.

142 Holman, K. T. et al., *Anion Binding, Aryl-Extended Cyclotriguaiacylenes and an Aryl-Bridged Cryptophane That Provides Snapshots of a Molecular Gating Mechanism*, Supramol. Chem., **2010**, Vol. 22 (11–12), 870–890.

Les cryptophanes mono fonctionnalisés sont obtenus en trois étapes en partant du CTB qui sera d'abord alkylé par un alcool benzylique possédant la fonction réactive avant de l'alkyler avec deux alcools benzyliques identiques. Enfin une étape de cyclotrimérisation permet d'obtenir le cryptophane désiré (Figure 55).

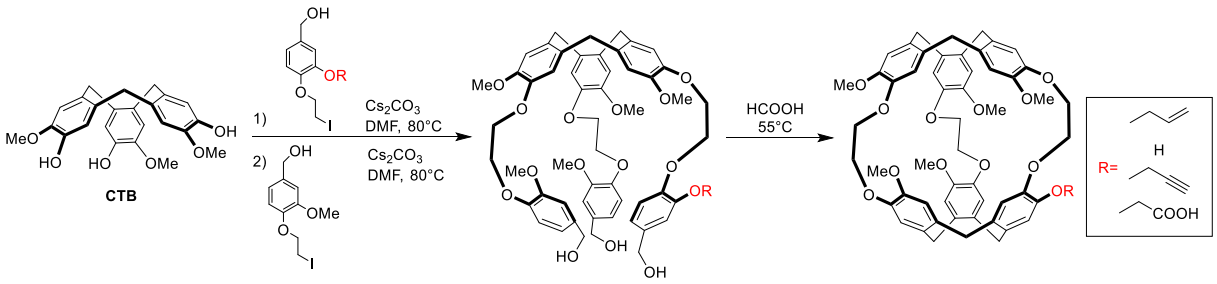


Figure 55 : Stratégies de synthèse pour un cryptophane mono fonctionnalisé

Cette stratégie a notamment été mise en application par les équipes de Pines,[86] Brotin,[143] Dmochowski[144] et Freund.[145]

Il est également possible de partir du cryptophane A symétrique puis de retirer sélectivement l'un des groupements méthoxy pour obtenir cryptophanol possédant une fonction réactive de type phénol.[146] Cependant cette méthode conduit à un mélange de cryptophane polyphénols difficilement séparables du cryptophanol d'intérêt. Enfin plus récemment, des cryptophanes fonctionnalisables par un de leurs ponts ont été décrits (Figure 56).[140]

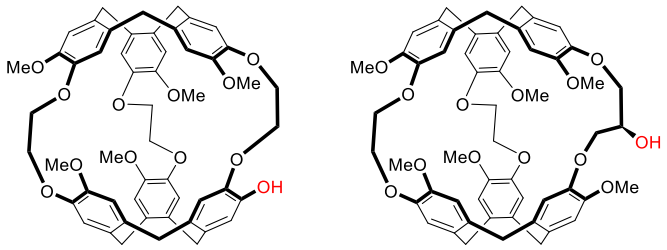


Figure 56 : Structures du cryptophanol et du cryptophane fonctionnalisable par sa chaîne pontante

- La tri fonctionnalisation

Cette méthode, essentiellement utilisée pas l'équipe de Dmochowski, utilise comme la précédente le CTB qui est fonctionnalisé avec trois équivalents du même alcool benzylique comportant une fonction réactive (Figure 57). Cette fonction réactive peut soit être

[143] Roy, V. et al., *A Cryptophane Biosensor for the Detection of Specific Nucleotide Targets through Xenon NMR Spectroscopy*, ChemPhysChem, **2007**, Vol. 8 (14), 2082–2085.
[144] Wei, Q. et al., *Designing129Xe NMR Biosensors for Matrix Metalloproteinase Detection*, J. Am. Chem. Soc., **2006**, Vol. 128 (40), 13274–13283.
[145] Schlundt, A. et al., *A Xenon-129 Biosensor for Monitoring MHC-Peptide Interactions*, Angew. Chemie - Int. Ed., **2009**, Vol. 48 (23), 4142–4145.
[146] Boutin, C. et al., *Cell Uptake of a Biosensor Detected by Hyperpolarized 129Xe NMR: The Transferrin Case*, Bioorganic Med. Chem., **2011**, Vol. 19 (13), 4135–4143.

protégée par un groupement allyle ou benzyle,[147,148] soit directement utilisable comme un alcyne.[149] Des structures énantiopures ont également été obtenues. [150]

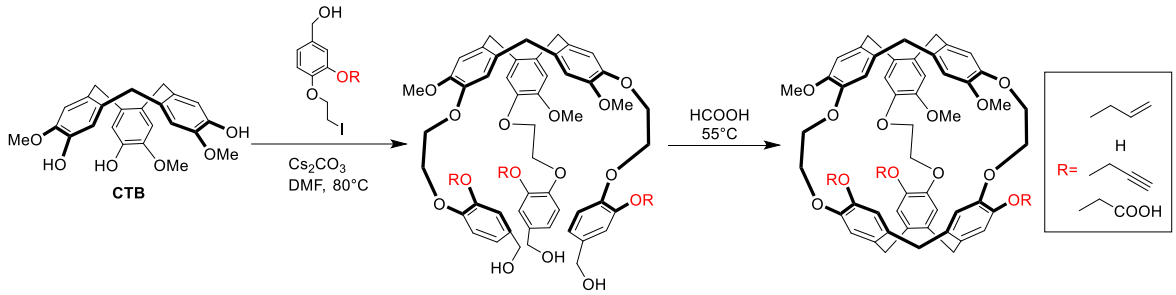


Figure 57 : Stratégies de synthèse pour un cryptophane tri fonctionnalisé

Cette méthode permet d'introduire plus de fonctions réactives ou améliorant la solubilité des cryptophanes. Cependant pour le greffage à une molécule d'intérêt, la purification sera également difficile pour séparer le produit attendu des cryptophanes poly substitués.

- L'hexa-fonctionnalisation

Les cryptophanes obtenus par hexa-fonctionnalisation, décrite en 1987 par l'équipe de Collet, sont les premiers cryptophanes hydrosolubles.[151] Elle se base sur le cryptophane A dont les six groupements méthoxy sont déméthylés par du diphénylphosphure de lithium, pour obtenir le composé hexa alcool, puis alkylé par du bromoacétate de méthyle. Enfin une dernière étape de saponification permet d'obtenir le cryptophane hexa-acide carboxylique souhaité (Figure 58). Le cryptophane [111], connu pour être très faiblement soluble, a également été rendu hydrosoluble par l'introduction de six fonctions acide carboxylique, partant du composé hexa-bromé.[152]

[147] Taratula, O. et al., *Shorter Synthesis of Trifunctionalized Cryptophane - A Derivatives*, Org. Lett., **2011**, Vol. 13 (6), 1414–1417.
[148] A. Hill, P. et al., *Substituent Effects on Xenon Binding Affinity and Solution Behaviour of Water-Soluble Cryptophanes*, J. Am. Chem. Soc., **2009**, Vol. 131 (8), 3069–3077.
[149] Hill, P. A. et al., *Thermodynamics of Xenon Binding to Cryptophane in Water and Human Plasma*, J. Am. Chem. Soc., **2007**, Vol. 129 (30), 9262–9263.
[150] Taratula, O. et al., *Synthesis of Enantiopure, Trisubstituted Cryptophane-A Derivatives*, Org. Lett., **2012**, Vol. 14 (14), 3580–3583.
[151] Canceill, J. et al., *Water-Soluble Cryptophane Binding Lipophilic Guests in Aqueous Solution*, J. Chem. Soc. Chem. Commun., **1987**, (3), 219.
[152] Dubost, E. et al., *Synthesis of a Functionalizable Water-Soluble Cryptophane-111*, Org. Lett., **2013**, Vol. 15 (11), 2866–2868.

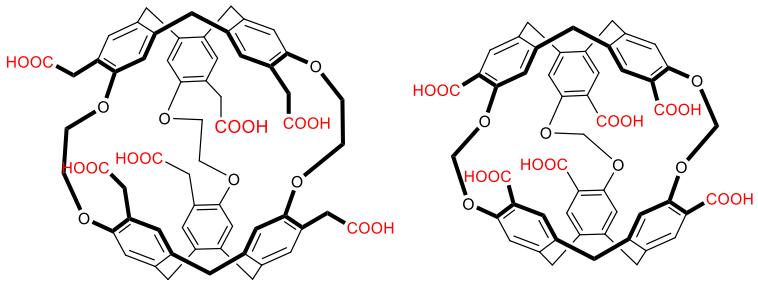


Figure 58 : Cryptophane [222] et [111] hexa acide carboxylique

Le cryptophane [222] hexa acide carboxylique est déjà à lui-seul une biosonde sensible au pH.[153] Le composé hexa alcool a quant à lui des propriétés d'encapsulation du xénon qui varient grandement, voir disparaissent, suivant le contre-ion utilisé.[154]

4.3. Cryptophane et xénon

Les cryptophanes sont décrits depuis longtemps comme capable d'encapsuler diverses entités comme des petites molécules : bromochlorofluorométhane,[155] chloroforme,[156] dichlorométhane,[157] méthane,[158] radon,[159] voire même acétylcholine.[160] Ils peuvent aussi encapsuler certains cations comme le césium ,le thallium[161] ou le rubidium.[162] Les cryptophanes de très grande taille ([333] au minimum) ont étés utilisés pour l'encapsulation de fullerènes.[163,164] La première étude d'encapsulation du xénon par le cryptophane A a été réalisée en 1998[165] et a ouvert les portes à un très grand nombre d'études pour mieux comprendre les aspects thermodynamiques et cinétique de cette encapsulation et il s'agit

[153] Berthault, P. et al., *Effect of PH and Counterions on the Encapsulation Properties of Xenon in Water-Soluble Cryptophanes*, Chem. - A Eur. J., **2010**, Vol. 16 (43), 12941–12946.
[154] Brotin, T. et al., *High Affinity of Water-Soluble Cryptophanes for Cesium Cations*, J. Org. Chem., **2012**, Vol. 77 (2), 1198–1201.
[155] Canceill, J. et al., *Analytical Optical Resolution of Bromochlorofluoromethane by Enantioselective Inclusion into a Tailor-Made "Cryptophane" and Determination of Its Maximum Rotation*, J. Am. Chem. Soc., **1985**, Vol. 107 (24), 6993–6996.
[156] Canceill, J. et al., *Structure and Properties of the Cryptophane-E/CHCl3 Complex, a Stable van Der Waals Molecule*, Angew. Chemie Int. Ed. English, **1989**, Vol. 28 (9), 1246–1248.
[157] Canceill, J. et al., *A New Bis-Cyclotribenzyl Cavitand Capable of Selective Inclusion of Neutral Molecules in Solution. Crystal Structure of Its CH2Cl2 Cavitate*, J. Chem. Soc. - Ser. Chem. Commun., **1985**, (6), 361–363.
[158] Benounis, M. et al., *Study of a New Evanescent Wave Optical Fibre Sensor for Methane Detection Based on Cryptophane Molecules*, Sensors Actuators B Chem., **2005**, Vol. 107 (1), 32–39.
[159] Jacobson, D. R. et al., *Measurement of Radon and Xenon Binding to a Cryptophane Molecular Host*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **2011**, Vol. 108 (27), 10969–10973.
[160] Garel, L. et al., *Complexation of Methane and Chlorofluorocarbons by Cryptophane-A in Organic Solution*, Angew. Chemie Int. Ed. English, **1993**, Vol. 32 (8), 1169–1171.
[161] Brotin, T. et al., *Water-Soluble Molecular Capsule for the Complexation of Cesium and Thallium Cations*, J. Phys. Chem. B, **2012**, Vol. 116 (35), 10905–10914.
[162] Eggers, D. K. et al., *Thermodynamic Contribution of Water in Cryptophane Host-Guest Binding Reaction*, J. Phys. Chem. B, **2020**, Vol. 124 (30), 6585–6591.
[163] Wong, T. H. et al., *Hemicarceplexes Modify the Solubility and Reduction Potentials of C 60*, J. Org. Chem., **2014**, Vol. 79 (8), 3581–3586.
[164] Ku, M. Y. et al., *Hemicarceplex Formation Allows Ready Identification of the Isomers of the Metallofullerene Sc3N@C80 Using 1H and 13C NMR Spectroscopy*, Chem. Commun., **2014**, Vol. 50 (79), 11709–11712.
[165] Bartik, K. et al., *129Xe and 1H NMR Study of the Reversible Trapping of Xenon by Cryptophane-A in Organic Solution*, J. Am. Chem. Soc., **1998**, Vol. 120 (4), 784–791.

aujourd'hui d'un des champs majeurs d'utilisation des cryptophanes. En effet ils répondent aux différents critères pour une biosonde à xénon hyperpolarisé énoncés plus haut (cf 3.3).

- Constante d'affinité

Les cryptophanes possèdent une forte affinité avec le xénon de par leur cavité hydrophobe, cependant, étant capable d'encapsuler d'autres petites molécules biologiques, il est nécessaire d'avoir des constantes d'association élevées avec le xénon. Il faut pour cela se référer au critère stérique de Rebek pour obtenir une taille de cavité optimale, soit un volume idéal pour la molécule hôte de 76 $Å^3$ dans le cas du xénon.[85] La nature des substituants des unités CTV et le type de solvant utilisé peut aussi avoir une influence. Une structure générale des cryptophane est définie pour pouvoir comparer les constantes d'affinité (Figure 59).

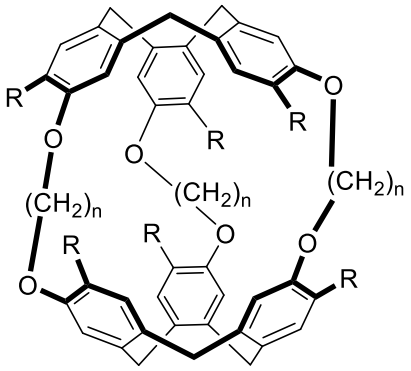


Figure 59 : Structure générale des cryptophanes

Il est également important de noter que la température joue un rôle dans la détermination de la constante. En effet la vitesse d'échange entre le xénon dans la cage et le xénon libre est entièrement dépendante de cette donnée : plus la température est élevée plus la vitesse d'échange sera grande, et donc la constante faible. Par exemple dans le cas du cryptophane [111] cette constante est de 28 000 M^{-1} à 278 K mais n'est plus que de 10 000 M^{-1} à 298 K. [166] Dans le tableau suivant, les valeurs des constantes sont données pour 278 K pour les études dans les solvants organiques et pour 296 K pour les études en milieu aqueux (Tableau 3). Enfin le solvant organique utilisé pour les analyses est le 1,1,2,2-tétrachloroéthane car il est trop volumineux pour pénétrer dans la cavité des cryptophanes et entrer en compétition avec le xénon.[165]

[166] Huber, G. et al., *Cryptophane-Xenon Complexes in Organic Solvents Observed through NMR Spectroscopy*, J. Phys. Chem. A, **2008**, Vol. 112 (45), 11363–11372.

Solvant	[n,n,n]	R1, R2	Volume (Å^3)	K (M^{-1})
$C_2D_2Cl_4$	[1,1,1]	H, H	81	28 000[166]
	[2,2,2]	OMe, OMe	95	3 900[166]
	[2,2,2]	H, H	95	1 400[166]
	[2,2,3]	OMe, OMe	102	2 800[166]
	[2,3,3]	OMe, OMe	117	800[166]
	[2,2,4]	OMe, OMe	109	9.5[166]
	[3,3,3]	OMe, OMe	120	6[166]
D_2O	[1,1,1]	6 [Cp*Ru]	81	29 000[167]
	[2,2,2]	R1=R2=OCH_2COOH	95	6 800[168]
	[2,2,2]	R1= OMe R2= OCH_2COOH (TTAC)	-	33 000[148]
	[2,2,2]	R1=OMe R2= triazole acide propionique (TTPC)	-	17 300[148]
	[2,2,2]	R1=OMe R2= triazole ethylamine (TTEC)	87	42 000[159]
	[2,2,3]	R1=R2=OCH_2COOH	102	2 200[168]
	[2,3,3]	R1=R2=OCH_2COOH	117	2 200[168]
	[3,3,3]	R1=R2=OCH_2COOH	121	1 000[168]

Tableau 3 : Valeurs des constantes d'affinités pour le xénon de différentes structures de cryptophanes

De manière classique la constante d'affinité est mesurée par une expérience de compétition entre un cryptophane dont la constante et connue et le cryptophane étudié.[166] L'intégration des signaux du spectre RMN du xénon du mélange des cryptophanes permet de remonter par un calcul à la constante d'affinité recherchée. Il est également possible de déterminer cette constante par titrage isothermique calorimétrique (ITC) et par analyse de fluorescence.[148]

On observe ici une baisse logique de la valeur de la constante d'affinité avec l'augmentation de la taille de la cavité. Ainsi en milieu organique la taille de la cavité est le facteur prédominant pour la constante d'affinité et c'est donc logiquement le cryptophane [111] qui a la constante la plus importante, son volume étant proche du volume idéal d'encapsulation du xénon (76 Å^3).

De plus on note ici que les substituants jouent un rôle, en comparant le cryptophane [222]-6 OMe et le cryptophane [222]-6H. Les groupements méthoxy créent un encombrement

[167] Fairchild, R. M. et al., *A Water-Soluble Xe@cryptophane-111 Complex Exhibits Very High Thermodynamic Stability and a Peculiar 129 Xe NMR Chemical Shift*, J. Am. Chem. Soc., **2010**, Vol. 132 (44), 15505–15507.
[168] Huber, G. et al., *Water Soluble Cryptophanes Showing Unprecedented Affinity for Xenon: Candidates as NMR-Based Biosensors*, J. Am. Chem. Soc., **2006**, Vol. 128 (18), 6239–6246.

stérique retardant l'échange du xénon avec le milieu extérieur, augmentant la constante d'affinité.

On constate enfin que, à taille identique, les constantes sont plus importantes pour les dérivés hydrosolubles. Cela s'explique par le caractère hydrophobe du xénon, et un effet hydrophobe vient s'ajouter aux forces de van der Waals mises en jeu lors de l'encapsulation en milieu aqueux, conduisant à des constantes d'affinités plus élevées.

- Gamme de déplacement chimique

Pour qu'une sonde à base de cryptophane soit utilisée en imagerie, les déplacements du xénon libre et du xénon encapsulés doivent être suffisamment distincts. Dans la grande majorité des cas pour le cryptophane, le signal du xénon complexé est autour de 40-60 ppm alors que celui du xénon dans l'eau ou un milieu biologique est au-delà des 200 ppm. Il est même possible de distinguer différents cryptophanes suivant leur structure, ou de distinguer les différents diastéréoisomères d'un cryptophane, tant le xénon est sensible à son environnement (Figure 60).

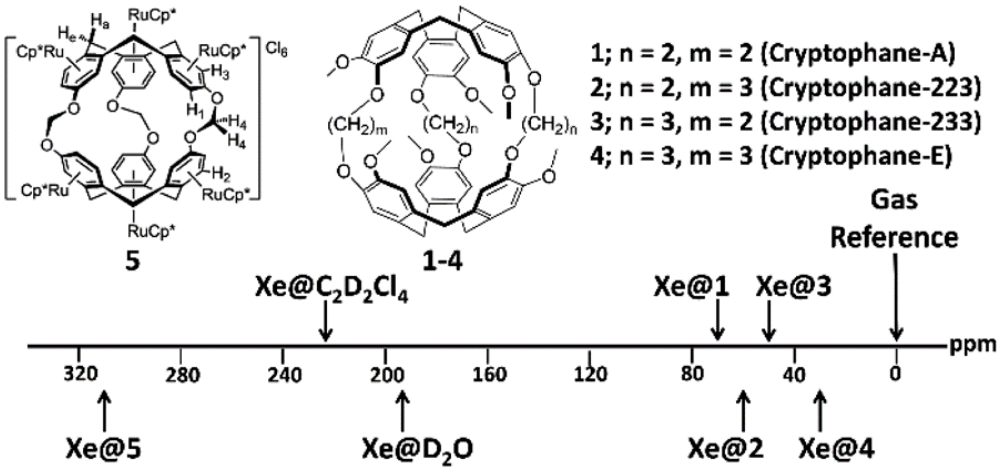


Figure 60 : Structures chimiques de cryptophanes et leur gamme de déplacement chimique en RMN du xénon[108]

- Vitesse d'échange et temps de relaxation

La vitesse d'échange est notamment impactée par le fait que les cryptophanes sont capables de s'adapter à leur hôte du fait de leur cavité légèrement flexible, grâce à la flexibilité des bras espaceurs. On parle alors d'effet « induced fit ».[131] Pour les cryptophane précédemment décrits, elle se situe entre 10 et 100 Hz, ce qui est considéré comme un échange lent à l'échelle de la RMN. De manière générale la vitesse d'échange augmente avec la taille de la cage. Par exemple le cryptophane [111] présente une vitesse d'échange de 2.4 Hz[109] alors que celle du cryptophane A est supérieure de deux ordres de grandeur.[165] Une vitesse d'échange élevée d'entrée et de sortie du xénon est nécessaire à l'apport continu de gaz hyperpolarisé, mais elle ne doit pas non plus être trop importante pour avoir le temps de détecter le xénon encapsulé. Classiquement un échange de l'ordre de 20 Hz est recherché

pour une application médicale. Ainsi d'un point de vue purement structurel ce sont les cryptophanes [222] et [223] qui remplissent le mieux cette contrainte.[87]

Les temps de relaxation mesurés pour le xénon au sein des cryptophanes varient entre 5 et 20 secondes, qui sont en pratique suffisamment long pour des acquisitions RMN.[166] La principale source de relaxation étant le couplage dipolaire xénon-proton au sein de la cage.

L'ensemble de ces caractéristiques nous permet de dire que les cryptophanes sont de bons candidats pour leur utilisation dans le cadre d'une application de biosonde pour le xénon hyperpolarisé.

4.4. Biosondes à base de cryptophanes

Depuis la première biosonde à base de cryptophane pour l'encapsulation du xénon publié en 2001 par l'équipe de Pines, un nombre important d'exemples de biosondes à xénon ont été décrits.[108,120] Dans un souci de clarté, seulement quelques exemples marquants de chaque équipe seront présentés.

- Equipe de Pines

Historiquement, elle est la première équipe à avoir mis au point une biosonde utilisant le xénon,[86] en fonctionnalisant le cryptophane A avec de la biotine, connue pour son affinité avec la protéine d'avidine, grâce à un bras espaceur hydrosoluble. Il était ainsi possible de détecter la présence de cette protéine par la formation d'un complexe stable avec la biosonde. Le spectre RMN du xénon est complexe du fait de la présence de 4 diastéréoisomères : le cryptophane étant utilisé sous forme racémique et la chaîne introduisant un centre asymétrique non contrôlé. Malgré cette difficulté, il est tout de même possible de visualiser la présence ou l'absence de l'avidine par la détection de deux pics de xénon encapsulé : un correspondant au xénon dans la biosonde libre, et un correspondant au xénon dans la biosonde associée à l'avidine (Figure 61).

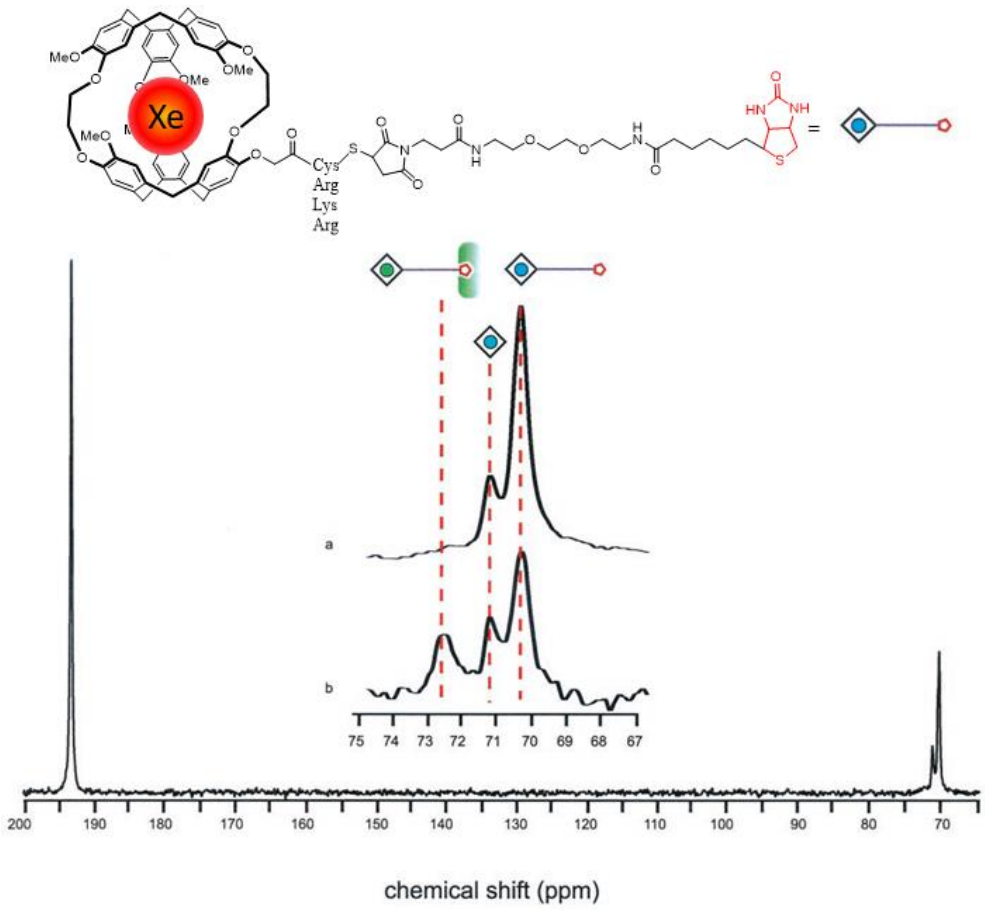


Figure 61 : Structure de la biosonde à avidine et spectres RMN du xénon en absence (a) et présence (b) d'avidine[86]

Cette biosonde sera par la suite améliorée en modifiant le bras espaceur pour supprimer le centre asymétrique. La longueur du bras fut également modifiée, mettant ainsi en évidence une limite de sensibilité de la RMN du xénon dans le cas d'un bras trop long (plus de douze groupements éthylène glycol).[169] Enfin cette biosonde sera également testée en étant greffée sur un support avidine-agarose.[170]

Le même groupe a également montré qu'il était possible d'utiliser les cryptophanes tels quels comme des sondes de température.[171] En effet le shift de signal entre le xénon encapsulé et le xénon libre évolue suivant la température. Il existe en fait une corrélation linéaire permettant de déterminer *in vitro* la température à partir du déplacement chimique du xénon encapsulé.

Par la suite, et dans le but d'augmenter le signal en RMN du xénon, l'équipe de Pines se tourne vers l'utilisation de nanoparticules afin de concentrer localement le nombre de

[169] Lowery, T. J. et al., *Optimization of Xenon Biosensors for Detection of Protein Interactions*, ChemBioChem, **2006**, Vol. 7 (1), 65–73.
[170] Hilty, C. et al., *Spectrally Resolved Magnetic Resonance Imaging of a Xenon Biosensor*, Angew. Chemie Int. Ed., **2006**, Vol. 45 (1), 70–73.
[171] Schilling, F. et al., *MRI Thermometry Based on Encapsulated Hyperpolarized Xenon*, ChemPhysChem, **2010**, Vol. 11 (16), 3529–3533.

cryptophanes à l'intérieur. Le premier exemple est l'utilisation de dendrimères polyamidoamines permettant l'attache de manière non covalente de 3 à 11 cryptophanes. Cet édifice présente un manque de stabilité de par ses liaisons non covalentes mais montre une amélioration du signal d'un facteur 8 comparé à la première biosonde.[172]

Une seconde approche est ensuite envisagée en s'inspirant d'une stratégie développée pour les agents de contrastes paramagnétiques et qui utilise une capside virale. La capside MS2 est composée de 180 monomères qui s'auto-assemblent en un transporteur quasi-sphérique contenant 32 pores, hydrosoluble et biocompatible. Une telle structure permet de concentrer facilement plus de 120 cryptophanes ce qui permet une détection à une concentration très faible de sonde (1 pM) par utilisation de l'HyperCEST.[173] Les cryptophanes sont greffés à la surface de la capside grâce à un bras espaceur comportant une fonction maléimide permettant une réaction click avec les cystéines de cette capside. Cette structure sera par la suite améliorée en ajoutant une unité de ciblage à base d'aptamères à la surface des capsides pour la détection de cellule de lymphome (Figure 62).[174]

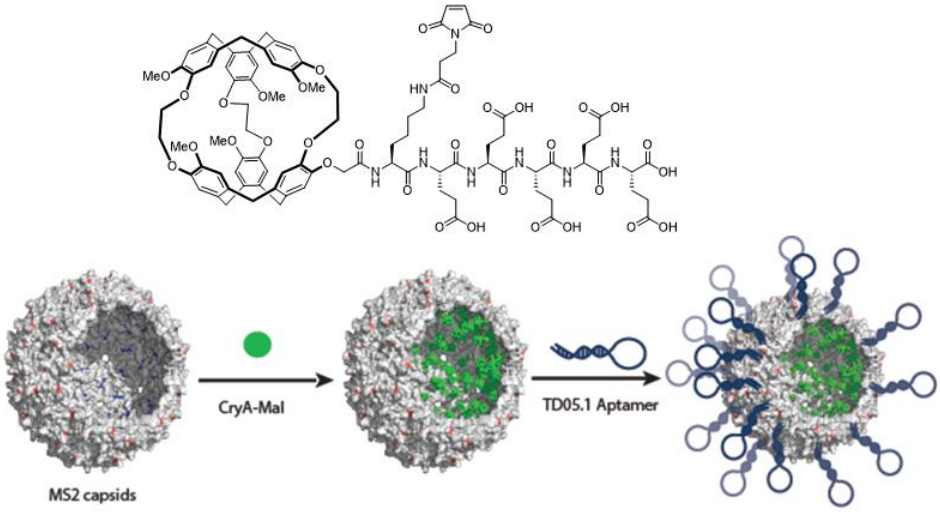


Figure 62 : Structure du cryptophane utilisé et structure de la capside décorée d'aptamères[174]

En se basant sur le même principe, l'équipe de Pines a également utilisé un bactériophage filamenteux, une structure protéique complexe dont l'une des extrémités (p3) peut être modifiée. Ainsi il a été possible de greffer plus de 1000 cryptophane A sur cette structure et de la détecter à une concentration de l'ordre de 200 fM.[175] Les bactériophages ont pu être modifiés avec un fragment variable d'anticorps à chaîne unique (scFV) permettant une reconnaissance spécifique du récepteur de l'EGF (Epidermal Growth Factor), connu pour

[172] Mynar, J. L. et al., *Xenon Biosensor Amplification via Dendrimer–Cage Supramolecular Constructs*, J. Am. Chem. Soc., **2006**, Vol. 128 (19), 6334–6335.
[173] Meldrum, T. et al., *A Xenon-Based Molecular Sensor Assembled on an MS2 Viral Capsid Scaffold*, J. Am. Chem. Soc., **2010**, Vol. 132 (17), 5936–5937.
[174] Jeong, K. et al., *Targeted Molecular Imaging of Cancer Cells Using MS2-Based 129 Xe NMR*, Bioconjug. Chem., **2016**, Vol. 27 (8), 1796–1801.
[175] Stevens, T. K. et al., *HyperCEST Detection of a 129 Xe-Based Contrast Agent Composed of Cryptophane-A Molecular Cages on a Bacteriophage Scaffold*, Magn. Reson. Med., **2013**, Vol. 69 (5), 1245–1252.

être surexprimé dans différentes tumeurs solides et utilisé pour suivre la progression d'un cancer.[176]

- Equipe de Dmochowski

La première sonde synthétisée par l'équipe de Dmochowski visait à détecter l'activité enzymatique de la métalloprotéase MMP-7 (Matrix MetalloProteinase-7), connue pour être surexprimée dans les régions extracellulaires dans certains cancer (colon et sein notamment). La biosonde est composée d'un cryptophane A monofonctionnalisé avec un bras espaceur et un peptide, substrat spécifique de MMP-7 grâce à une cycloaddition [3+2]. Ce substrat spécifique peut être détecté par MMP-7 et être clivé, donnant ainsi une nouvelle structure à la biosonde (Figure 63).[144]

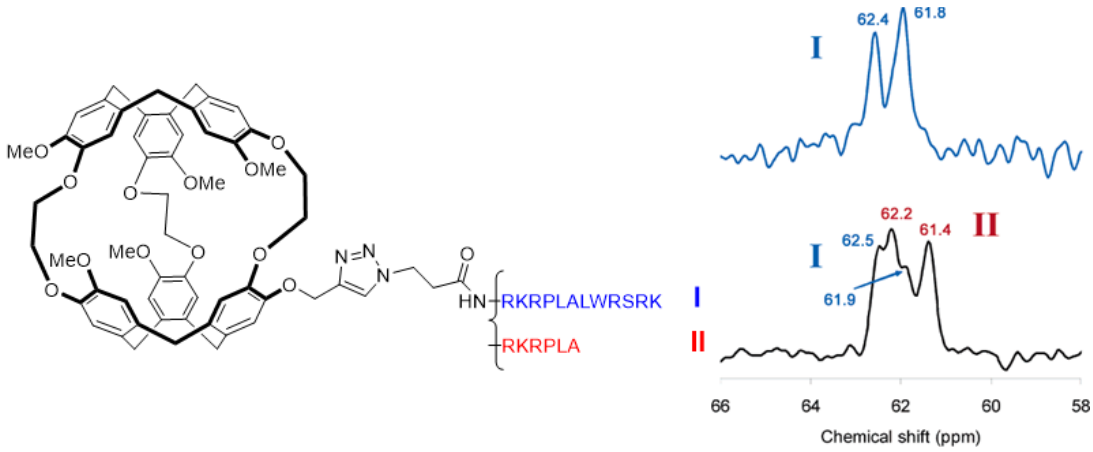


Figure 63 : Structure de la biosonde avant et après clivage par MMP-7 et spectres RMN du xénon correspondants[144]

Il est ainsi possible de détecter les deux biosondes différentes à une concentration de quelques micromoles grâce à la grande sensibilité de la RMN du xénon. Cependant le spectre RMN est complexe du fait de l'utilisation de cryptophane A racémique et le décalage de signal est faible (inférieur à 1 ppm).

Une deuxième sonde a été mise au point pour la détection d'anhydrases carboniques. Celle-ci sont des métalloenzymes à zinc catalysant la réaction d'hydratation de CO_2 pour former l'acide carbonique H_2CO_3 et sont surexprimées dans les cellules cancéreuses. La biosonde est composée d'un cryptophane A tri-fonctionnalisé, une nouvelle fois par cycloaddition [3+2], avec trois groupements sulfonamide capable de chélater l'ion Zn^{2+}.[177] Cette sonde a été par la suite améliorée en ne greffant qu'un groupement sulfonamine pour ajouter deux groupements acide carboxylique améliorant la solubilité. [178] La longueur du bras comportant

[176] Palaniappan, K. K. et al., *Molecular Imaging of Cancer Cells Using a Bacteriophage-Based 129 Xe NMR Biosensor*, Angew. Chemie, **2013**, Vol. 125 (18), 4949–4953.
[177] Aaron, J. A. et al., *Structure of a 129Xe-Cryptophane Biosensor Complexed with Human Carbonic Anhydrase II*, J. Am. Chem. Soc., **2008**, Vol. 130 (22), 6942–6943.
[178] Chambers, J. M. et al., *Cryptophane Xenon-129 Nuclear Magnetic Resonance Biosensors Targeting Human Carbonic Anhydrase*, J. Am. Chem. Soc., **2009**, Vol. 131 (2), 563–569.

la sulfonamide a également été augmentée pour évaluer son impact sur la RMN du xénon et la différence de déplacement chimique (entre 5 et 7.5 ppm) entre la cage libre et la cage liée à l'anhydrase carbonique (Figure 64).

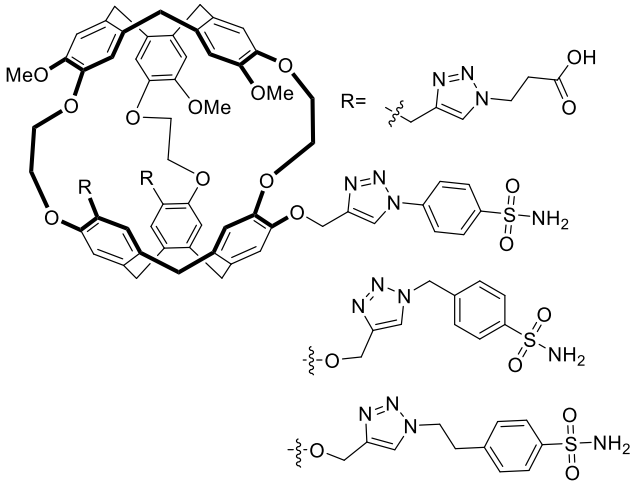


Figure 64 : Structure de la sonde à anhydrase carbonique et les différentes tailles du bras espaceur[178]

Afin d'améliorer encore le signal en RMN du xénon, la biosonde avec la meilleure différence de déplacement chimique a par la suite été synthétisée à partir d'un cryptophane énantiopur, limitant ainsi le nombre de signaux en RMN.[179]

Plus récemment ils ont montré que ce type de cryptophane fonctionnalisé par un groupement sulfonamide était capable, à forte concentration (quelques dizaines de micromoles), de s'auto agréger en milieu aqueux pour former un agrégat hydrosoluble de plusieurs centaines de nanomètre de diamètre.[180] L'ajout ensuite d'un excès d'anhydrase carbonique entraîne sa désagrégation et la formation du complexe biosonde-anhydrase précédemment décrit. Cette méthode permet ainsi d'améliorer la sensibilité en RMN du xénon HyperCEST et de détecter le complexe a des concentrations très faibles (Figure 65). Le même type d'agrégat a récemment été mis en évidence sur un cryptophane fonctionnalisé avec un groupement adamantyle.[181]

[179] Taratula, O. et al., *Enantiopure Cryptophane-129Xe Nuclear Magnetic Resonance Biosensors Targeting Carbonic Anhydrase*, Supramol. Chem., **2015**, Vol. 27, 65–71.
[180] Zemerov, S. D. et al., *Cryptophane Nanoscale Assemblies Expand 129 Xe NMR Biosensing*, Anal. Chem., **2018**, Vol. 90 (12), 7730–7738.
[181] Zemerov, S. D. et al., *Monomeric Cryptophane with Record-High Xe Affinity Gives Insights into Aggregation-Dependent Sensing*, Anal. Chem., **2021**, Vol. 93 (3), 1507–1514.

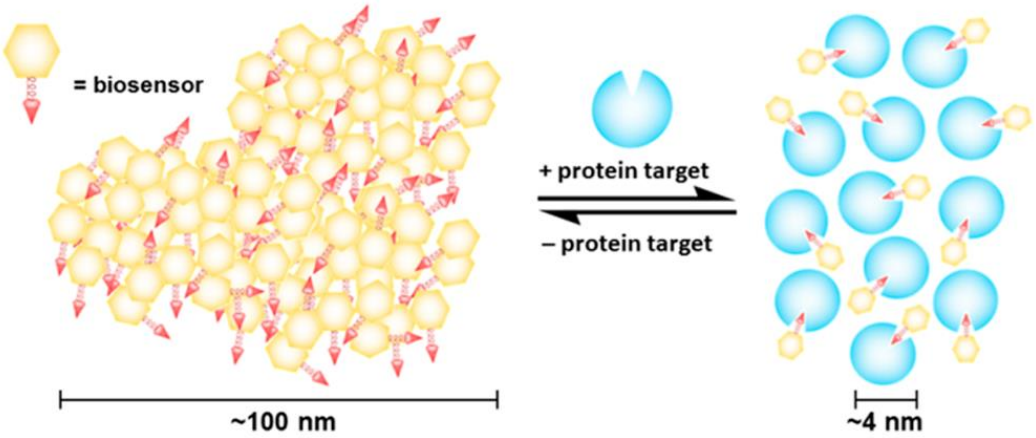


Figure 65 : Représentation schématique de l'agrégat et de sa désagrégation en présence d'anhydrase carbonique[180]

Les intégrines sont des glycoprotéines hétérodimériques responsables de nombreux phénomènes d'adhésion entre cellules d'une part et entre cellule et milieu extracellulaire d'autre part. Leur dysfonctionnement peut notamment entraîner l'apparition et la propagation de tumeurs cancéreuses, les intégrines $\alpha_v\beta_3$ ayant notamment un rôle crucial dans ces maladies. Une séquence de trois acides aminés arginine-glycine-acide aspartique (RGD) correspond au site de liaison de plusieurs de ces intégrines et est utilisé pour la conception de nombreux inhibiteurs. L'équipe de Dmochowski s'est intéressé à la synthèse de biosondes ciblant spécifiquement les cellules surexprimant les récepteurs d'intégrines $\alpha_v\beta_3$. Une première biosonde a été décrite, composée d'un cryptophane A monofonctionnalisé par un peptide tetra-RGD, qui a notamment permis les premières études de toxicité et d'internalisation cellulaire des cryptophanes.[182] Les cryptophanes testés dans ce cas n'ont d'ailleurs pas montré de toxicité notable aux concentrations nécessaires pour la RMN du xénon. Une seconde sonde a par la suite été décrite, composé d'un cryptophane A tri substitué par un peptide cyclique RGD pour l'adressage et deux fonctions acide carboxylique pour la solubilité.[183] Ainsi les intégrines ont pu être détectées grâce à la sonde avec une concentration de 50 µM (Figure 66).

[182] Seward, G. K. et al., *Peptide-Mediated Cellular Uptake of Cryptophane*, Bioconjug. Chem., **2008**, Vol. 19 (11), 2129–2135.
[183] Seward, G. K. et al., *Cell-Compatible, Integrin-Targeted Cryptophane-129XeNMR Biosensors*, Chem. Sci., **2011**, Vol. 2 (6), 1103–1110.

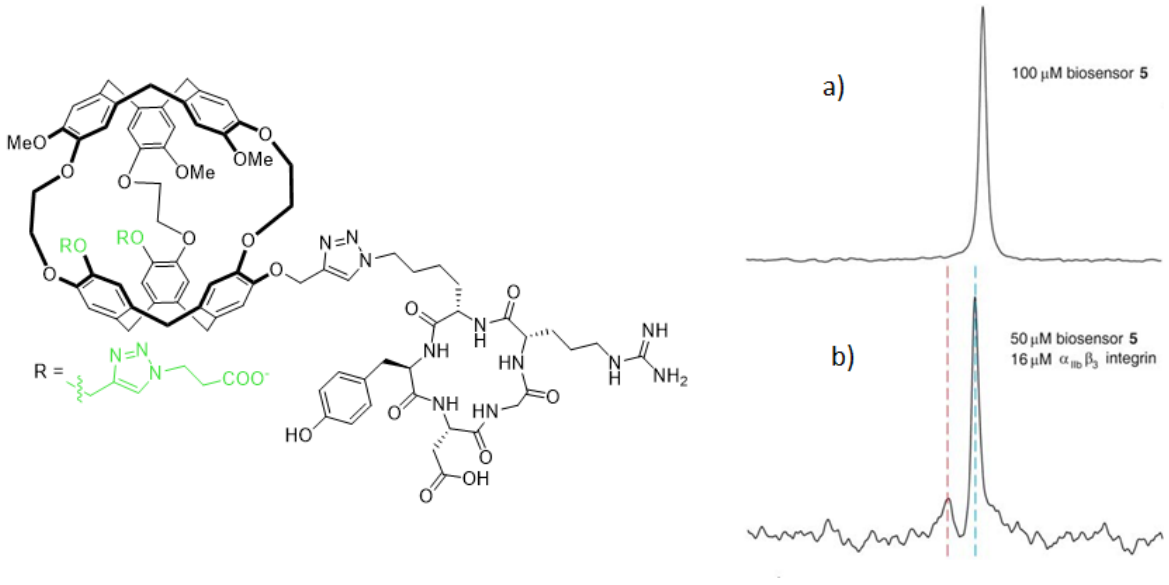


Figure 66 : Structure de la sonde à base de RGD cyclique et signaux RMN du xénon en absence (a) et présence (b) d'intégrine[183]

Basée sur la même structure de cryptophane tri-fonctionnalisé, et toujours dans l'optique de détecter des cellules cancéreuses, une sonde sensible au pH a également été mise au point. Le cryptophane est ici fonctionnalisé avec un peptide sensible au pH et permettant une insertion membranaire dans les cellules. Ainsi le peptide est sous forme d'hélice α à pH = 5.5 et sous forme désordonnée à pH = 7.5. Cela donne alors un shift en RMN du xénon entre les deux formes de 3.4 ppm et permet par HyperCEST une détection de la sonde à une concentration de l'ordre du picomolaire.[184]

- Equipe de Schröder

Dans un premier temps, l'équipe de Schröder a travaillé sur plusieurs biosondes bimodales composées d'un cryptophane A monofonctionnalisé avec divers fluorophores afin d'étudier les interactions des biosondes avec des biomembranes. La première sonde bimodale utilise le DY680 et DY682 comme fluorophore et permet d'utiliser les deux techniques complémentaires que sont la fluorescence et la RMN du xénon pour obtenir une image claire du mode d'interaction des sondes suivant la membrane lipidique étudiée.[185] D'autres cryptophanes bimodaux ont par la suite été synthétisés en faisant varier le type de fluorophore[186] puis furent utilisés pour détecter des fibroblastes L929.[187] Pour cela la biosonde a été légèrement modifiée en ajoutant un site de reconnaissance sur le bras comportant le fluorophore. La fluorescence permet ici de vérifier l'internalisation et la

[184] Riggle, B. A. et al., *A "Smart" 129Xe NMR Biosensor for PH-Dependent Cell Labeling*, J. Am. Chem. Soc., **2015**, Vol. 137 (16), 5542–5548.
[185] Sloniec, J. et al., *Biomembrane Interactions of Functionalized Cryptophane-A: Combined Fluorescence and 129Xe NMR Studies of a Bimodal Contrast Agent*, Chem. - A Eur. J., **2013**, Vol. 19 (9), 3110–3118.
[186] Rossella, F. et al., *Design and Characterization of Two Bifunctional Cryptophane A-Based Host Molecules for Xenon Magnetic Resonance Imaging Applications*, Chempluschem, **2014**, Vol. 79 (10), 1463–1471.
[187] Klippel, S. et al., *Cell Tracking with Caged Xenon: Using Cryptophanes as MRI Reporters upon Cellular Internalization*, Angew. Chemie - Int. Ed., **2014**, Vol. 53 (2), 493–496.

localisation de la sonde dans la membrane. Une culture cellulaire de fibroblastes est ensuite immobilisée sur un lit d'alginate, mise en contact avec la biosonde puis comparée par RMN du xénon avec une culture « vierge » (Figure 67). L'utilisation de la technique d'HyperCEST a permis de détecter la biosonde à une concentration de 15 µM.

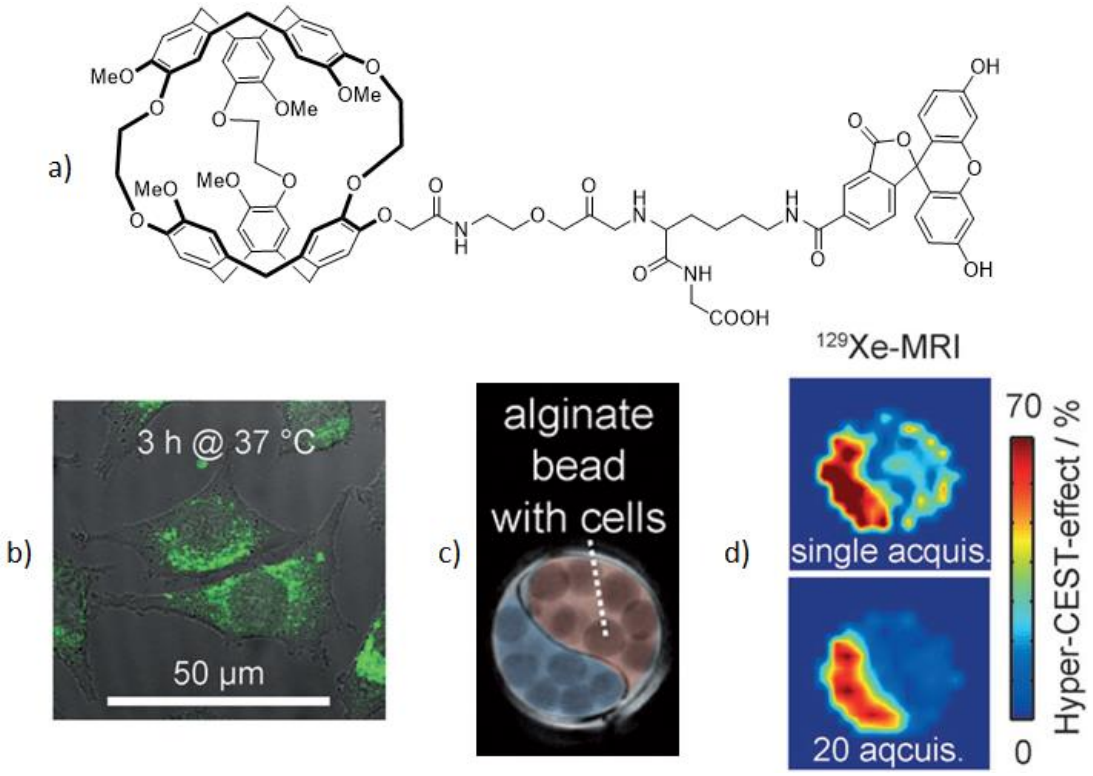


Figure 67 : a) Structure de la sonde. b) Image par fluorescence de l'internalisation de la sonde. c) Culture cellulaire avec biosonde (bleu) et vierge (rouge). d) IRM du xénon HyperCEST de la culture cellulaire en un et 20 scans[174]

De la même manière ils ont été capables de détecter spécifiquement des glycanes marqués métaboliquement à la surface de cellules. Les glycanes, situés dans et à la surface des membranes cellulaires, sont impliqués dans de nombreux processus biologiques et pathologiques et leur visualisation par la RMN du proton conventionnel est difficile. Dans ce cas les glycanes ont été marqués sur leur partie terminale par un sucre portant une fonction azide sur laquelle pourra être fixée, par chimie click, la biosonde comportant un alcyne sur le bras espaceur. Ainsi la fluorescence est utilisée pour confirmer le greffage du cryptophane sur le glycane puis les cellules sont imagées par IRM du xénon (Figure 68).[188]

[188] Witte, C. et al., *Live-Cell MRI with Xenon Hyper-CEST Biosensors Targeted to Metabolically Labeled Cell-Surface Glycans*, Angew. Chemie - Int. Ed., **2015**, Vol. 54 (9), 2806–2810.

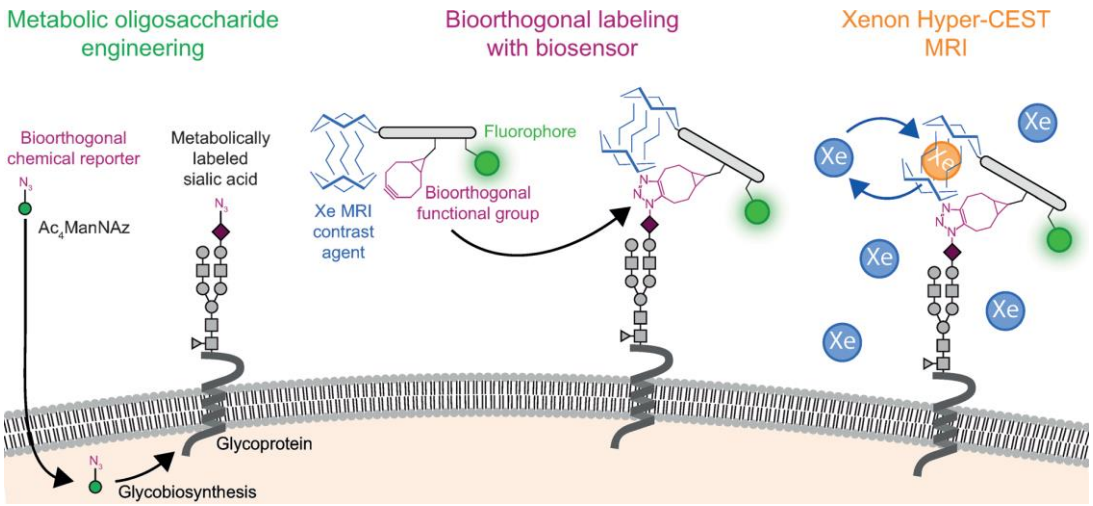


Figure 68 : Représentation schématique du concept de biosonde pour la visualisation de glycanes[175]

Ce groupe s'est également servi d'un cryptophane A fonctionnalisé par une biotine pour détecter la protéine de surface membranaire CD-14, impliquée dans des pathologies comme l'athérosclérose et certaines tumeurs. Le cryptophane est ici greffé grâce à sa biotine à un anticorps spécifique de CD-14, bioconjugué à de l'avidine. Ainsi l'ensemble cryptophane-anticorps est capable de se fixer spécifiquement à des cellules surexprimant la protéine CD-14 et d'être détecté par RMN du xénon à une concentration de moins de 20 nM.[189]

Enfin ils ont développé une série de biosondes de type nanoparticules pouvant être chargées de cryptophane A permettant une amélioration du signal. Ils ont notamment utilisé des liposomes composés d'une seule couche pour encapsuler jusqu'à 3800 cryptophanes. Ces liposomes sont, dans un deuxième temps, décorés par un peptide (P2Rn) permettant l'adressage de la biosonde qui peut ainsi passer la barrière hémato-encéphalique.[190] Plus récemment cette méthode a été améliorée en fonctionnalisant les cryptophanes A par une chaîne palmitoyle, entrainant un auto assemblage sous forme de micelles chargées en cryptophane. Ils ont ainsi montré que ce type de structure contenait en moyenne sept fois plus de cage que les liposomes, augmentant ainsi considérablement le signal.[81] Ces structures permettent de limiter les problèmes de solubilité des cryptophanes tout en réduisant leur toxicité.

- Equipe de Brotin et Dutasta en collaboration avec l'équipe de Berthault

La première biosonde réalisée par le groupe de Brotin et Dutasta, en collaboration avec le groupe de Berthault est une sonde à brin d'ADN.[143] Ils utilisent pour cela un cryptophane A monofonctionnalisé avec une fonction réactive de type N-hydroxysuccinimide (NHS), permettant l'ajout d'un brin d'ADN par couplage peptidique. Ainsi cette biosonde est

[189] Rose, H. M. et al., *Development of an Antibody-Based, Modular Biosensor for 129Xe NMR Molecular Imaging of Cells at Nanomolar Concentrations*, Proc. Natl. Acad. Sci., **2014**, Vol. 111 (32), 11697–11702.
[190] Schnurr, M. et al., *Brain Endothelial Cell Targeting Via a Peptide-Functionalized Liposomal Carrier for Xenon Hyper-CEST MRI*, Adv. Healthc. Mater., **2015**, Vol. 4 (1), 40–45.

capable, à faible concentration (de l'ordre du micromolaire) de détecter en milieu aqueux la présence du brin d'ADN complémentaire et donc d'induire une différence de déplacement chimique du xénon encapsulé en RMN du xénon (Figure 69). Ils ont également mis en évidence la spécificité de cette technique pour le brin d'ADN visé car aucun shift n'est visible en présence d'un brin d'ADN non complémentaire.

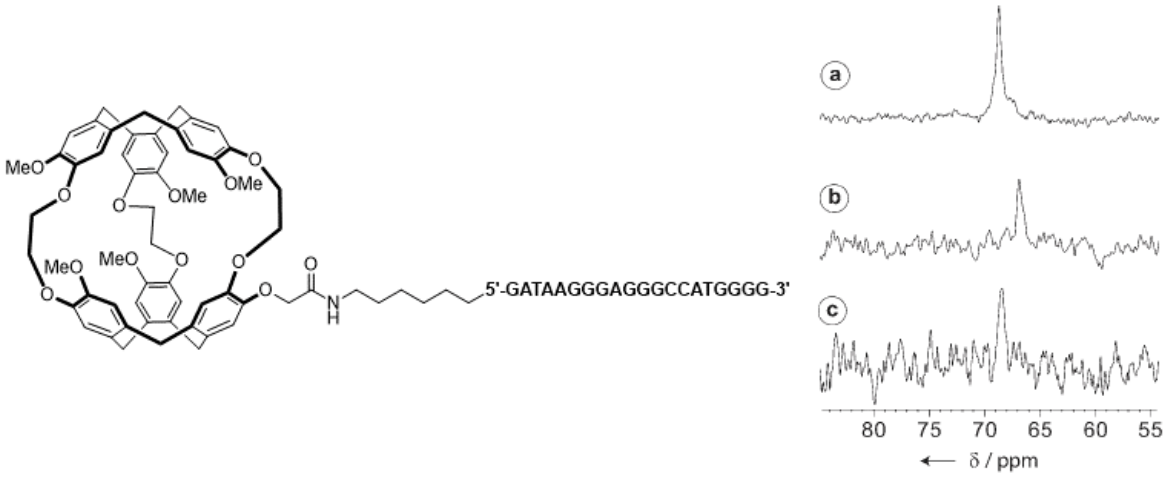


Figure 69 : Structure de la biosonde et spectres RMN du xénon de la sonde seule (a), avec le brin d'ADN complémentaire (b) et avec un brin d'ADN non complémentaire (c)[178]

A plus forte concentration (de l'ordre du milimolaire) on observe l'apparition de plusieurs signaux en RMN du xénon, expliqués par a formation d'agrégats de type micelles à cause du caractère amphiphile de la biosonde.

La même équipe a également travaillé sur l'endocytose d'un cryptophane par une cellule en utilisant la transferrine. Il s'agit d'une protéine globulaire de 76 kDa synthétisée par le foie et qui a pour rôle de transporter le fer de l'intestin vers les réserves hépatiques et réticulocytes. Le cryptophane est greffé à la surface de cette protéine, pour être ensuite reconnu par des récepteurs spécifiques à la surface des membranes cellulaires et être finalement internalisé par endocytose afin d'obtenir par RMN du xénon un signal de l'intérieur des cellules.[146] Le cryptophane A est ici fonctionnalisé avec un ester activé comportant un pentafluorophenyl. Cependant, la nature hydrophobe de la cage conduit à des interactions non spécifiques dans la membrane cellulaire, visibles en RMN du xénon. L'utilisation de cryptophane plus hydrosoluble est ici nécessaire pour améliorer cette technique.

Ils se sont également intéressés à la détection de plusieurs cations métalliques toxiques comme le zinc ou le plomb, et deux biosondes différentes ont été synthétisées. La première décrite en 2012 s'attarde sur le zinc, impliqué dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques comme le diabète, les problèmes cardiaques et des maladies neurodégénératives. Elle est composée d'un cryptophane A comportant cinq fonctions acide carboxylique et monofonctionnalisé avec un acide nitrilotriacétique (NTA) capable de

chélater certains métaux.[191] L'utilisation d'un composé énantiopure permet de limiter le nombre de signaux en RMN, le NTA contenant lui un centre stéréogène conduisant à la formation de deux diastéréoisomères. En présence de zinc, on observe une différence de déplacement chimique de 1.2 ppm du signal RMN du xénon encapsulé et la dépolarisation de ce signal par irradiation spécifique permet alors de détecter des concentrations très faibles de zinc (30 nM). Cette sonde a ensuite été étendue pour la détection de différents cations métalliques dans une solution. La RMN du xénon est alors assez précise pour permettre de différencier le signal de chaque cation (Figure 70).[192] Cet exemple montre qu'il est possible de détecter différents analytes à très faible concentration, de façon très rapide (quelques secondes) avec une seule sonde à xénon.

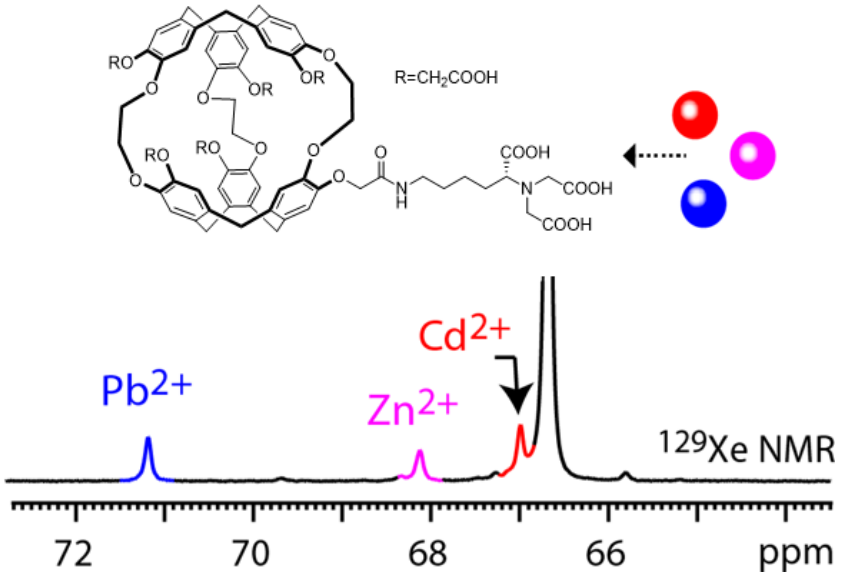


Figure 70 : Structure de la sonde à cations métallique et spectre RMN du xénon montrant la chélation des différents cations[192]

Récemment une nouvelle sonde pour la détection de zinc a été décrite, utilisant un cryptophane [223] dont le bras espaceur le plus long comporte un acide hydroxamique capable de chélater des espèces cationiques.[141]

Des sondes pour de l'imagerie bimodale RMN/fluorescence ont également été préparées. Ici aussi le cryptophane A utilisé comporte également cinq groupements acide carboxylique et est fonctionnalisé avec un composé fluorescent appelé CrASH et possédant deux atomes d'arsenic. Il est connu pour se lier de manière covalente à des protéines comportant un motif tetracystéine (Cys4), augmentant fortement sa fluorescence et permettant ainsi la détection de ces protéines. En RMN du xénon le shift est également suffisamment important

[191] Kotera, N. et al., *A Sensitive Zinc-Activated 129Xe MRI Probe*, Angew. Chemie - Int. Ed., **2012**, Vol. 51 (17), 4100–4103.
[192] Tassali, N. et al., *Smart Detection of Toxic Metal Ions, Pb2+ and Cd2+, Using a 129Xe NMR-Based Sensor*, Anal. Chem., **2014**, Vol. 86 (3), 1783–1788.

(6.4 pppm) pour permettre la distinction entre la sonde libre et la sonde liée à sa cible.[193] CraSH possédant plusieurs centres asymétriques, les différents énantiomères furent isolés puis utilisés séparément pour la détection de plusieurs protéines, avec des shifts en RMN du xénon allant jusqu'à 9 ppm.[194]

Enfin cette équipe a montré qu'il était également possible d'utiliser le cryptophane A portant six acides carboxyliques tel quel en tant que sonde à pH.[165] En effet on observe un changement des propriétés d'encapsulation du xénon par le cryptophane en fonction du pH du milieu. Par exemple le passage d'un pH de 3.5 à 10.8 entraîne un shift du signal en RMN du xénon d'environ 4 ppm. Dans une seconde approche, un mélange de deux cryptophanes portant respectivement trois et six groupes acide carboxylique est utilisé en mesurant la différence du shift entre les deux cages en fonction du pH, permettant une mesure plus simple et précise.[195]

- Equipe de Xin Zhou

La première sonde synthétisée par l'équipe de Xin Zhou est une sonde à mercure, à la structure originale puisque composée de deux cryptophane A reliés entre eux par une unité dipyrrolylquinoxaline (DQP) capable d'interagir avec l'ion Hg^{2+}. Ainsi l'ajout de mercure dans la solution va induire un changement de conformation de l'unité DQP d'une forme ouverte à fermée, rapprocher les deux cryptophanes et induire un shift d'environ 0.5 ppm en RMN du xénon (Figure 71).[196]

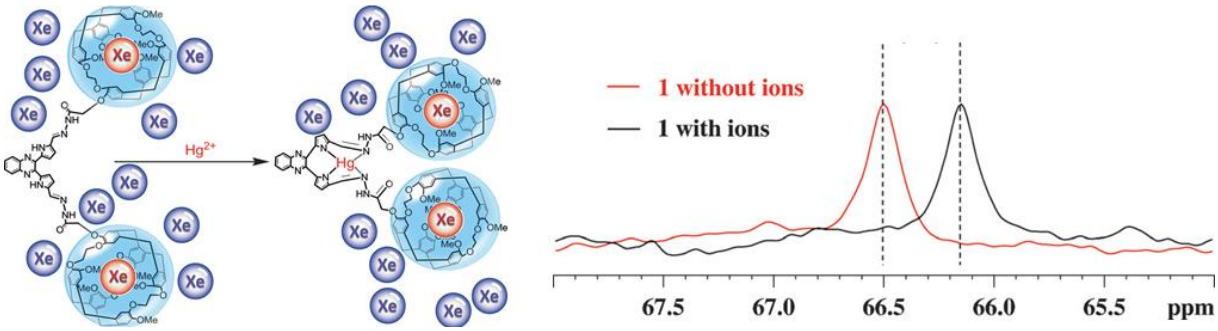


Figure 71 : Forme ouverte et fermée de la sonde en l'absence ou présence de mercure et spectre RMN du xénon[196]

Une deuxième famille de sonde a été développée dans le but de détecter des biothiols dans les milieux organiques comme la cystéine ou le glutathion, jouant un rôle important dans de

[193] Kotera, N. et al., *A Doubly Responsive Probe for the Detection of Cys4-Tagged Proteins*, Chem. Commun., **2015**, Vol. 51 (57), 11482–11484.
[194] Mari, E. et al., *Bimodal Detection of Proteins by 129Xe NMR and Fluorescence Spectroscopy*, ChemBioChem, **2019**, Vol. 20 (11), 1450–1457.
[195] Léonce, E. et al., *Accurate PH Sensing Using Hyperpolarized 129 Xe NMR Spectroscopy*, Chem. - A Eur. J., **2018**, Vol. 24 (25), 6534–6537.
[196] Guo, Q. et al., *A Molecular Imaging Approach to Mercury Sensing Based on Hyperpolarized 129 Xe Molecular Clamp Probe*, Chem. - A Eur. J., **2016**, Vol. 22 (12), 3967–3970.

nombreux métabolismes cellulaires. La première sonde de cette famille était un cryptophane A monofonctionnalisé par une fonction acrylate capable de réagir par addition 1,4 avec un biothiol. Il est donc possible de détecter la présence de ces biothiol par RMN du xénon, la liaison avec la sonde entraînant un shift de 1.5 ppm en RMN du xénon.[197] Le concept a par la suite été amélioré puisque le cryptophane a été fonctionnalisé avec un bras composé d'un pont disulfure, d'une partie fluorescente (naphthalimide) et d'une fonction d'adressage (triphenylphosphonium) visant spécifiquement les mitochondries. En présence de biothiols, le pont disulfure va être sélectivement clivé, ce qui pourra alors être détecté en RMN du xénon, avec une concentration limite de 200 pM.[198]

Plus récemment cette équipe a utilisé les cryptophanes dans le cadre de la théranostique permettant à la fois de détecter une cible mais également de la traiter. Le premier exemple décrit un cryptophane A fonctionnalisé avec une porphyrine.[199] Chaque composante de cette sonde permet l'utilisation d'une technique d'imagerie : la RMN du xénon pour le cryptophane et la fluorescence pour la porphyrine. Enfin cette même porphyrine permet également d'effectuer de la thérapie photodynamique par stress oxydant quand elle est irradiée par un laser de 650 nm de longueur d'onde (Figure 72).

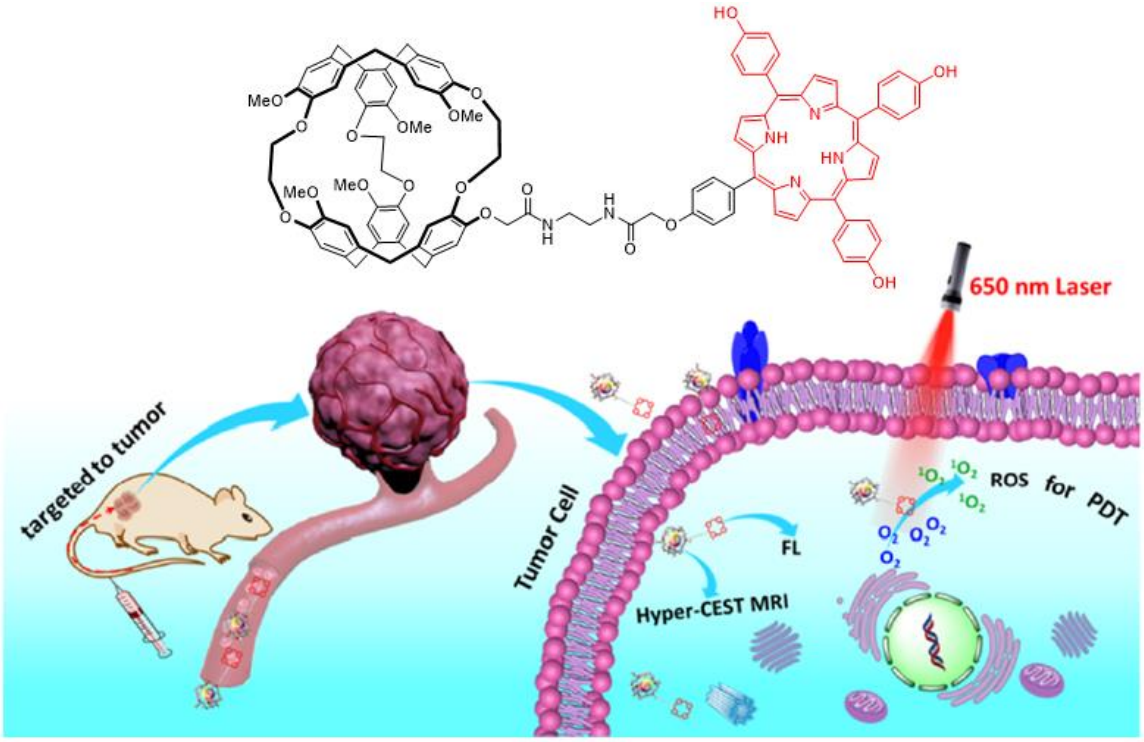


Figure 72 : Structure de la sonde et illustration de ses différentes fonctions[199]

[197] Yang, S. et al., *Biothiol Xenon MRI Sensor Based on Thiol-Addition Reaction*, Anal. Chem., **2016**, Vol. 88 (11), 5835–5840.
[198] Zeng, Q. et al., *Mitochondria Targeted and Intracellular Biothiol Triggered Hyperpolarized 129 Xe Magnetofluorescent Biosensor*, Anal. Chem., **2017**, Vol. 89 (4), 2288–2295.
[199] Zeng, Q. et al., *A Small Molecular Multifunctional Tool for PH Detection, Fluorescence Imaging, and Photodynamic Therapy*, ACS Appl. Bio Mater., **2020**, Vol. 3 (3), 1779–1786.

Cette sonde ne dispose pas de système d'adressage et doit donc être directement injectée dans les tissus tumoraux.

Enfin, et toujours dans une optique de théranostique, les cryptophanes ont été inclus dans des systèmes moléculaires plus complexes aux multiples composants : des nano-émulsions.[200] Elles sont composées d'un corps de dendrimères fluorés créant une bicouche lipidique sur laquelle viennent s'auto assembler à la surface des cryptophanes A et des porphyrines, fonctionnalisés par des polyéthylènes glycols fluorés. Des molécules de cholestérol portant un peptide RGD sont ensuite incorporées à l'édifice moléculaire, permettant ainsi de cibler les cellules tumorales (Figure 73).

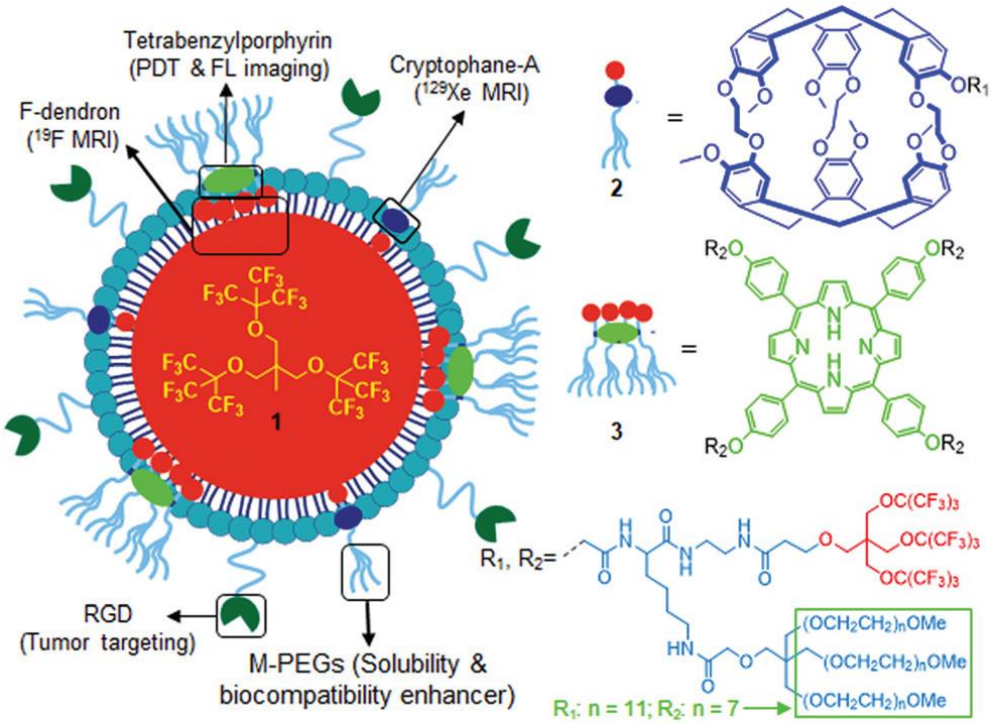


Figure 73 : Structure de la nano émulsion[200]

Cet ensemble, d'une taille de 130 nm, peut ainsi être utilisé pour de l'imagerie RMN du fluor et du xénon, en imagerie de fluorescence et également pour du traitement de tumeur par stress oxydatif induit.

Les exemples présentés ici ne constituent pas une liste exhaustive mais plutôt un aperçu de la grande variété des sondes à base de cryptophanes, utilisant dans la grande majorité des cas des dérivés du cryptophane A, qui sont utilisés du fait de la grande diversité des fonctionnalisations possibles. Cela montre également l'intérêt porté à ce type de structure et leur efficacité à détecter leur cible, même à très faible concentration, grâce à la RMN du

[200] Zhang, H. et al., *Fluorinated Cryptophane-A and Porphyrin-Based Theranostics for Multimodal Imaging-Guided Photodynamic Therapy*, Chem. Commun., **2020**, Vol. 56 (25), 3617–3620.

xénon hyperpolarisé. Des progrès, notamment au niveau de la sensibilité du signal, restent cependant encore à faire pour atteindre les premières applications *in vivo*.

5. Présentation du projet et objectifs

La première partie de cette thèse porte sur la synthèse d'une biosonde pour la détection de neuro-inflammation dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du professeur Denis Vivien du laboratoire PhIND (Physiopathologie et imagerie des troubles neurologiques, UMR-S 1237). Cette équipe a réussi à mettre en évidence la neuro-inflammation par l'utilisation de microparticules d'oxyde de fer (MPIO) couplées à des anticorps spécifiques de deux protéines : VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1) et P-sélectine,[201] connues pour être surexprimées à la lumière des cellules endothéliales à des stades précoces de la neuro inflammation.[202] Le premier objectif de cette thèse est donc de remplacer les MPIO par une alternative plus biocompatible, le xénon, et de synthétiser deux nouvelles sondes composées d'un cryptophanol, couplé par un linker aux anticorps spécifiques de VCAM-1 et de la P-sélectine (Figure 74).

Dans un second temps, et devant la difficulté d'obtenir des cryptophanes monofonctionnalisables, ce projet proposera la mise au point d'une nouvelle voie de synthèse permettant l'obtention de CTV de symétrie C_1 et ainsi introduire la fonction réactive à un stade plus précoce de la synthèse. Enfin, en se basant sur la nouvelle voie de synthèse mise en place, ce projet visera la synthèse de nouvelles structures de cryptophanes portant des azotes en remplacement des ponts méthylènes, améliorant ainsi leur solubilité et permettant un point d'encrage plus simple.

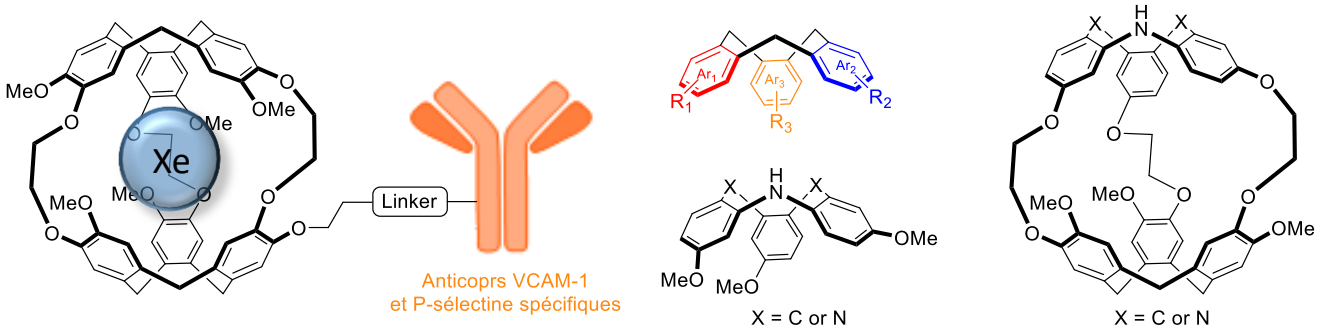


Figure 74 : Différentes structures envisagées dans cette thèse

[201] Gauberti, M. et al., *Molecular Magnetic Resonance Imaging of Brain-Immune Interactions*, Front. Cell. Neurosci., **2014**, Vol. 8 (November), 1–20.
[202] Wu, F. et al., *Endothelial Cell Activation in Central Nervous System Inflammation*, J. Leukoc. Biol., **2017**, Vol. 101 (5), 1119–1132.

Chapitre 2 : Synthèse d'une biosonde pour la détection de neuro-inflammation

1. La neuro-inflammation

La neuro-inflammation est un phénomène physiopathologique du SNC, impliquée dans plusieurs pathologies comme les AVC, la sclérose en plaque ou les maladies neurodégénératives, et qui se traduit par l'apparition de nombreux marqueurs biologiques.[203] Ainsi leur détection et quantification sont des enjeux importants à la fois dans le but d'obtenir un diagnostic plus précoce mais aussi pour adapter le mieux possible la réponse thérapeutique à la maladie détectée et avoir un suivi thérapeutique des patients plus efficace.

Dans des conditions physiologiques, l'endothélium vasculaire du SNC est dans un état de repos caractérisé par une interaction limitée avec les leucocytes en circulation, et les molécules d'adhésion telles que la P-selectine ne sont que très faiblement exprimées à la surface extracellulaire. En cas de lésion, les cellules endothéliales passent d'un phénotype inactif à un phénotype actif. L'activation endothéliale peut être, selon les connaissances actuelles, divisée en deux type I et II,[204] et se traduit respectivement par l'adressage de P-selectine à la surface endothéliale, permettant la liaison des leucocytes sur la paroi, et par la synthèse de molécules d'adhésion type VCAM-1.

Parmi les modalités possiblement adaptées pour détecter la neuro-inflammation, on peut noter l'utilisation de biomarqueurs plasmatiques,[205] mais aucun de fiable et spécifique n'a à ce jour été identifié. Les biomarqueurs du liquide céphalo-rachidien (LCR) ont également été utilisés par ponction,[206] mais cela ne permet pas de localiser la réponse inflammatoire et la ponction répétée de LCR s'avère être extrêmement inconvéniente pour un patient. Pour surmonter ces limitations, l'imagerie de la neuro-inflammation est en plein développement,[207] et notamment la détection de protéines circulantes apparaît être une alternative viable pour l'imagerie des inflammations vasculaires. Pour cela une cible pertinente doit être identifiée, un agent de contraste capable d'atteindre et de se fixer à sa cible doit être conçu et une méthode d'imagerie capable de détecter cet agent de contraste doit être choisie et utilisée.

En ce qui concerne les méthodes d'imagerie, actuellement, seules la TEMP et la TEP sont utilisées chez l'Homme pour le diagnostic clinique de la neuro-inflammation dans de nombreuses pathologies comme Alzheimer ou la sclérose en plaque.[208] Malgré leur valeur

---

[203] Wee Yong, V., *Inflammation in Neurological Disorders: A Help or a Hindrance?*, Neurosci., **2010**, Vol. 16 (4), 408–420.
[204] Pober, J. S. et al., *Evolving Functions of Endothelial Cells in Inflammation*, Nat. Rev. Immunol., **2007**,
[205] García-Berrocoso, T. et al., *From Brain to Blood: New Biomarkers for Ischemic Stroke Prognosis*, J. Proteomics, **2013**, Vol. 94 138–148.
[206] Novakova, L. et al., *Cerebrospinal Fluid Biomarkers of Inflammation and Degeneration as Measures of Fingolimod Efficacy in Multiple Sclerosis*, Mult. Scler. J., **2017**, Vol. 23 (1), 62–71.
[207] Albrecht, D. S. et al., *In Vivo Imaging of Human Neuroinflammation*, ACS Chem. Neurosci., **2016**, Vol. 7 (4), 470–483.
[208] Herranz, E. et al., *Neuroinflammatory Component of Gray Matter Pathology in Multiple Sclerosis*, Ann. Neurol., **2016**, Vol. 80 (5), 776–790.

clinique reconnue, ces méthodes souffrent d'une faible résolution spatiale, une faible disponibilité, un coût élevé et une exposition aux rayonnements ionisants. En revanche, l'IRM moléculaire est généralement dépourvue de ces inconvénients, même si elle est pour le moment limitée aux études expérimentales de preuve du concept, sans aller jusqu'à l'utilisation clinique, à cause de sa faible sensibilité et spécificité. Récemment, l'utilisation de MPIO a permis une amélioration non négligeable de la sensibilité et de la spécificité de l'IRM moléculaire.[201]

Le développement de l'IRM moléculaire pour l'étude de la neuro-inflammation était auparavant limité par un dilemme fondamental puisque les cibles d'imagerie étaient principalement intra-parenchymateuses, l'agent de contraste devant donc être suffisamment petit pour passer la barrière hémato-encéphalique, tout en contenant suffisamment de produit de contraste pour induire des changements détectables en IRM.

Le laboratoire PhIND a récemment contribué à une avancée dans l'IRM moléculaire de la neuro-inflammation en combinant un anticorps anti P-selectine et anti-VCAM-1 à des MPIO, apportant la preuve de concept de cette approche dans la détection des désordres du SNC.[209] Cette méthode a l'avantage de ne pas avoir à franchir la barrière hémato-encéphalique, les protéines étant surexprimées à la surface des cellules endothéliales, et a permis d'obtenir une sensibilité et une sélectivité sans précédent, avec la possibilité de révéler des dysfonctionnements de l'endothélium cérébral très discrets ou à des stades très précoces (Figure 75).

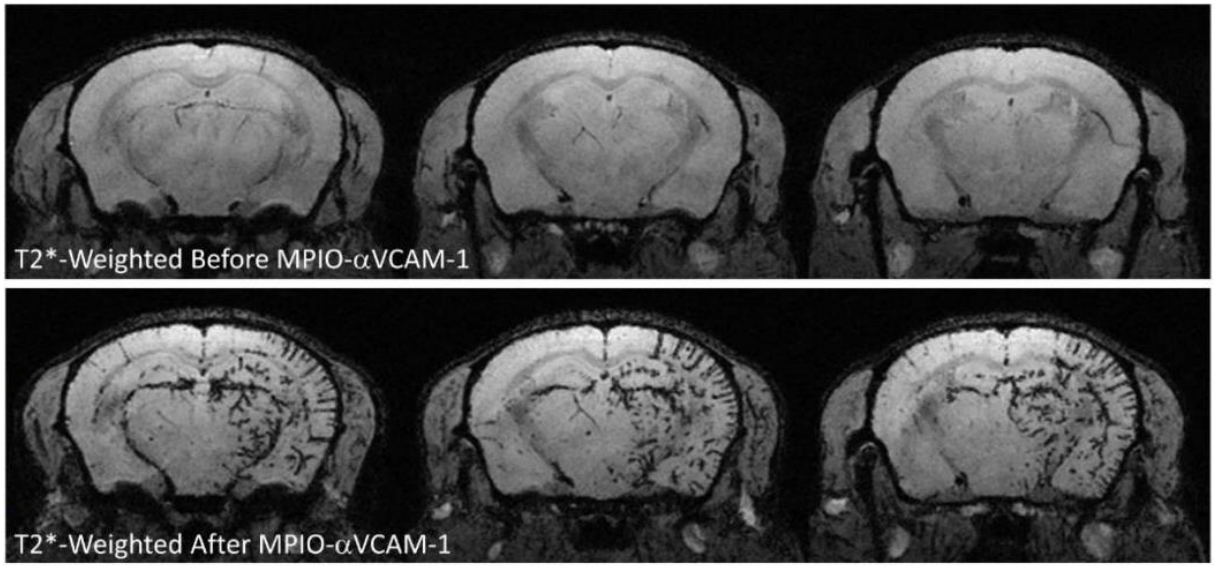


Figure 75 : Imagerie IRM de neuro-inflammation par l'utilisation de MPIO couplées à des anticorps spécifiques de VCAM-1[201]

[209] Fournier, A. P. et al., *Prediction of Disease Activity in Models of Multiple Sclerosis by Molecular Magnetic Resonance Imaging of P-Selectin*, Proc. Natl. Acad. Sci., **2017**, Vol. 114 (23), 6116–6121.

D'après ces données, l'IRM moléculaire des inflammations vasculaires apparaît comme une voie intéressante, non seulement pour les troubles du système nerveux, mais également pour toutes les pathologies dans lesquelles un dysfonctionnement endothélial est impliqué.

Cependant les MPIO non-biodégradables rendent cette approche inutilisable en clinique et le développement d'une alternative biocompatible est nécessaire. Parmi les agents de contraste disponibles, l'utilisation de xénon hyperpolarisé (HP-^{129}Xe) apparaît depuis quelques années comme une option prometteuse. En effet, grâce à différentes techniques, le xénon peut être hyperpolarisé, augmentant considérablement son signal, ce qui le rend détectable à très faible concentration. De plus il peut être détecté avec un très bon rapport signal/bruit en utilisant une méthode de détection par transfert de saturation par échange chimique (Hyper-CEST). Grâce à un nuage électronique large et hautement polarisable, le xénon est très sensible à son environnement ce qui se traduit, en RMN du xénon, par des shifts chimiques importants permettant non seulement la localisation de la sonde mais aussi d'observer les modifications de son environnement. Il est aussi intéressant de rappeler que le xénon est un gaz rare inerte et non toxique, soluble dans les solvants organiques, les solutions aqueuses et les fluides biologiques comme le sang, et peut être administré directement par inhalation ou injection intraveineuse.

Toutefois le xénon reste non spécifique d'une cible biologique, et pour être un agent de contraste utilisable, il doit être vectorisé par un hôte moléculaire capable de l'encapsuler. Parmi les composés chimiques capables d'encapsuler le xénon, les cages moléculaires appelées cryptophanes montrent de très bonnes propriétés d'encapsulation du xénon. Ce chapitre vise donc à concevoir et synthétiser de nouvelles sondes à xénon composées d'un cryptophane monophénol (ou cryptophanol), intermédiaire clé dans la synthèse globale, couplé par un linker à des anticorps spécifiques de VCAM-1 et de la P-sélectine. Les linkers synthétisés seront de deux types, soit comportant un ester activé type N-Hydroxy Succinimide (NHS), soit une fonction maléimide permettant de fonctionnaliser respectivement les amines et les thiols libres des anticorps.

2. Analyse rétrosynthétique

La biosonde utilisant du xénon hyperpolarisé pour la détection de la neuro-inflammation envisagée est composée de trois constituants, un cryptophane, molécule hôte du xénon, un linker permettant l'accroche à la molécule d'intérêt et l'anticorps spécifique de la P-sélectine ou VCAM-1 (Figure 76).

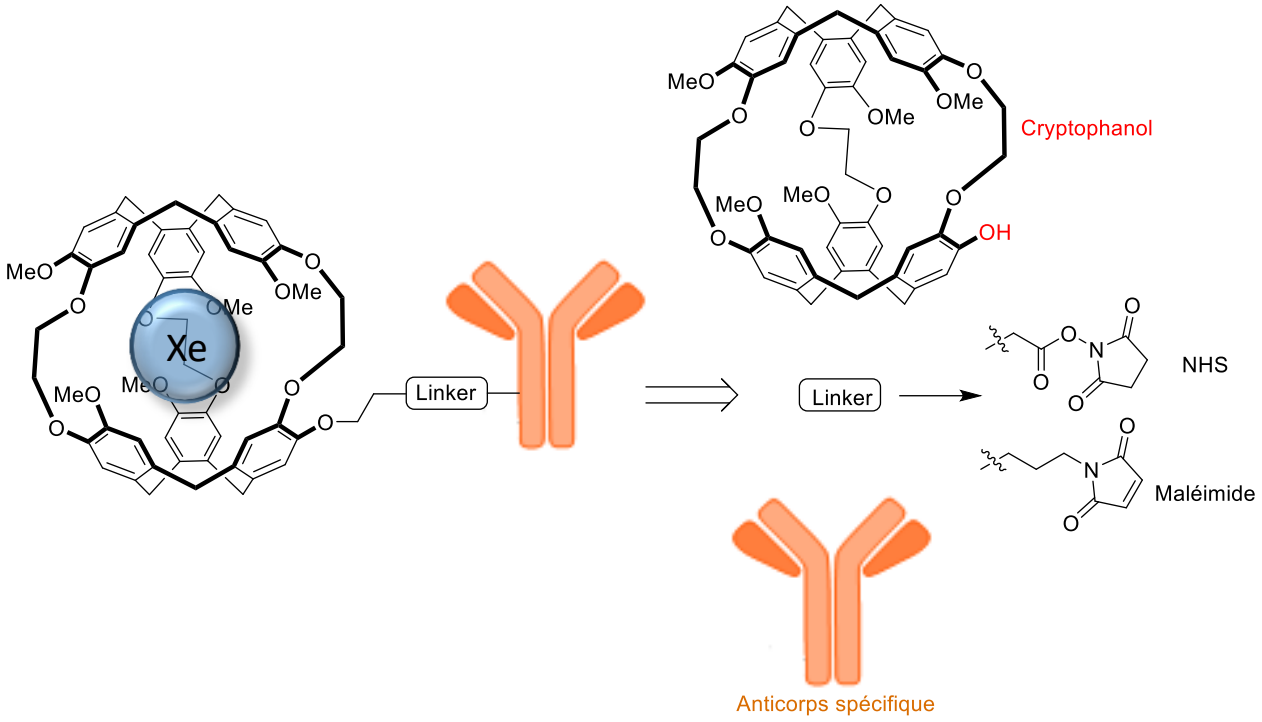


Figure 76 : Analyse rétrosynthétique de la biosonde

Le cryptophane choisit et le cryptophane A du fait de sa voie de synthèse largement décrité et de son utilisation majoritaire dans les applications en tant que biosonde. Les linkers envisagés pour ce projet sont de deux types : un comportant un ester activé type NHS et un comportant une fonction maléimide permettant de fonctionnaliser respectivement les amines et les thiols libres des anticorps. Afin d'accrocher ces linkers à un cryptophane, le cryptophane A doit être préalablement modifié pour obtenir le cryptophanol mono fonctionnalisable.

L'obtention de ce cryptophanol a été envisagée par deux voies différentes (Figure 77). La première est une monodéméthylation du cryptophane [222]-6 OMe. La deuxième vise à introduire la fonction phénol en amont de la synthèse par l'ajout d'un bras espaceur différent sur le CTB, comportant un alcool protégé par un groupement allyle.

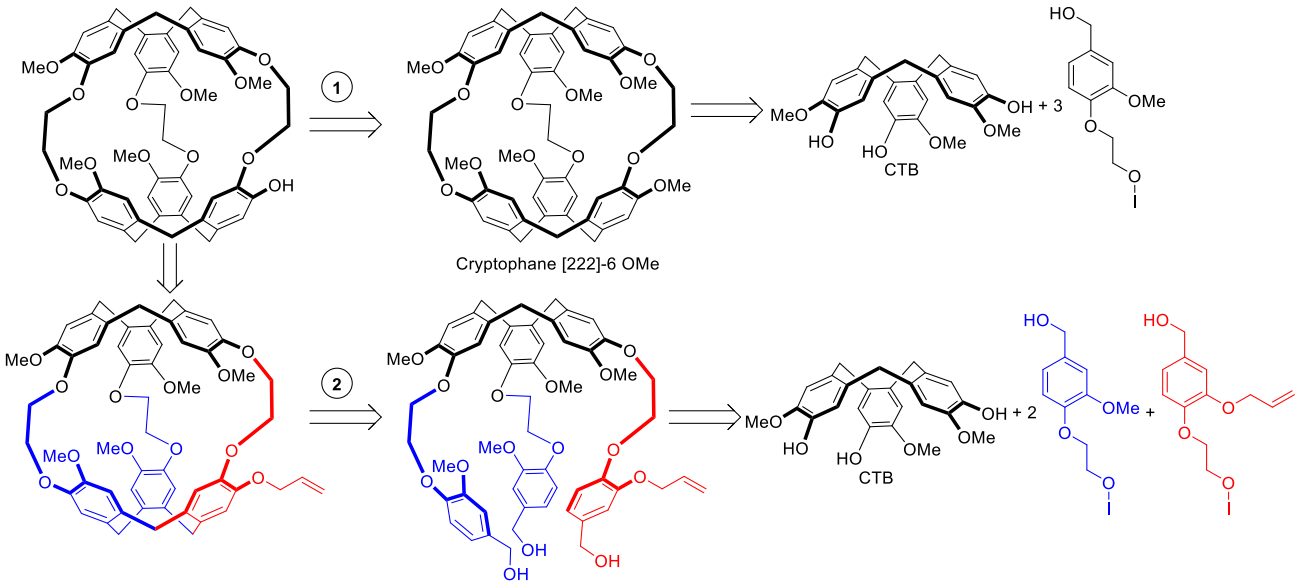


Figure 77 : Deux voies de synthèse envisagées pour l'obtention du cryptophanol

Bien que plus courte, la principale difficulté de la première voie réside dans la purification du cryptophanol vis-à-vis des composés polyphénols. Dans la deuxième voie, la difficulté se trouve également dans la purification des différents intermédiaires « ouverts » du cryptophane.

3. Synthèse du cryptophanol

La première partie des travaux de thèse a porté sur la mise au point d'une voie de synthèse simple, avec de bons rendements et reproductible du cryptophanol mono-fonctionnalisable, intermédiaire clé dans ce projet, pour l'obtention d'une biosonde. Compte tenu de la bibliographie et des différentes voies d'accès du cryptophane, un premier schéma de synthèse a été envisagé. Cette première voie de synthèse s'appuie sur une méthode template, déjà décrite,[210,112] en six étapes partant d'un seul et même produit de départ : l'alcool vanillique **1**. Dans la littérature cette voie de synthèse comporte de bons rendements, avec notamment l'étape de cyclotrimérisation du CTV autour de 50% et une dernière étape de fermeture du cryptophane entre 60 et 80%. Le rendement global pour le cryptophane A étant décrit autour de 10-20%.[120]

Enfin, l'étape de désymétrisation est effectuée à la toute fin de la synthèse par une étape de monodéméthylation. Cette étape, pourtant décrite comme simple dans la littérature, n'est décrite qu'avec un rendement de 37% en utilisant un équivalent de iodotriméthylsilyle (TMSI), portant le rendement global de la synthèse de ce composé autour de 6%.[146]

Quelle que soit la voie de synthèse choisit, les deux s'appuient sur le même intermédiaire : le CTB.

[210] Canceill, J. et al., *Optical Activity Due to Isotopic Substitution. Synthesis, Stereochemistry, and Circular Dichroism of (+)- and (−)-[2,7,12-2H3]Cyclotribenzylene*, J. Am. Chem. Soc., **1984**, Vol. 106 (20), 5997–6003.

3.1. Synthèse du CTB

La première étape de cette synthèse est une étape de protection du phénol de l'alcool vanillique **1** commercial par du bromure d'allyle, indispensable pour que la deuxième étape de cyclotrimérisation soit réalisable avec un bon rendement et limiter la formation de produits secondaires (Figure 78). La protection est effectuée en une nuit et le produit **2** est purifié par recristallisation dans l'éther. Ce dernier réagit ensuite avec l'acide perchlorique à température ambiante dans le méthanol pour obtenir le CTV **3**, il est intéressant de voir que plus l'ajout de l'acide est fait lentement et régulièrement, moins on observe la formation de produits secondaires ou de polymères. Le CTV **3** est purifié par trituration dans l'éther. Enfin la déprotection des alcools par de l'acétate de palladium conduit au CTB **4**, prêt à être alkylé par des bras espaceurs.

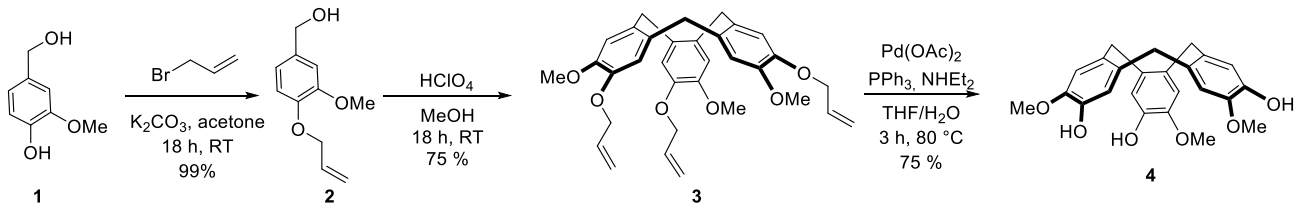


Figure 78 : Synthèse du CTB **4**

3.2. Première voie de synthèse

Dans cette voie de synthèse le bras espaceur **6** est obtenu en deux étapes (Figure 79), également à partir de l'alcool vanillique **1**, qui réagit tout d'abord avec du 1,2-dibromoéthane en présence de carbonate de potassium pour donner l'intermédiaire **5**, puis un échange d'halogène permet ensuite d'obtenir la molécule iodée **6**.

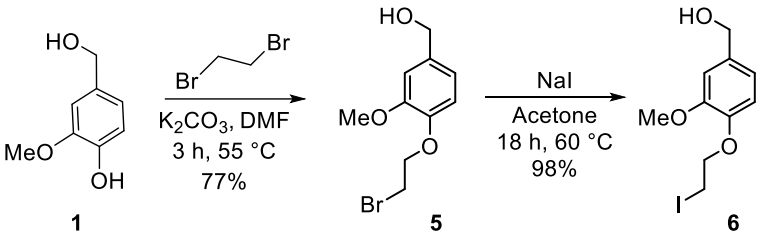
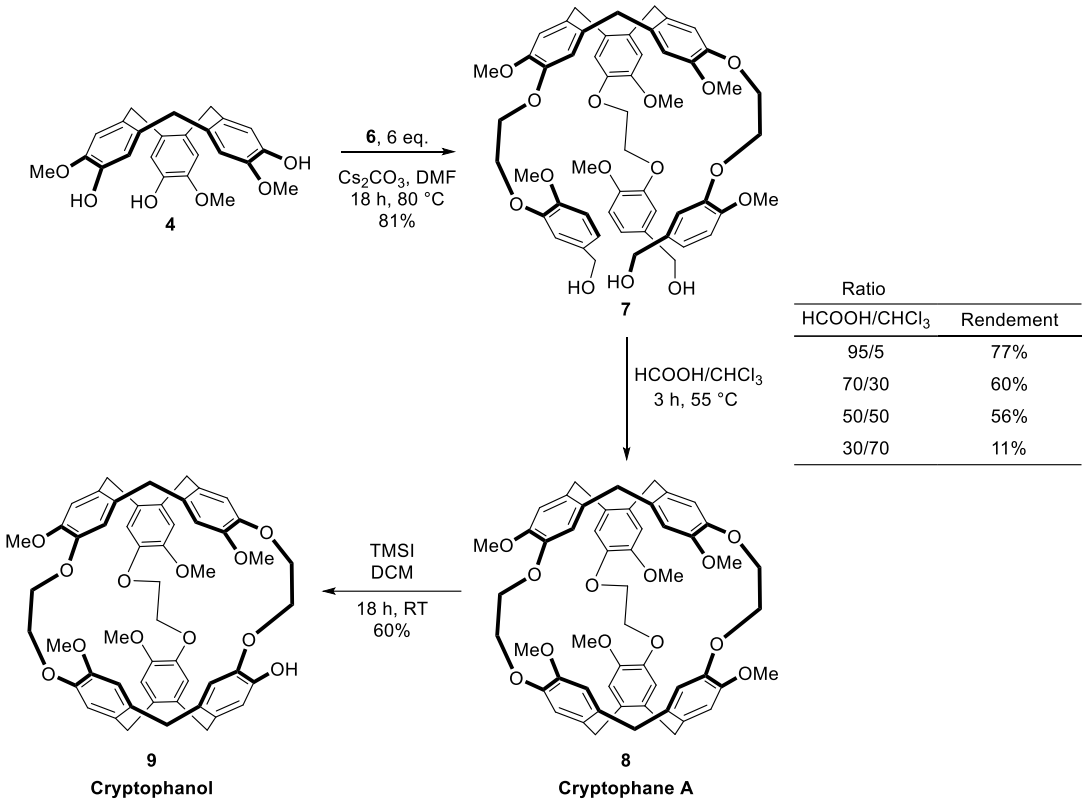


Figure 79 : Synthèse du bras espaceur **6**

Une triple substitution nucléophile entre le CTB **4** et le bras espaceur **6** permet d'obtenir le précurseur du cryptophane **7** avec un rendement de 81% (Figure 80). Une deuxième étape de cyclotrimérisation, cette fois dans un mélange 95/5 acide formique/chloroforme permet d'obtenir le cryptophane A **8** avec un rendement de 77%.



Ratio HCOOH/$CHCl_3$	Rendement
95/5	77%
70/30	60%
50/50	56%
30/70	11%

Figure 80 : Schéma de synthèse du cryptophanol

On peut noter ici que plus la proportion d'acide est importante, plus le rendement est élevé, le chloroforme ne servant qu'à solubiliser le produit de départ. On peut également ajouter que cette étape doit être effectuée à haute dilution (1.10^{-3} M) pour limiter la formation de produit secondaires et notamment des polymères. Le cryptophane A est ainsi obtenu en 5 étapes avec un rendement global de 35%, légèrement supérieur à ceux décrit dans la littérature.

Enfin une dernière étape de mono-déméthylation du cryptophane **8** par de l'iodure de triméthylsilyle permet d'obtenir le cryptophanol **9**.[146] Cette étape a nécessité beaucoup de mise au point car en ajoutant un équivalent de TMSI on observe obligatoirement la formation de produits di- ou tri-déméthylés très difficilement séparables les uns des autres et du produit voulu. Il a donc été décidé de diminuer la quantité de TMSI jusqu'à ne plus avoir que la formation du produit attendu (suivi par LC-MS), le cryptophane **8** et le cryptophanol **9** étant facilement séparables en utilisant de l'alumine neutre pour la purification par chromatographie. C'est pourquoi seulement 0.6 équivalent sont ajoutés dans la solution, ce qui permet d'obtenir seulement le cryptophanol **9**, avec un rendement de 60%, et également de récupérer très facilement le produit de départ pour pouvoir le réengager dans la même réaction de déprotection. Le rendement de cette étape est ici presque doublé par rapport à ce qui est décrit dans la littérature en utilisant un équivalent de TMSI.

Ainsi cette voie de synthèse permet d'obtenir le cryptophanol **9** avec un rendement global de 20%, un rendement supérieur à ce qui est décrit dans la bibliographie. Devant la difficulté de purifier ce composé avec de bons rendements, une deuxième voie de synthèse a été envisagée en parallèle.

3.3. Deuxième voie de synthèse

Cette voie de synthèse introduit la fonction alcool permettant de fonctionnaliser le cryptophane en amont dans la synthèse, par l'introduction d'un bras espaceur différent.[138, 211] Dans la littérature ce bras est introduit sur le CTB avec un rendement de 25-30%, puis les deux autres bras sont rajoutés, avec un rendement de 60-80%. La fermeture du cryptophane est ensuite réalisée avec un rendement de 35-40% puis le cryptophanol est obtenu avec un rendement de 80-85%, portant le rendement global à 2-4%. On note également que les alcools benzyliques des bras espaceurs sont protégés par des groupements acétals THP (tétrahydropyrane). Le choix a dont été fait de tester les deux possibilités : alcool non protégés et protégés afin de vérifier l'influence possible sur le rendement.

Le bras comportant l'alcool protégé est obtenu à partir du 3,4–dihydroxybenzaldehyde **10** commercial, dont l'un des deux alcools est sélectivement protégé par du bromure d'allyle en présence de deux équivalents de NaH (Figure 81). La deuxième fonction alcool est mise en réaction avec du 1,2-dibromoethane en présence de carbonate de potassium pour donner l'intermédiaire **12**. L'aldéhyde est ensuite réduit en présence de tétrahydroborate de sodium pour obtenir l'alcool benzylique **13**. Enfin une dernière étape d'échange d'halogène permet d'obtenir le bras espaceur iodé attendu **14**.

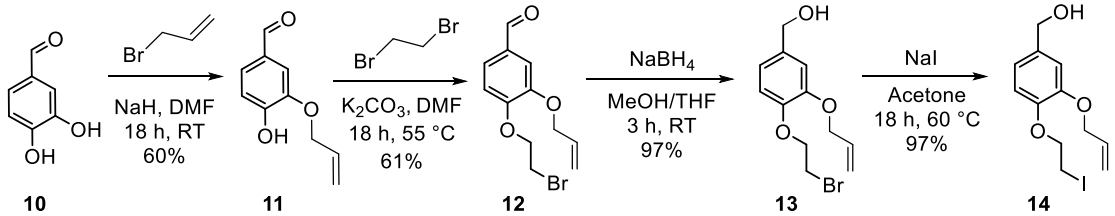


Figure 81 : Synthèse du bras espaceur

La synthèse a été légèrement modifiée par rapport à celle précédemment décrite, le dibromoéthane étant ici introduit avant la réduction, permettant un meilleur rendement. En effet, dans la littérature ce précurseur est obtenu avec un rendement global de 12% contre 34% ici.[211]

Le bras espaceur **14** est ensuite mis en réaction avec le CTB **4** pour obtenir l'intermédiaire **15** (Figure 82). Le faible rendement s'explique par la difficulté de la purification pour séparer le produit qui nous intéresse de celui comportant 2 et 3 bras espaceurs. Dans un

[211] Darzac, M. et al., *Synthesis and Application of Cryptophanol Hosts: 129Xe NMR Spectroscopy of a Deuterium-Labeled (Xe)2@bis-Cryptophane Complex*, New J. Chem., **2004**, Vol. 28 502–512.

second temps l'intermédiaire **15** est mis en présence de quatre equivalents du bras espaceur **6** pour obtenir l'intermédiaire **16** qui sera ensuite chauffé dans un mélange d'acide formique et de chloroforme pour réaliser la cyclotrimérisation et ainsi former le cryptophane **17**. Il est ici intéressant de noter qu'à l'inverse de la première voie de synthèse, la proportion du mélange des deux solvants acide formique/chloroforme n'influe que très peu sur le rendement de la réaction (35% en 95/5, et 38% en 50/50). Enfin une dernière étape de déprotection de l'alcool par de l'acétate de palladium permet l'obtention du cryptophanol **8** avec un rendement de 74%.

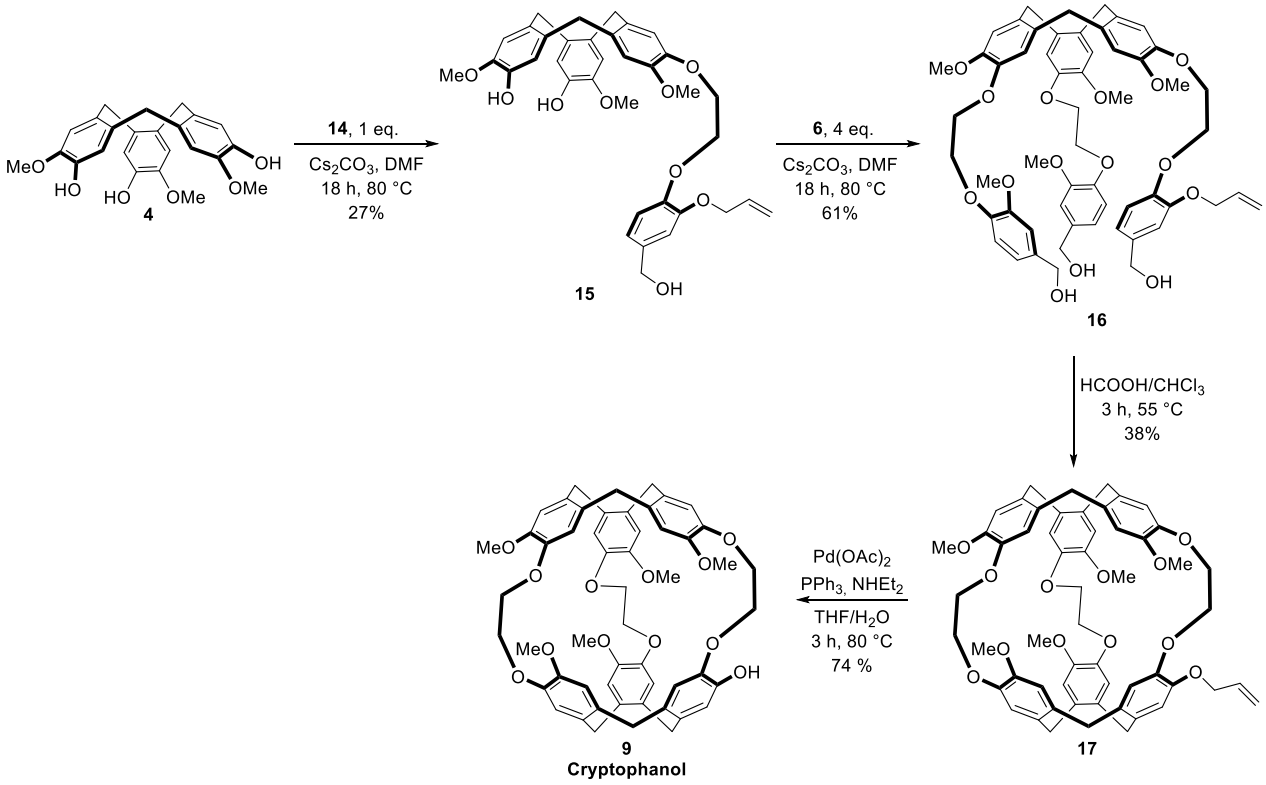


Figure 82 : Deuxième voie de synthèse du cryptophanol

Le rendement global de cette voie de synthèse est de 5%, donc similaire à ceux de la littérature.

Dans le but d'une possible amélioration de cette voie de synthèse du composé **17** et d'avoir des purifications plus aisées, les alcools benzyliques ont par la suite été protégés avec des groupements THP. La protection a été réalisés sur les deux composés **6** et **14**, en présence de PPTS, avec des rendements respectifs de 99 et 82%, similaires à la littérature (Figure 83).

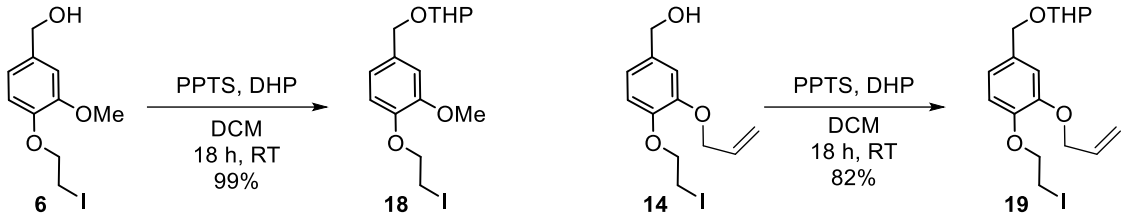


Figure 83 : Protection des alcools benzyliques par un THP

La synthèse est ensuite réalisée dans le même ordre que précédemment avec tout d'abord la réaction d'un équivalent du composé **19** avec le CTB **4** pour obtenir l'intermédiaire **20** avec un rendement de 35%. Il est par la suite mis en présence de quatre équivalents du composé **18** pour obtenir le précurseur **21** qui sera, pour finir, engagé dans une réaction de cyclotrimérisation pour obtenir le cryptophane **17** avec un rendement de 38% (Figure 84).

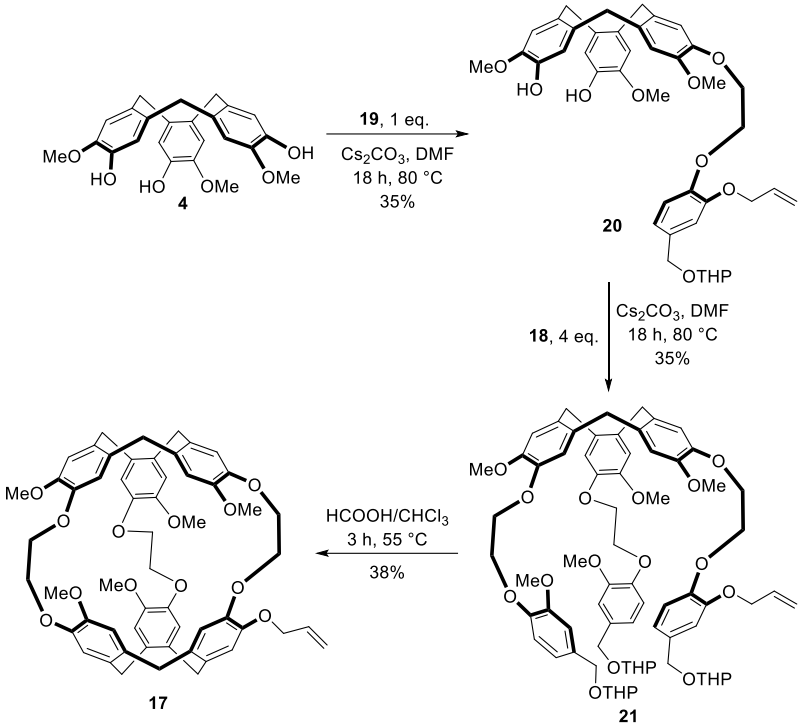


Figure 84 : Voie de synthèse du cryptophane **17** avec les composés ayant l'alcool benzylique protégé

On peut voir que, malgré la présence des fonctions THP, les rendements ne sont pas améliorés et les purifications restent toujours aussi complexes. On remarque également que leur présence n'est pas un souci pour l'étape de fermeture du cryptophane. En revanche elle a comme effet de compliquer grandement la caractérisation en RMN des produits intermédiaires car ils entraînent la formation de diastéréoisomères.

Cette seconde voie de synthèse permet donc d'obtenir le cryptophanol **8** avec un rendement global de 5%, similaires à ceux précédemment décrits dans la bibliographie. On remarque que l'ajout de groupement protecteurs de type THP n'a que très peu d'influence sur ces rendements, qui restent de toute façon bien inférieurs à la première voie de synthèse que

nous avons mis au point. Cela est notamment due aux purifications de produits intermédiaires complexes et à la fermeture du cryptophane **17** qui se fait avec un faible rendement. Même si une optimisation des purifications intermédiaires semble possible, une grande quantité de solvant est nécessaire et l'ensemble de la synthèse est bien plus longue que la première voie décrite précédemment. C'est donc la première voie de synthèse qui a été privilégiée pour obtenir du cryptophanol **9** en plus grande quantité et permettre ainsi les essais de fonctionnalisation du cryptophanol.

4. Fonctionnalisation du cryptophane

Une fois le cryptophanol **9** synthétisé il convient de trouver le meilleur linker possible pour pouvoir ensuite le greffer sur les anticorps. Dans cette perspective, deux linkers de petite taille ont été envisagés pour la suite, comportant soit une fonction NHS, soit une fonction maléimide.

4.1. Cryptophane-NHS

Un premier linker permettant d'obtenir un cryptophane fonctionnalisable par une liaison activée de type NHS est dans un premier temps synthétisé (Figure 85). Cette voie de synthèse reprend un des premiers article de l'équipe de Pines décrivant des biosondes à xénon, dans lesquelles ils fonctionnalisent le cryptophanol avec un acétate de méthyle et se servent de l'acide correspondant comme fonction réactive pour introduire les objets d'intérêt.[86]

Tout d'abord une substitution nucléophile entre le cryptophanol **9** et le 2-bromoacétate de méthyle permet d'obtenir l'intermédiaire **22** qui est ensuite saponifié par de l'hydroxyde de potassium pour obtenir le composé **23** de manière quantitative. Enfin une étape de couplage avec le disuccinimidyl carbonate (DSC) en présence de diisopropyléthylamine permet d'obtenir le composé cible **24**. Ce composé n'étant pas stable sur gel de silice, il est purifié par colonne de chromatographie en phase inverse (silice C18).

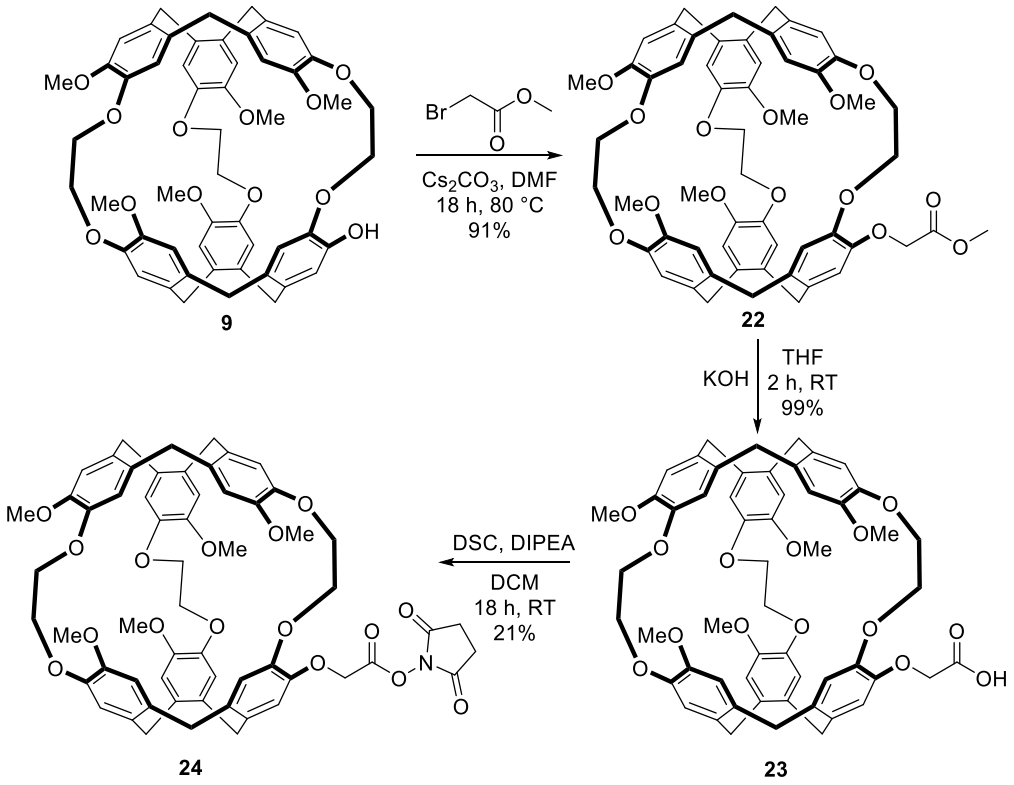


Figure 85 : Voie de synthèse du composé **24**

Le composé **24**, obtenu avec un rendement global de 19% à partir du composé **9**, présente un groupement carbonyle extrêmement réactif avec un grand nombre de nucléophiles comme les fonctions amines libres présentes sur les anticorps, mais aussi avec l'eau, ce qui pourrait poser problème au moment du couplage avec ces anticorps, disponibles en milieux aqueux. Un deuxième linker a donc été conçu, moins sensible et plus robuste en milieu aqueux.

4.2. Cryptophane-Maléimide

Le deuxième type de linker possédant une fonction maléimide a par la suite été synthétisé, également en trois étapes (Figure 86). Une substitution nucléophile du cryptophanol **9** par le 3-bromopropylamine, protégée par un groupement boc, permet d'obtenir l'intermédiaire **25** dont l'amine est déprotégée en milieu acide puis conservée sous forme de sel d'acide trifluoroacétique pour obtenir le composé **26**. Ce composé réagit ensuite avec de l'anhydride maléique puis est mis en milieu acide pour refermer le cycle maléimide et obtenir le composé cible **27**.

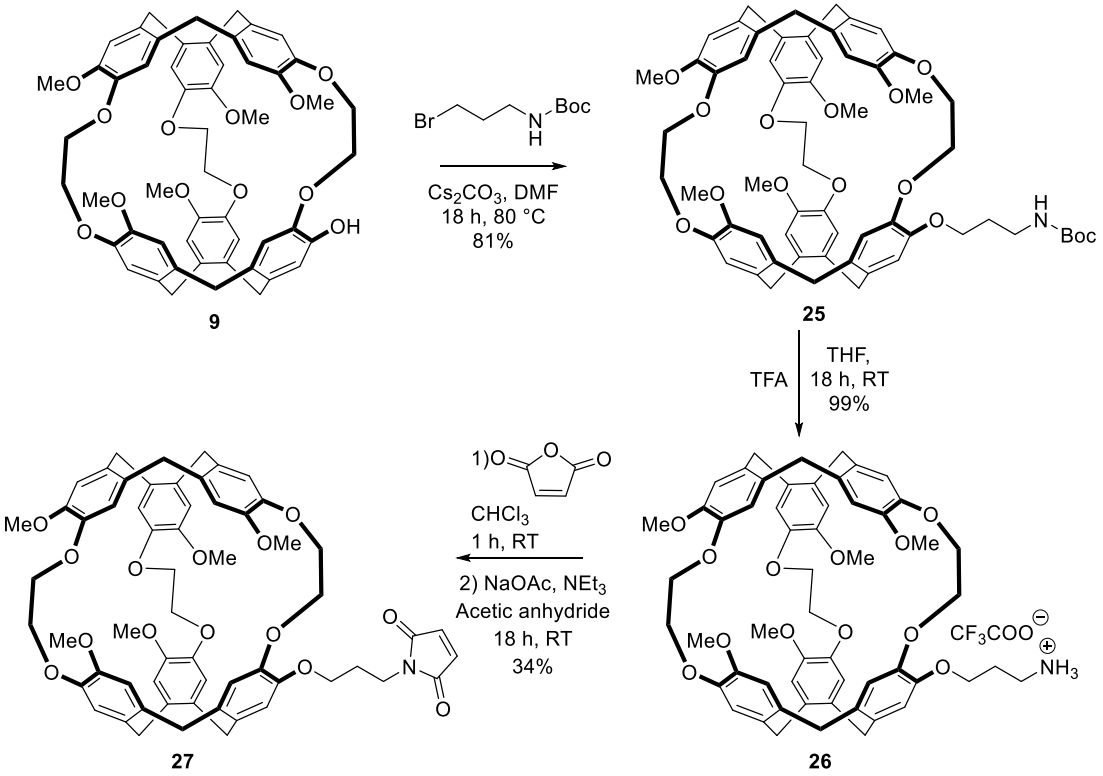


Figure 86 : Voie de synthèse du composé **27**

Celui-ci est obtenu avec un rendement global de 27% à partir du composé **9** et il permet, de par sa fonction maléimide, de réagir avec les fonctions thiols libres des anticorps. Il présente également l'avantage d'être beaucoup plus stable, notamment lors de la purification sur silice, mais aussi en milieu aqueux.

Les deux composés réactifs ayant été synthétisés, les premiers essais de greffage sur les anticorps anti VCAM-1 ont pu être réalisés.

5. Greffage du cryptophane à l'anticorps

Les essais de greffage des anticorps ont été réalisés en collaboration avec Thomas Bonnard du laboratoire PhIND, nous fournissant les anticorps et nous aidant à mettre au point le protocole. Un premier protocole de greffage des cryptophanes **24** et **27** (Figure 87) a ainsi été envisagé. Dans la littérature, le marquage des amines libres d'un anticorps par une molécule comportant une fonction NHS ou des thiols libres par des molécules comportant un maléimide sont décrites comme fonctionnant très bien à pH et osmolarité physiologique.[212] C'est pourquoi le milieu choisi pour réaliser ces greffages est un tampon phosphate salin ou PBS à un pH de 7,4.

La réaction a été réalisée avec deux solutions contenant des proportions cryptophane/anticorps différentes : une première avec une proportion équivalente à 4

[212] Conde, J. et al., *Revisiting 30 Years of Biofunctionalization and Surface Chemistry of Inorganic Nanoparticles for Nanomedicine*, Front. Chem., **2014**, Vol. 2

cryptophanes pour un anticorps et une deuxième avec une proportion 10 fois supérieure, soit 40 cryptophanes par anticorps. Pour cela le cryptophane est d'abord solubilisé dans du DMSO puis du PBS est ajouté pour dilution jusqu'à la concentration voulue. L'anticorps anti VCAM-1 étant déjà en solution dans du PBS, deux solutions pour chaque biosondes peuvent donc être réalisées avec les ratios souhaités.

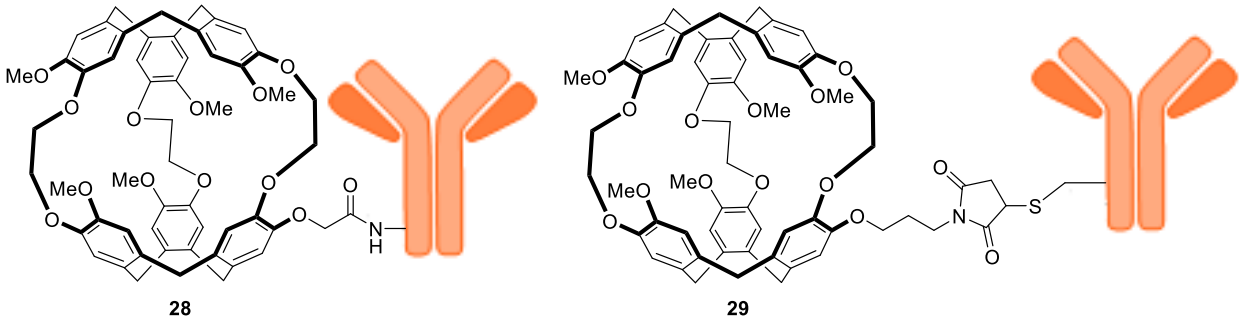


Figure 87 : Représentation des deux biosondes avec les cryptophanes **24** et **27**

On remarque que lors de l'application de ce protocole pour le composé **28**, l'ajout de PBS pour la dilution entraîne la formation d'un précipité blanc dans la solution, cela signifiant soit que le composé n'est pas soluble dans une solution aqueuse, soit que la fonction NHS a réagi avec l'eau pour reformer l'acide **23**, également non soluble dans l'eau. Nous avons décidé de garder cette solution pour la suite et le protocole à été modifié pour que la dilution des solutions du composé **28** soit faite avec du DMSO.

Ces solutions seront utilisées pour réaliser les premiers tests de RMN du xénon *in vitro*, mais il convient d'abord de caractériser pleinement les complexes formés, afin de déterminer le nombre moyen de cryptophanes greffés sur les anticorps et si une purification est nécessaire. N'ayant pour cela pas les outils (spectromètre de masse) au sein de notre laboratoire, les biosondes ont été envoyées à la plateforme PISARO de Rouen pour être analysées en UHPLC-ESI-QTOF. Les premiers résultats ont montré l'absence de greffage dans le cas du composé **28**, certainement lié au problème décrit ci-dessus, et la présence d'anticorps greffés dans le cas du composé **29**, mais en concentration trop faible pour pleinement caractériser le taux de greffage.

6. Conclusion

En conclusion, le cryptophanol **9** a été obtenu par deux voies de synthèse différentes, la plus efficace passant par l'intermédiaire du cryptophane A symétrique. Deux différents linkers ont été par la suite greffés sur le cryptophane pour obtenir les composés **24** et **27**, le composé possédant une fonction maléimide s'étant révélé plus simple à purifier et stable en milieu aqueux. Enfin des essais de greffages sur les anticorps ont été menés et les composés obtenus doivent d'abord être entièrement caractérisés et purifiés si besoin. Si jamais la caractérisation du taux de greffage révèle un marquage trop faible des anticorps, le

protocole pourra être modifié en utilisant une part de DMSO plus importante lors de la préparation des solutions et le ration cryptophane/anticorps pourra être augmenté. Finalement, les biosondes pourront être testées *in vitro* en RMN du xénon pour apporter la preuve de concept que ce type de biosonde à base de cryptophane peut être utilisé pour la détection de la neuro-inflammation.

En travaillant sur la synthèse des biosondes à base de cryptophane, il nous est apparu que l'obtention de cryptophanes monofonctionnels s'avère plus complexe que ce qui été attendu du fait de purifications difficiles, ce qui conduit donc à des rendements assez faibles. Ce type de cryptophanes étant pourtant très décrits et utilisés dans le cadre de biosondes, il nous semble intéressant de proposer une nouvelle voie de synthèse de cryptophanes monofonctionnalisables.

Chapitre 3 : Nouvelle voie de synthèse de CTV de symétrie C_1

1. Présentation du projet

Dans les cas décrits précédemment, le cryptophanol est essentiellement obtenu selon deux grandes voies : la première utilise un cryptophane A qui est désymétrisé, entraînant des difficultés de purification. La seconde utilise un CTV de symétrie C_3 sur lequel sont greffés différents bras, conduisant à une synthèse laborieuse et des purifications intermédiaires difficiles. On s'est donc proposé de développer une nouvelle voie de synthèse des cryptophanes, passant par un CTV intermédiaire de symétrie C_1, permettant d'introduire en amont de la synthèse une fonction réactive pour une possible fonctionnalisation ultérieure.

Il s'agit donc, dans un premier temps, de développer et de mettre au point une nouvelle voie de synthèse pour accéder à des CTV de symétrie C_1, composés très peu décrits dans la littérature et pouvant être utilisés pour développer de nouveaux cryptophanes. La majorité des techniques décrites utilise un même monomère engagé dans une réaction de trimérisation pour obtenir un CTV de symétrie C_3, ensuite modifié sur un de ses cycles aromatiques ou sur sa position apicale (cf chapitre 1, paragraphe 4.1.2).[122-124] Plus récemment l'équipe de Martinez a utilisé un mélange de deux alcools benzyliques, engagés dans une réaction de cyclotrimérisation conduisant à un mélange de CTV de symétrie C_3 et C_1.[125] Dans tous les cas une purification longue et laborieuse, conduisant à de faibles rendements, est nécessaire.

L'objectif ici est de proposer une voie de synthèse itérative, permettant l'ajout un à un des monomères préalablement modifiés selon nos besoins. Cela permettant notamment d'éviter l'étape de cyclotrimérisation connue pour entraîner la formation de nombreux sous-produits et l'étape de désymétrisation dont la purification s'avère souvent complexe et avec un rendement faible. On se base pour cela sur les travaux de l'équipe de Barluenga qui décrit la formation de ponts méthylènes entre deux cycles aromatiques, sans utiliser de métal, dans des conditions très douces et avec des produits de départ facile d'accès (hydrazones et acides boroniques).[213] Par cette méthode les cycles aromatiques peuvent ainsi être introduits un par un, avec un contrôle de la position et du type de substituants présents sur ces cycles (Figure 88).

[213] Barluenga, J. et al., *Metal-Free Carbon–Carbon Bond-Forming Reductive Coupling between Boronic Acids and Tosylhydrazones*, Nat. Chem., **2009**, Vol. 1 (6), 494–499.

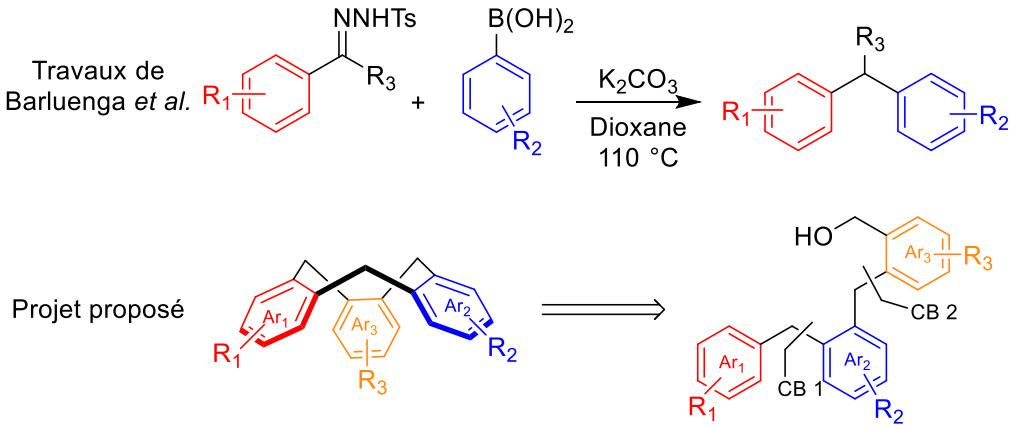


Figure 88 : Schéma général du couplage de Barluenga (CB) et schéma du projet envisagé

Le mécanisme de la réaction de Barluenga passe tout d'abord par la décomposition de l'hydrazone, en présence d'une base, pour donner le composé diazo **II** (Figure 89). Deux possibilités sont ensuite envisagées, la première étant un mécanisme associatif dans lequel l'acide boronique réagit avec le composé diazo pour former l'intermédiaire **IV**, puis un réarrangement 1,2 entraîne le départ de diazote et la formation de l'acide boronique **VII**. La deuxième possibilité est un mécanisme dissociatif qui passe par la formation, grâce au départ thermiquement induit de diazote, d'un carbène **V**, qui réagit avec l'acide boronique pour donner l'intermédiaire **VII**. Enfin une étape de protodéboronation permet d'obtenir le composé souhaité.

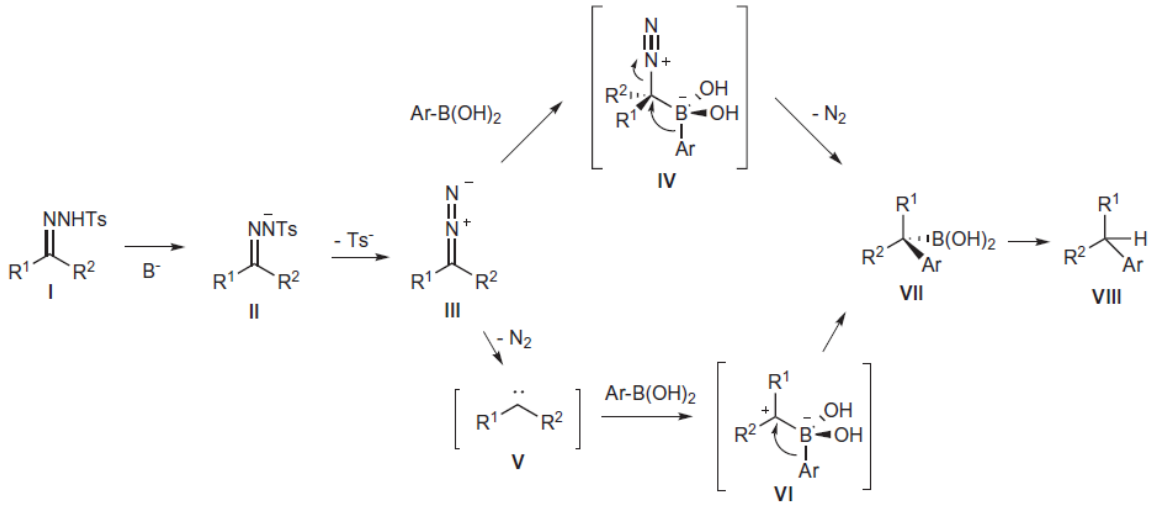


Figure 89 : Mécanismes proposés pour le couplage de Barluenga

Ainsi le trimère ouvert comportant trois cycles aromatiques et un alcool benzylique pourrait être obtenu par l'enchaînement de deux couplages de Barluenga, puis une cyclotrimérisation intramoléculaire permettrait l'obtention du CTV C_1. Afin de mettre au point et valider cette synthèse, le CTV de symétrie C_3 CTV-3 OMe, connu pour être un intermédiaire dans la

synthèse du cryptophane [111],[214] sera tout d'abord préparé. Cette méthode sera ensuite utilisée pour préparer des CTV C_1 possédant un alcool protégé permettant une mono fonctionnalisation, et un CTV possédant trois cycles aromatiques différents sera finalement synthétisé.

2. CTV de symétrie C_3

2.1. Approche rétrosynthétique

Le trimère **37**, précurseur du CTV, peut être obtenu par un couplage de Barluenga entre le dimère **34** possédant un acide boronique et la tosylhydrazone **31**. Ce dimère peut lui-même être obtenu à partir de l'acide 3-méthoxyphénylboronique commercial et de la tosylhydrazone **31** (Figure 90). Les tosylhydrazones sont facilement obtenues à partir des aldéhydes correspondants. Une attention particulière doit être portée à la position des groupements méthoxy pour bien obtenir le CTV de symétrie C_3 et non pas un diastéréoisomère C_1. Enfin le composé **37** est préféré à son isomère de position au niveau des méthoxy car il permet de bénéficier de l'effet électrodonneur et ainsi faciliter la cyclotrimérisation.

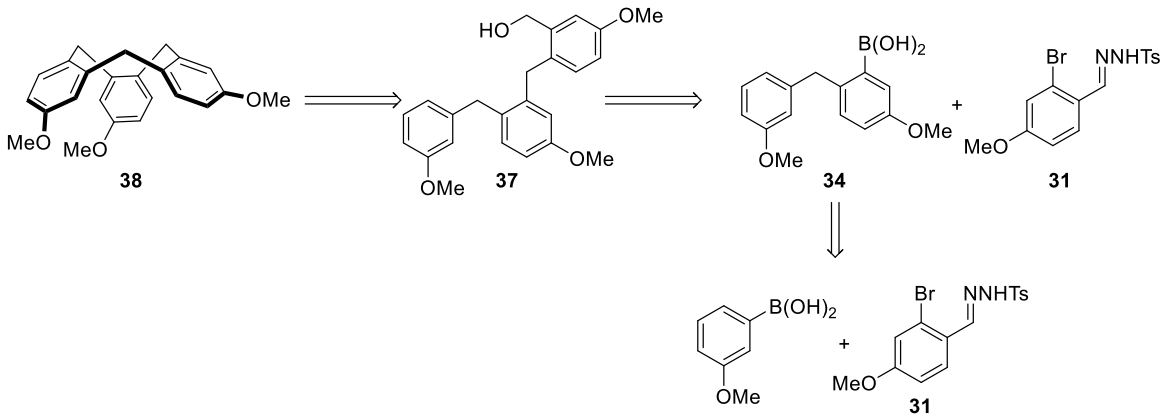


Figure 90 : Rétrosynthèse du CTV-3 OMe

2.2. Synthèse du CTV-3 OMe

Dans la littérature ce produit est synthétisé en une étape à partir de l'alcool 3-méthoxybenzylique, en présence de P_2O_5, avec un rendement de 6%, notamment sur une échelle de plusieurs dizaines de gramme de réactif.[215] Le composé triphénol est également décrit, obtenu en quatre étapes avec un rendement global de 27%.[214]

La première partie de la synthèse vise à obtenir le dimère clé **34**. Le 2-bromo-4-méthoxybenzaldehyde réagit tout d'abord avec la tosylhydrazine pour former la tosylhydrazone **31**. Non soluble dans le méthanol, une simple filtration permet de la

[214] Traoré, T. et al., *Scalable Synthesis of Cryptophane-1.1.1 and Its Functionalization*, Org. Lett., **2010**, Vol. 12 (5), 960–962.
[215] Traoré, T. et al., *Scalable Synthesis of Cyclotriphenolene*, Org. Process Res. Dev., **2011**, Vol. 15 (2), 435–437.

récupérer pure avec un rendement de 97%. Elle est ensuite engagée dans un premier couplage de Barluenga avec l'acide 3-méthoxyphénylboronique commercial, en présence de carbonate de potassium, pour obtenir le dimère bromé **32** avec un rendement de 97%. L'obtention de l'acide boronique **34** a tout d'abord été envisagée par une lithiation en utilisant le triméthylborate comme électrophile, suivi d'une hydrolyse *in situ* permettant l'obtention de l'acide. Cependant, étant difficilement isolable et impossible à purifier, on ne peut pas s'assurer de sa formation de façon quantitative. Le produit brut a tout de même été engagé dans la deuxième étape de couplage de Barluenga mais seulement un rendement très faible de 7% est obtenu. Un autre moyen d'obtention a alors été envisagé, passant par un intermédiaire de type ester boronique, obtenu par un échange halogène-métal sur le dimère bromé **32** en présence de *n*-butyllithium à -78°C, puis ajout d'isopropoxy pinacol borane. L'ester boronique **33** est obtenu avec un rendement de 84%. Le composé **33** a également été engagé directement dans l'étape de couplage de Barluenga mais la formation du produit n'est pas observée. Ainsi le composé **33** est engagé dans une réaction d'hydrolyse oxydante en présence de périodate de sodium pour obtenir l'acide boronique correspondant **34** quantitativement (Figure 91).

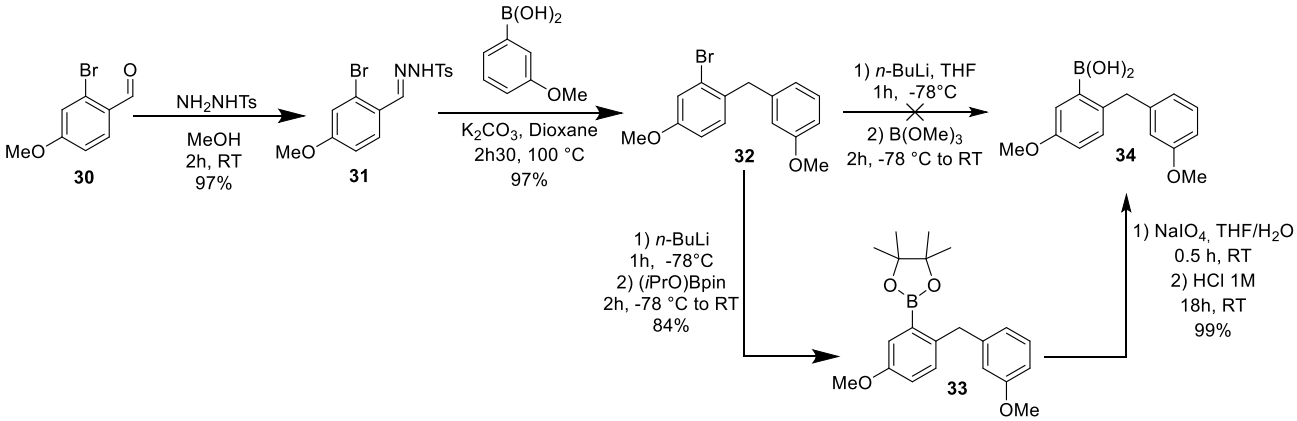


Figure 91 : Voie de synthèse du dimère **34**

Un deuxième couplage de Barluenga est ensuite réalisé entre de dimère **34** et la tosylhydrazone **31** pour obtenir le trimère bromé **35** avec un rendement de 74% (Figure 92). Afin d'obtenir l'alcool benzylique précurseur du CTV, le trimère est traité avec du *t*-butyllithium pour un échange halogène-métal, puis l'ajout de DMF permet d'obtenir l'aldéhyde **36** avec un rendement de 66%. Celui-ci est ensuite réduit de manière quantitative par du borohydrure de sodium à température ambiante pour obtenir l'alcool benzylique **37**. Enfin une réaction de cyclotrimérisation en présence d'un excès d'acide perchlorique, en milieu dilué, permet d'obtenir le CTV-3 OMe **38** en une nuit à température ambiante, avec un rendement de 80%.

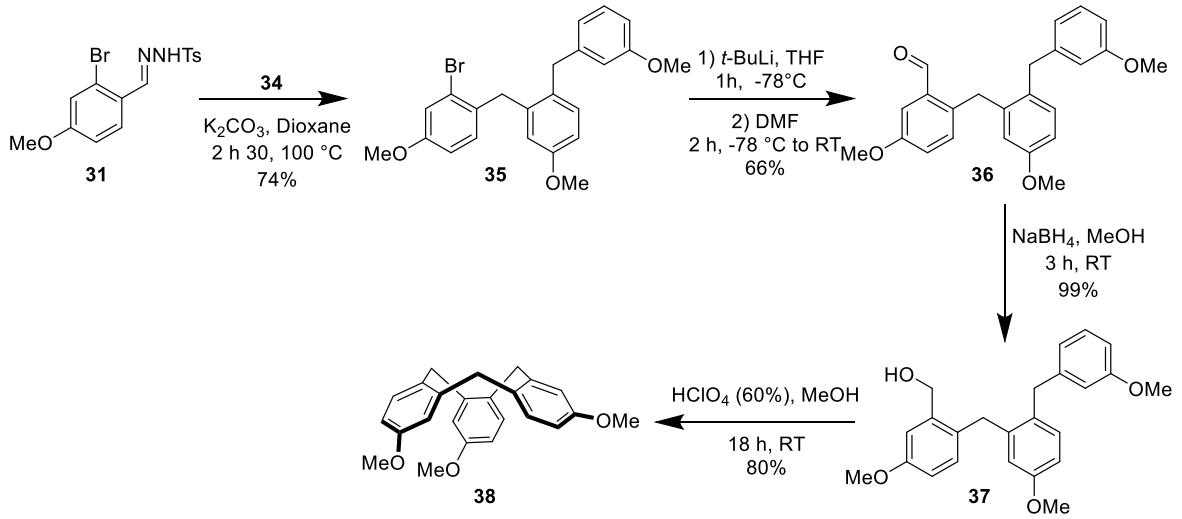


Figure 92 : Voie de synthèse du CTV-3 OMe **38**

Le CTV **38** est ainsi obtenu en 8 étapes avec un rendement global de 28% et, bien que possédant plus d'étapes, cette méthode montre un rendement global similaire à ceux décrits dans la littérature, tout en évitant des purifications difficiles. Cette voie de synthèse ayant été mise au point pour la synthèse d'un CTV de symétrie C_3, elle peut maintenant être appliquée à la synthèse de CTV C_1.

3. CTV de symétrie C_1

3.1. Analyse rétrosynthétique

Dans la partie précédente une tosylhydrazone disubstituée comportant seulement un groupement méthoxy était additionné sur l'acide boronique **34**. L'idée est ici d'introduire l'asymétrie par une tosylhydrazone trisubstituée, préalablement préparée, comportant en plus du méthoxy un phénol protégé et qui sera additionnée sur le dimère **34** (Figure 93).

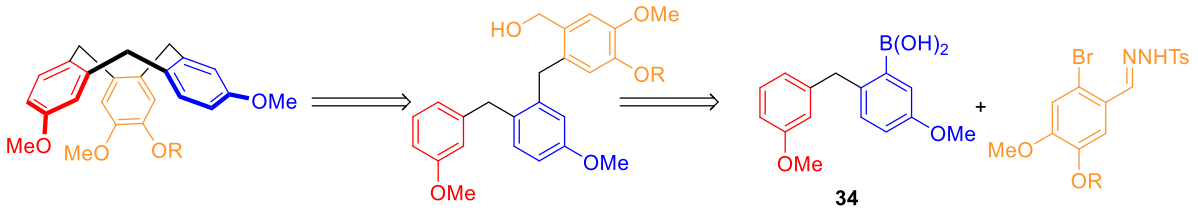


Figure 93 : Rétrosynthèse des CTV C_1

Les tosylhydrazones trisubstituées comporteront, en plus du groupement méthoxy et de l'atome de brome, une fonction alcool protégée en position 5 permettant, une fois le CTV formé, une déprotection sélective pour obtenir un CTV monofonctionnalisable. Les groupements protecteurs seront de différentes natures afin d'évaluer leur robustesse au long de la synthèse, notamment lors de la dernière étape de cyclotrimérisation. Ainsi des groupement carbonés (allyle et benzyle) et silylés (TBDMS et TIPS) seront utilisés.

3.2. Synthèse du CTV *C₁*

Les différentes tosylhydrazones sont obtenues en deux étapes en partant du 2-bromo-5-hydroxy-4-méthoxybenzaldéhyde commercial, dont l'alcool est d'abord protégé avec le groupement voulu. Les aldéhydes sont ensuite mis en réaction avec de l'hydrazine pour obtenir les tosylhydrazones correspondantes. On peut ici noter que les composés silylés sont partiellement solubles dans le méthanol, un mélange 50/50 avec du cyclohexane est alors utilisé pour la filtration et récupérer les produits purs (Figure 94).

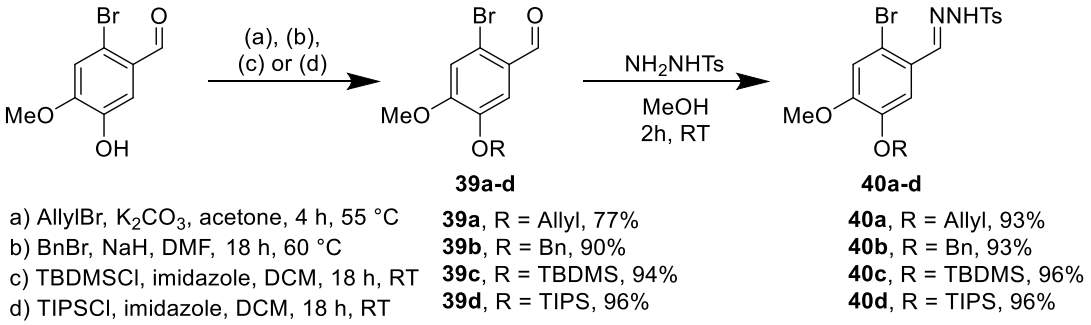


Figure 94 : Synthèse des tosylhydrazones trisubstituées

Les tosylhydrazones trisubstituées sont obtenues avec des rendements globaux allant de 72% à 92%. Elles sont ensuite engagées dans un couplage de Barluenga avec le dimère **34** pour obtenir les trimères bromés **41a-d** avec des rendements allant de 68 à 84% (Figure 95). Ils sont ensuite engagés dans la réaction d'échange halogène-métal avec du *t*-BuLi, puis l'ajout de DMF permet l'obtention des aldéhydes **42a-d** avec des rendements de 48 à 73%. Les rendements sont ici moins bons avec les cycles aromatiques trisusbtitués qu'avec les disubstitués. En effet les mélanges bruts récupérés avant purification sont moins propres et plusieurs sous-produits sont visibles en RMN. Pour les composés dont l'alcool est protégé par un allyle ou benzyle, cela peut s'expliquer par le caractère acide du proton en alpha de l'oxygène qui peut entraîner des réactions parasites. De manière plus générale, des produits comportant quatre cycles aromatiques ont notamment pu être isolés et analysés en RMN, bien que leur structure n'ait pas pu être déterminée. L'introduction d'un alcool protégé en *para* du carbone portant le brome peut également être responsable de la désactivation de cette position, entraînant une diminution de sa réactivité, favorisant ainsi l'apparition de sous-produit et une baisse de rendement.

Enfin les alcools benzyliques **43a-d** sont obtenus par réduction de l'aldéhyde avec du borohydrure de sodium.

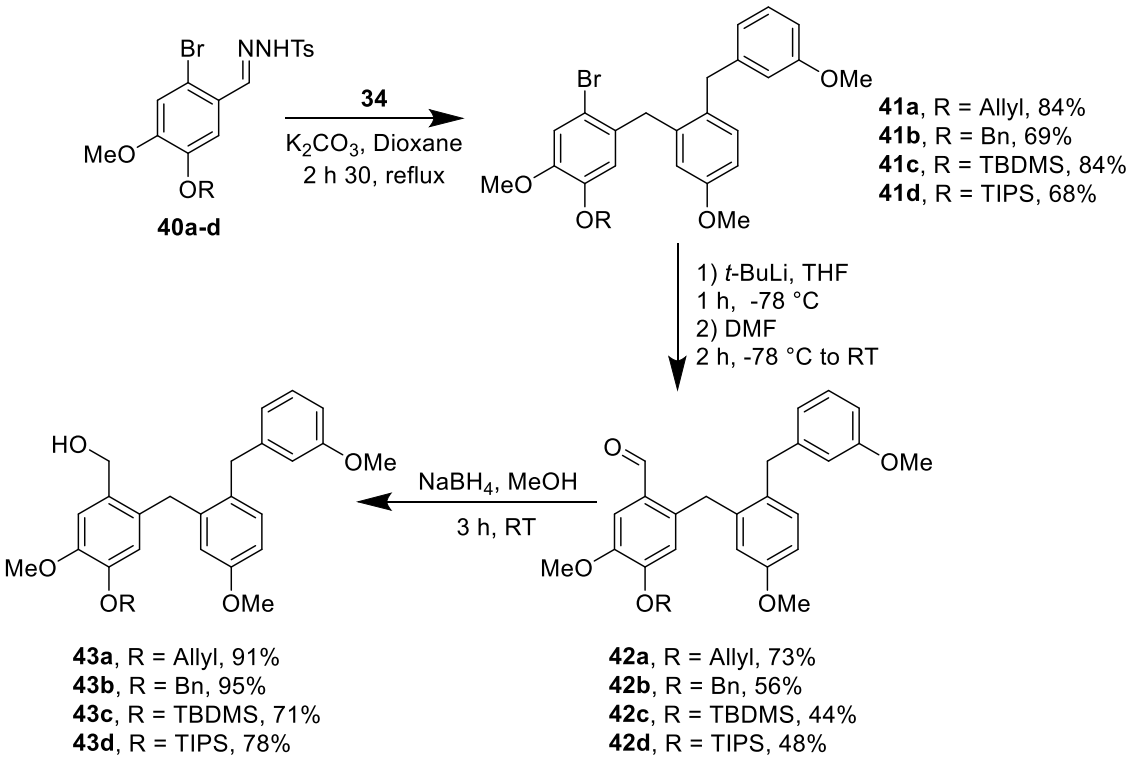
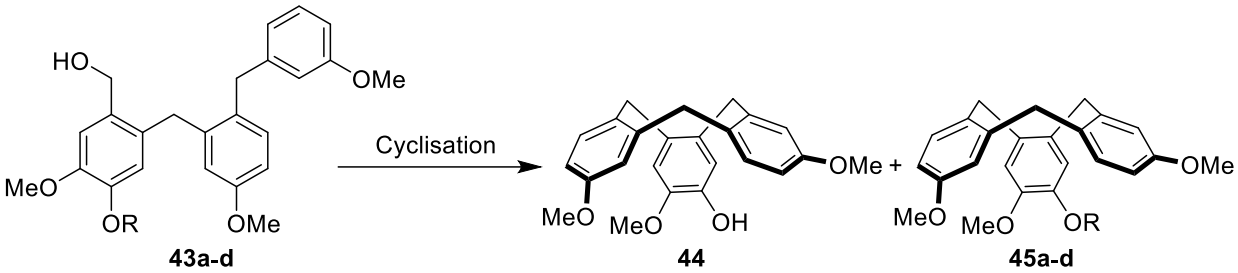


Figure 95 : Synthèse des précurseurs des CTV

L'étape de cyclisation a alors été testée, toujours réalisée à une dilution très élevée (5.10^{-3} M) afin de limiter au maximum l'apparition de produits secondaires de type polymères (Tableau 4). Plusieurs conditions ont été mises au point afin d'évaluer la robustesse des groupements protecteurs devant les conditions acides utilisées et de déterminer les meilleures conditions suivant les groupements utilisés. Dans un premier temps les mêmes conditions que celles utilisées pour le CTV-C_3 ont été appliquées sur le composé **43a**, à savoir un excès d'acide perchlorique dans du méthanol à température ambiante durant 18h, conduisant seulement à un mélange complexe de polymères. Cela s'explique par le fait que le carbocation formé réagisse préférentiellement de façon intermoléculaire plutôt qu'intramoléculaire, conduisant à la formation des polymères, et réagisse également avec le méthanol utilisé comme solvant pour former un groupement méthoxy en position benzylique. Les composés comportant trois, six et neuf cycles aromatiques et avec respectivement quatre, huit et douze groupements méthoxy ont notamment pu être identifiés, bien que non isolés individuellement.

Le remplacement du méthanol par de l'acétonitrile permet d'isoler le CTV **44** dont l'alcool a été déprotégé, avec un rendement de 20%. La déprotection étant certainement due à l'excès d'acide, seulement 1,2 équivalents seront par la suite utilisés. De plus, le suivi CCM de la réaction montre une disparition du produit de départ au bout d'une heure, conduisant à la formation du CTV-C_1 **45a** avec un rendement de 86%. Les mêmes conditions sont également utilisées pour le composé **43b**, permettant l'obtention du CTV **45b** avec un rendement de 91%.

En revanche, l'utilisation de ces conditions avec les groupements protecteurs sylilés conduit exclusivement à la formation du CTV **44** déprotégé. L'eau produite lors de la formation du carbocation, combinée au milieu acide peut expliquer cette déprotection. Le pentoxyde de phosphore est alors choisi comme acide car connu pour être un déshydratant très puissant, il captera l'eau formée durant la réaction. Ainsi l'utilisation de 1,3 équivalents de P_2O_5 permet la formation du CTV **45c** avec un rendement de 53%, en mélange avec le CTV **44** mais facilement séparable. Enfin ces conditions utilisées avec le composé **43d** conduisent au CTV **45d** avec un rendement de 84%.



Entrée	Précurseur	Conditions	Résultats
1	**43a**, R = Allyl	$HClO_4$ (excès), MeOH 18h, RT	Polymérisation
2	**43a**, R = Allyl	$HClO_4$ (excès), ACN 18h, RT	**44** (20%)
3	**43a**, R = Allyl	$HClO_4$ (1.2 eq.), ACN 1h, RT	**45a** (86%)
4	**43b**, R = Bn	$HClO_4$ (1.2 eq.), ACN 1h, RT	**45b** (91%)
5	**43c**, R = TBDMS	$HClO_4$ (1.2 eq.), ACN 1h, RT	**44** (98%)
6	**43c**, R = TBDMS	P_2O_5 (1.3 eq.), ACN 1h, RT	**44** (34%), **45c** (58%)
7	**43d**, R = TIPS	P_2O_5 (1.3 eq.), ACN 1h, RT	**45d** (84%)

Tableau 4 : Mise au point de l'étape de cyclisation

On obtient au final quatre structures de CTV de symétrie C_1 comportant un alcool protégé par différents groupements, en 6 étapes depuis le composé **34**, avec des rendements globaux de 27%, 22%, 11% et 20% respectivement pour les dérivés allyle, benzyle, TBDMS et TIPS. De plus deux méthodes de cyclisation ont été mises au point, permettant une flexibilité sur les groupements utilisables pour fonctionnaliser les CTV.

Une fois cette méthode mise au point, nous avons souhaité l'optimiser en réalisant certaines étapes en « one-pot ».

4. Synthèse optimisée

Afin de démontrer que cette technique est flexible et permet l'obtention d'une large variété de composés de symétrie C_1, une dernière structure de CTV a été synthétisée, comportant trois cycles aromatiques différents, avec notamment des groupements électrodonneur et accepteur.

Dans un premier temps le composé **47** a été obtenu à partir du 2-bromo-4-méthylbenzaldéhyde par une réaction « one-pot » de couplage de Barluenga, après formation d'une tosylhydrazone, avec un rendement de 82% (Figure 96). Un échange halogène-métal de *n*-butyllithium à -78°C suivi de l'ajout d'isopropoxy pinacol borane, permet l'obtention du dimère **48** avec un rendement de 70%. En parallèle la tosylhydrazone **50** est obtenu avec un rendement de 98% par traitement du 2-bromo-4-chlorobenzaldéhyde avec de la tosylhydrazine.

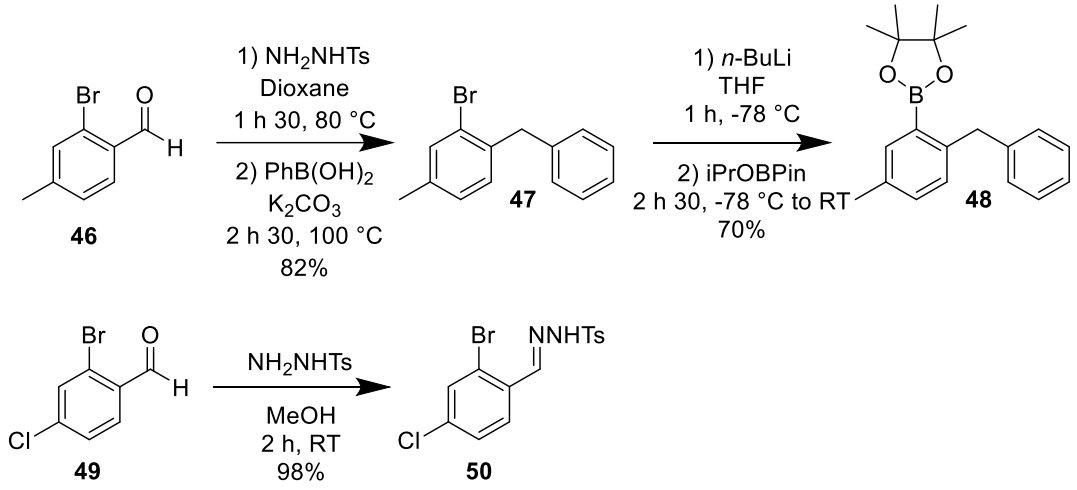


Figure 96 : Voie de synthèse des composés **48** et **50**

Le composé **48** est ensuite engagé dans une réaction d'hydrolyse oxydante en présence de périodate de sodium puis dans un deuxième couplage de Barluenga avec la tosylhydrazone **50** pour obtenir le trimère **51** (Figure 97). Comparé aux précédents couplages réalisés pour l'obtention de ce type de trimère, la température a dû être réduite à 60°C. En effet on observe une meilleure conversion de la réaction à reflux mais également la formation d'un produit secondaire impossible à séparer du produit désiré dans nos tentatives de purification. Limiter la température de réaction permet donc de supprimer l'apparition de ce produit secondaire, bien que diminuant également le rendement. Un échange halogène-métal suivi de l'ajout de DMF permet ensuite l'obtention du composé comportant un aldéhyde, directement réduit en présence de borohydrure de sodium pour obtenir l'alcool benzylique **52**, avec un rendement global de 71% sur deux étapes. Enfin une dernière étape de cyclisation, réalisée une nouvelle fois dans des conditions très diluées (5.10^{-3} M), en présence de P_2O_5 à 60°C dans l'acétonitrile permet l'obtention du CTV **53** composé de trois cycles aromatiques différents.

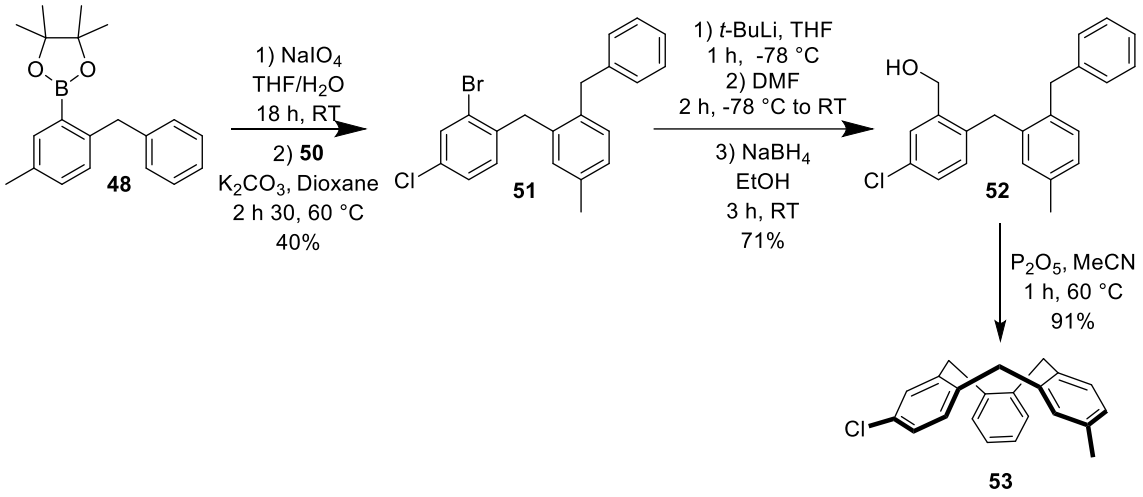


Figure 97 : Voie de synthèse du CTV **53**

On peut noter ici que l'absence de groupement méthoxy sur le cycle aromatique attaquant le carbocation rend la réaction de cyclisation moins efficace, d'où la nécessité de chauffer la réaction. De plus l'utilisation d'acide perchlorique s'est montrée dans ce cas inefficace, en quantité stœchiométrique comme en large excès, et à température ambiante comme en chauffant.

Enfin cette voie de synthèse optimisée permet l'obtention en 5 étapes, avec un rendement global de 15%, d'un CTV composé de trois cycles aromatiques différents, structure jamais décrite dans la littérature, démontrant que cette stratégie pourrait être appliquée pour l'obtention de CTV-C_1 de structures variées et originales.

5. Conclusion

En conclusion, nous avons mis au point une voie de synthèse par succession de couplage de Barluenga, permettant l'ajout un à un de composés préalablement modifiés, offrant la possibilité d'une synthèse contrôlée de CTV. Cette méthode a dans un premier temps été mise au point et validée par la préparation d'un CTV-C_3, puis a été appliquée à la synthèse de CTV-*C1*. Enfin la méthode a été optimisée en réalisant plusieurs réactions en one-pot et a été utilisée pour la synthèse d'un nouveau CTV à la structure inédite avec trois cycles aromatiques différents. Enfin le rendement global, en 5 étapes, de 15% grâce notamment à des étapes de purification plus aisées, valide le fait que cette méthode est une alternative efficace aux méthodes décrites pour la synthèse de CTV originaux de symétrie C_1. L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'une publication.[216]

[216] Vigier, C. et al., *Controlled Access to C 1 – Symmetrical Cyclotriveratrylenes (CTVs) by Using a Sequential Barluenga Boronic Coupling (BBC) Approach*, Adv. Synth. Catal., **2021**, Vol. 363 (15), 3756–3761.

Par la suite on s'est intéressé à l'application de cette méthode de synthèse pour l'obtention de structures de CTV plus complexes comportant par exemple un ou plusieurs hétéroatomes comme des azotes en remplacement des ponts méthylènes.

Chapitre 4 : synthèse de nouveaux CTV et cryptophanes azotés

1. Présentation du projet

Les perspectives qu'ouvre cette nouvelle approche synthétique, mise au point dans le chapitre précédent, nous permet d'envisager d'accéder à de nouvelles structures de cryptophanes et d'explorer par exemple leur fonctionnalisation par les ponts méthylènes. Les structures des cryptophanes décrits jusqu'à présent sont entièrement carbonées et ils sont fonctionnalisés soit par un des cycles aromatiques, soit par un des bras espaceur.[120,141] L'ajout d'un ou plusieurs azotes serait donc un apport inédit pour la structure d'un cryptophane en plus d'offrir la possibilité d'un point d'encrage nouveau par les ponts azotés. Ces azotes peuvent être introduits dans la synthèse par le remplacement des couplages de Barluenga par des couplages de Buchwald-Hartwig. Le projet vise donc à s'inspirer de la méthode précédemment décrite en réalisant une synthèse itérative, introduisant un à un les cycles aromatiques composant les CTV, en utilisant un ou plusieurs couplages de Buchwald afin d'ajouter un ou plusieurs azotes à la structure.

Dans un premier temps la synthèse des CTV comportant un, deux et trois azotes sera investiguée, leurs structures ayant été imaginées pour comporter des groupements méthoxy qui pourront ensuite être utilisés dans un second temps pour synthétiser les cryptophanes correspondants. Le but est ici de produire de nouvelles structures de cryptophane présentant la possibilité d'un point d'encrage aisé grâce aux azotes, offrant ainsi une alternative viable aux étapes difficiles de désymétrisation des cryptophanes déjà existantes.

Enfin ces nouvelles structures seront analysées par cristallographie et leur propriété d'encapsulation du xénon sera évaluée par RMN du xénon.

Dans la littérature, très peu de publications font actuellement référence à des structures de CTV azotés. On peut noter la description d'un CTV comportant un azote par Hara *et al.*,[217] ainsi qu'un CTV comportant 3 azotes par Panagopoulos *et al.*[218] Pour cette dernière, il s'agit également d'une synthèse séquentielle composée tour à tour : d'un couplage de Buchwald-Hartwig, d'une protection de l'azote par un méthyle et d'une réduction d'un groupement nitro (Figure 98).

[217] Hara, H. et al., *Synthetic Studies on Azacyclotribenzylenes*, Heterocycles, **2005**, Vol. 65 (1), 1.
[218] Panagopoulos, A. M. et al., *Synthesis of an Ortho -Triazacyclophane: N , N ′ , N ′ ′ -Trimethyltribenzo-1,4,7-Triazacyclononatriene*, J. Org. Chem., **2010**, Vol. 75 (22), 7887–7892.

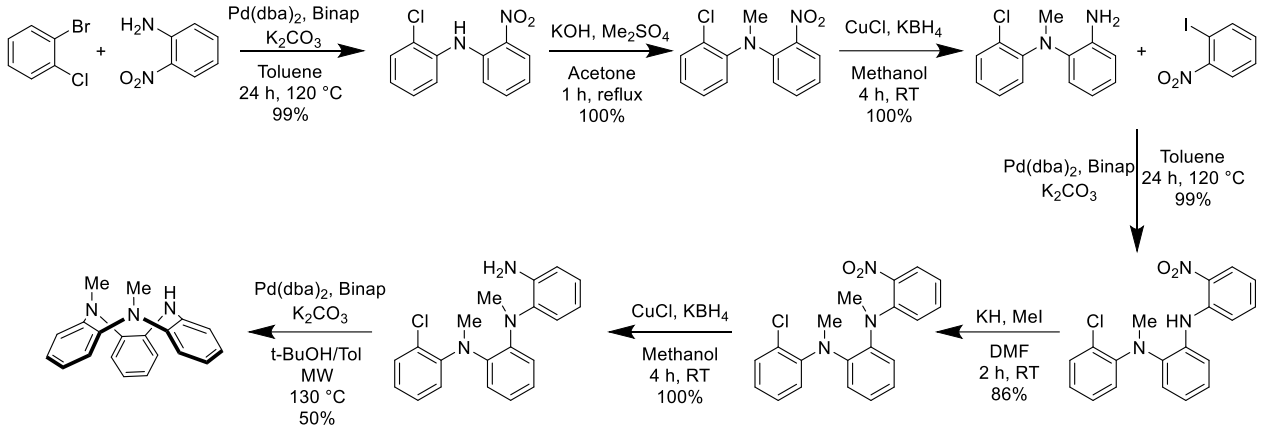


Figure 98 : Synthèse d'un CTV-3N[218]

Cette synthèse a tout de même comme désavantage que les azotes protégés par un méthyle n'ont pas pu être déprotégés une fois le CTV formé. Elle ne permet pas non plus d'obtenir un cryptophane comportant des azotes du fait de l'absence de groupements méthoxy. C'est pourquoi, dans le cadre de ce projet, on se propose de synthétiser des aza-CTV comportant des groupements méthoxy, dans un premier temps sans protection sur les azotes, puis si besoin avec une protection benzyle, plus simple à déprotéger.

2. Analyse rétrosynthétique

L'objectif final étant l'obtention de cryptophanes, le design des aza-CTV doit être pensé en conséquence, notamment sur la position des groupements méthoxy placés de telle façon à pouvoir obtenir le cryptophane correspondant (Figure 99). Pour ne pas compliquer les structures et en fonction de la disponibilité des monomères de base, seuls les groupements méthoxy seront introduits dans un premier temps sur les aza-CTV. Enfin, au vu de la littérature et des synthèses précédemment réalisées, les cryptophanes visés dans un premier temps seront des analogues du cryptophane C, soit [222]-3 OMe, connu pour avoir également une bonne propriété d'encapsulation du xénon.[155,166]

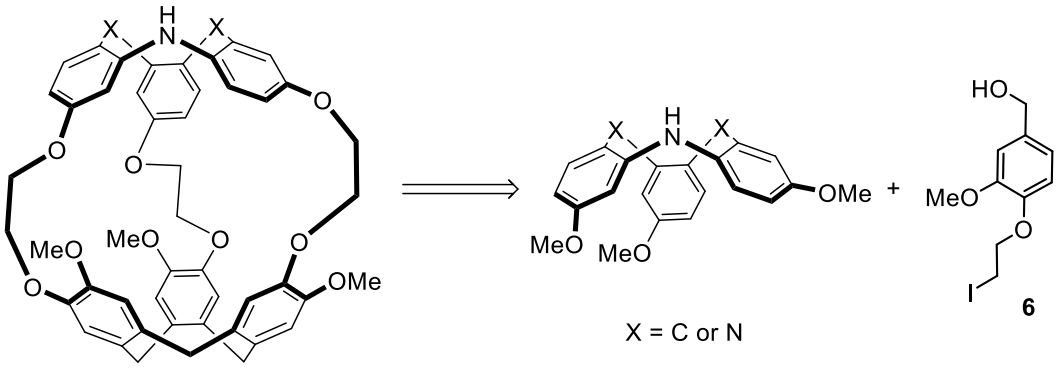


Figure 99 : Rétrosynthèse des aza-cryptophanes

Ensuite pour la synthèse des aza-CTV il convient de différencier deux cas : les CTV-1 et 2N d'un côté et le CTV-3N de l'autre. En effet les premiers peuvent être cyclisés en utilisant la

même méthode que précédemment, à savoir l'utilisation d'un alcool benzylique pour réaliser une substitution électrophile aromatique. En revanche pour le CTV-3N, la fermeture doit être effectuée par un couplage de Buchwald (CB).

Dans le cas du CTV-1N, si l'azote est introduit via le troisième cycle aromatique, il nous est possible d'utiliser le composé **32** comme dimère (Figure 100). De plus l'alcool benzylique devra être préalablement protégé afin d'éviter les réactions parasites lors de l'étape de couplage.

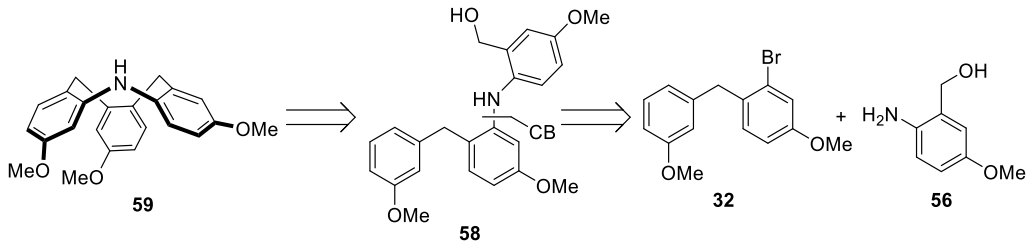


Figure 100 : Rétrosynthèse du CTV-1N

Pour le CTV-2N, le dimère doit être obtenu par un premier couplage de Buchwald entre les monomères commerciaux **60** et **61** (Figure 101). Dans ce cas également l'alcool benzylique devra être protégé pour permettre le deuxième couplage.

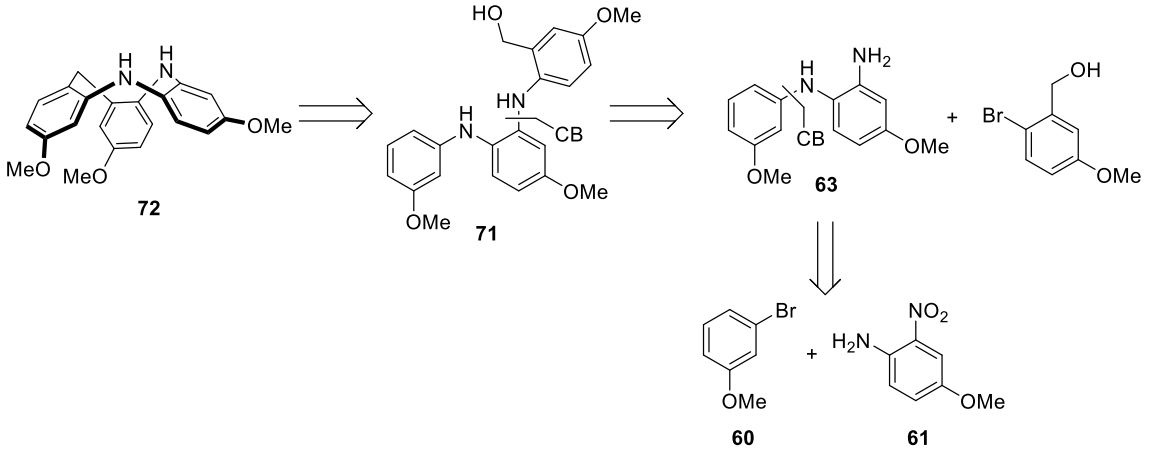


Figure 101 : Rétrosynthèse du CTV-2N

Enfin, dans le cas du CTV-3N, l'étape de cyclisation finale doit également être un couplage de Buchwald, ce qui nous permet d'envisager une voie de synthèse proche de celle décrite par Panagopoulos *et al.*, enchaînant couplage et réduction (Figure 102).[218] L'utilisation du 4-bromo-3-chloroanisole nous permet de réaliser le premier couplage tout en gardant un halogène pour le dernier couplage, bien que les chlores soient moins réactifs pour un couplage de Buchwald.

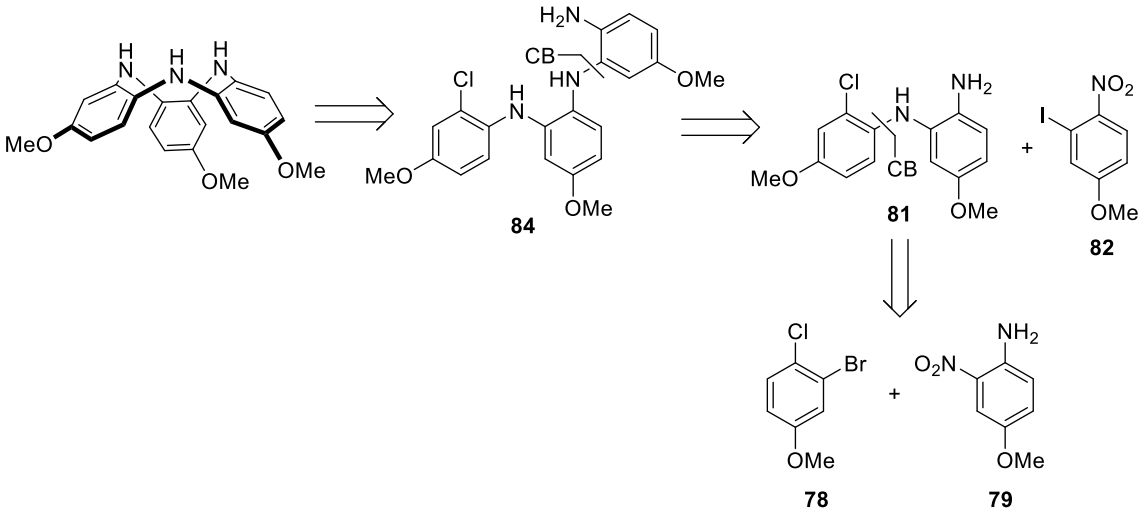


Figure 102 : Rétrosynthèse du CTV-3N

En cas de difficulté dans les différentes synthèses, les azotes pourront également être protégés avec des groupements benzyles.

3. Synthèse de CTV azotés

3.1. CTV-1N

La synthèse du composé **32** étant déjà mise au point, le premier objectif de cette synthèse était l'obtention du troisième cycle aromatique apportant à la fois l'aniline et l'alcool benzylique protégé (Figure 103). Pour cela l'acide 2-amino-5-méthoxybenzoïque commercial **54** est tout d'abord réduit avec du tétrahydruroaluminate de lithium pour obtenir l'alcool benzylique **55** correspondant avec un rendement de 87%. Cet alcool est ensuite protégé avec un groupement protecteur de type *tert*-butyldiméthylsilyle en présence d'imidazole pour obtenir l'alcool protégé **56** avec un rendement de 83%.

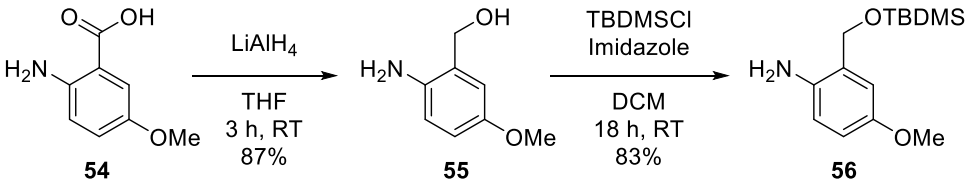


Figure 103 : Synthèse du composé **56**

Ce composé peut ensuite être engagé dans un couplage de Buchwald avec le dimère **32** pour obtenir le trimère **57** avec un rendement de 97% en 3h (Figure 104). L'alcool benzylique est ensuite déprotégé en présence de TBAF pour donner le précurseur du CTV-1N **58** avec un rendement de 96%. Enfin ce dernier est engagé dans une étape de cyclisation, avec une dilution très élevée (5.10^{-3} M), dans de l'acétonitrile en présence d'un large excès d'acide perchlorique. Dans un premier temps la réaction est laissée à température ambiante toute une nuit pour obtenir **59** avec un rendement de 58%, puis est optimisée en la chauffant une heure à 60°C pour obtenir le CTV-1N avec un rendement de 89%.

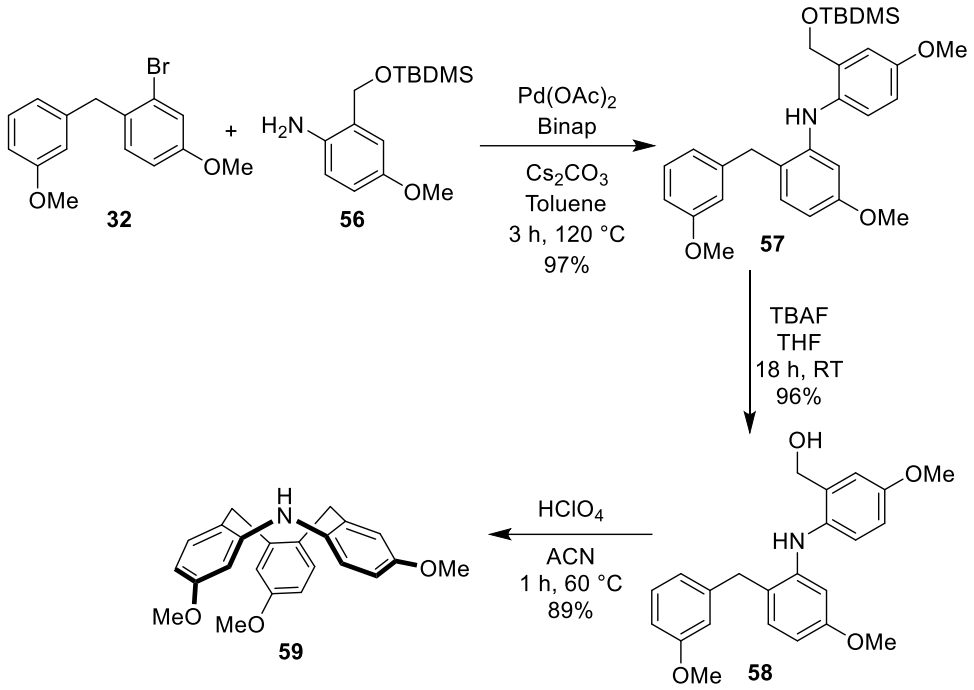


Figure 104 : Synthèse du CTV- 1N

Il est intéressant de noter que, comparé à son analogue entièrement carboné, le spectre RMN du composé **59** comporte deux singulets à 3.83 et 3.69 ppm, correspondants aux signaux des ponts méthylènes, au lieu de deux doublets à 4.79 et 3.66 ppm dans le cas de son analogue (Figure 105). Cela laisse donc supposer que le CTV-1N est en conformation saddle plutôt que crown, comme cela a déjà pu être observé dans la littérature.[127]

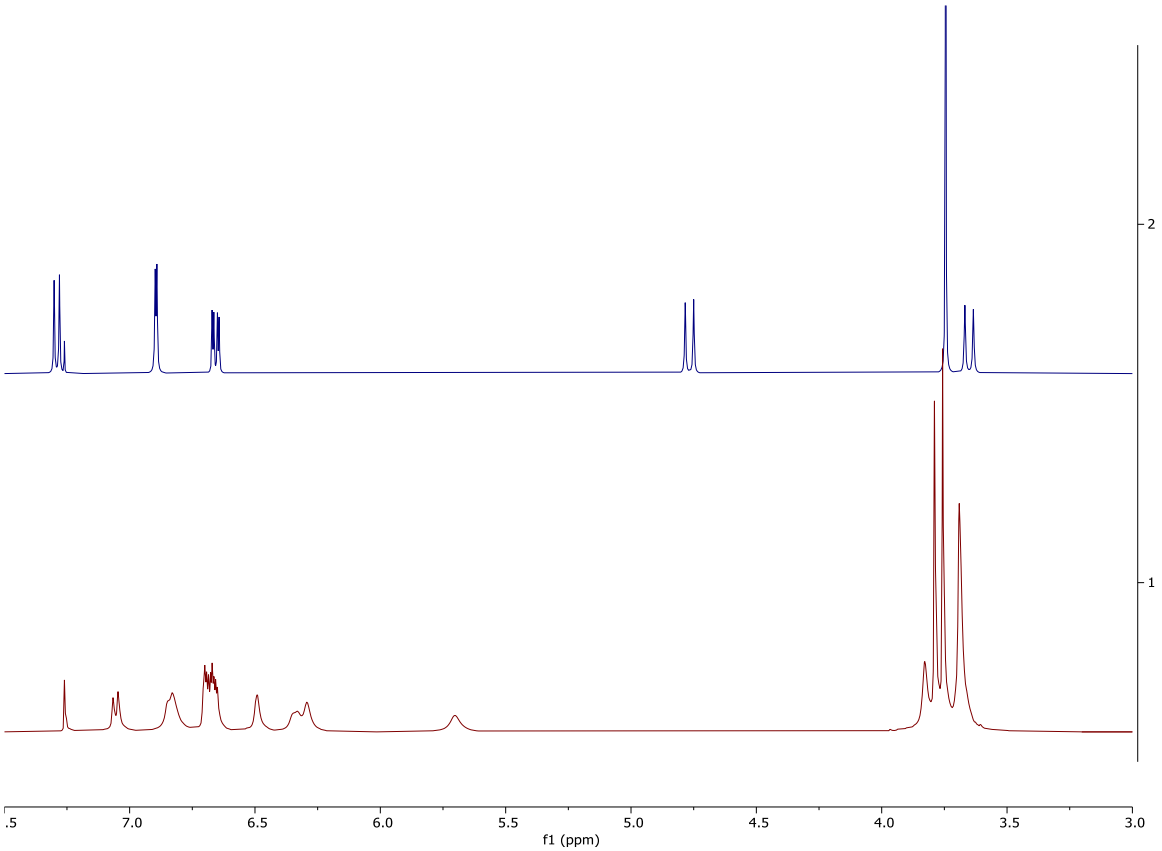


Figure 105 : Comparaison des spectres RMN du CTV-3 OMe (bleu) et du CTV-1N (rouge)

Après cristallisation du composé dans le dichlorométhane à froid, les analyses cristallographiques confirment bien la présence de la forme saddle (Figure 106). On remarque également que seule deux des trois formes sont visibles. En effet, la forme dont le cycle aromatique renversé est celui relié au deux pont méthylènes carbonés n'est pas observée.

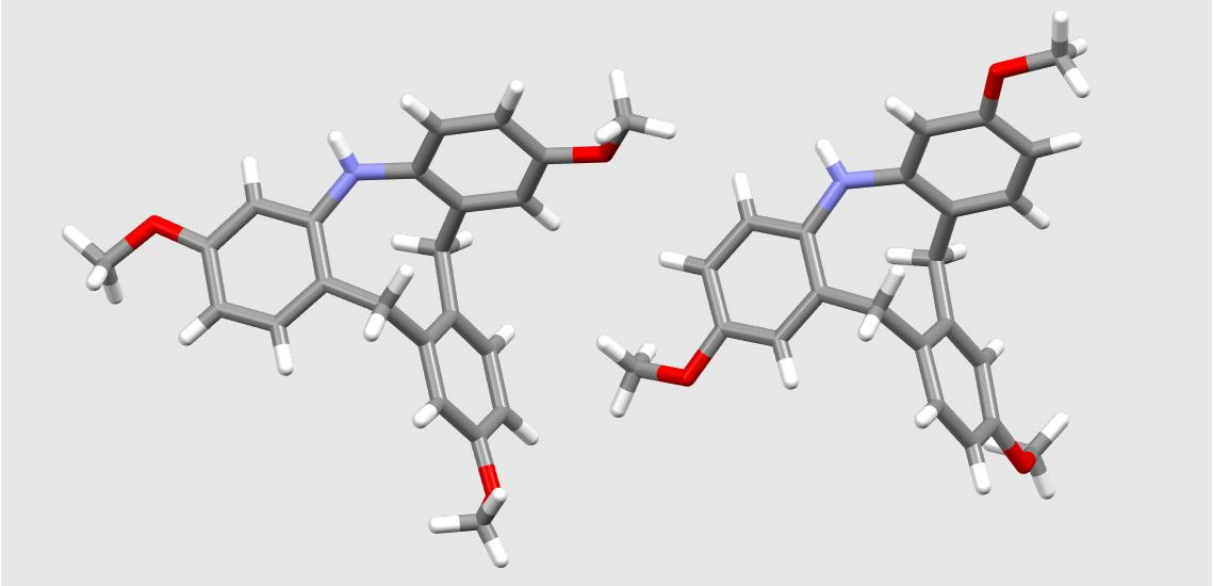


Figure 106 : Conformation saddle des deux énantiomères du CTV-1N

Le CTV-1N, présentant une structure inédite de par son azote, a donc été synthétisé en 5 étapes, avec un rendement global de 78%. On s'est ensuite intéressé à la possibilité de « complexifier » la structure des CTV en ajoutant un autre azote sur la structure du CTV.

3.2. CTV-2N

3.2.1. Azote non protégé

Dans un premier temps la synthèse est envisagée sans ajout de groupements protecteurs sur les azotes pour ne pas trop rallonger la synthèse et compliquer les spectres RMN. Une première voie d'accès au CTV-2N a été envisagée, l'alcool benzylique étant amené ici aussi par le biais du troisième monomère, dans ce cas le 2-bromo-5-méthoxybenzaldéhyde. La première partie de cette synthèse consiste en l'obtention des dimère **63** et du 2-bromo-5-méthoxybenzaldéhyde protégé **65** (Figure 107).

Le composé **63** est obtenu en deux étapes en utilisant successivement un couplage de Buchwald et une réduction au chlorure d'étain, avec un rendement de 90% sur ces deux étapes. Le second est lui obtenu en une étape après protection de l'aldéhyde par la formation d'un acétal avec un rendement de 88%.

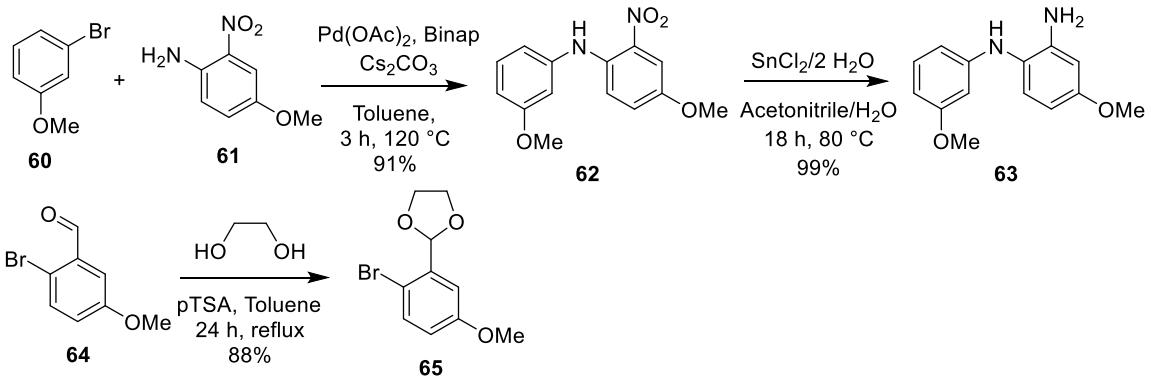


Figure 107 : synthèse des composés **63** et **65**

Ces deux composés sont ensuite engagés dans un deuxième couplage de Buchwald pour obtenir le trimère **66** avec un rendement de 73% (Figure 108). Une étape de déprotection de l'acétal est réalisée avec de l'acide trifluoroacétique dans le méthanol mais le produit **67** attendu n'est pas obtenu. En effet en RMN ^{1}H le signal du proton de l'aldéhyde n'est pas présent et après analyse par LC-MS le produit n'a pas la masse attendue mais une masse inférieure de 17 unités de masse. L'hypothèse la plus probable est la formation d'une imine avec un des azotes de la molécule et donc une perte d'eau, ce qui expliquerait la masse et le spectre RMN. Cependant, même un traitement en milieu acide ne nous a pas permis de récupérer le composé souhaité.

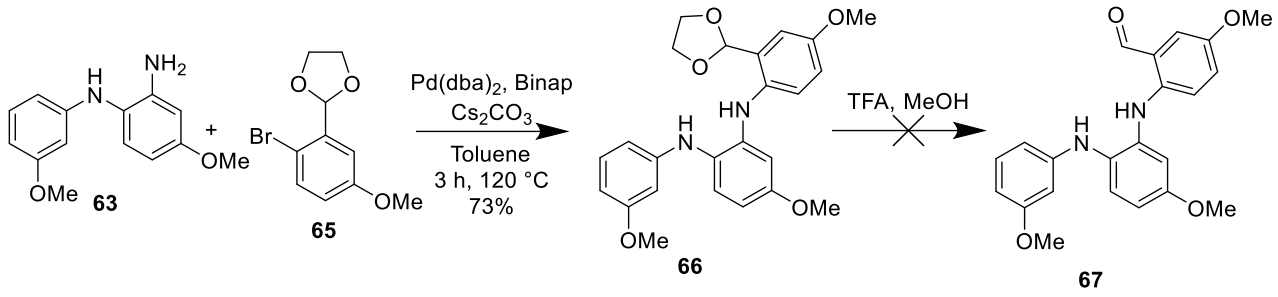


Figure 108 : Première voie de synthèse du trimère envisagée

Une deuxième voie de synthèse a donc été envisagée dans laquelle le 2-bromo-5-méthoxybenzaldéhyde **64** est tout d'abord réduit en alcool puis protégé par un groupement *tert*-butyldiméthylsilyle (TBDMS) pour obtenir le composé **68** de façon quantitative (Figure 109). Il est ensuite engagé dans le deuxième couplage de Buchwald pour obtenir le trimère **69** avec un rendement de 90%, dont l'alcool est déprotégé en présence de TBAF pour obtenir le précurseur du CTV **70**. La cyclisation est réalisée dans les mêmes conditions que le CTV-1N, à savoir en milieu dilué (5.10^{-3} M) dans de l'acétonitrile, chauffé à 60°C pendant une heure pour obtenir le CTV **71** correspondant avec un rendement de 61%.

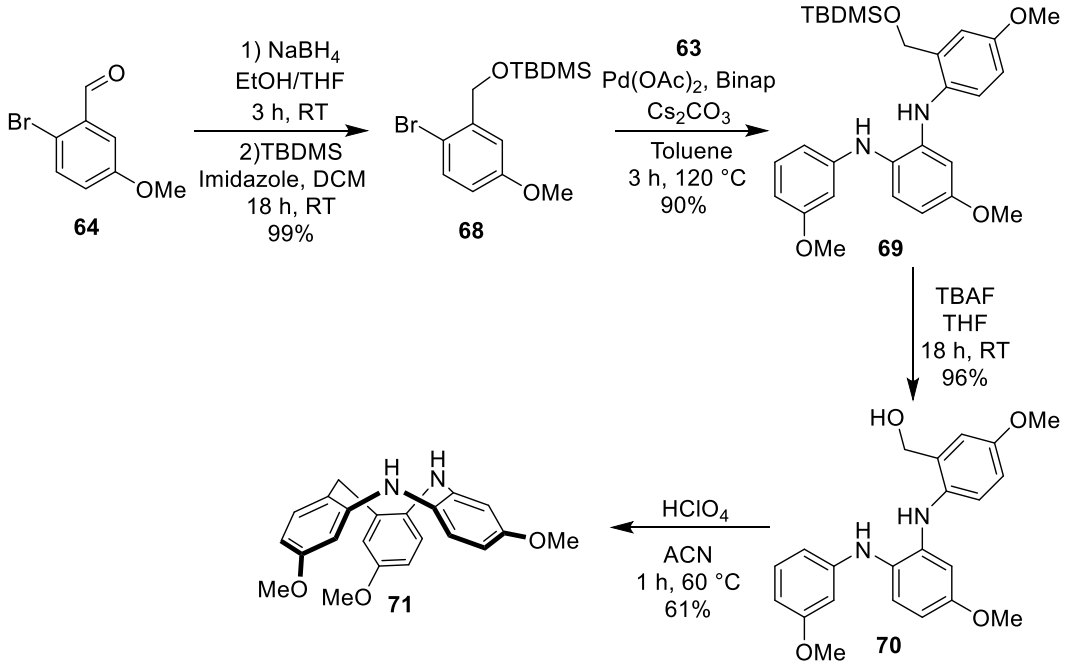


Figure 109 : Synthèse du CTV-2N **71**

On remarque ici que le rendement de fermeture du composé est moins bon avec deux azotes qu'avec un seul, cela étant due à l'apparition d'un produit secondaire, non identifié, difficilement séparable du produit souhaité. Des cristaux de ce composé n'ont, pour le moment, pas pu être obtenus afin de déterminer sa conformation par cristallographie.

Le CTV-2N a été synthétisé en 6 étapes, avec un rendement global de 47%. L'ajout d'un groupement protecteur sur un azote va maintenant être étudié pour vérifier s'il permet d'améliorer la synthèse, et notamment la dernière étape de cyclisation.

3.2.2. Azote protégé

Le choix a été fait de ne protéger tout d'abord qu'un seul des azotes afin de pouvoir évaluer son influence sur la voie de synthèse mais également pour garder un azote libre, permettant de garder un point d'encrage disponible pour le CTV, voir le cryptophane. A l'inverse, protéger les deux azotes nous ramènerait aux mêmes problématiques que les CTV et cryptophanes entièrement carbonés puisque nous aurions à déprotéger ou fonctionnaliser sélectivement un des deux azotes. Un autre moyen de s'affranchir de cette difficulté serait d'utiliser deux groupements protecteurs différents pour chacun des azotes, hypothèse qui n'a pour l'instant pas pu être mise en œuvre.

Le groupement protecteur choisi est un benzyle car suffisamment robuste pour l'ensemble de la synthèse et facilement clivable par hydrogénation. La protection par un simple méthyle a été écartée du fait des difficultés décrites par Panagopoulos *et al.* pour déprotéger les composés par la suite.[218]

La protection est donc introduite en début de synthèse, sur le dimère **62** avant la réduction du groupement nitro (Figure 110). Le dimère protégé **72** est donc obtenu de manière quantitative puis l'étape de réduction permet d'obtenir le composé **73**. Le rendement est ici moins bon du fait d'une déprotection partielle de l'azote. Le couplage de Buchwald entre les composés **68** et **73** permet d'obtenir le trimère **74**, puis le précurseur du CTV **75** est synthétisé par déprotection de l'alcool par du TBAF avec un rendement de 94%. La cyclisation est réalisée dans les mêmes conditions que le CTV-2N non protégé et permet l'obtention du CTV **76** avec un rendement de 71%.

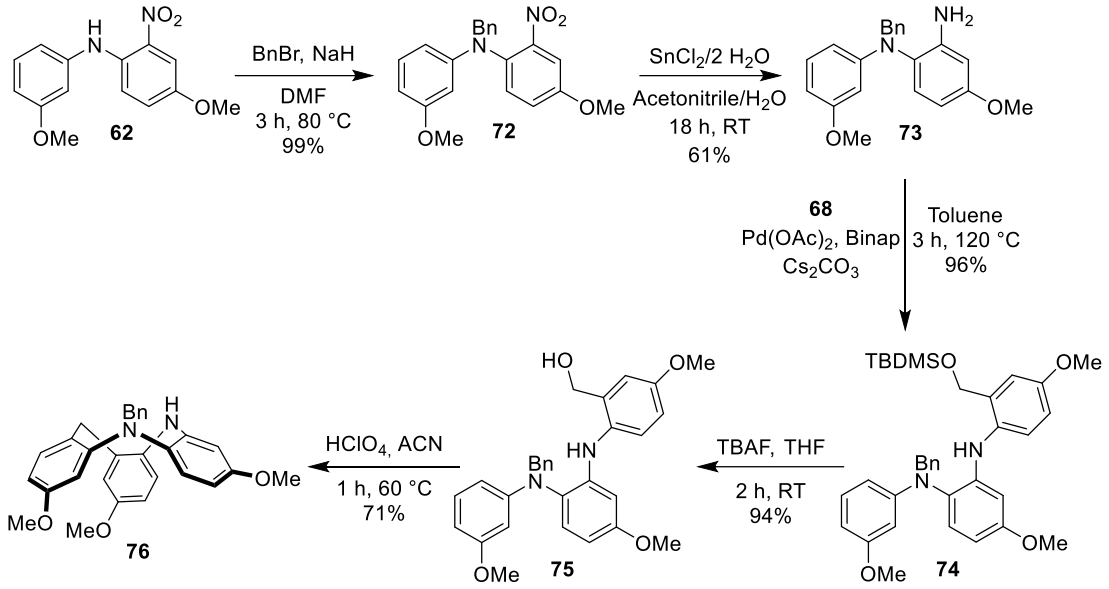


Figure 110 : Synthèse du CTV-2N **76**

La version avec un azote protégé du CTV-2N est donc obtenu avec un rendement global de 35% sur 7 étapes, la principale réaction diminuant le rendement étant l'étape de réduction. On note également une légère amélioration du rendement de l'étape de cyclisation et la disparition du produit secondaire observé sans groupement protecteur. De manière globale, l'ajout d'un azote supplémentaire sur les CTV tend à diminuer le rendement global de la voie de synthèse. Finalement nous nous sommes penchés sur l'utilisation de la méthode itérative pour la synthèse d'un CTV entièrement azoté sur ses ponts méthylènes.

3.3. CTV-3N

La différence majeure entre l'obtention d'un CTV-3N par rapport aux précédents CTV synthétisés réside dans le fait que l'étape de fermeture s'effectue par un couplage de Buchwald et non pas par substitution électrophile aromatique. Prenant en compte ce changement, une première voie de synthèse est donc imaginée, suivant en partie la voie de synthèse de Panagopoulos *et al.* (Figure 98), avec cependant quelques modifications (Figure 111). Les azotes ne seront pas protégés par un groupement protecteur, et des groupements méthoxy seront introduits sur les produits de départ, permettant une possible poursuite de la synthèse vers des aza-cryptophanes.

La synthèse envisagée ici est une synthèse séquentielle : couplage – réduction – couplage – réduction – couplage. Un premier couplage de Buchwald entre le 4-bromo-3-chloroanisole **77** et la 5-méthoxy-2-nitroaniline **78** permet l'obtention du dimère **79** avec un rendement de 75%. Le groupement nitro est ensuite réduit par du chlorure d'étain puis le composé **80** est engagé dans une deuxième réaction de couplage avec le 2-iodo-4-méthoxy-1-nitrobenzene **81** pour obtenir le trimère **82**. Ce dernier est à son tour réduit par du chlorure d'étain pour obtenir le précurseur du CTV-3N **83**.

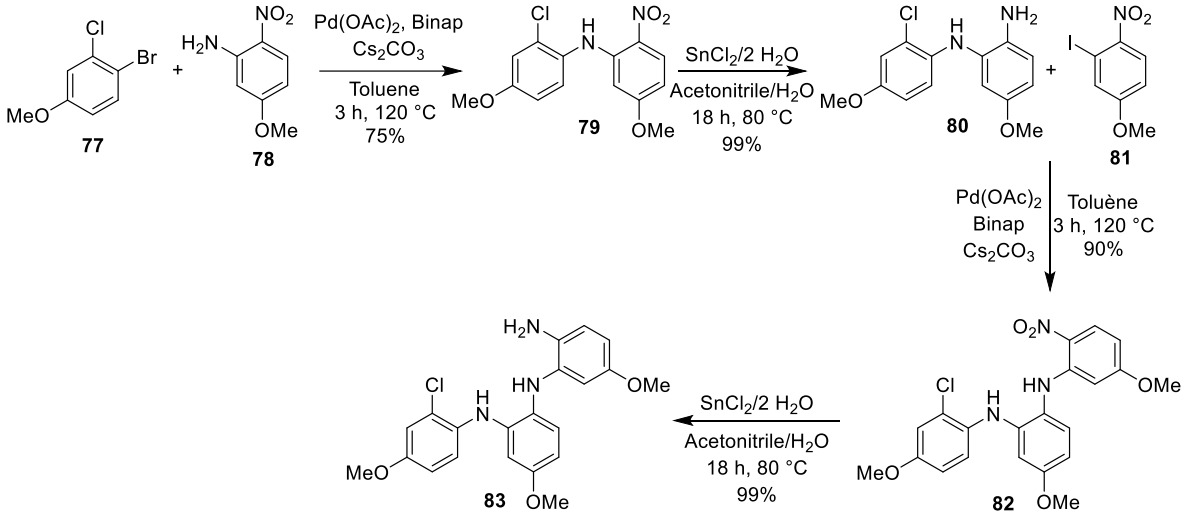


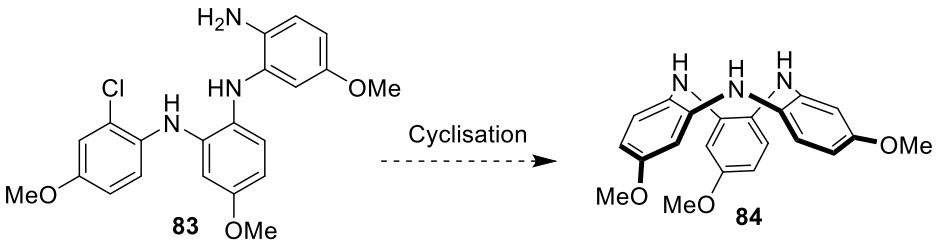
Figure 111 : Synthèse du précurseur de l'aza-CTV-3N

Il est ici intéressant de noter que le solvant de cette réaction a dû être modifié (pour ensuite être étendu à toutes les réactions de réduction d'un groupement nitro) car les premiers essais réalisés montraient la formation d'un seul produit correspondant au produit de départ sur lequel c'était additionné une molécule de solvant (LC-MS, RMN). Ce fût le cas en utilisant notamment du méthanol, de l'éthanol et du THF. Finalement l'utilisation d'un mélange acétonitrile/eau permet de solubiliser le produit et d'éviter ce problème. On remarque aussi que le produit formé a tendance à se chélater avec les sels d'étain formés pendant la réaction et ainsi diminuer le rendement de la réaction, pourtant totale en suivi CCM et LC-MS. Du tartrate de sodium est donc ajouté au milieu réactionnel avant extraction pour chélater les sels formés et ainsi être sûr de récupérer un maximum de produit. Par la suite, et pour prévenir ce genre de soucis, le tartrate de sodium a été utilisé dans tous les protocoles d'extraction des réactions impliquant du chlorure d'étain.

Plusieurs tests de fermeture ont été réalisés, en utilisant tout d'abord les conditions classiques de couplage, mais ne menant qu'à un mélange complexe, avec disparition du produit de départ (Tableau 5). La même réaction dans un milieu plus dilué mène elle aussi à un mélange complexe. Les mêmes conditions ont également été testées au micro-onde, une vérification RMN étant réalisée toutes les heures, mais au bout de six heures seul le produit de départ est observé en plus d'un très faible signal d'impureté. Le solvant a ensuite été modifié, passant du toluène au dioxane, pour palier un éventuel problème de solubilité mais une nouvelle fois seul un mélange complexe sans trace du produit souhaité est obtenu. Le Xantphos a également été utilisé comme ligand à la place du Binap, sans apporter de changement.

Le catalyseur a par la suite été modifié, utilisant du palladium bis(dibenzylideneacetone) à la place de l'acétate de palladium, ne menant qu'à un mélange complexe et disparition du produit de départ, que le ligand utilisé soit du binap ou du xantphos. Ce catalyseur a

également été testé au micro-onde, mais le suivi RMN montre une nouvelle fois seulement une légère apparition d'impuretés, sans disparition du produit de départ au bout de plusieurs heures. Enfin les conditions décrites par Panagopoulos *et al.* pour réaliser la fermeture du CTV ont été utilisées, à savoir le palladium bis(dibenzylideneacetone) en tant que catalyseur et le binap en tant que ligand dans un mélange 1:1 de *tert*-Butanol et toluène, en chauffant au micro-onde à 130°C. Dans ce cas également seul le produit de départ est récupéré, même après plusieurs heures de réaction.



Entrée	Conditions	Concentration	Résultats
1	$Pd(OAc)_2$, Cs_2CO_3, Binap Toluène, reflux	0.1 M	Mélange complexe
2	$Pd(OAc)_2$, Cs_2CO_3, Binap Toluène, reflux	5.10^{-3} M	Mélange complexe
3	$Pd(OAc)_2$, Cs_2CO_3, Binap Toluène, 120°C, MW, 4h	0.1 M	Produit de départ + impuretés
4	$Pd(OAc)_2$, Cs_2CO_3, Binap Dioxane, reflux	0.1M	Mélange complexe
5	$Pd(OAc)_2$, Cs_2CO_3, Xantphos Toluène, reflux	0.1 M	Mélange complexe
6	$Pd(dba)_2$, Cs_2CO_3, Binap Toluène, reflux	0.1 M	Mélange complexe
7	$Pd(dba)_2$, Cs_2CO_3, Xantphos Toluène, reflux	0.1 M	Mélange complexe
8	$Pd(dba)_2$, Cs_2CO_3, Binap Toluène, 120°C, MW, 4h	0.1 M	Produit de départ + impureté
9	$Pd(dba)_2$, K_2CO_3, Binap *t*-BuOH/Toluène, 130°C, MW	0.1M	Produit de départ + impureté

Tableau 5 : Tests de fermeture du CTV-3N

Devant la difficulté d'obtenir le CTV **84**, plusieurs explications sont avancées. La réaction intermoléculaire semble être préférentielle par rapport à la réaction intramoléculaire, semblant indiquer que le précurseur soit dans une conformation défavorisant la cyclisation. L'utilisation d'une macromolécule jouant le rôle de template pour la réaction et favorisant la réaction intramoléculaire pourrait alors être envisagée. De plus, les couplages de

Buchwald étant connus pour n'être que très peu efficaces avec des composés chlorés, une modification de la synthèse pour obtenir un trimère iodé plutôt que chloré peut également être envisagée. Enfin la protection des azotes peut également être testée, les azotes non protégés pouvant entraîner l'apparition de réactions parasites.

En conclusion, trois nouveaux CTV azotés ont pu être synthétisés, utilisant le même schéma de synthèse que la méthode précédemment mise au point. On peut notamment souligner que la structure du CTV-1N a pu être déterminée par cristallographie, validant l'hypothèse d'une conformation saddle. Ces structures peuvent maintenant être utilisées pour essayer de synthétiser les cryptophanes correspondants.

4. Synthèse de cryptophanes azotés

Les structures des cryptophanes azotés envisagées seront dans un premier temps des analogues du cryptophane C ou [222]-3 OMe, grâce à une méthode template (Figure 112). Dans un second temps des essais pour réaliser le cryptophane [111] par méthode directe et template seront également envisagés.

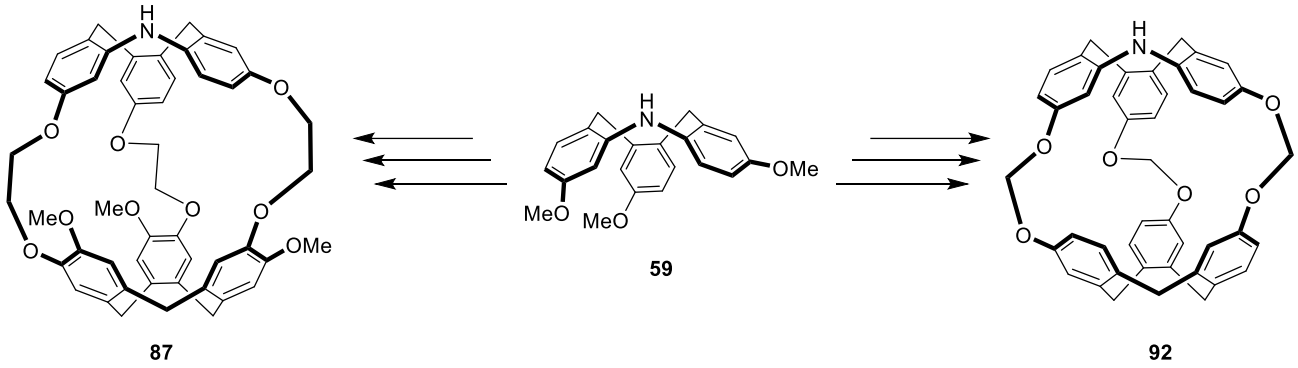


Figure 112 : Structures des cryptophanes 1N [222] et [111]

4.1. Cryptophane [222] 1N

4.1.1. Synthèse

Dans un premier temps les trois groupements méthoxy doivent être déprotégés pour pouvoir être alkylés par le composé **6**. Le CTV-1N **59** est donc traité par un excès de tribromure de bore pour obtenir le CTV triphénol **85** avec un rendement de 96% (Figure 113). Il est ensuite alkylé par trois unités du composé **6** en présence de carbonate de césium, avec un rendement de 82%. Enfin une étape de cyclotrimérisation est effectuée dans les mêmes conditions que celles utilisées pour le cryptophane A, à savoir une dilution de 1.10^{-3} M dans un mélange 95/5 acide formique/chloroforme, menant à un mélange de deux cryptophanes différents identifiés grâce à leurs données cristallographiques comme les composés *anti* et *syn* avec des rendements respectifs de 67 et 23%.

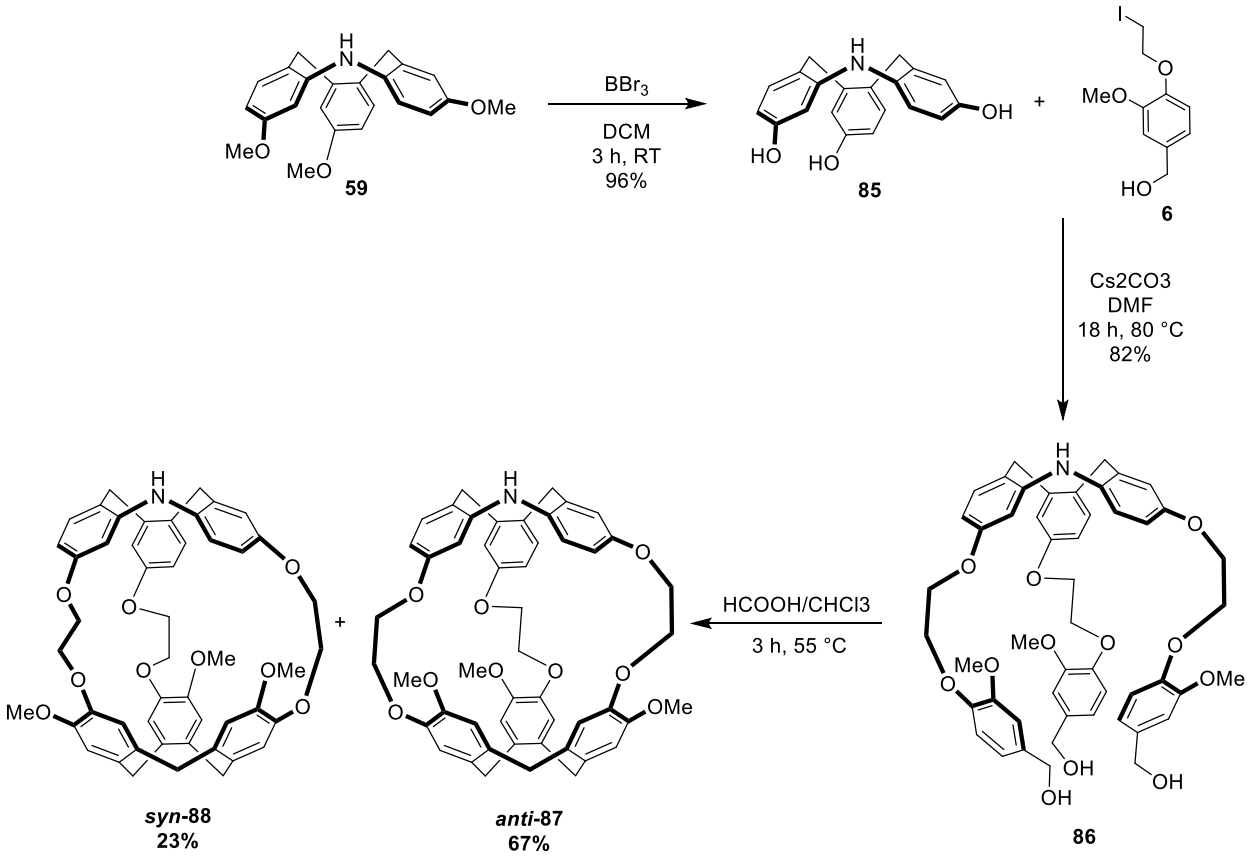


Figure 113 : Synthèse du cryptophane [222] 1N

Les deux cryptophanes sont les analogues stricts des cryptophanes entièrement carbonés C et D, portant un azote en position apicale. On remarque notamment que les proportions entre les deux diastéréoisomères sont similaires avec ou sans azote.[155]

La synthèse de ces cryptophanes permet donc d'envisager l'utilisation de l'azote comme point d'encrage et des essais de fonctionnalisation peuvent donc être entrepris, validant ainsi l'objectif d'obtenir des cryptophanes facilement monofonctionnalisables.

4.1.2. Fonctionnalisation

La fonctionnalisation du cryptophane *anti*-**87** a été investiguée en utilisant différentes chaînes alkyles halogénées, de longueurs différentes, avec différentes fonctions réactives et permettant d'être greffées à un composé d'intérêt par son autre extrémité. Le schéma de réaction est le même pour chaque chaîne testée, à savoir traitement du cryptophane par de l'hydrure de sodium puis ajout d'un léger excès de la chaîne halogénée (Figure 114).

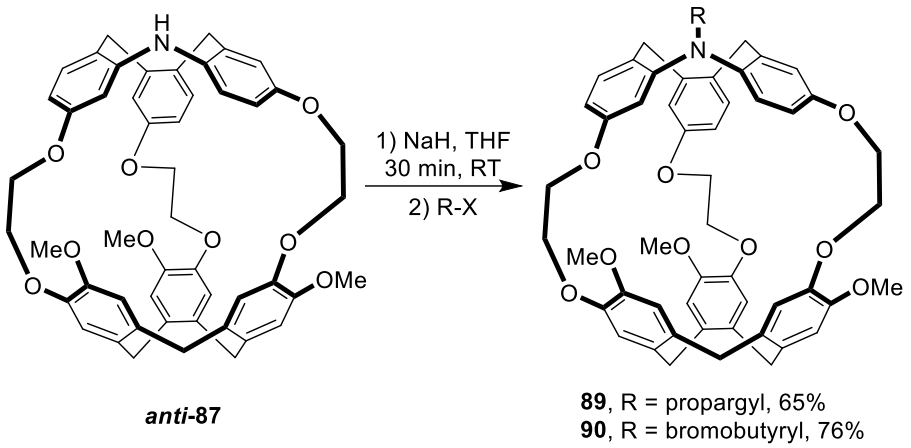


Figure 114 : Schéma de fonctionnalisation du composé *anti-**87***

A l'heure actuelle trois chaînes différentes ont été testées, avec succès pour le bromure de propargyl et le chlorure de 4-bromobutyrile ont ainsi pu être greffés sur le cryptophane avec des rendements respectifs de 65 et 76%. En revanche la réaction avec le 3-bromopropylamine, protégée par un groupement boc, déjà utilisé pour la synthèse du liner maléimide (cf chapitre 2, paragraphe 4.2), ne conduit qu'à la récupération du produit de départ.

Nous avons donc mis au point la synthèse, avec d'excellents rendements et sur une échelle d'un gramme, d'un nouveau type de cryptophane [222] permettant une monofonctionnalisation simple sans passer par des étapes de purifications complexes. On peut maintenant se demander s'il est également possible de synthétiser les analogues azotés de plus petits cryptophanes, les [111], ayant de meilleures propriétés d'encapsulation du xénon.

4.2. Cryptophane [111] 1N

Plusieurs voies de synthèse ont été envisagées pour essayer de synthétiser des cryptophanes azotés [111]. La première reprend la méthode template décrite pour la synthèse de l'analogue carboné, à savoir traiter le CTV triphénol avec du carbonate de césium en milieu très dilué puis ajout d'un large excès de bromochlorométhane.[120,214]

Dans le cas des CTV azotés, il convient d'utiliser un mélange 1:1 des CTV triphénols azotés et carbonés (Figure 115). L'utilisation de ce mélange entrainera à minima la formation de trois types de cryptophanes différents : un entièrement carboné, un avec un azote et un avec deux azotes.

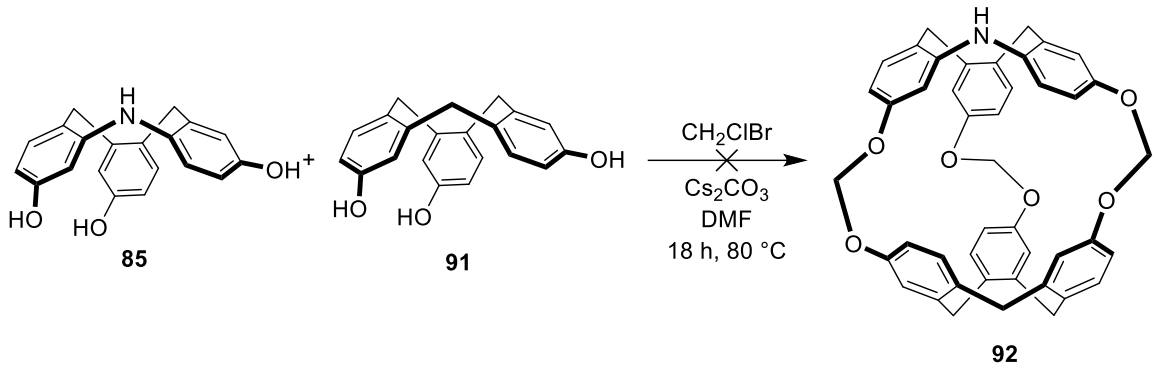


Figure 115 : Première voie de synthèse envisagée pour le cryptophane **92**

Des premiers essais ont été menés mais des problèmes de solubilité sont apparus. En effet le cryptophane [111] est connu pour sa très faible solubilité, même dans les solvants organiques, ce qui fut le cas lors des essais réalisés, le milieu réactionnel étant difficile à extraire et le mélange brut difficilement analysable en RMN, quel que soit le solvant deutéré utilisé. Devant ces difficultés et le fait qu'au minimum trois produits soient formés, une deuxième voie de synthèse a été envisagée.

Se basant sur la méthode template utilisée pour la synthèse du cryptophane A, elle consiste d'abord à synthétiser le composé alkylant le CTV comportant une chaîne éther avec un seul carbone (Figure 116).[219] Celui-ci est obtenu en deux étapes à partir de l'alcool vanillique dont le phénol est alkylé par du sulfure de chlorométhyle méthyle pour obtenir le composé **93**. Il est ensuite traité par du chlorure de sulfuryle pour obtenir le dérivé chlorométhyle **94** avec un rendement de 70%.

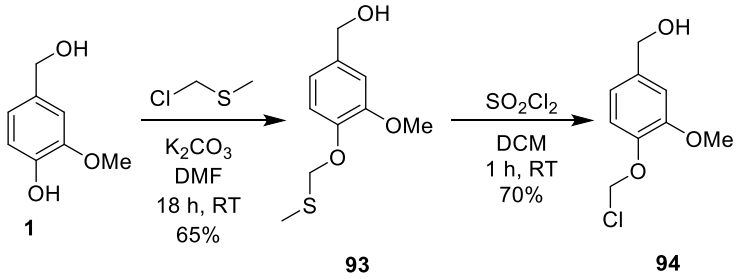


Figure 116 : Synthèse du synthon **94**

Le composé **94** est ensuite engagé dans une réaction d'alkylation du CTV-1N triphénol pour obtenir le précurseur du cryptophane [111] (Figure 117). Malheureusement le résultat brut n'a jamais pu être analysé en RMN car insoluble dans les solvants d'analyse et les tentatives de purification et d'isolement d'un produit n'ont pas fonctionné.

[219] Traoré, T., *Synthèse de Nouvelles Molécules Cages et Applications Pour l'Imagerie Par RMN Xénon*, **2011**.

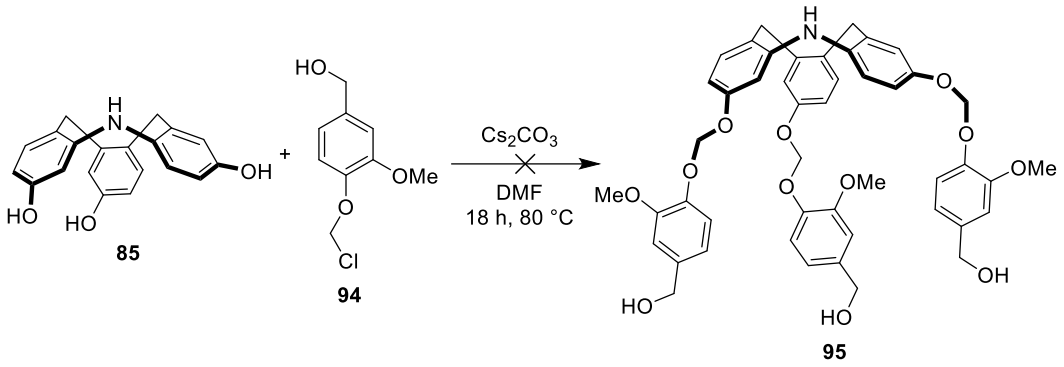


Figure 117 : Réaction testée pour le précurseur **95**

Enfin, la même réaction suivie, sans purification intermédiaire, d'un traitement acide pour obtenir directement le cryptophane a également été testée mais le résultat n'a pas non plus été concluant. L'hypothèse la plus probable aux échecs à synthétiser ce cryptophane ou son précurseur en passant par la méthode template est que l'acétal formé pendant la réaction n'est pas stable et se rompt trop rapidement.

Bien que la synthèse d'un cryptophane azoté de plus petite taille n'ait pas abouti, nous nous sommes ensuite intéressés à la synthèse d'un cryptophane [222] comportant deux azotes.

4.3. Cryptophane [222] 2N

Comme pour les cryptophanes comportant un azote, la voie de synthèse retenue pour obtenir des cryptophanes [222] 2N sera une méthode template, que les azotes soient protégés ou non, pour accéder aux précurseurs des cryptophanes. La voie de synthèse étant la même dans les deux cas, les résultats seront présentés en même temps.

Dans le cas du composé non protégé, la première étape de déprotection des groupements méthoxy permet d'obtenir le composé triphénol **96** avec un rendement de 70% (Figure 118). Il est ensuite trialkylé par le composé **6** en présence de carbonate de césium pour donner le précurseur du cryptophane **98** avec un rendement de 62%. Enfin, de nombreux essais de cyclotrimérisation ont été réalisés mais le cryptophane **100** n'a jamais pu être obtenu.

Dans le cas du composé protégé, la déprotection des méthoxy permet l'obtention du triphénol **97** avec un rendement de 66%, une partie du produit étant malheureusement déprotégé pour aboutir au triphénol **96.** Le composé **97** est ensuite alkylé pour obtenir le précurseur du cryptophane **99**, dont la cyclotrimérisation n'a également pas pu être réalisée.

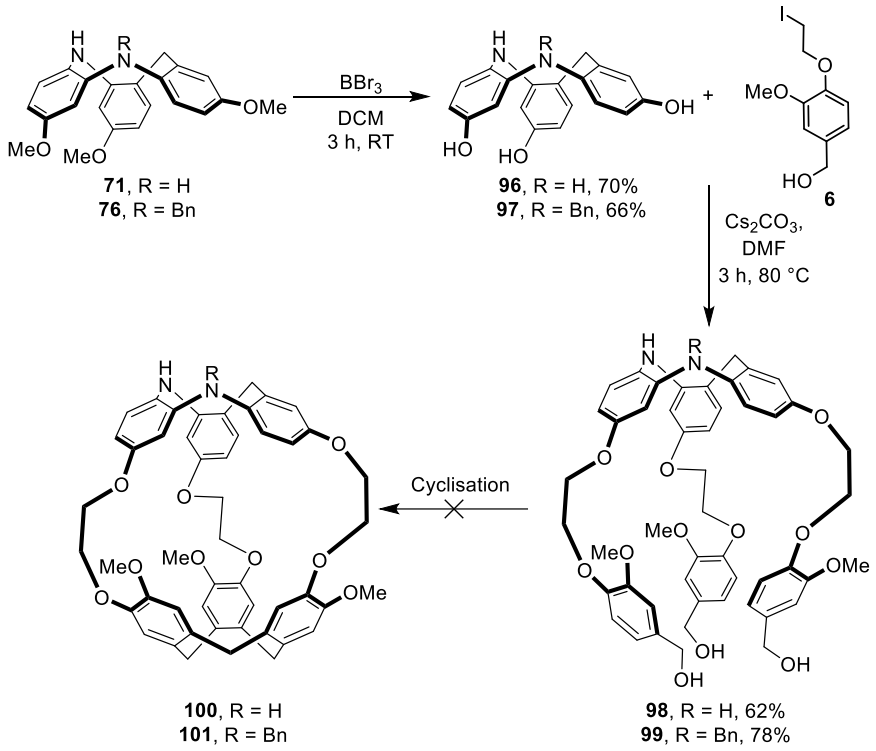


Figure 118 : Voie de synthèse des cryptophanes **100** et **101**

En effet pour les deux précurseurs, de nombreuses tentatives de cyclisation ont été réalisées (Tableau 6), en faisant varier l'acide utilisé (HCOOH, $HClO_4$, P_2O_5, $Sc(OTf)_3$), le solvant (chloroforme, acétonitrile, dioxane) et la température de réaction. Dans la majorité des cas on observe bien une disparition du produit de départ en suivi CCM mais le brut récupéré reste toujours un mélange complexe difficilement analysable en RMN et dont les tentatives de purification et d'isolement d'un produit ont été infructueuses. On peut aussi rajouter que les essais avec le composé **99** conduisaient le plus souvent à un mélange extrêmement peu soluble et inexploitable.

Entrée	R	Acide	Conditions	Résultats
1	H	HCOOH	$CHCl_3$, 3 h, 55 °C	Mélange complexe
2	H	HCOOH	$CHCl_3$, 3 h, TA	Mélange complexe
3	H	HCOOH	Dioxane, 3 h, 100 °C	Mélange complexe
4	H	P_2O_5	$CHCl_3$, 3 h, 55 °C	Insoluble
5	H	$Sc(OTf)_3$	$CHCl_3$, 3 h, 55 °C	Mélange complexe
6	Bn	HCOOH	$CHCl_3$, 3 h, 55 °C	Mélange complexe
7	Bn	HCOOH	$CHCl_3$, 3 h, TA	Mélange complexe
8	Bn	P_2O_5	$CHCl_3$, 3 h, 55 °C	Insoluble
9	Bn	P_2O_5	Acétonitrile, 3 h, 55 °C	Insoluble
10	Bn	$Sc(OTf)_3$	$CHCl_3$, 3 h, 55 °C	Insoluble
11	Bn	$HClO_4$	$CHCl_3$, 3 h, 55 °C	Insoluble

Tableau 6 : Différents essais de fermeture des composés **98** et **99**

L'hypothèse la plus probable pour expliquer l'échec de l'étape de cyclisation est que la réaction intermoléculaire est privilégiée à la réaction intramoléculaire, conduisant à la formation de nombreux polymères insolubles. Cela étant sûrement due à la conformation des précurseurs, non favorable à une cyclisation intramoléculaire, que même le chauffage du milieu réactionnel ne permet pas de modifier. Une des solutions qui peut être envisagée pour surmonter cette difficulté est l'emploi d'une macromolécule pour un effet template ou d'un petit cation permettant une pré-conformation des précurseurs facilitant ainsi la réaction.

En conclusion nous avons réussi à synthétiser un seul cryptophane azoté, comportant un azote, les composés avec deux azotes s'étant révélés impossible à fermer. Les propriétés de ce cryptophane telles que la taille de sa cavité, sa solubilité ou sa capacité d'encapsulation peuvent maintenant être étudiées.

5. Propriétés du cryptophane [222] 1N

Les cryptophanes en général étant connus pour leur propriété d'encapsulation de divers gaz, cations et petites molécules,[155-162] une attention particulière à été portée à la détermination de la taille de la cavité du cryptophane 1N et de sa conformation. Plus particulièrement, dans le cadre de ce produit et de cette thèse, des analyses seront également menées concernant l'effet de l'azote sur sa solubilité et sa capacité à encapsuler du xénon.

A l'heure actuelle ce composé a pu être solubilisé dans plusieurs solvants comme le DMSO, le chloroforme et l'acétonitrile, avec des solubilités atteintes respectives de 58 mM, 8.3 mM et 1.46 mM. A titre de comparaison le cryptophane A est soluble à 27 mM dans le DMSO et n'est que très faiblement soluble dans l'acétonitrile. Ces données rendent ce type de cryptophane potentiellement intéressant pour de possibles applications biologiques.

5.1. Cristallographie

Les données cristallographiques des deux cryptophanes 1N *anti* et *syn* ont pu être obtenues par Jana Sopkova-de Oliveira Santos. L'obtention des cristaux s'est faite par évaporation lente dans du dichlorométhane à 4°C (Figure 119). Les cryptophanes étant connus pour encapsuler ce solvant, les cristaux obtenus sont co-cristallisé avec le dichlorométhane, nous permettant ainsi de déterminer la taille de la cavité lorsqu'un invité est à l'intérieur. Le composé *anti* dispose donc d'une cavité de 137.0 $Å^3$ et le composé *syn* d'une cavité de 121.4 $Å^3$, des tailles donc supérieures à celle du cryptophane C (114.5 $Å^3$).

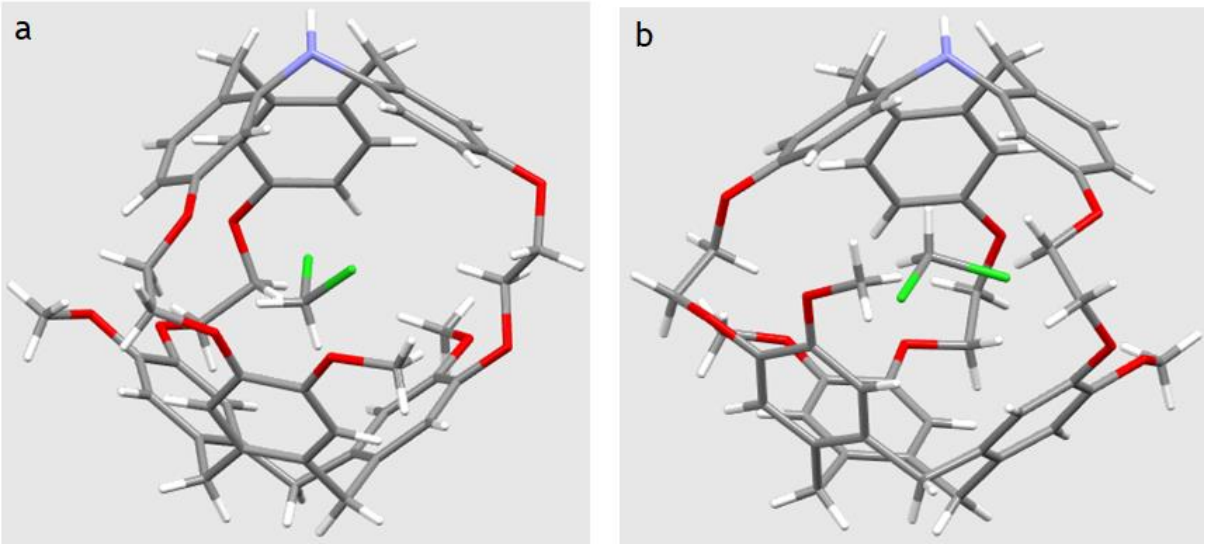


Figure 119 : Structure des cryptophanes 1N *anti* **87** (a) et *syn* **88** (b) co-cristallisés avec du dichlorométhane

On remarque notamment que contrairement aux représentations schématiques, les cycles aromatiques ne sont pas face à face les uns des autres mais plutôt légèrement éclipsés, avec les ponts éthylènedioxy capables de passer de conformation *gauche* à *anti* pour adapter la taille de la cavité à son invité. Cette capacité avait déjà été décrite par l'équipe de Dmochowski avec le cryptophane A.[131] Dans le cas du composé *anti*, deux ponts sont en conformation *gauche* et un en *anti*, alors que pour le composé *syn* les trois ponts sont en conformation *gauche*. On peut également voir que les groupements méthoxy sont orientés vers l'extérieur de la cavité et que le proton de l'azote est lui orienté vers l'intérieur, induisant ainsi que le doublet non liant de l'azote est dirigé vers l'extérieur.

Afin de pouvoir visualiser la conformation du cryptophane et la taille de la cavité sans invité, des cristaux ont également été réalisé par évaporation lente dans l'anisole, trop volumineux pour pénétrer dans la cage. Seuls des cristaux du composé *anti* ont pu être obtenus (Figure 120).

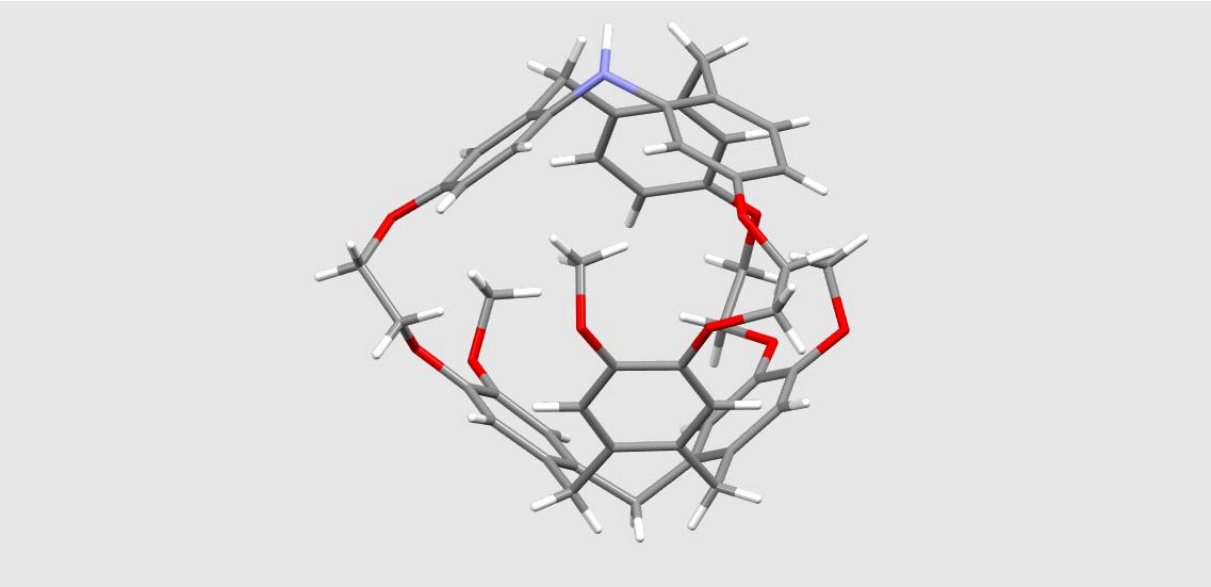


Figure 120 : Structure du cryptophane 1N *anti* **87** cristallisé dans de l'anisole

Il est intéressant de noter que ces cristaux se sont montrés moins stables dans le temps que ceux obtenus avec le dichlorométhane. La taille de la cavité vide a pu être déterminée entre 85.4 et 86.8 $Å^3$. On remarque dans ce cas les groupements méthoxy pointant vers la cavité et l'ensemble des ponts éthylènedioxy en conformation *gauche*. Enfin, dans ce cas aussi le proton de l'azote pointe vers l'intérieur de la cavité.

On peut conclure de ces données que l'ajout d'un azote sur l'un des ponts méthylène du cryptophane ne modifie que très peu la taille de la cavité, comparé à son homologue carboné, ce qui veut dire qu'il aura les mêmes propriétés d'encapsulation que le cryptophane C tout en s'affranchissant des problèmes de solubilité et de monofonctionnalisation.

5.2. RMN du xénon

Les expérience de RMN du xénon sont réalisées au Laboratoire Catalyse et Spectroscopie (LCS), sur un montage réalisé par Hussein El Siblani (Figure 121). Il s'agit d'un montage en flux continu permettant les analyses *in vitro*. Le xénon est dans un premier temps hyperpolarisé en faisant plusieurs boucles dans un circuit fermé contenant la cellule de polarisation, puis injecté directement dans l'échantillon. Pour cela un tube RMN spécial est utilisé, avec une entrée, ayant à son extrémité un capillaire, et une sortie pour le xénon. Lors de l'injection du xénon il peut donc être injecté dans l'échantillon en étant directement bullé dans la solution, puis récupéré dans le circuit fermé et ainsi réaliser plusieurs boucles d'injection. Ce tube est préalablement inséré dans le spectrometre RMN situé juste à côté pour une analyse directe et une limitation des pertes de polarisation, l'envoi de xénon dans l'échantillon étant bien évidemment coupé le temps de l'analyse RMN pour ne pas perturber le signal.

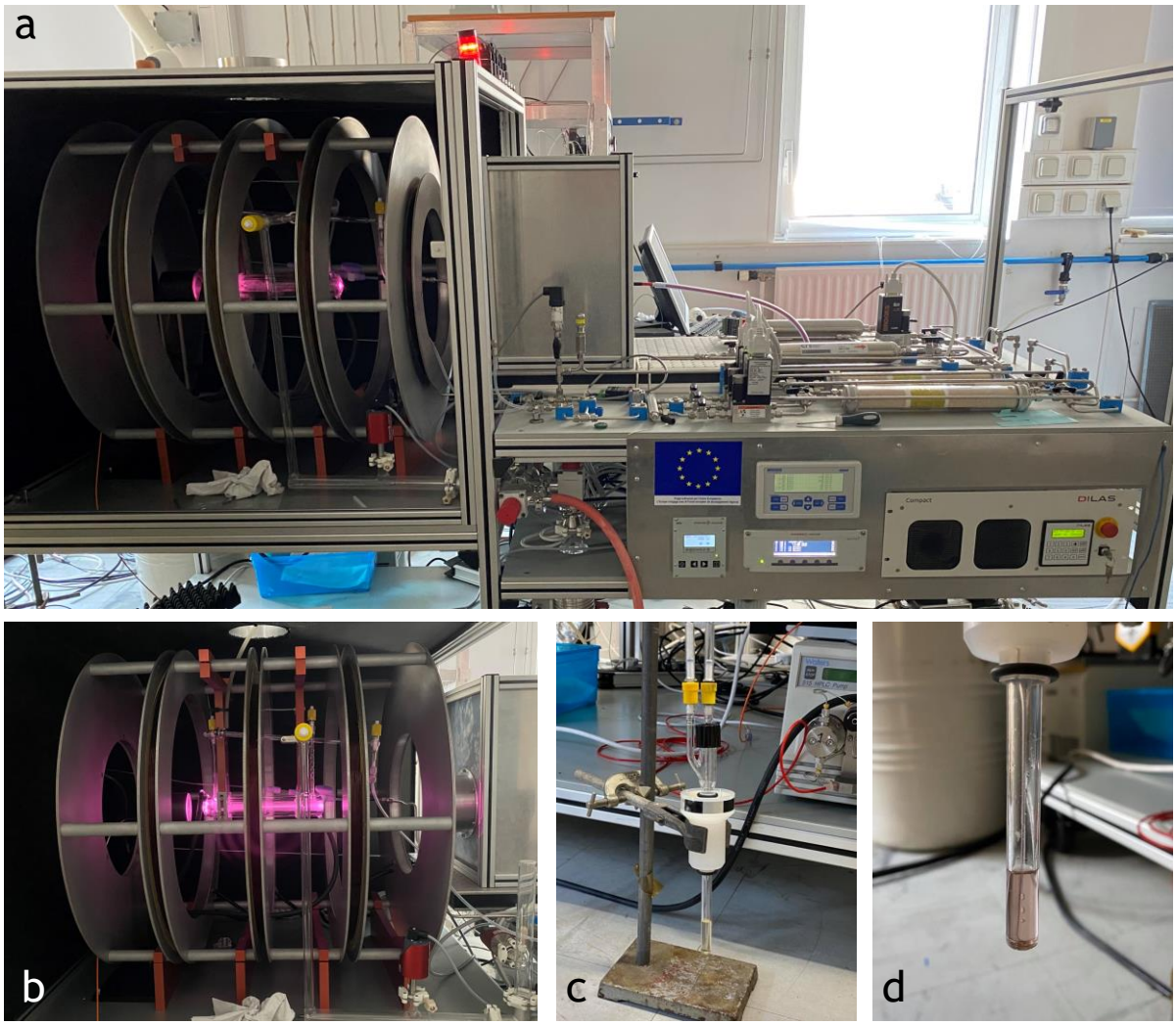


Figure 121 : Photos du montage entier (a), de la cellule de polarisation en marche (b), du tube utilisé (c) et du capillaire à l'intérieur (d)

Les spectres RMN doivent être réalisés dans un solvant deutéré trop volumineux pour pénétrer dans la cavité du cryptophane et ainsi ne pas entrer en compétition avec le xénon. Le solvant choisi pour ces expériences sera le tétrachloroéthane deutéré, déjà utilisé dans les différentes analyses décrites dans la littérature.[166] Une série de spectres a été enregistrée avec le cryptophane 1N *anti*, en faisant varier la température, de la température ambiante jusqu'à 233 K. On observe trois signaux, à 232.5, 63.7 et 0 ppm à 278 K, correspondant respectivement aux signaux du xénon dans le solvant, dans le cryptophane et libre (Figure 122). On voit également que le signal du xénon dans le cryptophane s'affine lorsque la température diminue, traduisant une vitesse d'échange rapide entre le xénon libre et le xénon dans le cryptophane.

Dans le cas du cryptophane C (*anti*), le signal en RMN du xénon est décrit comme ayant un shift de 70 ppm à 293 K et ayant une vitesse d'échange lente avec le xénon.[220] Le signal du cryptophane D (*syn*) n'est lui pas observé à 293 K et est décrit comme ayant une vitesse d'échange rapide.

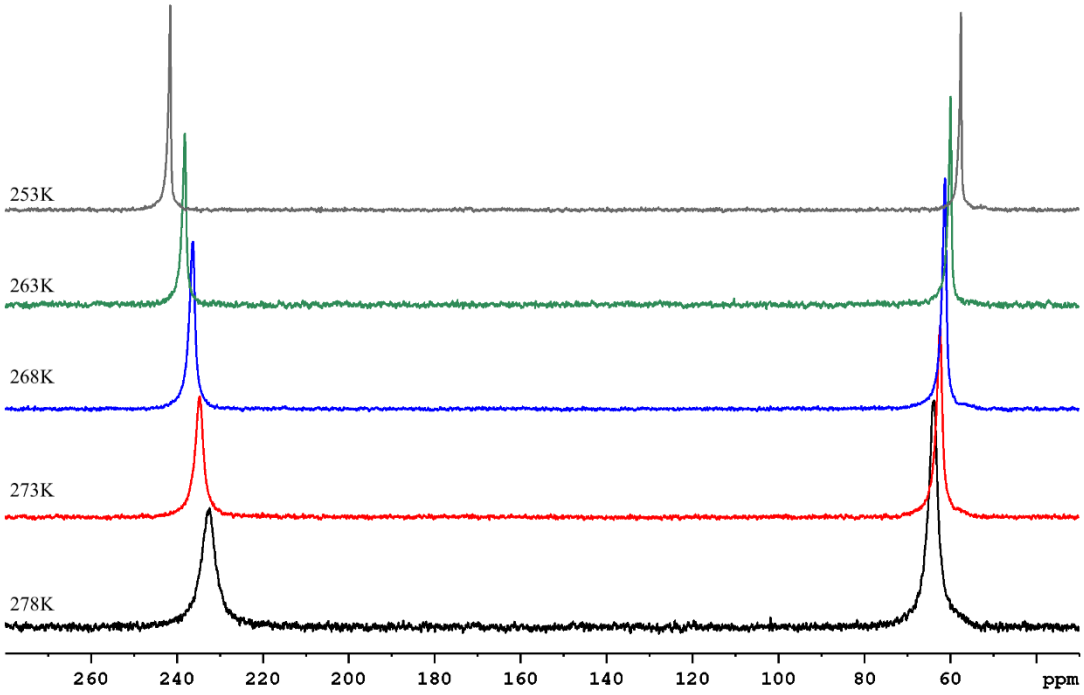


Figure 122 : Spectre RMN du ^{129}Xe hyperpolarisé du cryptophane 1N *anti* **87** en fonction de la température

On peut en conclure que l'ajout d'un azote sur la structure du cryptophane ne l'empêche pas d'encapsuler du xénon, bien que la vitesse d'échange pour le xénon semble plus rapide que son homologue carboné.

Enfin des essais pour déterminer la constante d'affinité du cryptophane 1N *anti* pour le xénon ont été effectués. Plusieurs méthodes existent pour la déterminer, comme une analyse par ITC,[148] la réalisation d'expériences successives avec une température et une concentration en xénon très précise,[220] ou encore une expérience de compétition entre un cryptophane dont la constante est connue, et le cryptophane dont la constante doit être déterminée.[166] Compte tenu du matériel et des moyens à notre disposition, c'est pour l'étude de compétition que nous avons opté, en prenant le cryptophane [111] comme cryptophane dont la constante est connue (28000 ± 5000 M^{-1} à 278 K).

Pour cela un premier spectre RMN du proton, dans le tétrachloroéthane deutéré, du mélange 1/1 des deux cryptophanes sans xénon est tout d'abord réalisé puis le xénon est ajouté à

[220] Berthault, P. et al., *Role of the Methoxy Groups in Cryptophanes for Complexation of Xenon: Conformational Selection Evidence from 129Xe-1H NMR SPINOE Experiments*, ChemPhysChem, **2017**, Vol. 18 (12), 1561–1568.

l'échantillon et un spectre RMN du proton et du xénon sont réalisés. Enfin, la constante d'affinité peut être déterminée par l'équation suivante :[166]

$$K_{Xe@a} / K_{Xe@b} = [\gamma(1+\beta)/\alpha]-\beta$$

a correspondant au cryptophane dont la constante est à déterminer et b au cryptophane dont la constante est connue. α est défini comme le ratio des concentrations des cryptophanes. β est défini comme le ratio de cryptophane 1 contenant du xénon sur le cryptophane 1 vide, déterminé par comparaison des spectres proton du mélange sans et avec xénon. En effet un léger shift doit s'opérer sur les signaux des protons aromatiques et donc permettre de déterminer le ratio. Enfin γ est défini comme le ratio des concentrations des cryptophanes 1 et 2 contenants du xénon, déterminé grâce au spectre xénon du mélange.

Plusieurs essais ont donc été menés mais il est rapidement apparu qu'il ne serait pas possible de déterminer la constante d'affinité en utilisant les signaux du spectre proton. En effet, il s'avère que le spectre proton du cryptophane 1N dans le tétracholoréthane deutéré sans xénon est inexploitable, car ne donnant plus du tout les signaux obtenus dans des solvants RMN classique comme le chloroforme deutéré (Figure 123). Le résultat nous donnant plutôt l'impression d'avoir un produit rempli d'impuretés. En revanche l'ajout de xénon dans l'échantillon nous permet de récupérer un signal conforme à celui attendu.

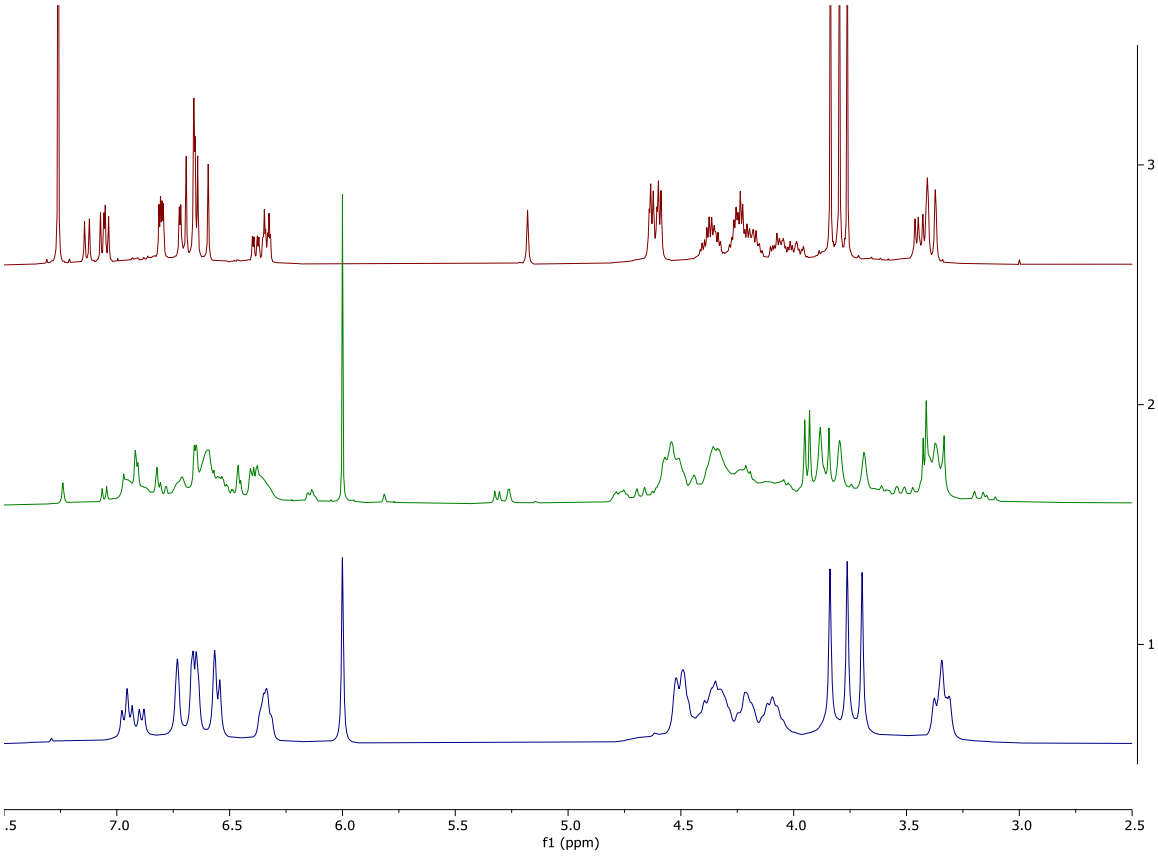


Figure 123 : Spectres RMN du proton du cryptophane 1N *anti* **87** à 278 K, en l'absence de xénon dans le chloroforme (rouge) et le tétrachloroéthane (vert) et en présence de xénon dans le tétrachloroéthane (bleu)

L'hypothèse la plus probable pouvant expliquer cette situation est que le tétrachloroéthane ne pénétrant pas dans le cryptophane, la structure de ce dernier n'est pas « stabilisée » et donne lieu au spectre vert. L'ajout du xénon, qui lui peut pénétrer dans la cavité permet alors de bloquer la structure du cryptophane et permet ainsi de retrouver un spectre similaire à celui dans le chloroforme, qui peut lui aussi rentrer dans la cavité.

En conclusion des premières études sur les propriétés ont pu être menées, les structures ont pu être résolues par cristallographie, confirmant la présence de composés *anti* et *syn* et des premiers tests de solubilité ont été menés, montrant une plus grande solubilité dans les solvants testés que le cryptophane A. La RMN du xénon a également permis de confirmer que ces composés sont capables d'encapsuler du xénon, bien que la constante d'affinité n'ait pas pu être déterminée. Une autre méthode que l'étude par compétition devra pour cela être faite. L'ensemble des travaux sur les cryptophanes azotés a fait l'objet d'un premier dépôt de brevet réalisé en janvier 2021.

Conclusions et perspectives

Au cours de cette thèse trois différents projets ont pu être menés à bien. Tout d'abord deux précurseurs de biosondes à xénon ont pu être mis au point. Pour cela le cryptophanol, intermédiaire clé dans ce projet, a été obtenu par deux voies de synthèse différentes. La première visait la synthèse du cryptophane A symétrique par une méthode template puis une étape de mono-déprotection d'un groupement méthoxy permettant d'accéder au cryptophanol. La deuxième s'inspire de la méthode template en permettant l'ajout d'un alcool protégé et ainsi d'obtenir le cryptophanol avec une purification simplifiée. Cependant, les purifications intermédiaires étant complexes, la première méthode a été privilégiée pour une montée en échelle et avoir une quantité suffisante de cryptophanol. Deux linkers sont ensuite ajoutés en trois étapes chacun, permettant d'accéder aux deux précurseurs pouvant se greffer sur les thiols ou amines libres des anticorps suivant le linker choisit. Enfin, le greffage aux anticorps spécifique de la P-selectin a été réalisé pour donner les deux biosondes envisagées dans ce projet (Figure 124).

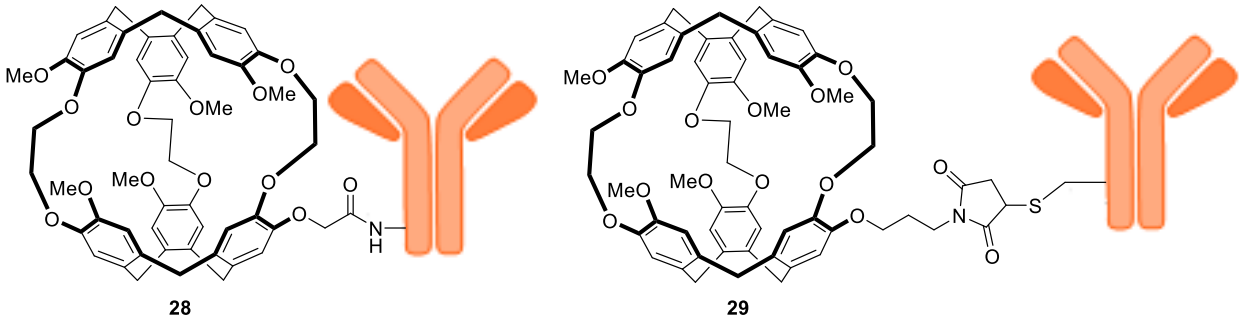


Figure 124 : Représentation des deux biosondes obtenues

Ces biosondes sont actuellement en cours de caractérisation par spectrométrie de masse, les premiers résultats montrant un greffage effectif seulement dans le cas du maléimide. Elles seront par la suite purifiées si besoin puis testées et validées *in vitro* par des analyses de RMN du xénon (Figure 125). Ces analyses permettront de déterminer le signal en RMN du xénon hyperpolarisé des biosondes seules puis des biosondes liées à leur cible et ainsi donner la preuve de concept que ce type de biosonde à base de cryptophane peut être utilisé pour la détection de neuro-inflammation en utilisant le xénon hyperpolarisé.

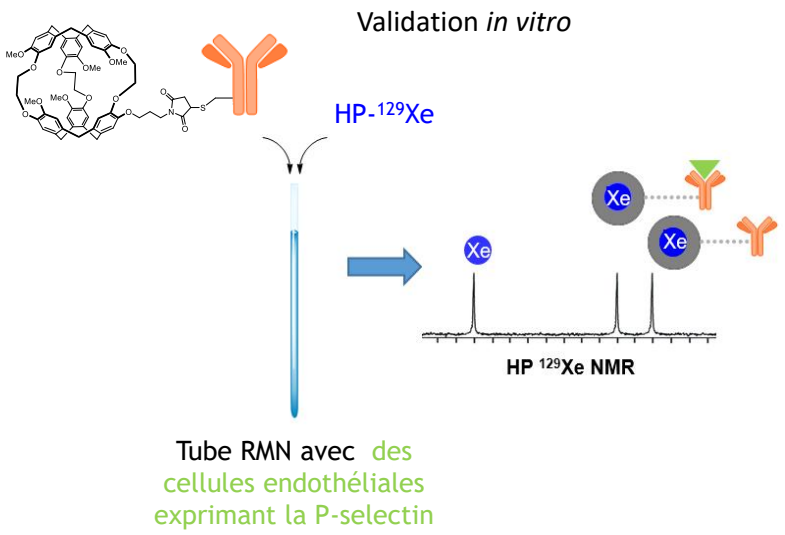


Figure 125 : Schéma des analyses *in vitro* restant à réaliser pour les biosondes

Dans un second temps, cette thèse a permis de mettre au point une nouvelle voie de synthèse permettant l'accès à des CTV de symétrie C_1, par une méthode itérative basée sur le couplage de Barluenga, permettant l'ajout un à un de cycles aromatiques modifiés suivant les besoins. Cette méthode a ainsi été mise au point par la synthèse d'un CTV-3 OMe de symétrie C_3, avant d'être utilisée pour synthétiser des CTV de symétrie C_1, possédant un alcool protégé (Figure 126). Cela nous a permis de mettre au point l'étape de cyclotrimérisation et de l'adapter suivant les groupements protecteurs pour la rendre compatible à des groupements pourtant moins robustes en conditions acide. Enfin cette méthode a été optimisée pour être réalisable en 5 étapes et utilisée pour synthétiser une structure de CTV C_1 inédite composé de trois cycles aromatiques différents.

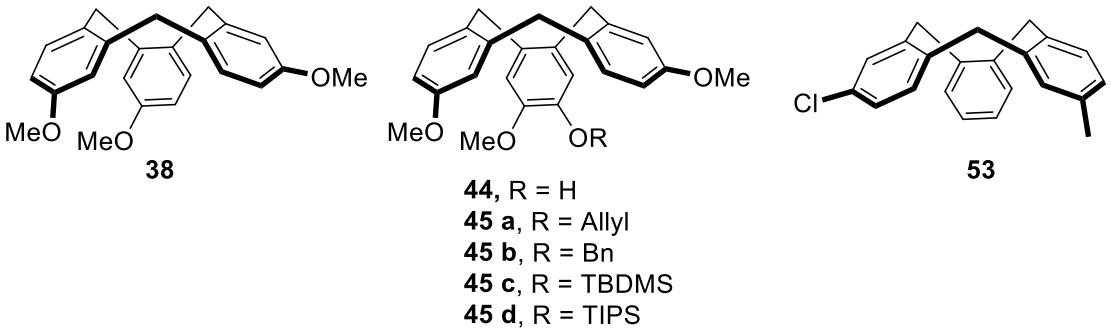


Figure 126 : Structures des CTV obtenus avec la nouvelle méthode de synthèse

Cette nouvelle voie de synthèse offre une vraie alternative pour la synthèse de CTV en général, et peut ouvrir la voie vers une grande variété de structures de CTV innovantes. De plus le couplage de Barluenga est décrit pour fonctionner aussi bien avec des aldéhydes qu'avec des cétones, il serait donc intéressant de voir si cette voie de synthèse peut également être utilisée avec des cétones et ainsi obtenir de nouvelles structures de CTV fonctionnalisés par leur ponts méthylènes.

Enfin le dernier projet de cette thèse visait à appliquer la nouvelle méthode de synthèse à la préparation de CTV comportant des azotes sur les ponts méthylènes et les cryptophanes correspondants. Ainsi, trois CTV azotés ont pu être obtenus comportant respectivement un azote, deux azotes libres et deux azotes dont un protégé. De ces trois structures seul le cryptophane comportant un seul azote, le cryptophane 1N, a pu être synthétisé. Les conformations *anti* et *syn* de ce cryptophane ont pu être visualisées par cristallographie, et des fonctionnalisations sur cet azote ont été réalisées, validant l'hypothèse d'utiliser cet azote comme point d'encrage pour de possible applications.

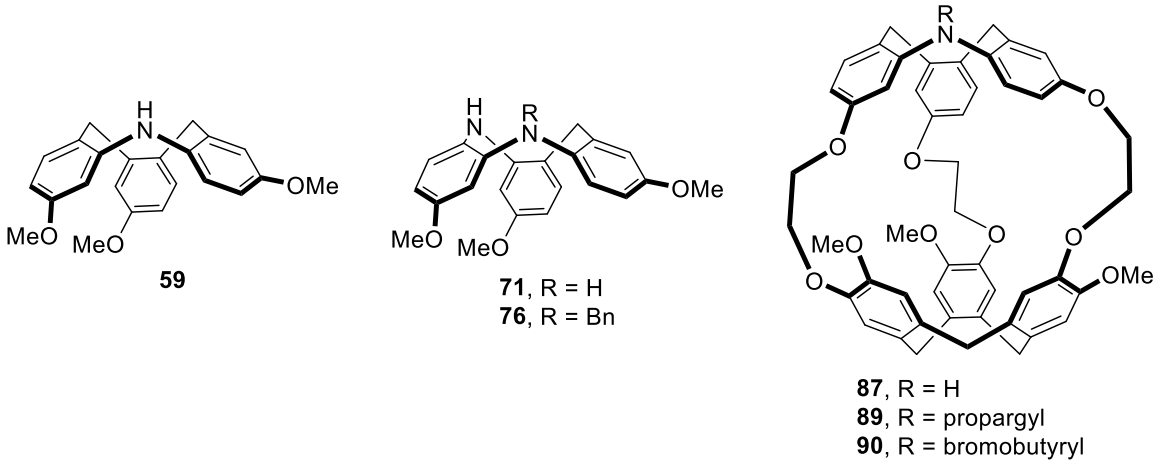


Figure 127 : Structures des CTV et cryptophanes azotés obtenus

Les analyses cristallographiques ont également permis de déterminer la taille de la cavité des composé *anti* et *syn* en présence d'un invité à l'intérieur, et celle du composé *anti* vide. Ces données nous montrent que l'ajout d'un azote sur l'un des ponts méthylène n'a que très peu d'influence sur la taille de la cage comparée à son homologue carboné. Enfin la confirmation de la capacité d'encapsulation du xénon par ces composés a été obtenue par RMN du xénon. Des essais pour déterminer la constante d'affinité ont également été menés, sans succès pour le moment. Enfin les premiers tests de solubilité ont montré une amélioration de celle-ci par rapport aux composés carbonés.

L'ensemble de ces données nous montre que la synthèse du cryptophane 1N offre une vraie alternative pour l'utilisation de cryptophane dans le cadre d'une application en tant que biosonde. En effet, la présence de l'azote ne modifiant que très peu la taille de la cavité, on peut également envisager que le cryptophane 1N dispose de propriétés d'encapsulation similaire au cryptophane C et D. Il offre donc les avantages de ses homologues carbonés tout en s'affranchissant des problèmes de fonctionnalisation grâce à son point d'encrage, et permettant possiblement une utilisation facilitée pour des applications biologiques grâce à sa meilleure solubilité. Une publication sur le cryptophane 1N est actuellement en cours d'écriture.

De nouveaux essais pourraient également être faits pour la synthèse du cryptophane [111] azoté, son analogue carboné étant connu pour ses bonnes capacités d'encapsulation du xénon ainsi que sa faible solubilité et l'extrême difficulté de le fonctionnaliser. L'obtention du composé azoté serait donc très intéressante à la fois pour ses propriétés de solubilité et l'utilisation de l'azote comme point d'encrage.

Concernant les CTV comportant deux atomes d'azotes, bien que les cryptophanes correspondants n'ont pour le moment pas été obtenus, des pistes sont envisagées pour surmonter les difficultés rencontrées comme l'utilisation d'une molécule template ou d'un cation. De plus, sachant grâce à la cristallographie que le CTV-1N est en position saddle sans bloquer l'obtention du cryptophane correspondant, on peut se demander pourquoi il n'en est pas de même pour les composés avec deux azotes. Pour cela une étude cinétique des réactions de cyclotrimérisation des cryptophanes pourrait être envisagée.

Enfin pour les CTV entièrement azotés, de nouvelles voies de synthèse sont actuellement envisagées, notamment en protégeant entièrement les trois atomes d'azotes.

La combinaison de la méthode de synthèse de CTV de symétrie C_1 et l'ajout d'azote dans la structure peut ouvrir la voie à des structures de cryptophanes plus complexes permettant par exemple de la multi fonctionnalisation à la fois pas l'azote et les cycles aromatiques et des applications en imagerie multimodale.

Partie expérimentale

Materials and Methods

- Reactants and reagents

All reagents and solvents were obtained from commercial suppliers and were used without further purification, unless stated otherwise. N-BuLI and t-Buli were titrated prior tu use according to the described procedure.[221] Water or air sensitive reaction were performed under inert atmosphere, using dry solvents and flushed under nitrogen prior to use. Column chromatography was carried out on a column using silica gel 60 Merck (0.063-0.200 mm), neutral alumina (0.050-0.200 mm), or RP-18 (0.050 mm). The microwave reactions were performed using a Biotage Initiator or an Anton Paar Monowave 400 microwave oven.

- LC-MS analyses

LC-MS analyses were performed using a Waters Alliance 2695 (Waters corporation, Milford, MA, USA) as separating module (column XBridge C18 2.5 µM/4.6 × 50 mM), with a flow rate of 0.8 mL/min, using the following gradients: A (95%)/B (5%) to A (5%)/B (95%) in 4.00 min. This ratio was hold during 1.50 min before return to initial conditions in 0.50 min. Initial conditions were then maintained for 2.00 min (A = H_2O, B = CH_3CN; each containing HCOOH: 0.1%).

- ^{1}H, ^{13}C, ^{129}Xe NMR spectrometer

NMR spectra were recorded at 400 MHz (Bruker Advance III 400 MHz) for ^{1}H NMR, 100 MHz for ^{13}C NMR and at 100 MHz for ^{129}Xe with chemical shift (δ) given in parts per million (ppm) standard and recorded at 295 K. $CDCl_3$, $(CD_3)_2SO$, $(CD_3)_2CO$, or $(CDCl_2)_2$ were used as solvent. The following abbreviations are used to describe peak splitting patterns when appropriate: br=broad, s=singlet, d=doublet, t=triplet, q=quartet, m=multiplet, dd=doublet of doublet, dt=doublet of triplet. Coupling constants *J* are reported in hertz units (Hz).

- Melting point apparatus

Melting points were measured on a Stuart Automatic Melting point SMP-50 apparatus.

- Mass spectrometry

High resolution mass spectra (HRMS) were obtained by atmospheric solids analysis probe (HRMS/ASAP), or by positive electrospray ionisation (HRMS/ ESI) on a Bruker maXis mass spectrometer.

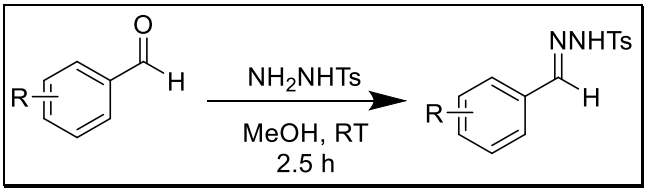
[221] Suffert, J., *Simple Direct Titration of Organolithium Reagents Using N-Pivaloyl-o-Toluidine and/or N-Pivaloyl-o-Benzylaniline*, J. Org. Chem., **1989**, Vol. 54 (2), 509–510.

- Hyper Polarized xenon experiments

HP ^{129}Xe were produced using a home-build HP ^{129}Xe polarizer operating under a continuous recirculating flow at 50 ml/min of a gas mixture containing 90% He, 6% N_2 and 4% of natural abundance xenon at a total pressure of 1.5 atm, directly connected to the sample inside the NMR Spectrometer. HP ^{129}Xe NMR spectra were recorded on a 9.6T Bruker AVIII spectrometer equipped with a Bruker 10mm BBO probehead. For variable temperature (VT) experiments, the temperature variation was limited to a slope of 5K per minute. Once the desired temperature achieved, a waiting delay of about 10 min was necessary to ensure a homogenous temperature all over the sample. A solenoid valve controlled by the spectrometer and synchronized with the NMR pulse sequence permit to by-pass the sample and hence working in an interrupted flow mode during acquisition time.

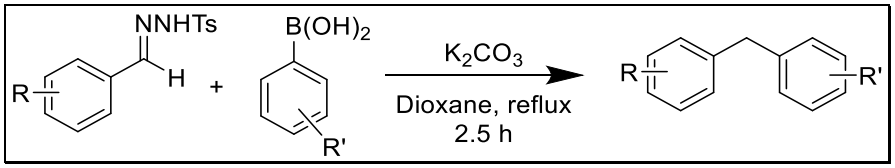
General procedures

1. Tosylhydazones synthesis – General procedure A



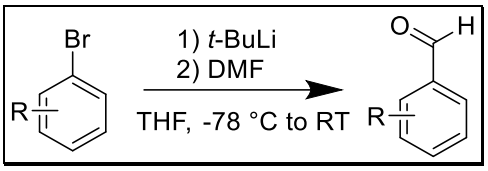
In a round bottom flask, *para*-toluene sulfonylhydrazide (1.05 equiv.) was solubilized in methanol (1.5 mL/mmol). Substituted benzaldehyde (1.00 equiv.) was added to the solution, the resulting mixture was stirred for 2.5 h. The resulting mixture was evaporated to dryness, dissolved in a small portion of diethyl ether. The solid was filtered, and the expected product was obtained.

2. Barluenga Boronic Coupling – General procedure B



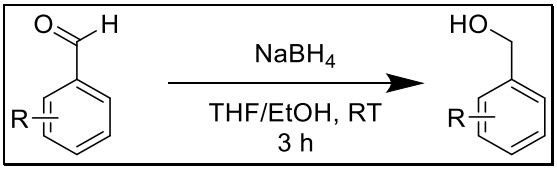
In a round bottom flask, substituted *para*-toluene sulfonylhydrazone (1.00 equiv.) was solubilized in dioxane (15 mL/mmol). Potassium carbonate (4 equiv.) and boronic acid (1.5 equiv.) were added to the solution, and the reaction mixture was heated at reflux for 2.5 h. The resulting mixture was allowed to reach room temperature and an aqueous saturated solution of sodium bicarbonate was added (15 mL/mmol). The mixture was extracted three times with ethyl acetate. The organic layers were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated under vacuum. The crude mixture was purified using silica chromatography using cyclohexane/ethyl acetate as the eluent, affording the expected product.

3. Metal-halogen exchange – General procedure C



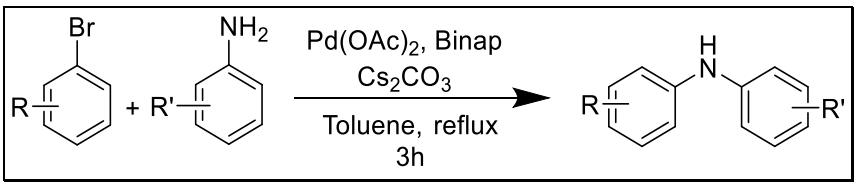
In a round bottom flask placed under nitrogen atmosphere, *t*-BuLi 1.7 M in *n*-hexane (1.2 equiv.) was added to a solution of substituted bromobenzene (1 equiv.) in anhydrous THF (15 mL/mmol) at -78 °C. The solution was stirred for 1 hour and anhydrous DMF (10 equiv.) was added. The mixture was stirred at -78 °C for 2h and subsequently warm to room temperature over 1 hour. The reaction was quenched with water, extracted with EtOAc, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. The crude mixture was purified using silica chromatography using cyclohexane/ethyl acetate as the eluent, affording the expected product.

4. Aldehyde reduction – General procedure D



In a round bottom flask, sodium borohydride (1.5 equiv.) was added to a solution of substituted aldehyde (1 equiv.) in a 1/1 mixture THF/EtOH (10 mL/mmol) at 0 °C and the solution was stirred at room temperature for 3 h. The solution was quenched with an aqueous saturated solution of NH_4Cl and extracted with ethyl acetate. The combined organic phases were washed with water and brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. The crude mixture was purified using silica chromatography using cyclohexane/ethyl acetate as the eluent, affording the expected product.

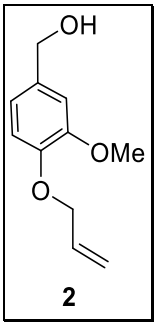
5. Buchwald - Hartwig coupling – General procedure E



In a round bottom flask placed under nitrogen atmosphere, substituted bromophenol (1 equiv.), substituted aminophenol (1 equiv.), palladium acetate (0.1 equiv.), 2,2′-bis(diphenylphosphino)-1,1′-binaphthyl (0.2 equiv.) and cesium carbonate (3 equiv.) in anhydrous toluene (5 mL/mmol) was heated to reflux for 3 h. The solution was filtrated through a pad of SiO_2 using ethyl acetate as eluent and concentrated under vacuum. The

crude mixture was purified using silica chromatography using cyclohexane/Et_2O as the eluent, affording the expected product.

4-Allyoxy-3-methoxy benzyl alcohol 2



Chemical Formula: $C_{11}H_{14}O_3$
Molecular weight: 194.23 g/mol

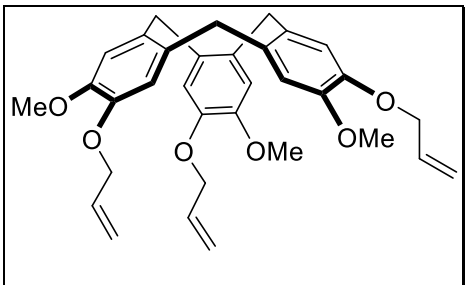
Vanillyl alcohol (10.0 g, 64.8 mmol) and allyl bromide (8.4 mL, 97.2 mmol) were refluxed in acetone (150 mL) in presence of potassium carbonate (26.9 g, 194.4 mmol) for 18 h. The solvent was removed under vacuum, the residue was dissolved in dichloromethane, washed with water and brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification by recrystallization in diethyl ether afforded the product as a white solid (12.5 g, 99%).

^{1}**H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 6.94 (s, 1H), 6.86 (s, 2H), 6.12-6.04 (m, 1H), 5.41 (dd, *J* = 14.6, 1.2, 1H), 5.29 (dd, *J* = 8.1, 1.2, 1H), 4.62 (m, 4H), 3.89 (s, 3H), 1.63 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H).

^{13}**C NMR** (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 149.6, 147.6, 134.0, 133.3, 119.3, 118.0, 113.4, 110.9, 70.0, 65.3, 55.9.

Data consistent with literature values.[115]

12-Tris-allyloxy-3, 8, 13-trimethoxy-10,15-dihydro-*5H*-tribenzo-[*a*,*d*,*g*]cyclononene 3



3

Chemical Formula: $C_{33}H_{36}O_6$
Molecular weight: 528.65 g/mol

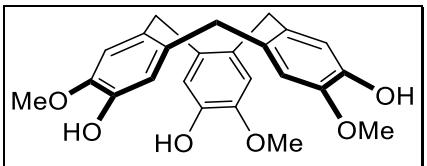
To a stirred solution of **2** (10.0 g, 51.7 mmol) in methanol (65 mL) at 0 °C was added perchloric acid (60%, 31 mL) dropwise. The resulting pink solution was stirred at room temperature for 18 h, affording a white precipitate. The mixture was poured into water and the product was extracted with dichloromethane, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification by trituration in diethyl ether afforded the product as a white powder (6.8 g, 75%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 6.86 (s, 3H), 6.80 (s, 3H), 6.10-6.02 (m, 3H), 5.39 (m, 3H), 5.25 (m, 3H), 4.75 (d, *J* = 13.8 Hz, 3H), 4.59 (m, 6H), 3.83 (s, 9H), 3.53 (d, *J* = 13.8 Hz, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 148.5 (3C), 134.0 (3C), 147.1 (3C), 132.6 (3C), 132.0 (3C), 117.7 (3C), 115.0 (3C), 114.0 (3C), 70.5 (3C), 56.4 (3C), 36.8 (3C).

Data consistent with literatures values.[115]

3, 8, 13-Trimethoxy-10,15-dihydro-*5H*-tribenzo [*a*,*d*,*g*]cyclononene-2, 7, 12-triol 4



4

Chemical Formula: $C_{24}H_{24}O_6$
Molecular weight: 408.65 g/mol

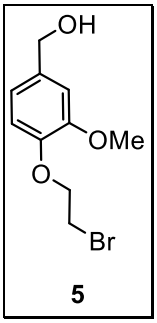
3 (7.7 g, 14.6 mmol), palladium acetate (214 mg, 0.95 mmol), triphenylphosphine (737 mg, 2.75 mmol) and diethylamine (69.5 mL) were dissolved in THF (180 mL), and water (37 mL) and the solution was stirred at 80 °C under a nitrogen atmosphere for 3 h. The solvent was removed under vacuum and the product was extracted with ethyl acetate, washed with water and filtrated with filter paper to remove insoluble material. The combined organic layers were washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum to afforded a yellow solid, which was filtered and washed three times with diethyl ether to afford the product as a light brown solid (4.8 g, 75 %).

^{1}H NMR (400 MHz, $(CD_3)_2CO$): δ = 6.99 (s, 3H), 6.92 (s, 3H), 4.73 (d, *J* = 13.5 Hz, 3H), 3.79 (s, 9 H), 3.43 (d, *J* = 13.5 Hz, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, $(CD_3)_2CO$): δ = 145.2 (3C), 144.1 (3C), 132.4 (3C), 131.2 (3C), 115.4 (3C), 112.2 (3C), 55.0 (3C), 36.3 (3C).

Data consistent with literature values.[107]

[4-(2-Bromoethoxy)-3-methoxyphenyl] methanol 5



Chemical Formula: $C_{10}H_{13}BrO_3$
Molecular weight: 261.12 g/mol

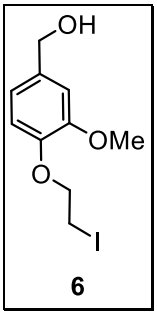
Potassium carbonate (16.0 g, 269 mmol) was added to a solution of vanillyl alcohol (10.0 g, 55.8 mmol) in acetone (100 mL) placed under nitrogen atmosphere. The mixture was stirred at room temperature for 30 min. Dibromoethane (25 mL, 279 mmol) was added in one portion and the resulting mixture was heated overnight at 55 °C. The reaction mixture was poured into water and the product was extracted with ethyl acetate. The organic layers were combined and washed with a solution of NaOH (1M in water), water and brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification by chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 80/20) afforded the product as a white solid (13.0 g, 77%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 6.96 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 6.90 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.88 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H), 4.63 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 4.33 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.66 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.65 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 150.0, 147.0, 135.3, 119.5, 114.8, 111.3, 69.4, 65.2, 56.1, 29.0.

Data consistent with literatures values.[86]

[4-(2-Iodoethoxy)-3-methoxyphenyl]methanol 6



Chemical Formula: $C_{10}H_{13}IO_3$
Molecular weight: 308.12 g/mol

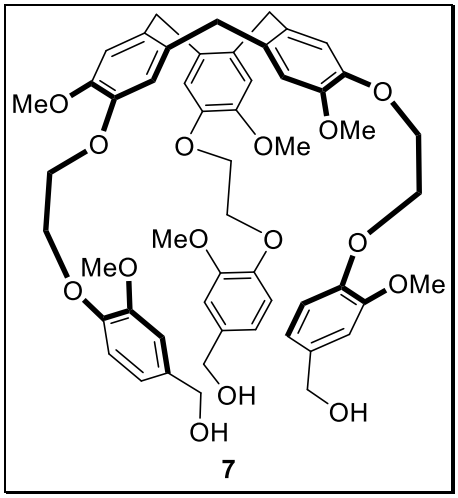
Sodium iodide (15.0 g, 100.4 mmol) was added in one portion to the stirred solution of **5** (6.6 g, 25.1 mmol) in acetone (80 mL) placed under nitrogen atmosphere. The mixture was heated to 50 °C overnight. Upon reaction completion, the solvent was removed under vacuum. The resulting solid was dissolved in dichloromethane and washed with a saturated sodium thiosulfate solution, water and brine. The organic layers were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum to afford the product without further purification as a white solid (5.7 g, 98%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 6.95 (s, 1H), 6.87 (s, 2H), 4.63 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 4.30 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.45 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.65 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 150.0, 146.8, 135.2, 119.5, 114.8, 111.3, 70.4, 65.3, 56.1, 1.2.

Data consistent with literatures values.[107]

2,7,12-Trimethoxy-3,8,13-tris-{2-[2-methoxy-4-methoxy phenoxy]ethoxy}-10,15-dihydro-*5H*-tribenzo[*a*,*d*,*g*]cyclononene 7



Chemical Formula: $C_{54}H_{60}O_{15}$
Molecular weight: 949.06 g/mol

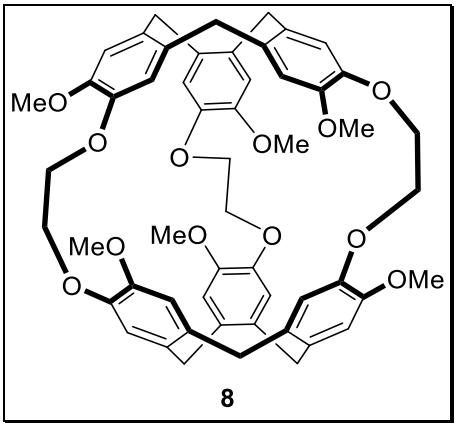
In a round bottom flask placed under nitrogen atmosphere, **6** (5.28 g, 17.1 mmol) was added to a stirred solution of **4** (1.25 g, 3.06 mmol) and cesium carbonate (5.6 g, 17.1 mmol) in anhydrous DMF (50 mL) placed under nitrogen atmosphere and the solution was heated for 18 h at 80 °C. The mixture was poured into water and the product was extract with ethyl acetate, washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification by chomatography on silica gel (EtOAc/MeOH, 100/0 to 90/10) afforded the product as a white solid (2.36 g, 81%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.00 (s, 3H), 6.90 (d, *J* = 1.9 Hz, 3H), 6.89 (s, 1H), 6.87 (s, 2H), 6.83 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 6.82 (s, 4H), 4.74 (d, *J* = 13.7 Hz, 3H), 4.61 (s, 6H), 4.36 (m, 12H), 3.77 (s, 9H), 3.70 (s, 9H), 3.53 (d, *J* = 13.7 Hz, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 149.7 (3C), 148.5 (3C), 147.5 (3C), 146.8 (3C), 133.2 (3C), 131.9 (3C), 119.4 (3C), 116.7 (3C), 114.0 (3C), 113.9 (3C), 113.8 (3C), 111.1 (3C), 68.2 (3C), 67.8 (3C), 65.2 (3C), 56.2 (3C), 55.8 (3C), 36.4 (3C).

Data consistent with literature values.[107]

Cryptophane A 8



Chemical Formula: $C_{54}H_{54}O_{12}$
Molecular weight: 895.01 g/mol

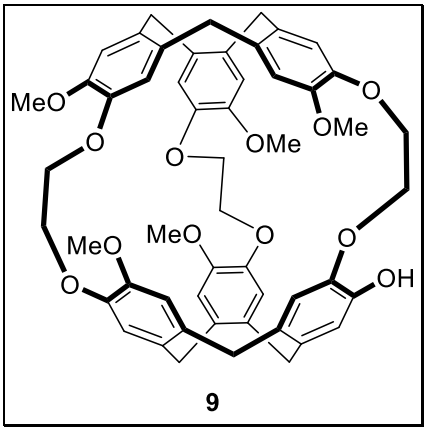
7 (300 mg, 0.31 mmol) was dissolved in chloroform (5 mL) and 305 mL of formic acid was added in one portion. The solution was heated to 60 °C for 3 h. The solvent was evaporated under vacuum and the crude residue was purified by chromatography on neutral alumina (DCM/EtOAc 90/10) to afford the product as a white solid (216 mg, 77%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 6.74 (s, 6H), 6.65 (s, 6H), 4.58 (d, *J* = 13.5 Hz, 6H), 4.15 (m, 12H), 3.78 (s, 18H), 3.39 (d, *J* = 13.5 Hz, 6H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 149.6 (6C), 146.6 (6C), 134.1 (6C), 131.6 (6C), 120.8 (6C), 113.7 (6C), 69.3 (6C), 55.7 (6C), 36.2 (6C).

Data consistent with literature values.[107]

Cryptophanol 9



Chemical Formula: $C_{53}H_{52}O_{12}$
Molecular weight: 880.99 g/mol

First procedure: Iodotrimethylsilane (53.2 µL, 0.32 mmol) was added in one portion to a stirred solution of **8** (500 mg, 0.56 mmol) in dichloromethane (10 mL). The solution was stirred in the dark overnight under nitrogen at room temperature. Dichloromethane was added and the solution was quenched with hydrochloric acid (1M), the organic layer was washed with water, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification on alumina neutral gel (DCM/EtOAc 90/10 to 0/100) afforded the product as a white solid (169 mg, 60%).

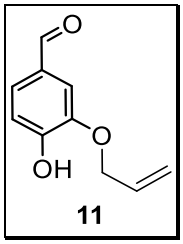
Second procedure: A solution of **17** (140 mg, 0.15 mmol), Palladium acetate (9 mg, 0.04 mmol), triphenylphosphine (20 mg, 0.07 mmol), diethylamine (2.2 mL), THF (5 mL), and water (1.4 mL) was stirred for 3 h at 80 °C. The solvent was removed under vacuum and the product was extracted with ethyl acetate, washed with water and filtrated to remove insoluble material. The organic layer was washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification by chromatography on silica gel (DCM/Acetone 100/0 to 95/5) afforded the product as a white solid (96 mg, 74%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 6.83 (s, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.76 – 6.72 (m, 4H), 6.68 (s, 1H), 6.67 (s, 1H), 6.66 (s, 1H), 6.65 (s, 1H), 6.64 (s, 1H), 6.62 (s, 1H), 5.37 (s, 1H), 4.65 – 4.50 (m, 6H), 4.45 (m, 1H), 4.29 – 4.02 (m, 11H), 3.80, (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.77 (s, 6H), 3.40 (m, 6H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 150.1, 149.9, 149.7, 149.6, 149.4, 146.84, 146.77, 146.7, 146.6, 146.2, 145.3, 144.1, 134.7, 134.5, 134.4, 134.1, 133.9, 133.7, 131.89, 131.88, 131.8, 131.5, 131.3, 131.2, 121.73, 121.68, 121.5, 121.03, 120.98, 116.4, 115.4, 114.0, 113.9, 113.7, 113.6, 113.5, 69.9, 69.8, 69.5, 69.4, 69.3, 68.6, 55.8, 55.75, 55.70, 55.65, 55.6, 36.5, 36.4, 36.3 (3C), 36.0.

Data consistent with literatures values.[138]

4-Hydroxy-3-(prop-2-en-1-yloxy)benzaldehyde 11



Chemical Formula: $C_{10}H_{10}O_3$
Molecular weight: 178.19 g/mol

To a suspension of sodium hydride 60 % (6.2 g, 155.0 mmol) in anhydrous DMF (18 mL), was slowly added at 0 °C to a solution of 3,4-dihydroxybenzaldehyde (10 g, 72.4 mmol) in anhydrous DMF (50 mL) placed under nitrogen atmosphere. After 30 minutes of stirring, allyl bromide (6.2 mL, 72.4 mmol) was added and the reaction was stirred at room temperature for 18 h. The reaction was quenched with water and a solution of hydrochloric acid (1M) was added until reaching pH 2. The organic layer was extracted with ethyl acetate, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification by chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 90/10 to 70/30) afforded the product as a white solid (6.92 g, 60%).

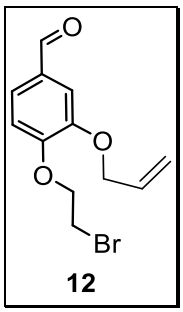
^{1}**H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 9.82 (s, 1H), 7.44 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.05 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.26 (s, 1H) 6.18 – 6.08 (m, 1H), 5.46 (dd, *J* = 17.3, 1.2 Hz, 1H), 5.38 (dd, *J* = 10.5, 1.2 Hz, 1H), 4.68 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H)

^{13}**C NMR** (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 190.8, 151.8, 146.0, 131.9, 129.8, 127.5, 119.1, 114.6, 110.2, 69.9.

Data consistent with literature values.[222]

[222] Spence, M. M. et al., *Development of a Functionalized Xenon Biosensor*, J. Am. Chem. Soc., **2004**, Vol. 126 (46), 15287–15294.

4-(2-Bromoethoxy)-3-(prop-2-en-1- yloxy)benzaldehyde 12



Chemical Formula: $C_{12}H_{13}BrO_3$
Molecular weight: 285.14 g/mol

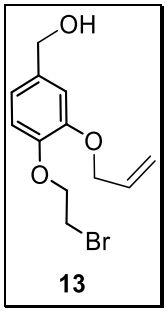
11 (6.03 g, 33.8 mmol) and K_2CO_3 (23.5 g, 169 mmol) was dissolved in acetone (55 mL), 1 ,2 – Dibromoethane (11.4 mL, 135.2 mmol) was added and the reaction was stirred at 60 °C for 18 h. The reaction was allowed to reach room temperature, diethyl ether was added and the organic layer was extracted, washed with hydrochloric acid (1M), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification by chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 90/10) afforded the product as a yellow oil (5.84 g, 61%).

^{1}**H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 9.85 (s, 1H), 7.46 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.44 (s, 1H), 6.99 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.18 – 6.07 (m, 1H), 5.44 (dd, *J* = 17.3, 1.2 Hz, 1H), 5.30 (dd, *J* = 10.5, 1.2 Hz, 1H), 4.65 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H), 4.40 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.68 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H).

^{13}**C NMR** (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 190.8, 153.3, 148.8, 132.6, 130.6, 126.4, 117.8, 112.9, 112.1, 69.7, 68.8, 28.7.

Data consistent with literatures values.[222]

[4-(2-Bromoethoxy)-3-(prop-2-en-1-yloxy)phenyl]methanol 13



Chemical Formula: $C_{12}H_{15}BrO_3$
Molecular weight: 287.15 g/mol

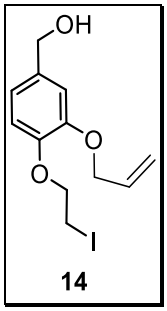
Prepared from **12** (5.84 g, 20.5 mmol), following general procedure D, the expected product was obtained as a white solid (5.70 g, 97%).

^{1}**H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 6.96 – 6.89 (m, 3H), 6.18 – 6.07 (m, 1H), 5.44 (dd, *J* = 17.3, 1.2 Hz, 1H), 5.30 (dd, *J* = 10.5, 1.2 Hz, 1H), 4.55 – 4.65 (m, 4H), 4.33 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.65 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H).

^{13}**C NMR** (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 148.9, 147.3, 135.3, 133.2, 119.9, 117.7, 115.6, 113.5, 69.9, 69.6, 64.7, 29.4.

Data consistent with literatures values.[222]

[4-(2-Iodoethoxy)-3-(prop-2-en-1- yloxy)phenyl]methanol 14



Chemical Formula: $C_{12}H_{15}IO_3$
Molecular weight: 334.15 g/mol

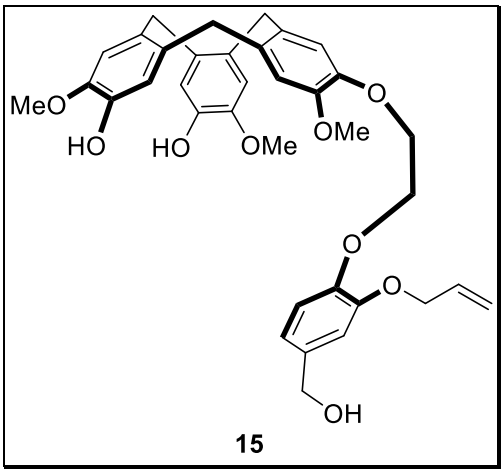
13 (5.70 g, 19.9 mmol) and sodium iodide (11.92 g, 79.5 mmol) was dissolved in acetone (76 mL) and the solution was heated at 50 °C overnight. The solvent was evaporated and the crude residue was dissolved in dichloromethane, washed with sodium thiosulfate and brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum to afford the product as a white solid (6.25 g, 97%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 6.94 – 6.88 (m, 3H), 6.18 – 6.07 (m, 1H), 5.44 (dd, *J* = 17.3 Hz, 1.2 Hz, 1H), 5.30 (dd, *J* = 10.5, 1.2 Hz, 1H), 4.55 – 4.65 (m, 4H), 4.27 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.42 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 148.9, 147.2, 135.2, 133.3, 119.9, 117.8, 115.5, 113.5, 70.4, 69.9, 65.0, 1.5.

Data consistent with literatures values.[211]

Compound 15



Chemical Formula: $C_{36}H_{38}O_9$
Molecular weight: 614.69 g/mol

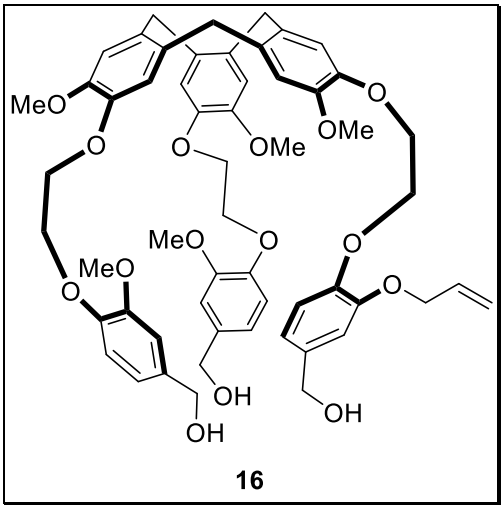
In a round bottom flask placed under nitrogen atmosphere, **14** (0.82 g, 2.45 mmol) was added to a stirred solution of **4** (1.0 g, 2.45 mmol) and cesium carbonate (1.6 g, 4.9 mmol) in anhydrous DMF (50 mL) under nitrogen atmosphere. The solution was stirred at 80 °C overnight. The crude mixture was poured into water and extracted with ethyl acetate, washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification by chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 50/50 to 0/100) afforded the product as a with powder (0.4 g, 27%).

^{1}**H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 6.95 (s, 1H), 6.92 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.88 (d, *J* = 2.8 Hz, 2H), 6.87 – 6.80 (m, 3H), 6.77 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H), 6.00 (m, 1H), 5.59 (s, 1H), 5.56 (s, 1H), 5.36 (dd, *J* = 17.3, 1.6 Hz, 1H), 5.21 (dd, *J* = 10.5, 1.4 Hz, 1H), 4.69 (m, 3H), 4.58 (m, 3H), 4.53 (m, 2H), 4.33 (m, 4H), 3.81 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 3.53 – 3.44 (m, 3H).

^{13}**C NMR** (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 149.0, 148.7, 148.3, 146.8, 145.39, 145.35, 144.3, 144.2, 134.6, 133.5, 133.2, 132.6, 132.4, 132.1, 131.4, 131.3, 120.1, 117.7, 116.8, 115.7, 115.6, 114.8, 114.0, 113.6, 112.34, 112.31, 70.1, 68.3, 68.0, 65.3, 56.4, 56.19, 56.18, 36.5, 36.4, 36.3.

Data consistent with literatures values.[211]

Compound 16



Chemical Formula: $C_{56}H_{62}O_{15}$
Molecular weight: 975.10 g/mol

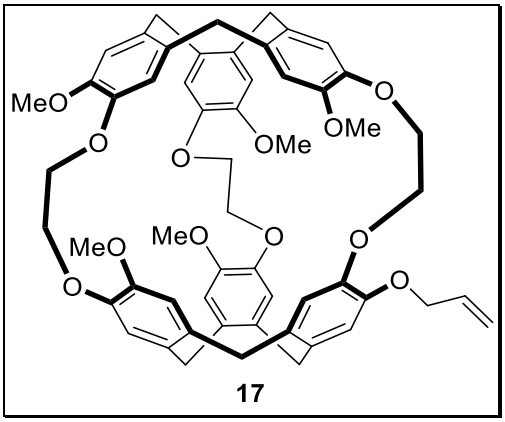
In a round bottom flask placed under nitrogen atmosphere, **6** (400 mg, 1.3 mmol) was added to a stirred solution of **15** (200 mg, 0.325 mmol) and cesium carbonate (425 mg, 1.3 mmol) in anhydrous DMF (15 mL) under nitrogen atmosphere. The solution was stirred at 80 °C overnight. The crude mixture was poured into water and extracted with ethyl acetate, washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification by chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 50/50 to 0/100) afforded the product as a withe powder (194 mg, 61%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 6.93 (s, 2H), 6.89 (s, 1H), 6.83 (m, 5H), 6.79 (m, 2H), 6.77 – 6.71 (m, 5H), 5.93 (m, 1H), 5.28 (dd, *J* = 17.3, 1.6 Hz, 1H), 5.13 (dd, *J* = 10.5, 1.4 Hz, 1H), 4.66 (d, *J* = 13.7 Hz, 3H), 4.51 (m, 6H), 4.46 (dt, *J* = 5.3, 1.4 Hz, 2H), 4.34 – 4.22 (m, 12H), 3.70 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 3.64 (s, 3H), 3.62 (s, 6H), 3.46 (d, *J* = 13.8 Hz, 3H), 1.87 (m, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 149.6 (3C), 148.7, 148.5, 148.4, 147.9, 147.3 (2C), 146.79, 146.78, 146.77, 134.8, 134.7 (2C), 133.4, 133.05, 133.03, 133.01, 132.0, 131.9, 119.9, 119.3 (3C), 117.6, 116.6, 116.4, 114.7, 113.8 (3C), 113.4, 111.0 (3C), 69.9 (2C), 68.2 (2C), 68.1, 67.9, 67.8 (2C), 65.0 (2C), 64.9, 56.2 (2C), 56.1, 55.8 (2C), 36.4 (3C), 30.9.

Data consistent with literatures values.[211]

Cryptohane-OAllyl 17



Chemical Formula: $C_{56}H_{56}O_{12}$
Molecular weight: 921.05 g/mol

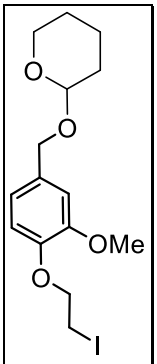
Formic acid (150 mL) was added in one portion to a solution of **16** (147 mg, 0.16 mmol) in chloroform (10 mL). The solution was stirred for 2.5 h at 55 °C. The solvent was evaporated under vacuum and the residue purified by chromatography on alumina neutral gel (DCM/EtOAc 90/10) to afforded the product as a white glassy powder. (52 mg, 38%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 6.79 (s, 1H), 6.75 (dd, *J* = 4.8, 3.1 Hz, 4H), 6.72 (d, *J* = 3.5 Hz, 2H), 6.68 – 6.65 (m, 5H), 6.10 – 5.99 (m, 1H), 5.47 (dd, *J* = 17.3, 1.6 Hz, 1H), 5.34 (dd, *J* = 10.6, 1.5 Hz, 1H), 4.65 – 4.53 (m, 6H), 4.53 – 4.42 (m, 2H), 4.24 – 4.08 (m, 12H), 3.81 – 3.79 (m, 9H), 3.79 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.39 (m, 6H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 149.84, 149.79, 149.71, 149.68, 149.65, 149.0, 147.3, 146.8, 146.7 (2C), 146.6, 134.5, 134.33, 134.25, 134.24, 134.19, 134.1, 133.9 (2C), 132.4, 131.8, 131.7, 131.6 (2C), 131.5, 122.1, 121.36, 121.32, 120.6, 120.59, 120.56, 117.1 (2C), 116.7, 114.3, 113.8, 113.7 (2C), 70.1, 69.7, 69.6, 69.5, 69.40, 69.36, 69.3, 56.3, 55.9, 55.79, 55.76, 55.7, 36.3 (6C).

Data consistent with literatures values. [211]

2-{[4-(2-Iodoethoxy)-3-methoxyphenyl]methoxy}oxane 18



18

Chemical Formula: $C_{15}H_{21}IO_4$
Molecular weight: 392.24 g/mol

Pyridinium *p*-toluenesulfonate (PPTS) (327 mg, 1.3 mmol) in dichloromethane (8 mL) was added to a stirred solution of **6** (4,0 g, 12.98 mmol) and dihydropyran (DHP) (1.64 g, 19.47 mmol) in THF (48 mL) placed under nitrogen atmosphere. The solution was stirred at room temperature overnight. The solvent was removed under vacuum and the residue extracted with diethyl ether. The organic layer was washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification by filtration on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 80/20) afforded the product as a white powder (5.05 g, 99%).

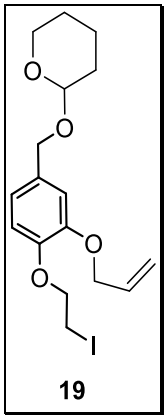
^{1}**H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 6.93 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 6.93 – 6.83 (m, 2H), 4.72 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 4.69 (dd, *J* = 4.3, 3.0 Hz, 1H), 4.44 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 4.29 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.60 – 3.50 (m, 1H), 3.41 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.93 – 1.79 (m, 1H), 1.74 (m, 1H), 1.70 – 1.48 (m, 5H).

^{13}**C NMR** (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 149.8, 146.7, 132.4, 120.6, 114.7, 112.2, 97.7, 70.3, 68.7, 62.3, 56.1, 30.7, 25.5, 19.5, 1.2.

Data consistent with literatures values.[223]

[223] Brotin, T. et al., *Synthesis of Deuterium-Labeled Cryptophane-A and Investigation of Xe@Cryptophane Complexation Dynamics by 1D-EXSY NMR Experiments*, Chemistry (Easton)., **2001**, Vol. 7 (7), 1561–1573.

2-[3-Allyloxy-4-(2-iodoethoxy)benzyloxy]tetrahydropyran 19



Chemical Formula: $C_{17}H_{23}IO_4$
Molecular weight: 418.27 g/mol

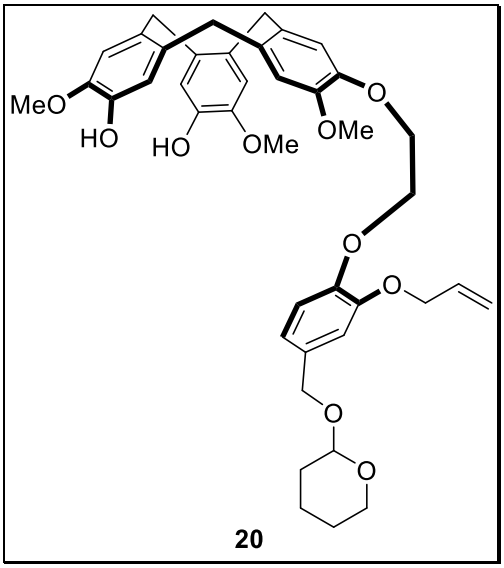
Pyridinium *p*-toluenesulfonate (PPTS) (0.47 g, 1.87 mmol) in dichloromethane (12 mL) was added in one portion to a stirred solution of **14** (6.25 g, 18.7 mmol) and dihydropyran (DHP) (2.36 g, 28.1 mmol) in THF (75 mL) placed under nitrogen atmosphere. The solution was stirred at room temperature overnight. The solvent was removed under vacuum and the crude residue extracted with diethyl ether. The organic layer was washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification by chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 90/10 to 70/30) afforded the product as a colorless oil (6.38 g, 82%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 6.93–6.85 (m, 3H), 6.18 – 6.07 (m, 1H), 5.41 (dd, *J* = 17.3, 1.6 Hz, 1H), 5.26 (dd, *J* = 10.5, 1.4 Hz,1H), 4.68 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.66 (m, 1H), 4.59 (m, 2H), 4.40 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.27 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.90 (m, 1H), 3.53 (m, 1H), 3.41 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.88–1.78 (m, 1H), 1.76–1.66 (m, 1H), 1.64–1.46 (m, 4H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 148.9, 147.3, 133.4, 132.5, 121.1, 117.8, 115.6, 114.6, 97.7, 70.5, 70.1, 68.7, 62.4, 30.7, 25.6, 19.6, 1.6.

Data consistent with literatures values.[223]

Compound 20



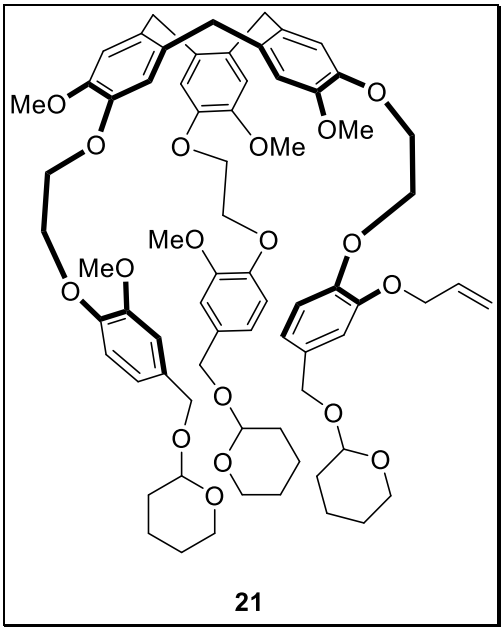
Chemical Formula: $C_{41}H_{46}O_{10}$
Molecular weight: 698.81 g/mol

In a round bottom flask placed under nitrogen atmosphere, **19** (1.02 g, 2.45 mmol) was added to a stirred solution of **4** (1.0 g, 2.45 mmol) and cesium carbonate (1.6 g, 4.9 mmol) in anhydrous DMF (50 mL) under nitrogen atmosphere. The solution was stirred at 80 °C overnight. The crude mixture was poured into water and extracted with ethyl acetate, washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification by chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 60/40 to 40/60) afforded the product as a withe powder (0.53 g, 35%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.00 – 6.96 (m, 1H), 6.95 – 6.92 (m, 1H), 6.91 – 6.87 (m, 4H), 6.83 (s, 1H), 6.78 (m, 2H), 6.09 – 5.96 (m, 1H), 5.44 (s, 1H), 5.38 (m, 1H), 5.26 – 5.18 (m, 1H), 4.71 (m, 5H), 4.62 – 4.52 (m, 2H), 4.43 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 4.38 – 4.28 (m, 3H), 3.92 (m, 1H), 3.87 – 3.80 (m, 9H), 3.76 – 3.68 (m, 2H), 3.59 – 3.45 (m, 3H), 1.85 (m, 1H), 1.72 (m, 1H), 1.67 – 1.60 (m, 3H), 1.58 – 1.50 (m, 2H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 148.6, 148.5, 148.1, 146.8, 145.37, 145.33, 144.3, 144.2, 134.6, 133.5, 133.1, 132.5, 132.3, 132.1, 131.7, 131.3, 121.1, 117.64, 117.62, 116.6, 115.6, 114.51, 114.45, 113.9, 112.33, 112.27, 97.8, 70.1, 68.6, 68.1, 67.8, 62.3, 56.2, 56.0 (2C), 36.4, 36.3 (2C), 30.6, 25.5, 19.5.

Compound 21



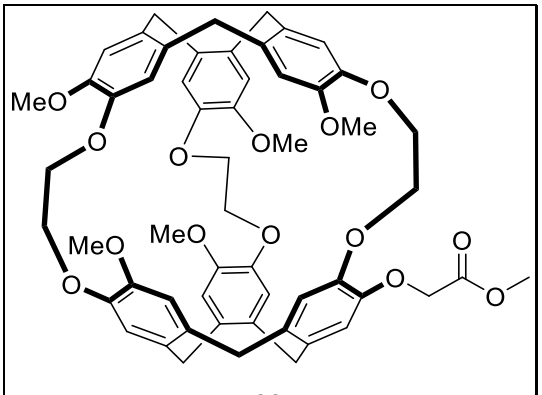
Chemical Formula: $C_{71}H_{86}O_{18}$
Molecular weight: 1227.45 g/mol

In a round bottom flask placed under nitrogen atmosphere, **18** (400 mg, 1.3 mmol) was added to a stirred solution of **20** (200 mg, 0.325 mmol) and cesium carbonate (425 mg, 1.3 mmol) in anhydrous DMF (15 mL) under nitrogen atmosphere. The solution was stirred overnight at 80°C. The crude mixture was poured into water and extracted with ethyl acetate, washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification by chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 50/50 to 0/100) afforded the product as a withe powder (194 mg, 61%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.03 (s, 2H), 6.99 (s, 1H), 6.96 – 6.91 (m, 3H), 6.91 (m, 5H), 6.87 (s, 1H) 6.86 – 6.84 (m, 2H), 6.83 (s, 1H), 6.05 (m, 1H), 5.39 (dd, *J* = 10.5, 1.6 Hz, 1H), 5.23 (dd, *J* = 10.5, 1.4 Hz, 1H), 4.78 – 4.66 (m, 9H), 4.60 (dt, *J* = 5.3, 1.3 Hz, 2H), 4.43 (m, 3H), 4.36 (m, 12H), 3.92 (m, 3H), 3.87 (s, 6H), 3.74 (s, 9H), 3.58 – 3.49 (m, 6H), 1.85 (m, 3H), 1.79 – 1.69 (m, 3H), 1.68 – 1.48 (m, 12H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 149.6 (2C), 148.71, 148.66, 148.62, 148.60, 148.2, 147.7 (2C), 147.0 (2C), 146.9, 133.6 (2C), 133.08 (2C), 133.07, 131.9 (2C), 131.8, 131.7 (2C), 121.1, 120.7 (2C), 117.7 (2C), 116.7 (2C), 116.6, 114.6, 114.5, 114.0, 113.9, 113.7 (2C), 112.0 (2C), 97.72, 97.71, 97.65, 70.1 (2C), 68.8 (2C), 68.7 (2C), 68.3 (2C), 68.2, 67.9, 67.8 (2C), 62.4 (2C), 62.3, 56.3, 56.3 (2C), 56.0 (2C), 36.5, 30.7 (3C), 25.6 (3C), 19.6 (3C).

Cryptophane-methylacetate 22



22

Chemical Formula: $C_{56}H_{56}O_{14}$
Molecular weight: 953.05 g/mol

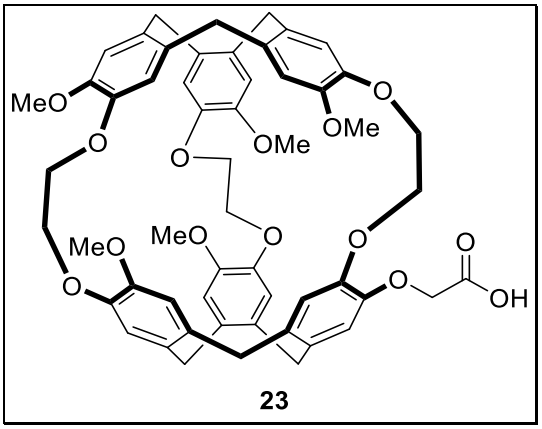
Methyl bromoacetate (190 µL, 1.89 mmol) was added to a solution of **9** (300 mg, 0.34 mmol) and cesium carbonate (240 mg, 0.68 mmol) in anhydrous DMF (12 mL) under nitrogen atmosphere. The solution was heated overnight at 80 °C. The crude mixture was poured into water, the product was extracted with ethyl acetate, washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification by chromatography over silica gel (DCM/EtOAc 100/0 to 90/10) afforded the product as a white solid (296 mg, 91%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 6.80 – 6.73 (m, 6H), 6.72 – 6.68 (m, 2H), 6.68 – 6.63 (m, 4H), 4.65 – 4.49 (m, 8H), 4.26 – 4.09 (m, 12H), 3.88 – 3.71 (m, 18H), 3.45 – 3.33 (m, 6H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 169.35, 149.95, 149.81, 149.77, 149.72, 149.54, 147.90, 147.72, 146.91, 146.84, 146.71, 146.66, 134.37, 134.27, 134.24, 134.21, 134.13, 134.09, 133.90, 131.92, 131.77, 131.67, 131.59, 131.38, 121.66, 121.60, 121.33, 121.28, 120.90, 120.88, 120.83, 120.25, 118.39, 114.81, 113.79, 113.76, 113.74, 69.62, 69.55, 69.49, 69.44, 69.41, 69.14, 67.23, 56.28, 55.81 (2C), 55.73, 55.69, 52.23, 36.30 (6C).

Data consistent with literature.[222]

Cryptophane-carboxylic acid 23



Chemical Formula: $C_{55}H_{54}O_{14}$
Molecular weight: 939.02 g/mol

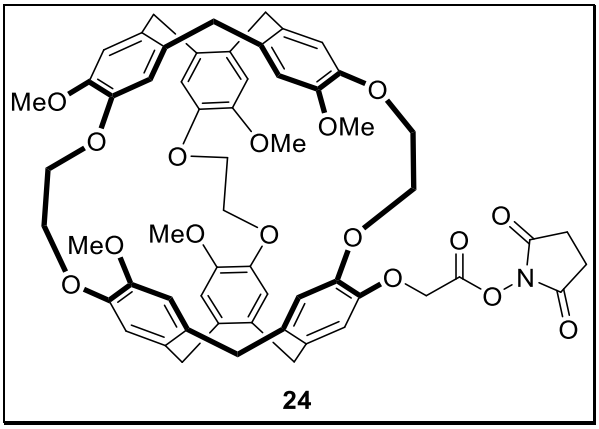
22 (185 mg, 0.194 mmol) was dissolved in THF (8 mL), potassium hydroxide (218 mg, 3.88 mmol) was added and the mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction was quenched with hydrochloric acid (1M), extracted with dichloromethane, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. The product was obtained without further purification as a white solid (173 mg, 95%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 6.84 (d, *J* = 4.7 Hz, 3H), 6.77 – 6.71 (m, 3H), 6.70 – 6.63 (m, 6H), 4.75 – 4.49 (m, 8H), 4.37 – 4.11 (m, 10H), 4.09 – 3.96 (m, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.83 – 3.71 (m, 12H), 3.46 – 3.34 (m, 6H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 170.9, 149.8, 149.68, 149.65, 149.6, 148.30, 148.25, 148.0, 146.9, 146.8, 146.7, 146.4, 135.0, 134.7, 134.6, 134.1, 134.0, 133.8, 133.7, 133.2, 131.9, 131.7, 131.3, 131.2, 122.6, 122.3, 120.9, 120.84, 120.75, 120.21, 120.17, 115.2, 115.1, 113.82, 113.78, 113.7, 113.5, 70.0, 69.7, 69.4, 69.2, 69.1, 68.1, 65.9, 59.5, 55.9, 55.8, 55.7, 55.6, 36.34 (4C), 36.25, 36.0.

Data consistent with literature values.[222]

Cryptophane-NHS 24



Chemical Formula: $C_{59}H_{57}NO_{16}$
Molecular weight: 1036.10 g/mol

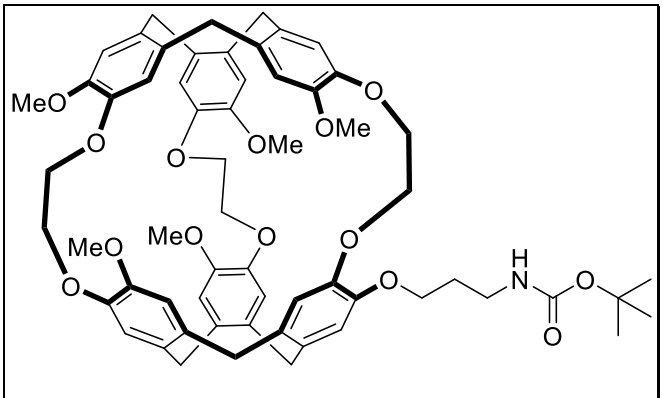
24 (80 mg, 0.09 mmol) was dissolved in dichloromethane (1.5 mL), N,N'-Disuccinimidyl carbonate (DSC) (64 mg, 0.26 mmol) and N, N-diisopropylethylamine (DIPEA) (38 µL, 0.22 mmol) were added to the mixture and the solution was stirred 48 h at room temperature. Dichloromethane was added and the solution was washed with saturated aqueous solution of $NaHCO_3$, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification by reversed phase chromatography on C18 silica gel (acetonitrile/H_2O 5/95 to 100/0) afforded the product as a light yellow powder (20 mg, 21%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 6.80 (s, 2H), 6.78 (s, 1H), 6.77 (s, 1H), 6.77 – 6.73 (m, 3H), 6.71 (s, 1H), 6.69 – 6.64 (m, 4H), 4.88 (q, *J* = 16.8 Hz, 2H), 4.58 (m, 6H), 4.30 – 4.07 (m, 12H), 3.79 (m, 12H), 3.75 (s, 3H), 3.48 – 3.35 (m, 6H), 2.93 (s, 4H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 168.9 (2C), 164.9, 150.1, 149.8, 149.75, 149.74, 149.6, 147.8, 147.5, 146.88, 146.86, 146.7 (2C), 146.6, 135.1, 134.7, 134.33, 134.32, 134.2, 134.1, 133.8, 131.9, 131.72, 131.68, 131.59, 131.49, 121.7, 121.4, 121.2, 121.0, 120.8, 120.6, 119.2, 114.6, 113.81 (2C), 113.78, 113.6, 69.7, 69.6, 69.49, 69.43, 69.39, 69.2, 65.9, 56.3, 55.84, 55.81, 55.78, 55.74, 53.6, 36.4, 36.3 (2C), 35.9, 29.8, 25.8 (2C).

HRMS-ESI calculated for $C_{59}H_{57}NO_{16}$ [$M^{+\cdot}$] 1035.3677, found 1035.3694.

Cryptophane-NHBoc 25



25

Chemical Formula: $C_{61}H_{67}NO_{14}$
Molecular weight: 1038.20 g/mol

9 (100 mg, 0.11 mmol), 3-(Boc-amino) propyl bromide (136 mg, 0.57 mmol) and cesium carbonate (180 mg, 0.57 mmol) were dissolved in anhydrous DMF (8 mL) and the mixture was stirred 24 h at 80 °C. The reaction was quenched with water, extract with ethyl acetate, washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification over silica gel (DCM/EtOAc 100/0 to 85/15) afforded the product as a white powder (95 mg, 81%).

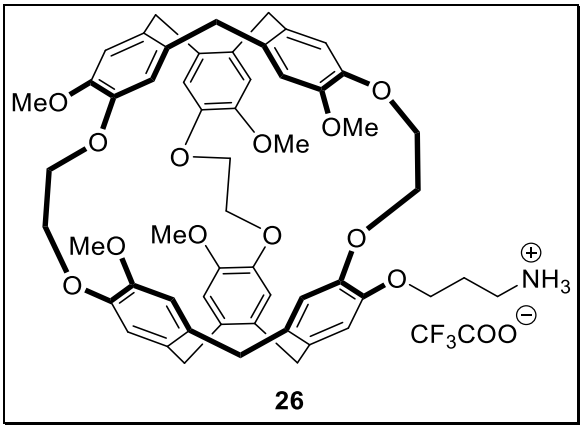
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 6.78 (s, 1H), 6.76 (s, 2H), 6.74 (s, 2H), 6.73 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 6.69 (s, 1H), 6.66 (m, 4H), 4.58 (m, 6H), 4.25 – 4.18 (m, 2H), 4.18 – 4.07 (m, 12H), 4.02 – 3.94 (m, 2H), 3.81 – 3.77 (m, 12H), 3.75 (s, 3H), 3.39 (m, 6H), 1.99 – 1.91 (m, 2H), 1.48 (s, 9H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 156.2, 149.9, 149.8, 149.68 (2C), 149.66, 149.1, 147.4, 147.0, 146.9, 146.8, 146.69, 146.65, 134.4, 134.33, 134.31, 134.25, 134.2, 134.0, 132.7, 132.3, 131.7, 131.63, 131.61, 131.5, 121.41, 121.37, 121.2, 120.9, 120.7, 120.6, 116.44, 116.42, 115.5, 113.8, 113.70, 113.65, 79.3, 69.7, 69.6, 69.41, 69.37, 69.36, 69.3, 60.5, 56.6, 55.80, 55.77, 55.73, 55.71, 53.5, 36.6, 36.31, 36.29, 36.27, 36.25, 36.2, 29.9, 28.6 (3C).

Melting Point 72-74 °C

HRMS-ESI calculated for $C_{61}H_{67}NO_{14}Na[M+Na^+]$ 1060.4469, found 1060.4459.

Cryptophane-TFA salt 26



Chemical Formula: $C_{56}H_{60}NO_{12}$
Molecular weight: 939.09 g/mol

Trifluoroacetic acid (TFA) (1 mL) was added to a solution of **25** (95 mg, 0.09 mmol) in dichloromethane (2 mL) and the solution was stirred overnight at room temperature. The solvent was removed under vacuum and the product was obtained without purification as a yellow powder (85 mg, 99%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 6.88 (s, 1H), 6.79 – 6.74 (m, 4H), 6.74 – 6.62 (m, 7H), 4.69 – 4.49 (m, 6H), 4.39 – 3.97 (m, 14H), 3.79 (s, 9H), 3.77 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.40 (m, 8H), 2.25 (m, 2H).

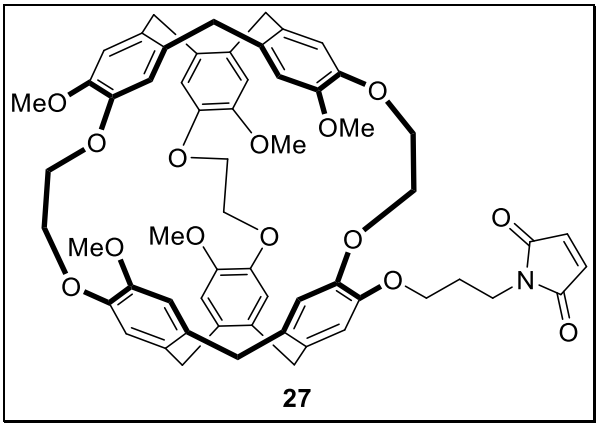
6.82 – 6.70 (m, 5H), 6.69 – 6.57 (m, 7H), 4.66 – 4.38 (m, 6H), 4.31 – 3.92 (m, 14H), 3.77 (m, 9H), 3.72 (m, 6H), 3.36 (m, 8H), 2.28 – 2.01 (m, 2H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 150.05, 149.93, 149.85, 149.78, 149.61, 149.3, 148.8, 147.09, 146.74, 146.67, 134.80, 134.63, 134.58, 134.27, 134.12, 134.09, 134.03, 134.02, 133.58, 131.96, 131.94, 131.86, 131.51, 121.55, 121.45, 121.37, 121.35, 121.34, 121.06, 117.45, 117.37, 113.85, 113.82, 113.81, 113.78, 113.77, 69.62, 69.56, 69.53, 69.52, 69.48, 69.43, 69.23, 55.77, 55.75, 55.71, 55.70, 53.57, 53.53, 53.53, 36.41, 36.30, 36.25, 36.22, 36.15, 36.12.

Melting Point 201-203 °C

HRMS-ESI calculated for $C_{56}H_{60}NO_{12}$ [$M^{+\cdot}$] 938.4469, found 938.4116.

Cryptophane maleimide 27



Chemical Formula: $C_{60}H_{59}NO_{14}$
Molecular weight: 1018.13 g/mol

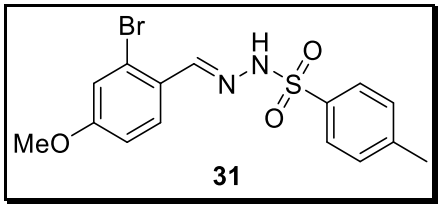
26 (60 mg, 0.06 mmol) was dissolved in chloroform (2 mL), triethylamine (8 µL, 0.06mmol) and maleic anhydride (9 mg, 0.09 mmol) were added and the mixture was stirred at room temperature for 1 h. Chloroform was evaporated, the crude residue was dissolved in acetic anhydride (2 mL), sodium acetate (4.6 mg, 0.06 mmol) and triethylamine (8 µL, 0.06mmol) were added and the solution was stirred overnight at room temperature. The reaction was quenched with water, extracted with ethyl acetate, washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification over silica gel (DCM/EtOAc 100/0 to 80/20) afforded the product as a yellow powder (20 mg, 34%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 6.77 (m, 3H), 6.76 – 6.74 (m, 3H), 6.73 (s, 2H), 6.72 – 6.69 (m, 2H), 6.68– 6.64 (m, 4H), 4.64 – 4.52 (m, 6H), 4.15 (m, 12H), 3.99 – 3.87 (m, 2H), 3.86 – 3.81 (m, 2H), 3.80 – 3.78 (m, 12H), 3.76 (s, 3H), 3.40 (m, 6H), 2.13 – 1.98 (m, 2H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 170.91 (2C), 149.91, 149.80, 149.74, 149.72, 149.69, 149.03, 147.71, 146.90, 146.76, 146.74, 146.70, 134.54, 134.34, 134.31 (2C), 134.28, 134.23, 134.10, 133.09, 132.13, 131.75, 131.67, 131.64, 131.53, 122.17, 121.39, 121.31, 120.73, 120.70, 120.59, 117.80, 115.04, 113.81, 113.76 (2C), 113.71, 69.66, 69.59, 69.49, 69.44, 69.39, 69.30, 67.72, 60.55, 56.42, 55.85, 55.79 (2C), 55.73, 53.57, 36.35 (4C), 36.26, 35.58, 29.8, 28.8.

HRMS-ESI calculated for $C_{60}H_{60}NO_{14}$ [M+H$^+$] 1018.4014, found 1018.4018.

***N'*-[(*1E*)-(2-Bromo-4-methoxyphenyl)methylidene]-4-methylbenzene-1-sulfonohydrazide 31**



Chemical Formula: $C_{15}H_{15}BrN_2O_3S$
Molecular weight: 383.26 g/mol

Prepared from 2-bromo-4-methoxybenzaldehyde (10.00 g, 46.53 mmol), following general procedure A, the expected compound was obtained as a white powder (17.39 g, 97%).

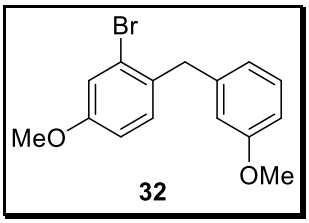
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.21 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.87 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.81 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.30 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 7.01 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 8.83 (dd, J = 8.8, 2.6 Hz, 1H), 3.79 (s, 3H), 2.40 (s, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 161.6, 146.5, 144.4, 135.4, 129.8 (2C), 128.8, 128.1 (2C), 125.0, 124.9, 117.6, 114.5, 55.8, 21.8.

Melting point 147-149 °C.

HRMS-ESI calculated for $C_{15}H_{16}BrN_2O_3S$ [M+H$^+$] 383.0065, found 383.0071.

1-Bromo-3-methoxy-6-(3-methoxybenzyl)-benzene 32



Chemical Formula: $C_{15}H_{15}BrO_2$
Molecular weight: 307.19 g/mol

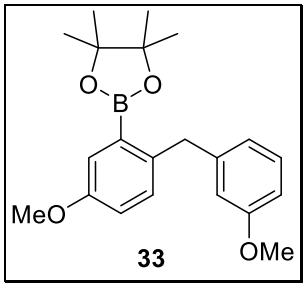
Prepared from tosylhydrazone **31** (17.4 g, 45.4 mmol) and 3-methoxyphenylboronic acid (8.97 g, 59 mmol), following general procedure B, the expected compound was obtained as a light yellow oil (13.7 g, 97 %).

^{1}**H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.21 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.13 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.05 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.81-6.72 (m, 4H), 4.03 (s, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.77 (s, 3H).

^{13}**C NMR** (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 159.8, 158.7, 141.8, 132.3, 131.5, 129.5, 125.0, 121.4, 118.0, 114.8, 113.8, 111.5, 55.7, 55.3, 41.0.

HRMS-ESI calculated for $C_{15}H_{15}BrO_4$ [$M^{+\cdot}$], 306.0255 found 306.0253.

2-{5-Methoxy-2-[(3-methoxyphenyl)methyl]phenyl}-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolane 33



Chemical Formula: $C_{21}H_{27}BO_4$
Molecular weight: 354.25 g/mol

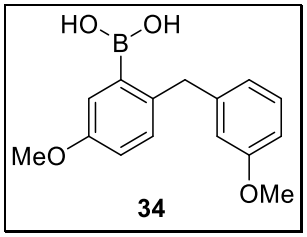
n-BuLi 2.5M in n-hexane (4.7 mL, 11.7 mmol) was added to a solution of **32** (2.00 g, 7.01 mmol) in 8 mL of anhydrous THF at -78 °C. The solution was stirred for 1 hour and *i*PrOBPin (1.73 mL, 8.47 mmol) was added. The mixture was stirred for 2 h at -78 °C and subsequently warm to room temperature over 1 h. The reaction was quenched with water and extracted with EtOAc. The combined organic phases were dried over MgSO4, filtered and concentrated under vacuum. Purification over silica gel (Cyclohexane/EtOAc 96/4) afforded the product as a colorless oil (1.93 g, 84%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.32 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 7.14 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.07 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6,89 (dd, J = 8.4, 2.9 Hz, 1H), 6.77-6.72 (m, 2H), 6.69 (ddd, J = 8.2, 2.6, 1.0 Hz, 1H), 4.23 (s, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 1.27 (s, 12H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 159.6, 157.3, 153.1 144.7, 139.5, 131.3, 129.1, 121.5, 120.4, 117.3, 114.8, 111.0, 83.7 (2C), 55.5, 55.2, 40.1, 24.9 (4C).

HRMS-ESI calculated for $C_{21}H_{27}BO_4Na$ [M+Na$^+$] 377.1900, found 377.1900.

(5-Methoxy-2-[(4methoxyphenyl)methyl]phenyl)boronic acid 34



Chemical Formula: $C_{15}H_{17}BO_4$
Molecular weight: 272.11 g/mol

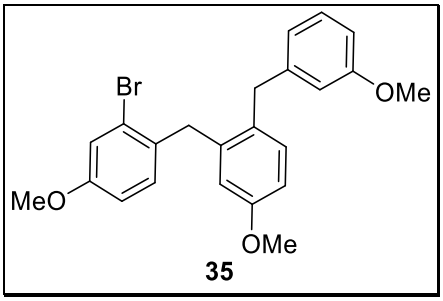
$NaIO_4$ (4.138 g, 19.35 mmol) was added to a solution of **33** (2.3 g, 6.49 mmol) in a mixture of THF (60 mL) and H_2O (15 mL) at room temperature. The solution was stirred under air for 30 minutes. Aqueous 1 M HCl (6.5 mL, 6.5 mmol) was added to the reaction mixture and the solution was stirred overnight at room temperature, over which time a white solid precipitated. The reaction mixture was quenched with H_2O, extracted with EtOAc, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum to afford the product as an oil. The crude boronic acid was carried into the cross-coupling step without any further purification. The yield was assumed to be quantitative.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.64 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 7.16-7.08 (m, 2H), 6,99 (dd, J = 8.5, 2.9 Hz, 1H), 6.79-6.67 (m, 3H), 4.52 (s, 2H), 3.67 (s, 3H), 3.65 (s, 3H), signals due to the OHs are missing.

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 159.7, 157.5, 144.0, 140.9, 132.0, 129.4, 121.5, 120.8, 119.1, 114.8, 111.3, 83.7, 55.11, 55.07, 39.9.

Despite our best efforts we were not able to obtain HRMS for this compound.

2-Bromo-4-methoxy-1-({5-methoxy-2-[(3-methoxyphenyl)methyl]phenyl}methyl) benzene 35



Chemical Formula: $C_{23}H_{23}BrO_3$
Molecular weight: 427.34 g/mol

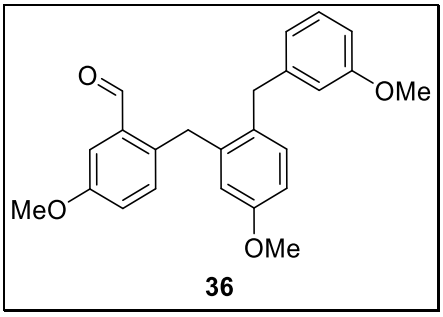
Prepared from **31** (0.11 g, 0.29 mmol) and **34** (0.11 g, 0.43 mmol), following general procedure B, the expected compound was obtained as a colorless oil (91 mg, 74%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.17 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.10 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.81-6.68 (m, 4H), 6.64 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 6.55 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 3.93 (s, 2H), 3.88 (s, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.75 (s, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 159.8, 158.6, 158.4, 142.5, 139.6, 131.6, 131.5, 131.2, 131.0, 129.4, 125.1, 121.3, 118.0, 116.1, 114.6, 113.6, 111.3 (2C), 55.6, 55.3, 55.2, 38.5, 38.4.

HRMS-ASAP calculated for $C_{23}H_{23}BrO_3$ [$M^{+\cdot}$] 426.0831, found 426.0834.

5-Methoxy-2-({5-methoxy-2-[(3-methoxyphenyl)methyl]phenyl}methyl)benzaldehyde 36



Chemical Formula: $C_{24}H_{24}O_4$
Molecular weight: 376.45 g/mol

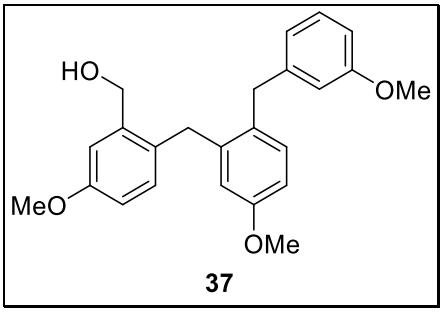
Prepared from **35** (172 mg, 0.45 mmol), following general procedure C, the expected compound was obtained as a yellow oil (101 mg, 66%).

^{1}**H NMR** (400 MHz, CDl_3): δ 9,98 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.27 – 7.25 (m, 1H), 7.19 – 7.15 (m, 1H), 7.10 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.73 – 6.62 (m, 5H), 6.37 (s, 1H) 4.22 (s, 2H), 3.93, (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.70 (s, 3H).

^{13}**C NMR** (100 MHz, $CDCl_3$): δ 191.9, 159.9, 158.6, 158.6, 142.3, 140.5, 134.9, 134.7, 132.6, 131.7, 130.7, 129.5, 121.1, 121.0, 116.3, 114.6, 114.1, 111.4, 111.0, 55.6, 55.3 (2C), 38.7, 34.5.

HRMS-ESI calculated for $C_{24}H_{24}O_4Na$ [M+Na$^+$] 399.1572, found 399.1571

5-Methoxy-2-({5-methoxy-2-[(3-methoxyphenyl)methyl]phenyl}methyl)phenyl] methanol 37



Chemical Formula: $C_{24}H_{26}O_4$
Molecular weight: 378.47 g/mol

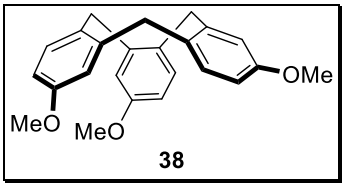
Prepared from **36** (70 mg, 0.18 mmol), following general procedure D, the expected compound was obtained as a yellow oil (69 mg, 99%).

^{1}H NMR (400 MHz, CDl_3) δ 7.18 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.10 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 6.88 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.75 – 6.69 (m, 4H), 6.64 (m, 1H), 6,43 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 4.42 (s, 2H), 3.91 (s, 2H), 3.84 (s, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 1.43 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 159.8, 158.6, 158.6, 142.6, 140.6, 140.2, 131.6, 131.3, 130.9, 129.5, 121.2 (2C), 115.8, 114.7, 113.7, 113.0, 111.3, 111.0, 63.2, 55.4, 55.3, 55.2, 38.6, 34.9.

HRMS-ESI calculated for $C_{24}H_{26}O_4Na$ [M+Na$^+$] 401.1729, found 401.1724.

CTV-*C*$_3$-3OMe 38



Chemical Formula: $C_{24}H_{24}O_3$
Molecular weight: 360.45 g/mol

Perchloric acid (60% in water, 0.8 mL) was added dropwise at 0 °C to a stirred solution of **37** (15 mg, 0.04 mmol) in methanol (1.5 mL). The solution was stirred overnight at room temperature, affording a white precipitate. The mixture was poured into water and the product was extracted with dichloromethane, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification by trituration in diethyl ether afforded the expected product as a white powder (12 mg, 80%).

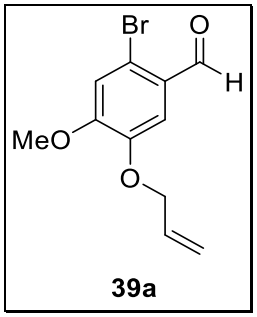
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.29-7.27 (m, 3H), 6.89-6.88 (m, 3H), 6.66-6.63 (m, 3H), 4.76 (d, *J* = 13.6 Hz, 3H), 3.74 (s, 9H), 3.65 (d, *J* = 13.6 Hz, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 158.4 (3C), 141.2 (3C), 131.7 (3C), 131.1 (3C), 115.6 (3C), 112.1 (3C), 55.3 (3C), 36.7 (3C).

Melting point 233-235 °C.

Data consistent with literature.[115]

2-Bromo-4-methoxy-5-(2-propen-1-yloxy)benzaldehyde 39a



Chemical Formula: $C_{11}H_{11}BrO_3$
Molecular weight: 271.11 g/mol

Allyl bromide (0.84 mL, 9.74 mmol) was added to a suspension of potassium carbonate (1.79 g, 12.98 mmol) and 2-bromo-5-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde (1.5 g, 6.49 mmol) in acetone. The reaction was stirred for 4 h at reflux. The mixture was concentrated under vacuum and poured into dichloromethane (40 mL). The organic layer was washed with brine and water, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification over silica gel (Cyclohexane/Et_2O 96/4) afforded the product as a white solid (1.36 g, 77%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 10.17 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.06 (s, 1H), 6.06 (ddt, J = 17.2, 10.7, 5.5 Hz, 1H), 5.44 (dq, J = 17.2, 1.5 Hz, 1H), 5.33 (dq, J = 10.5, 1.5 Hz, 1H), 4.64 (dt, J = 5.5, 1.4 Hz, 2H), 3.95 (s, 3H).

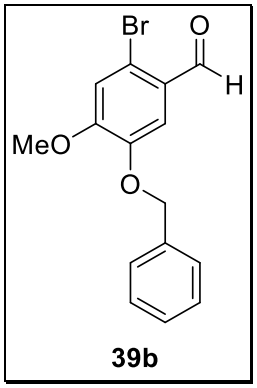
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 190.9, 155.0, 147.9, 132.2, 126.6, 120.6, 119.1, 115.8, 112.2, 70.0, 56.6.

Melting point 111-113 °C.

Data consistent with literature.[224]

[224] Blasco, V. et al., *Synthesis and Biological Evaluation of Cyclic Derivatives of Combretastatin A-4 Containing Group 14 Elements*, Org. Biomol. Chem., **2018**, Vol. 16 (32), 5859–5870.

5-(Benzyloxy)-2-bromo-4-methoxybenzaldehyde 39b



Chemical Formula: $C_{15}H_{13}BrO_3$
Molecular weight: 321.17 g/mol

Potassium carbonate (2.39 g, 17.3 mmol) was added to a suspension of 2-bromo-5-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde (2 g, 8.66 mmol) in anhydrous DMF (20 mL) and the solution was stirred for 30 minutes. Benzyl chloride (2.05 mL, 17.3 mmol) was added and the reaction was stirred for 18 h at 60 °C. The reaction was quenched with water, extracted with ethyl acetate, washed with an aqueous saturated solution of $Na_2S_2O_3$, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification over silica gel (Cyclohexane/EtOAc 8/2) afforded the product as a white solid (2.5 g, 90%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 10.16 (s, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.47-7.43 (m, 2H), 7.40-7.36 (m, 2H), 7.34-7.32 (m, 1H), 7.07 (s, 1H), 5.16 (s, 2H), 3.95 (s, 3H).

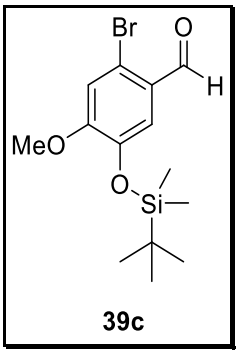
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 190.9, 155.2, 148.1, 136.0, 128.8 (2C), 128.4, 127.7, 126.6 (2C), 120.8, 115.9, 112.6, 71.1, 56.6.

Melting point 141-143 °C.

Data consistent with literature.[225]

[225] Xie, S. et al., *Design, Synthesis and Biological Evaluation of Isochroman-4-One Hybrids Bearing Piperazine Moiety as Antihypertensive Agent Candidates*, Bioorganic Med. Chem., **2019**, Vol. 27 (13), 2764–2770.

2-Bromo-5-[(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy]-4-methoxybenzaldehyde 39c



Chemical Formula: $C_{14}H_{21}BrO_3Si$
Molecular weight: 345.31 g/mol

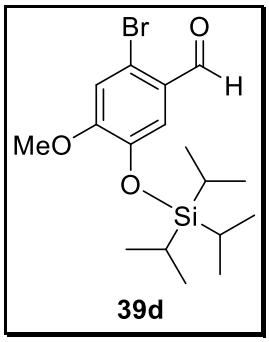
tert-butyldimethylsilyl chloride (1.96 g, 12.99 mmol) was added to a solution of 2-bromo-5-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde (2 g, 8.66 mmol) and imidazole (885 mg, 12.99 mmol) in dichloromethane (20 mL). The mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction was quenched with water, extracted with dichloromethane, washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification over silica gel (cyclohexane/EtOAc 95/5) afforded the product as a colorless oil (2.8 g, 94%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 10.15 (s, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.03 (s, 1H), 3.89 (s, 3H), 0.98 (s, 9H), 0.16 (s, 6H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 190.9, 156.9, 145.1, 126.9, 120.62, 120.59, 116.13, 56.1, 25.7 (3C), 18.5, -4.5 (2C).

HRMS-ESI calculated for $C_{14}H_{22}BrO_3Si$ [M+H$^+$] 345.0522, found 345.0518.

2-Bromo-4-methoxy-5-{[tris(propan-2-yl)silyl]oxy}benzaldehyde 39d



Chemical Formula: $C_{17}H_{27}BrO_3Si$
Molecular weight: 387.39 g/mol

Triisopropylsilyl chloride (542 g, 2.81 mmol) was added to a solution of 2-bromo-5-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde (500 mg, 2.16 mmol) and imidazole (221 mg, 3.24 mmol) in dichloromethane (10 mL). The mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction was quenched with water, extracted with dichloromethane, washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification over silica gel (cyclohexane/EtOAc 95/5) afforded the product as a colorless oil (803 mg, 96%).

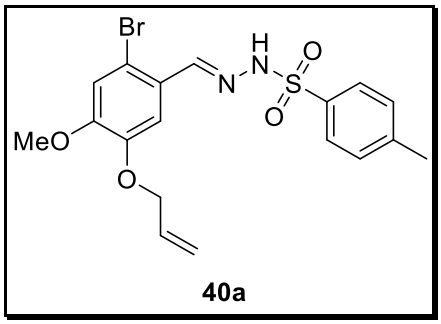
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 10.14 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.02 (s, 1H), 3.89 (s, 3H), 1.30 – 1.20 (m, 3H), 1.10 – 1.06 (m, 18H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 190.9, 156.8, 145.6, 126.7, 120.2, 119.9, 116.1, 56.1, 17.9 (6C), 12.9 (3C).

Data consistent with literature.[226]

[226] Clark, R. et al., *Preparation of Triazolone Derivatives as Blood Coagulation Factor VIIa Inhibitors*, **2007**, (12),

***N'*-[(*Z*)-[2-Bromo-4-methoxy-5-(prop-2-en-1-yloxy)phenyl]methylidene]-4-methylbenzene-1-sulfonohydrazide 40a**



Chemical Formula: $C_{18}H_{19}BrN_2O_4S$
Molecular weight: 439.32 g/mol

Prepared from **39a** (1.8 g, 6.64 mmol), following general procedure A, the expected compound was obtained as a white powder (2.702 g, 93%).

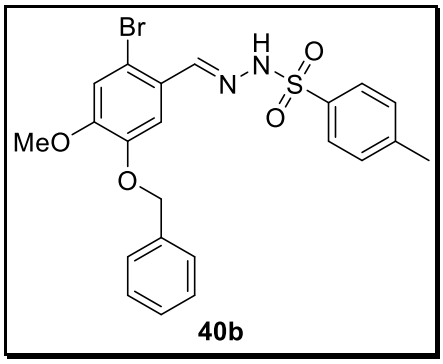
^{1}**H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.01 (s, 1H), 7.87 – 7.85 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.74 (s, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.32-7.30 (m, 2H), 6.94 (s, 1H), 6.12-6.02 (m, 1H), 5.48-5.42 (m, 1H), 5.36-5.32 (m, 1H), 4.64-4.61 (m, 2H), 3.87 (s, 3H), 2.42 (s, 3H).

^{13}**C NMR** (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 152.1, 147.7, 146.4, 144.5, 135.4, 132.7, 129.8 (2C), 128.2 (2C), 124.4, 119.0, 116.0, 115.3, 110.1, 70.0, 56.4, 21.8.

Melting point 147-149 °C.

HRMS-ESI calculated for $C_{18}H_{20}BrN_2O_4S$ [M+H$^+$] 439.0327, found 439.0333.

***N'*-[(*Z*)-[5-(Benzyloxy)-2-bromo-4-methoxyphenyl]methylidene]-4-methylbenzene-1-sulfonohydrazide 40b**



Chemical Formula: $C_{22}H_{21}BrN_2O_4S$
Molecular weight: 489.38 g/mol

Prepared from **39b** (2.5 g, 7.78 mmol), following general procedure A, the expected compound was obtained as a white powder (3.534 g, 93%).

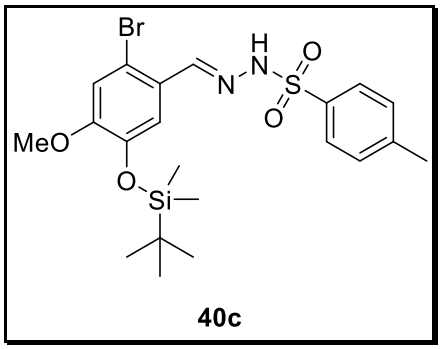
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.98 (s, 1H), 7.79 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.72 (s, 1H), 7.48-7.45 (m, 3H), 7.43-7.35 (m, 3H), 7.27-7.25 (m, 2H), 6.95 (s, 1H), 5.16 (s, 2H), 3.87 (s, 3H), 2.41 (s, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 152.3, 147.9, 146.3, 144.4, 136.5, 135.4, 129.8 (2C), 128.9 (2C), 128.3, 128.1 (2C), 127.6 (2C), 124.4, 116.2, 115.4, 111.4, 71.1, 56.4, 21.8.

Melting point 175-177 °C.

HRMS-ESI calculated for $C_{22}H_{22}BrN_2O_4S$ [M+H$^+$] 489.0484, found 489.0485.

***N'*-[(*Z*)-{2-Bromo-5-[(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy]-4-methoxyphenyl}methylidene]-4-methylbenzene-1-sulfonohydrazide 40c**



40c

Chemical Formula: $C_{21}H_{29}BrN_2O_4SSi$
Molecular weight: 513.52 g/mol

Prepared from **39c** (2.8 g, 8.1 mmol), following general procedure A, the expected compound was obtained as a white powder (4.01 g, 96%).

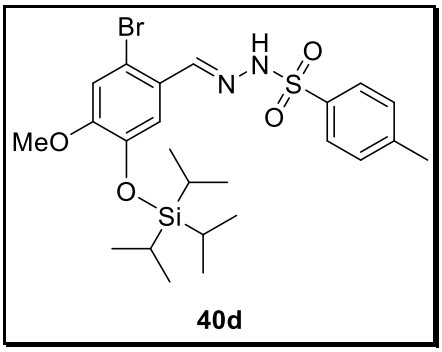
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.99 (s, 1H), 7.87 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.33 (s, 1H), 7.29 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.91 (s, 1H), 3.80 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 1.00 (s, J = 3.0 Hz, 9H), 0.16 (s, J = 3.1 Hz, 6H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 153.80, 146.64, 144.82, 144.41, 135.29, 129.8 (2C), 128.2 (2C), 124.79, 118.91, 116.27, 115.63, 55.87, 25.8 (3C), 21.76, 18.61, -4.52 (2C).

Melting point 137-139 °C.

HRMS-ESI calculated for $C_{21}H_{29}BrN_2O_4SSi$ [M+H$^+$] 513.0879, found 513.0879.

***N'*-[(Z)-(2-bromo-4-methoxy-5-{[tris(propan-2-yl)silyl]oxy}phenyl)methylidene]-4-methylbenzene-1-sulfonohydrazide 40d**



Chemical Formula: $C_{24}H_{35}BrN_2O_4SSi$
Molecular weight: 555.60 g/mol

Prepared from **39d** (800 mg, 2.07 mmol), following general procedure A, the expected compound was obtained as a white powder (1.10 g, 96 %).

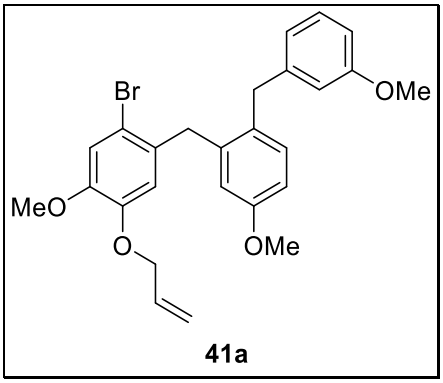
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.98 (s, 1H), 7.85 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.74 (s, 1H), 7.38 (d, J = 3.5 Hz, 1H), 7.29 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 6.90 (s, 1H), 3.80 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 1.29 – 1.20 (m, 3H), 1.10 (d, J = 7.2 Hz, 18H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 153.7, 146.6, 145.3, 144.4, 135.3, 129.7 (2C), 128.2 (2C), 124.5, 118.1, 115.9, 115.6, 55.9, 21.8, 18.0 (3C), 12.7 (6C).

Melting point 168-170 °C.

HRMS-ESI calculated for $C_{24}H_{36}BrN_2O_4SSi$ [M+H$^+$] 555.1348, found 555.1343.

1-Bromo-5-methoxy-2-({5-methoxy-2-[(3-methoxyphenyl)methyl]phenyl}methyl)-4-(prop-2-en-1-yloxy)benzene 41a



Chemical Formula: $C_{26}H_{27}BrO_4$
Molecular weight: 483.40 g/mol

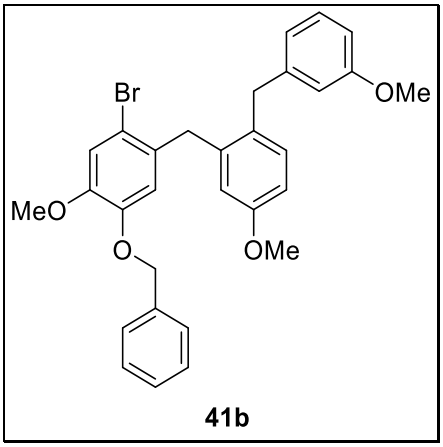
Prepared from **40a** (733 mg, 1.67 mmol) and **34** (590 mg, 2.17 mmol), following general procedure B, the expected compound was obtained as a light yellow oil (676 mg, 84%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.18 – 7.13 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.10 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.02 (s, 1H), 6.76 (dd, *J* = 8.4, 2.8 Hz, 1H), 6.72 – 6.67 (m, 2H), 6.63 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.53 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 6.35 (s, 1H), 5.92 (m, 1H), 5.21 (dq, *J* = 7.7, 1.3 Hz, 1H), 5.17 (t, *J* = 1.4 Hz, 1H), 4.35 (dt, *J* = 5.6, 1.3 Hz, 2H), 3.90 (s, 2H), 3.86 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.74 (s, 6H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 159.8, 158.5, 148.5, 147.4, 142.5, 139.5, 133.0, 131.61, 131.57, 131.2, 129.4, 121.3, 118.6, 116.1, 115.8, 115.4, 115.0, 114.7, 111.5, 111.2, 70.0, 56.3, 55.3, 55.2, 38.9, 38.5.

HRMS-ESI calculated for $C_{26}H_{28}BrO_4$ [M+H$^+$] 483.1171, found 483.1172.

1-(Benzyloxy)-4-bromo-2-methoxy-5-({5-methoxy-2-[(3-methoxyphenyl)methyl]phenyl}methyl) benzene 41b



Chemical Formula: $C_{30}H_{29}BrO_4$
Molecular weight: 533.46 g/mol

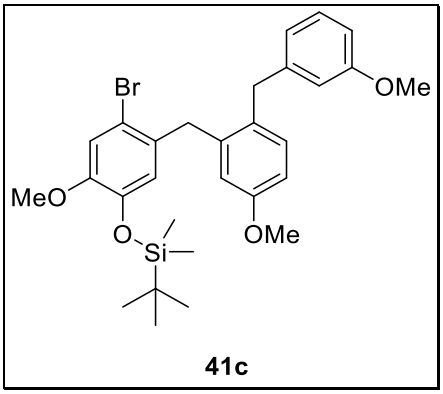
Prepared from **40b** (709 mg, 1.67 mmol) and **34** (590 mg, 2.17 mmol), following general procedure B, the expected compound was obtained as a light yellow oil (617 mg, 69%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.30 – 7.25 (m, 3H), 7.24 – 7.20 (m, 2H), 7.16 – 7.11 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.08 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.03 (s, 1H), 6.77 (dd, J = 8.4, 2.8 Hz, 1H), 6.69 (dd, J = 8.0, 2.3 Hz, 1H), 6.63 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.59 (m, 1H), 6.48 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.30 (s, 1H), 4.88 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.84 (s, 2H), 3.73 (s, 5H), 3.72 (s, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 159.7, 158.4, 148.6, 147.3, 142.5, 139.2, 136.7, 131.7, 131.6, 131.2, 129.3, 128.6 (2C), 127.9, 127.5 (2C), 121.2, 116.0, 115.9, 115.7, 115.0, 114.6, 111.8, 111.1, 70.9, 56.3, 55.2, 55.2, 38.9, 38.3.

HRMS-ESI calculated for $C_{30}H_{30}BrO_4$ [M+H$^+$] 533.1327, found 533.1321.

[4-Bromo-2-methoxy-5-({5-methoxy-2-[(3-methoxyphenyl)methyl]phenyl}methyl)phenoxy](*tert*-butyl)dimethylsilane 41c



Chemical Formula: $C_{29}H_{37}BrO_4Si$
Molecular weight: 557.60 g/mol

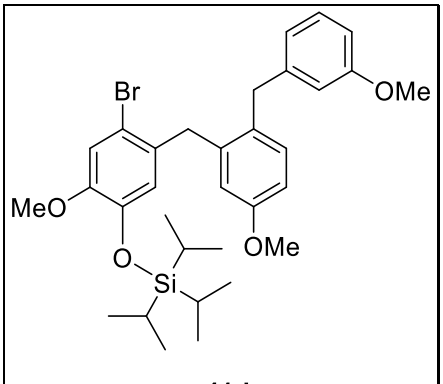
Prepared from **40c** (858 mg, 1.67 mmol) and **34** (590 mg, 2.17 mmol), following general procedure B, the expected compound was obtained as a light yellow oil (881 mg, 84%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.17 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.06 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.02 (s, 1H), 6.76 – 6.68 (m, 3H), 6.66 (s, J = 1.7 Hz, 1H), 6.51 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.40 (s, 1H), 3.86 (s, 4H), 3.79 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 0.91 (s, 9H), 0.05 (s, 6H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 159.8, 158.5, 150.2, 144.6, 142.6, 139.5, 131.8, 131.4, 131.1, 129.4, 122.8, 121.3, 116.4, 115.7, 115.6, 114.6, 111.7, 111.4, 56.0, 55.31, 55.26, 38.6, 38.5, 25.8 (3C), 18.5 -4.6 (2C).

HRMS-ESI calculated for $C_{29}H_{38}BrO_4Si$ [M+H$^+$] 557.1723, found 557.1730.

[4-Bromo-2-methoxy-5-({5-methoxy-2-[(3-methoxyphenyl)methyl]phenyl}methyl)phenoxy]tris (propan-2-yl)silane 41d



41d

Chemical Formula: $C_{32}H_{43}BrO_4Si$
Molecular weight: 599.68 g/mol

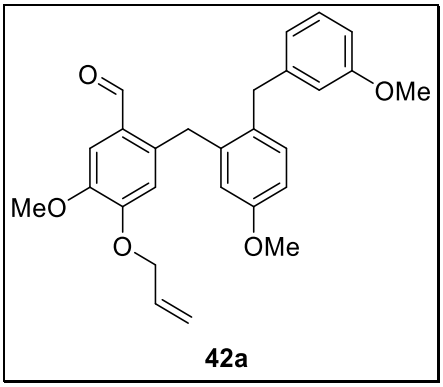
Prepared from **40d** (700 mg, 1.26 mmol) and **34** (445 mg, 1.63 mmol), following general procedure B, the expected compound was obtained as a light yellow oil (516 mg, 68%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.17 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.05 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.01 (s, 1H), 6.76 – 6.67 (m, 3H), 6.65 (m, 1H), 6.55 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.36 (s, 1H), 3.85 (s, 2H), 3.80 (s, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 1.07 (m, 3H), 0.99 (d, J = 6.7, 18H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 159.8, 158.6, 150.0, 145.0, 142.5, 139.5, 131.8, 131.5, 131.3, 129.4, 122.0, 121.3, 116.4, 115.9, 114.6, 114.0, 111.9, 111.4, 56.1, 55.3, 55.3, 38.7, 38.4, 17.9 (6C), 12.8 (3C).

HRMS-ESI calculated for $C_{32}H_{44}BrO_4Si$ [M+H$^+$] 599.2192, found 599.2246.

5-Methoxy-2-({5-methoxy-2-[(3-methoxyphenyl)methyl]phenyl}methyl)-4-(prop-2-en-1-yloxy)benzaldehyde 42a



Chemical Formula: $C_{27}H_{28}O_5$
Molecular weight: 432.52 g/mol

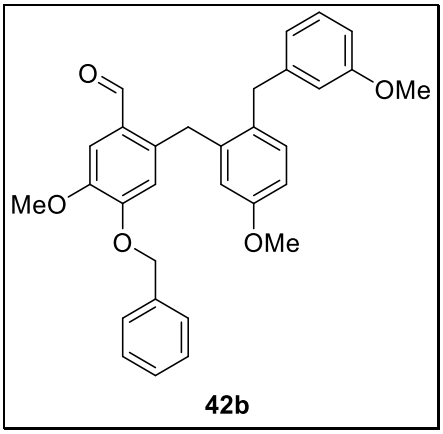
Prepared from **41a** (850 mg, 1.756 mmol), following general procedure C, the expected compound was obtained as a red oil (551 mg, 73%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 9.94 (s, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.17 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.13 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.77 – 6.70 (m, 2H), 6.68 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 6.63 (m, 1H), 6.44 (s, 1H), 6.42 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 5.96 (ddt, J = 17.1, 10.8, 5.6 Hz, 1H), 5.27 (dd, J = 9.9, 1.3 Hz, 1H), 5.24 (dd, J = 3.1, 1.4 Hz, 1H), 4.51 – 4.47 (m, 2H), 4.23 (s, 2H), 3.92 (s, 5H), 3.74 (s, 3H), 3.72 (s, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 190.1, 159.8, 158.6, 152.9, 148.1, 142.3, 140.1, 137.4, 132.3, 131.7, 130.6, 129.5, 127.2, 121.0, 119.0, 116.3, 114.7, 114.6, 111.7, 111.22, 111.21, 69.7, 56.1, 55.2, 55.2, 38.7, 34.4.

HRMS-ESI calculated for $C_{27}H_{29}O_5$ [M+H$^+$] 433.2015, found 433.2016.

4-(Benzyloxy)-5-methoxy-2-({5-methoxy-2-[(3-methoxyphenyl)methyl]phenyl}methyl) benzaldehyde 42b



Chemical Formula: $C_{31}H_{30}O_5$
Molecular weight: 482.58 g/mol

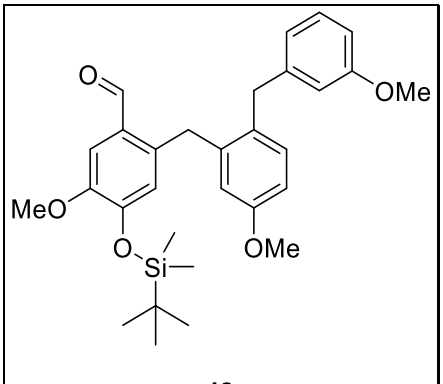
Prepared from **41b** (590 mg, 1.11 mmol), following general procedure C, the expected compound was obtained as a yellow oil (302 mg, 56%).

^{1}**H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 9.96 (s, 1H), 7.39 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 7.34 – 7.29 (m, 3H), 7.28 – 7.24 (m, 2H), 7.16 (t, J = 8.4 Hz, 1H), 7.12 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.78 (dd, J = 8.3, 2.7 Hz, 1H), 6.71 (dd, J = 8.2, 2.5 Hz, 1H), 6.63 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 6.60 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.43 (s, J = 3.6 Hz, 1H), 6.40 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 5.01 (s, 2H), 4.21 (s, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.80 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 3.73 (d, J = 5.0 Hz, 3H), 3.71 (s, 3H).

^{13}**C NMR** (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 190.1, 159.8, 158.6, 152.9, 148.2, 142.3, 139.8, 137.5, 136.0, 131.8, 130.7, 129.5, 128.7 (2C), 128.2, 127.4 (2C), 127.2, 121.0, 116.3, 114.9, 114.6, 112.0, 111.5, 111.2, 70.7, 56.2, 55.2, 55.2, 38.6, 34.4.

HRMS-ESI calculated for $C_{31}H_{31}O_5$ [M+H$^+$] 483.2171, found 483.2170.

4-[(*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy]-5-methoxy-2-({5-methoxy-2-[(3-methoxyphenyl)methyl]phenyl}methyl)benzaldehyde 42c



42c

Chemical Formula: $C_{30}H_{38}O_5Si$
Molecular weight: 506.71 g/mol

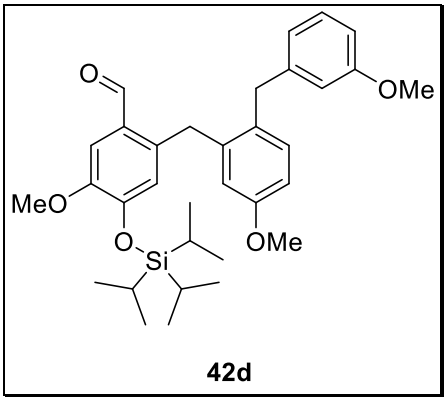
Prepared from **41c** (500 mg, 0.9 mmol), following general procedure C, the expected compound was obtained as a yellow oil (200 mg, 44%).

^{1}**H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 9.89 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.19 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.10 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.74 (dd, J = 8.3, 2.7 Hz, 2H), 6.69 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 6.65 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 6.51 (s, 1H), 6.42 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 4.19 (s, 2H), 3.92 (s, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 0.95 (s, 9H), 0.13 (s, 6H).

^{13}**C NMR** (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 190.3, 159.9, 158.6, 150.9, 150.0, 142.3, 140.3, 137.2, 131.6, 130.6, 129.5, 128.1, 123.3, 121.0, 116.0, 114.5, 112.7, 111.4 (2C), 55.7, 55.23, 55.22, 38.7, 34.3, 25.7 (3C), 18.6, -4.46 (2C).

HRMS-ESI calculated for $C_{30}H_{39}O_5Si$ [M+H$^+$] 507.2567, found 507.2564.

5-Methoxy-2-({5-methoxy-2-[(3-methoxyphenyl)methyl]phenyl}methyl)-4-{[tris(propan-2-yl)silyl]oxy}benzaldehyde 42d



Chemical Formula: $C_{33}H_{44}O_5Si$
Molecular weight: 548.80 g/mol

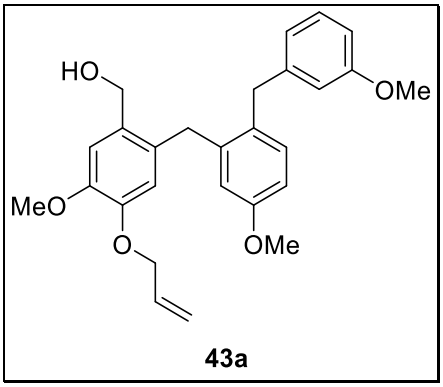
Prepared from **41d** (515 mg, 0.86 mmol), following general procedure C, the expected compound was obtained as a yellow oil (226 mg, 48%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 9.94 (s, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.18 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.09 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.74 (m, 2H), 6.67 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 6.64 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.47 (s, 1H), 4.20 (s, 2H), 3.86 (s, 5H), 3.76 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 1.17 – 1.11 (m, 3H), 1.04 – 1.00 (m, 18H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 190.3, 159.9, 158.7, 151.4, 149.8, 142.3, 140.1, 137.3, 131.7, 130.7, 129.5, 127.7, 122.4, 121.0, 116.1, 114.5, 113.0, 111.7, 111.4, 55.8, 55.2 (2C), 38.6, 34.3, 17.9 (6C), 12.9 (3C).

HRMS-ESI calculated for $C_{33}H_{45}O_5Si$ [M+H$^+$] 549.3036, found 549.3034.

[5-Methoxy-2-({5-methoxy-2-[(3-methoxyphenyl)methyl]phenyl}methyl)-4-(prop-2-en-1-yloxy)phenyl]methanol 43a



Chemical Formula: $C_{27}H_{30}O_5$
Molecular weight: 434.53 g/mol

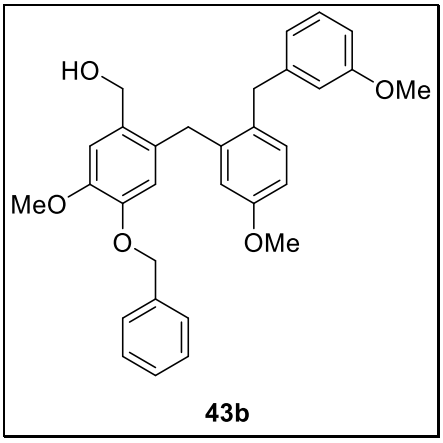
Prepared from **42a** (551 mg, 1.27 mmol), following general procedure D, the expected compound was obtained as a yellow oil (548 mg, 98%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.18 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.10 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.95 (s, 1H), 6.75 – 6.69 (m, 3H), 6.65 (m, 1H), 6.47 (s, 1H), 6.45 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.04 – 5.92 (m, 1H), 5.26 (dd, J = 10.3, 1.5 Hz, 1H), 5.20 (ddd, J = 10.5, 2.6, 1.2 Hz, 1H), 4.45 (dt, J = 5.5, 1.3 Hz, 2H), 4.41 (s, 2H), 3.90 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.85 (s, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 1.73 (s, 1H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 159.7, 158.5, 147.8, 147.2, 142.5, 140.5, 133.3, 131.5, 131.5, 130.8, 129.9, 129.4, 121.1, 118.2, 115.7, 115.6, 114.7, 112.3, 111.1, 111.0, 69.9, 62.8, 56.0, 55.2 (2C), 38.5, 35.0.

HRMS-ESI calculated for $C_{27}H_{30}O_5Na$ [M+Na$^+$] 457.1991, found 457.2001.

[4-(Benzyloxy)-5-methoxy-2-({5-methoxy-2-[(3-methoxyphenyl)methyl]phenyl}methyl)phenyl] methanol 43b



Chemical Formula: $C_{31}H_{32}O_5$
Molecular weight: 484.59 g/mol

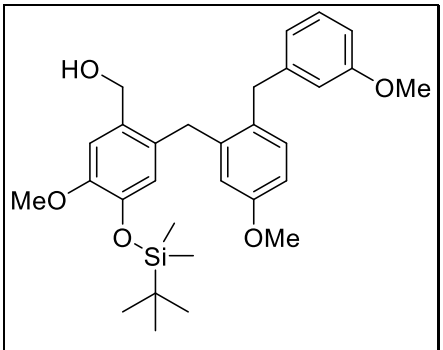
Prepared from **42b** (300 mg, 0.62 mmol), following general procedure D, the expected compound was obtained as a yellow oil (293 mg, 98%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.32 – 7.25 (m, 5H), 7.17 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.09 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.77 – 6.70 (m, 2H), 6.66 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.62 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 6.45 (s, 1H), 6.41 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 4.99 (s, 2H), 4.42 (s, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.81 (m, 2H), 3.80 (s, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 1.39 (s, 1H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 159.7, 158.5, 148.0, 147.4, 142.6, 140.3, 137.1, 131.7, 131.5, 130.9, 130.1, 129.4, 128.6 (2C), 127.8, 127.4 (2C), 121.1, 116.0, 115.8, 114.7, 112.5, 111.3, 111.1, 70.9, 62.9, 56.2, 55.2 (2C), 38.5, 35.1.

HRMS-ESI calculated for $C_{31}H_{32}O_5Na$ [M+Na$^+$] 507.2147, found 507.2150.

{4-[(*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy]-5-methoxy-2-({5-methoxy-2-[(3-methoxyphenyl)methyl]phenyl}methyl)phenyl}methanol 43c



43c

Chemical Formula: $C_{30}H_{40}O_5Si$
Molecular weight: 508.73 g/mol

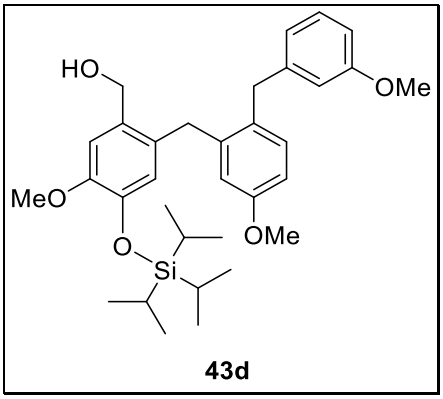
Prepared from **42c** (210 mg, 0.41 mmol), following general procedure D, the expected compound was obtained as a yellow oil (148 mg, 71%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ =7.19 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.08 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.92 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 6.76 – 6.69 (m, 3H), 6.67 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.43 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 4.37 (s, 2H), 3.91 (s, 2H), 3.81 (s, 5H), 3.76 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 1.40 (s, 1H), 0.96 – 0.93 (m, 9H), 0.11 – 0.08 (m, 6H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 159.8, 158.6, 149.5, 144.6, 142.7, 140.7, 132.2, 131.6, 130.8, 130.2, 129.5, 123.2, 121.2, 115.4, 114.6, 113.0, 111.4, 111.3, 63.1, 55.8, 55.3, 55.2, 38.6, 35.0, 25.8 (3C), 18.6, -4.5 (2C).

HRMS-ESI calculated for $C_{30}H_{40}O_5SiNa$ [M+Na$^+$] 531.2543, found 531.2537.

[5-Methoxy-2-({5-methoxy-2-[(3-methoxyphenyl)methyl]phenyl}methyl)-4-{[tris(propan-2-yl)silyl]oxy}phenyl]methanol 43d



Chemical Formula: $C_{33}H_{46}O_5Si$
Molecular weight: 550.81 g/mol

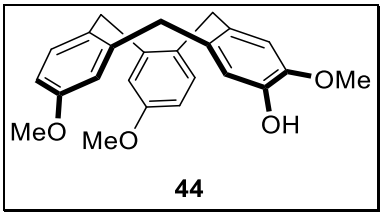
Prepared from **42d** (226 mg, 0.41 mmol), following general procedure D, the expected compound was obtained as a yellow oil (177 mg, 78%).

^{1}**H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.19 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.08 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.91 (s, 1H), 6.76 – 6.68 (m, 3H), 6.66 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 6.49 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.47 (s, 1H), 4.42 (s, 2H), 3.87 (s, 2H), 3.83 (s, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 1.53 (s, 1H), 1.15 (m, 3H), 1.03 (d, J = 6.9 Hz, 18H).

^{13}**C NMR** (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 159.8, 158.6, 149.3, 145.1, 142.7, 140.6, 131.6, 131.6, 130.9, 130.3, 129.5, 122.2, 121.1, 115.6, 114.6, 113.1, 111.5, 111.2, 63.0, 55.9, 55.22, 55.19, 38.5, 34.9, 18.0 (6C), 12.8 (3C).

HRMS-ESI calculated for $C_{33}H_{46}O_5SiNa$ [M+Na$^+$] 573.3012, found 573.3032.

CTV-*C₁* 44



Chemical Formula: $C_{24}H_{24}O_4$
Molecular weight: 376.45 g/mol

Perchloric acid (60% in water, 17.6 µL, 0.175 mmol) was added dropwise at 0 °C to a solution of **43c** (75 mg, 0.145 mmol) in acetonitrile (29 mL) and the mixture was stirred for 1 h at room temperature. The reaction was quenched with water and extracted with ethyl acetate, washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification over silica gel (cyclohexane/EtOAc 7/3) afforded the product as a light pink powder (57 mg, 98%).

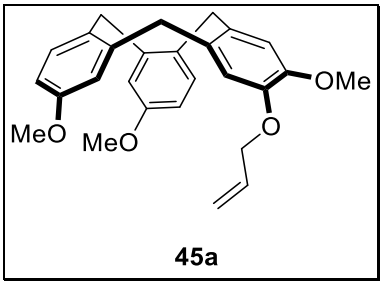
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.28 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.25 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.91 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.88 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.66 (ddd, *J* = 8.5 2.6, 1.9 Hz, 1H), 5.39 (s, 1H), 4.79 – 4.71 (m, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.67 – 3.54 (m, 3H), 1.27 (s, 1H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 158.9, 158.8, 146.7, 145.6, 142.0, 141.9, 133.1, 132.6, 132.3, 131.9, 131.6, 131.5, 116.9, 115.7, 115.7, 113.7, 112.4 (2C), 56.1, 55.1, 55.0, 36.6, 36.4, 35.9.

Melting point 188-190 °C.

HRMS-ESI calculated for $C_{24}H_{25}O_4$ [M+H$^+$] 377.1753, found 377.1742.

CTV-*C₁* 45a



Chemical Formula: $C_{27}H_{28}O_4$
Molecular weight: 416.52 g/mol

Perchloric acid (60% in water, 50.2 µL, 0.461 mmol) was added dropwise at 0 °C to a solution of **43a** (167 mg, 0.384 mmol) in acetonitrile (82 mL) and the mixture was stirred for 1 h at room temperature. The reaction was quenched with water and extracted with ethyl acetate, washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification over silica gel (cyclohexane/EtOAc 9/1 to 8/2) afforded the product as a light pink powder (136 mg, 86%).

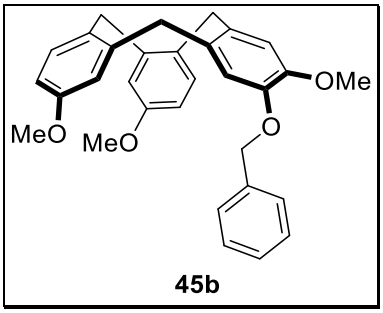
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.33 – 7.28 (m, 2H), 6.92 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.88 (s, 1H), 6.86 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.84 (s, 1H), 6.69 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.67 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.07 (ddt, J = 17.2, 10.6, 5.4 Hz, 1H), 5.44 – 5.37 (m, 1H), 5.31 – 5.26 (m, 1H), 4.81 – 4.72 (m, 3H), 4.60 (m, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.68 – 3.55 (m, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 158.4, 158.3, 148.4, 146.7, 141.2, 141.0, 133.7, 132.6, 132.1, 131.6, 131.2, 131.2, 130.9, 117.9, 115.7, 115.6, 115.5, 113.4, 112.1 (2C), 70.2, 56.2, 55.3 (2C), 37.1, 36.6, 36.2.

Melting point 105-107 °C.

HRMS-ESI calculated for $C_{27}H_{28}O_4Na$ [M+Na$^+$] 439.1885, found 439.1901.

CTV-*C₁* 45b



Chemical Formula: $C_{31}H_{30}O_4$
Molecular weight: 466.58 g/mol

Perchloric acid (60% in water, 20.9 µL, 0.192 mmol) was added dropwise at 0 °C to a solution of **43b** (78 mg, 0.16 mmol) in acetonitrile (32 mL) and the mixture was stirred for 1 h at room temperature. The reaction was quenched with water and extracted with ethyl acetate. The combined organic phases were washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification over silica gel (cyclohexane/EtOAc 9/1) afforded the product as a white powder (67 mg, 91%).

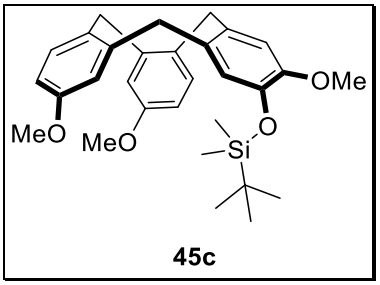
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.45 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.40 – 7.35 (m, 2H), 7.34 – 7.27 (m, 3H), 6.92 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.89 (s, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.74 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.68 (ddd, J = 9.8, 8.6, 2.7 Hz, 2H), 5.12 (s, 2H), 4.79 – 4.71 (m, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 3.68 – 3.60 (m, 2H), 3.53 (d, J = 13.6 Hz, 1H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 158.3 (2C), 148.6, 147.1, 141.2, 140.9, 137.5, 132.9, 132.1, 131.6, 131.3, 131.2, 130.9, 128.7 (2C), 127.9, 127.3 (2C), 116.1, 115.7, 115.5, 113.7, 112.1, 112.1, 71.5, 56.3, 55.30, 55.28, 37.1, 36.6, 36.2.

Melting point 123-125 °C.

HRMS-ESI calculated for $C_{31}H_{30}O_4Na$ [M+Na$^+$] 489.2042, found 489.2049.

CTV-*C₁* 45c



Chemical Formula: $C_{30}H_{38}O_4Si$
Molecular weight: 490.72 g/mol

Phosphorus pentoxide (25 mg, 0.089 mmol) was added at 0 °C to a solution of **43c** (35 mg, 0.069 mmol) in acetonitrile (27 mL) and the mixture was stirred for 1 h at room temperature. The mixture was filtrated through a pad of silica gel and concentrated under vacuum. Purification over silica gel (cyclohexane/EtOAc 9/1 to 8/2) afforded the product as a yellow powder (20 mg, 58%).

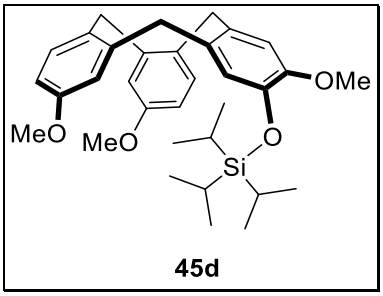
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.31 – 7.25 (m, 2H), 6.91 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.84 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.82 (s, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.69 – 6.67 (m, 1H), 6.66 – 6.64 (m, 1H), 4.80 – 4.68 (m, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.66 – 3.52 (m, 3H), 0.98 (s, 9H), 0.13 (s, 3H), 0.11 (s, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 158.3, 158.2, 149.6, 143.6, 141.2, 141.1, 132.9, 132.1, 131.6, 131.5, 130.99, 130.95, 122.2, 115.5, 114.8, 114.0, 112.7, 112.0, 55.9, 55.17, 55.15, 36.8, 36.5, 36.2, 25.8 (3C), 18.5, -4.47, -4.51.

Melting point 105-107 °C.

HRMS-ESI calculated for $C_{30}H_{38}O_4SiNa$ [M+Na$^+$] 513.2437, found 513.2438.

CTV-*C₁* 45d



Chemical Formula: $C_{33}H_{44}O_4Si$
Molecular weight: 532.80 g/mol

Phosphorus pentoxide (37 mg, 0.129 mmol) was added at 0 °C to a solution of **43d** (60 mg, 0.107 mmol) in acetonitrile (23 mL) and the mixture was stirred for 1 h at room temperature. The mixture was filtrated through a pad of silica gel and concentrated under vacuum. Purification over silica gel (cyclohexane/EtOAc 9/1 to 8/2) afforded the product as a white powder (48 mg, 84%).

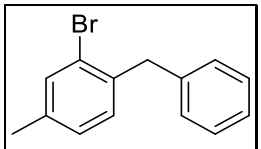
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.26 (m, 2H), 6.90 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.84 (s, 1H), 6.81 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.78 (s, 1H), 6.67 (dd, J = 3.4, 3.0 Hz, 1H), 6.64 (dd, J = 3.5, 2.9 Hz, 1H), 4.73 (m, 3H), 3.76 (s, 6H), 3.73 (s, 3H), 3.61 – 3.50 (m, 3H), 1.08 (m, 21H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 158.4, 158.3, 149.5, 144.3, 141.3, 141.2, 132.5, 132.4, 131.6, 131.5, 131.1, 131.0, 121.6, 115.6, 115.0, 114.3, 112.7, 112.0, 56.1, 55.3, 55.2, 37.0, 36.7, 36.3, 18.11 (3C), 18.09 (3C), 13.0 (3C).

Melting point 105-107 °C.

HRMS-ESI calculated for $C_{33}H_{44}O_4SiNa$ [M+Na$^+$] 555.2907, found 555.2924.

1-Benzyl-2-bromo-4-methylbenzene 47



47

Chemical Formula: $C_{14}H_{13}Br$
Molecular weight: 261.16 g/mol

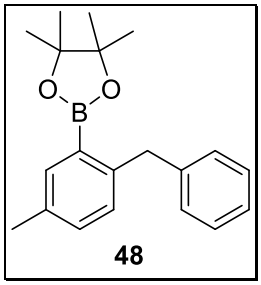
Para-toluene solfonylhydrazide (985 mg, 5.27 mmol) was added to a solution of 2-bromo-4-methylbenzaldehyde (1 g, 5.02 mmol) in dioxane (25 mL) and the mixture was stirred for 1.5 h at 80 °C. Potassium carbonate (1.04 g, 7.53 mmol) and phenylboronic acid (673 mg, 5.52 mmol) were added and the solution was refluxed for 2.5h. The resulting mixture was evaporated to dryness, dissolved in ethyl acetate, washed with an aqueous saturated solution of sodium bicarbonate and brine, dried over $MgSO_4$, filtrated and evaporated under vacuum. Purification over silica gel (Cyclohexane/EtOAc 99/1) afforded the product as a colorless oil (1.07 g, 82 %).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.42 (s, 1H), 7.34 – 7.24 (m, 2H), 7.26 – 7.16 (m, 3H), 7.08 – 6.99 (m, 2H), 4.09 (s, 2H), 2.31 (s, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 140.0, 138.0, 137.3, 133.4, 130.9, 129.1 (2C), 128.6 (2C), 128.4, 126.3, 124.7, 41.4, 20.7.

HRMS-ASAP calculated for $C_{14}H_{13}Br$ [$M^{+\cdot}$], 260.0201, found 260.0203.

2-(2-Benzyl-5-methylphenyl)-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolane 48



Chemical Formula: $C_{20}H_{25}BO_2$
Molecular weight: 308.23 g/mol

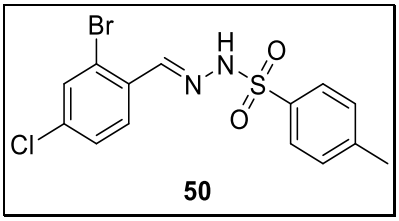
n-BuLi 2.5M in n-hexane (1.47 mL, 3.65 mmol) was added to a solution of **47** (530 mg, 2.03 mmol) in 8 mL of anhydrous THF at -78 °C. The solution was stirred for 1 hour and *i*PrOBPin (0.54 mL, 2.64 mmol) was added. The mixture was stirred for 2 h at -78 °C and subsequently warm to room temperature over 1 h. The reaction was quenched with water and extracted with EtOAc. The combined organic phases were dried over MgSO4, filtered and concentrated under vacuum. Purification over silica gel (Cyclohexane/EtOAc 98/2) afforded the product as a yellow oil (436 mg, 70%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.63 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.25 – 7.20 (m, 2H), 7.18 – 7.11 (m, 4H), 7.06 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.29 (s, 2H), 2.32 (s, 3H), 1.27 (s, 12H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 144.5, 142.9, 136.7 (2C), 134.8, 131.9, 130.2, 129.1 (2C), 128.2 (2C), 125.6, 83.6 (2C), 40.6, 24.9 (4C), 21.0.

HRMS-ESI calculated for $C_{20}H_{22}BO_2$ [M+ H^+] 309.2026, found 309.2039.

N'-[(Z)-(2-bromo-4-chlorophenyl)methylidene]-4-methylbenzene-1-sulfonohydrazide 50



Chemical Formula: $C_{14}H_{12}BrClN_2O_2S$
Molecular weight: 387.67 g/mol

Prepared from 2-bromo-4-chlorobenzaldehyde (1 g, 4.56 mmol), following general procedure A, the expected compound was obtained as a white powder (1.72 g, 98%).

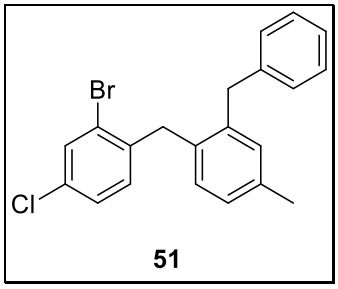
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.05 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.88 – 7.85 (m, 2H), 7.83 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.29 (dd, *J* = 8.6, 2.0 Hz, 1H), 2.42 (s, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 144.7, 136.9, 135.2, 132.8 (2C), 130.8, 130.0 (2C), 128.6, 128.3, 128.1 (2C), 124.2, 21.8.

Melting point 185-187 °C.

HRMS-ESI calculated for $C_{14}H_{12}BrClN_2O_2S$ [M+H$^+$] 386.9570, found 386.9753.

1-[(2-Benzyl-4-methylphenyl)methyl]-2-bromo-4-chlorobenzene 51



Chemical Formula: $C_{21}H_{18}BrCl$
Molecular weight: 385.73 g/mol

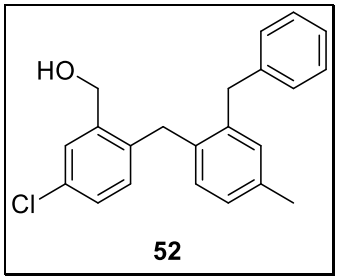
Prepared from **50** (451 mg, 1.17 mmol) and **48** (314 mg, 1.4 mmol), following general procedure B, the expected compound was obtained as a colorless oil (175 mg, 40%).

^{1}**H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.57 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.26 – 7.21 (m, 2H), 7.17 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.11 – 7.05 (m, 5H), 6.80 (s, 1H), 6.72 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 3.94 (s, 2H), 3.88 (s, 2H), 2.30 (s, 3H).

^{13}**C NMR** (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 140.4, 138.7, 137.0, 136.5, 136.3, 132.6, 132.2, 131.2, 131.1, 130.8, 128.9 (2C), 128.5 (2C), 127.8, 127.7, 126.1, 125.2, 38.9, 38.7, 21.2.

HRMS-ASAP calculated for $C_{21}H_{18}BrCl$ [$M^{+\cdot}$], 384.0280, found 384.0279.

{2-[(2-Benzyl-4-methylphenyl)methyl]-5-chlorophenyl}methanol 52



Chemical Formula: $C_{22}H_{21}ClO$
Molecular weight: 336.86 g/mol

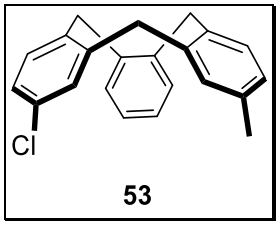
Prepared from **51** (270 mg, 0.69 mmol), following general procedure C, the crude mixture was engaged without purification in the reduction reaction following general procedure D, the expected compound was obtained as a colorless oil (166 mg, 71%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.42 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.29 – 7.24 (m, 2H), 7.22 – 7.14 (m, 2H), 7.11 – 7.07 (m, 3H), 7.05 – 7.02 (m, 1H), 6.86 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.67 (s, 1H), 4.41 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.93 (s, 2H), 3.85 (s, 2H), 2.25 (s, 3H), 1.41 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 140.69, 140.59, 137.87, 136.61, 136.32, 135.89, 132.44, 131.38, 130.88, 130.35, 128.75, 128.59, 127.77, 127.77, 127.56, 126.22, 77.16, 62.55, 39.10, 34.88, 21.21.

HRMS-ASAP calculated for $C_{22}H_{19}Cl$ [M-H_2O], 318.1175, found 318.1169.

CTV-*C₁* 53



Chemical Formula: $C_{22}H_{19}Cl$
Molecular weight: 318.84 g/mol

Phosphorus pentoxide (697 mg, 2.4 mmol) was added to a solution of **52** (80 mg, 0.24 mmol) in acetonitrile (48 mL) and the mixture was stirred for 1 h at 60 °C. The reaction was quenched with an aqueous solution of saturated $NaHCO_3$, extracted with EtOAc, washed with brine, dried over $MgSO_4$ and concentrated under vacuum. Purification over silica gel (cyclohexane/EtOAc 95/5) afforded the product as a white powder (62 mg, 91%).

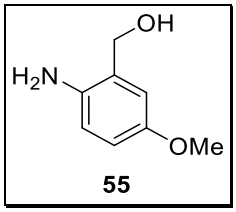
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.31 – 7.26 (m, 2H), 7.25 – 7.15 (m, 3H), 7.06 – 7.01 (m, 3H), 6.98 (dd, *J* = 8.3, 2.2 Hz, 1H), 6.84 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.74 (dd, *J* = 15.7, 13.7 Hz, 3H), 3.68 – 3.55 (m, 3H), 2.16 (s, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 141.4, 139.9, 138.8, 138.7, 138.2, 136.7, 136.5, 132.3, 131.5, 130.6, 130.2, 130.19, 130.15, 129.9, 128.1, 127.4, 127.2, 127.1, 37.1, 36.9, 36.6, 21.1.

Melting point 206-208 °C.

HRMS-ASAP calculated for $C_{22}H_{19}Cl$ [$M^{+\cdot}$] 318.1175, found 318.1171.

(2-Amino-5-methoxyphenyl)methanol 55



Chemical Formula: $C_8H_{11}NO_2$
Molecular weight: 153.18 g/mol

In a round bottom flask, lithium aluminium hydride (3.4 g, 89.7 mmol) was added dropwise at 0 °C to a solution of 5 – methoxyanthranilic acid (5.0 g, 29.9 mmol) in anhydrous THF (50 mL) and the mixture was stirred for 3 h at room temperature. 3.4 mL of water was added, the solution was stirred for few minutes, 3.4 mL of a 15% solution of NaOH was added and the solution was stirred for few minutes. Finally, 10.2 mL of water and $MgSO_4$ were added and the mixture was filtrated and concentrated under vacuum to obtain the product without further purification as a light brown powder (3.92 g, 87%).

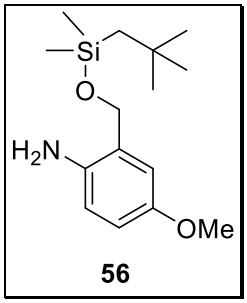
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 6.72 (m, 2H), 6.66 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.65 (s, 2H), 3.75 (s, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 152.6, 139.5, 126.5, 117.5, 115.1, 114.7, 64.4, 55.9.

Data consistent with literature.[227]

[227] Wales, S. M. et al., *Benzoazepine-Fused Isoindolines via Intramolecular (3 + 2)-Cycloadditions of Azomethine Ylides with Dinitroarenes*, Org. Lett., **2019**, Vol. 21 (12), 4703–4708.

2-[(*tert*-Butyldimethylsilyl)oxymethyl]-4-methoxyaniline 56



Chemical Formula: $C_{14}H_{25}NO_2Si$
Molecular weight: 267.44 g/mol

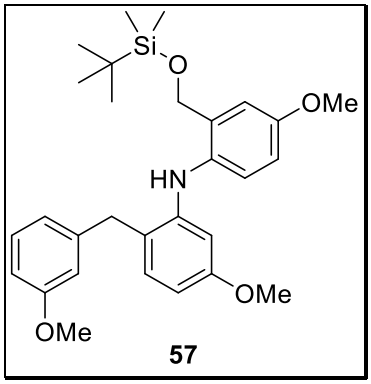
55 (3.9 g, 25.6 mmol), TBDMSCl (5.79 g, 38.4 mmol) and imidazole (2.62 g, 38.4 mmol) were dissolved in dichloromethane (40 mL) and the solution was stirred overnight at room temperature. The reaction was quenched with water, extracted with ethyl acetate, washed with brine, dried over $MgSO_4$ and concentrated under vacuum. Purification over silica gel (cyclohexane/Et_2O 9/1 to 8/2) afforded the product as a red oil (5.67 g, 83%).

^{1}**H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 6.70 – 6.66 (m, 2H), 6.65 – 6.59 (m, 1H), 4.65 (s, 2H), 3.86 (s, 2H), 3.74 (s, 3H), 0.91 (s, 9H), 0.08 (s, 6H).

^{13}**C NMR** (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 152.4, 139.5, 126.9, 116.9, 114.5, 113.8, 64.7, 55.9, 26.0 (3C),18.4, -5.1 (2C).

HRMS-ESI calculated for $C_{14}H_{25}NO_2Si$ [$M^{+\cdot}$] 267.1655, found 267.1657

2-(((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)methyl)-4-methoxy-*N*-(5-methoxy-2-(3-methoxybenzyl)phenyl)aniline 57



Chemical Formula: $C_{29}H_{39}NO_4Si$
Molecular weight: 493.72 g/mol

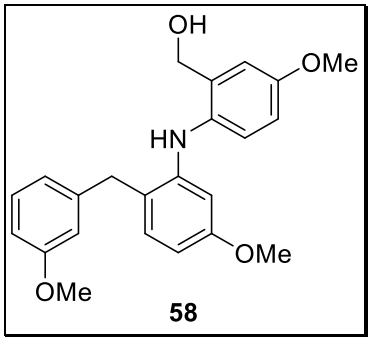
Obtained from **32** (3.0 g, 9.77 mmol) and **56** (2.61 g, 9.77 mmol), following general procedure E, the expected product was obtained as a yellow oil. (4.66 g, 97%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.21 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.05 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.98 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 6.81 – 6.73 (m, 4H), 6.38 (dt, *J* = 8.2, 2.6 Hz, 2H), 5.67 (s, 1H), 4.44 (s, 2H), 3.89 (s, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 0.89 – 0.86 (m, 9H), 0.03 – -0.01 (m, 6H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 159.9, 159.5, 155.6, 144.8, 141.7, 134.9, 133.7, 131.5, 129.7, 123.4, 121.1, 120.0, 114.5, 113.6, 113.3, 111.8, 104.4, 101.5, 62.9, 55.7, 55.3, 55.2, 37.4, 26.0 (3C), 18.4, -5.1 (2C).

HRMS-ESI calculated for $C_{29}H_{39}NO_4$ [$M^{+\cdot}$] 493.2648, found 493.2647

(5-Methoxy-2-((5-methoxy-2-(3-methoxybenzyl)phenyl)amino)phenyl)methanol 58



Chemical Formula: $C_{23}H_{25}NO_4$
Molecular weight: 379.46 g/mol

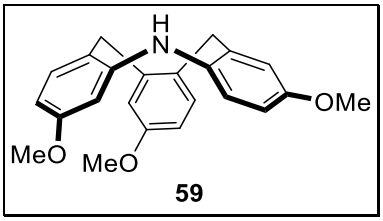
Tetrabutylammonium fluoride (1M in THF, 5.7 mL, 5.7 mmol) was added at 0 °C to a solution of **57** (1.4 g, 2.84 mmol) in THF (25 mL) and the mixture was stirred overnight at room temperature. The solution was quenched with saturated $NaHCO_3$, extracted with ethyl acetate, washed with brine, dried over $MgSO_4$ and concentrated under vacuum. Purification over silica gel (Cyclohexane/Et_2O 7/3 to 4/6) afforded the product as a light yellow oil. (1.0 g, 96%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.22 (dd, *J* = 8.9, 7.6 Hz, 1H), 7.11 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.08 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.83 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 6.80 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 6.78 (m, 2H), 6.39 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 5.75 (s, 1H), 4.31 (d, *J* = 4.1 Hz, 2H), 3.94 (s, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.71 (s, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 159.9, 159.5, 155.6, 144.9, 141.8, 134.3, 134.1, 131.9, 129.6, 124.0, 120.9, 119.4, 114.8, 114.4, 114.0, 111.7, 104.0, 101.2, 63.4, 55.6, 55.3, 55.2, 37.7.

HRMS-ESI calculated for $C_{23}H_{26}NO_4$ [M+H$^+$] 380.1862, found 380.1843

CTV-1N 59



Chemical Formula: $C_{23}H_{23}NO_3$
Molecular weight: 361.44 g/mol

Perchloric acid (60% in water, 0.8 mL) was added dropwise at 0 °C to a solution of **58** (500 mg, 1.32 mmol) in acetonitrile (265 mL) and the solution was heated for 1 h at 60 °C. The reaction was quenched with water, extracted with ethyl acetate, washed with brine, dried over $MgSO_4$ and concentrated under vacuum. Purification over silica gel (cyclohexane/Et_2O 8/2 to 7/3) afforded the product as a white powder (425 mg, 89%).

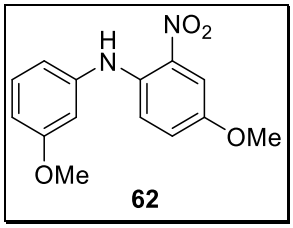
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.06 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.87 – 6.81 (m, 2H), 6.72 – 6.64 (m, 3H), 6.50 (s, 1H), 6.34 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.30 (s, 1H), 5.71 (s, 1H), 3.83 (s, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.69 (s, 5H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 159.0, 158.4, 155.4, 144.9, 141.4, 136.2, 134.0, 131.8, 131.8, 130.9, 122.1, 118.0, 117.0, 116.6, 113.1, 110.6, 106.3, 103.3, 55.5, 55.31, 55.30, 35.6, 35.5.

Melting point 166-168 °C

HRMS-ESI calculated for $C_{23}H_{24}NO_3$ [M+H$^+$] 362.1756, found 362.1755

4-Methoxy-*N*-(3-methoxyphenyl)-2-nitroaniline 62



Chemical Formula: $C_{14}H_{14}N_2O_4$
Molecular weight: 274.28 g/mol

Obtained from 3 – bromoanisole (1.5 g, 8.02 mmol) and 4-methoxy-2-nitoaniline (1.35 g, 8.02 mmol), following general procedure E, the product was obtained as a dark red powder. (2.13 g, 97%).

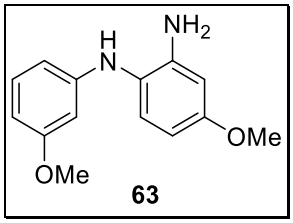
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 9.28 (s, 1H), 7.60 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 7.31 – 7.24 (m, 2H), 7.06 (dd, J = 9.4, 3.0 Hz, 1H), 6.82 (dd, J = 7.9, 1.8 Hz, 1H), 6.77 (t, J = 2.2 Hz, 1H), 6.71 (dd, J = 8.1, 2.1 Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.80 (s, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 160.8, 151.4, 140.7, 137.7, 133.2, 130.5, 126.2, 118.5, 115.6, 110.5, 109.1, 107.0, 55.9, 55.5.

Melting point 83-85 °C

HRMS-ESI calculated for $C_{14}H_{15}N_2O_4$ [M+H$^+$] 275.1032, found 275.1032.

4-Methoxy-*N1*-(3-methoxyphenyl)benzene-1,2-diamine 63



Chemical Formula: $C_{14}H_{16}N_2O2$
Molecular weight: 244.29 g/mol

62 (2 g, 7.3 mmol) and $SnCl_2$ (16.4 g, 73 mmol) were dissolved in a 1/1 mixture acetonitrile/water (40 mL) and the solution was stirred overnight at 80 °C. A saturated solution of potassium carbonate and a 2 M solution of sodium tartrate were added, the solution was stirred for 2 h, extracted with ethyl acetate, washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. The product was obtained without purification as a brown powder (1.77 g, 99%).

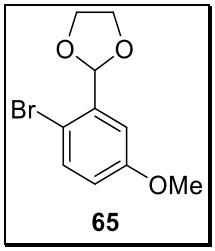
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.08 (t, J = 8.1 Hz, 1H), 7.00 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.36 – 6.29 (m, 3H), 6.25 (ddd, J = 8.1, 2.1, 0.7 Hz, 1H), 6.18 (t, J = 2.3 Hz, 1H), 5.03 (s, 1H), 3.86 (s, J = 9.9 Hz, 1H), 3.78 (s, J = 4.9 Hz, 3H), 3.74 (s, J = 4.0 Hz, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 160.9, 158.8, 148.4, 144.9, 130.2, 128.8, 120.6, 106.9, 104.2, 103.7, 101.3, 100.0, 55.4, 55.2.

Melting point 116-118 °C

HRMS-ESI calculated for $C_{14}H_{17}N_2O_2$ [M+H$^+$] 245.1290, found 245.1584.

2-(2-Bromo-5-methoxyphenyl)-1,3-dioxolane 65



Chemical Formula: $C_{10}H_{11}BrO_3$
Molecular weight: 259.29 g/mol

Ethylene glycol (1.6 mL, 28 mmol) and para toluenesulfonic acid (PTSA) (36 mg, 0.188 mmol) were added to a solution of 2-bromo-5-methoxybenzaldehyde (4 g, 18.6 mmol) in toluene (30 mL) under nitrogen atmosphere. The resulting mixture was heated at refluxed for 24 h under a Dean-Stark water separator. The reaction was quenched with NaOH solution (1 M), extracted with ethyl acetate, washed with water and brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification over silica gel (Cyclohexane/EtOAc 10/0 to 9/1) afforded the product as a yellow oil. (4.23 g, 88%).

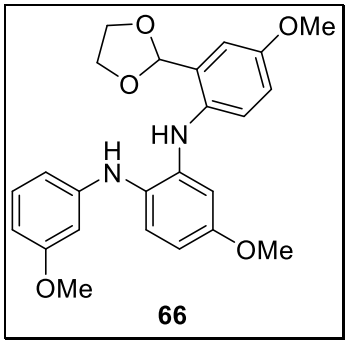
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 7.43 (dd, *J* = 8.7, 4.4 Hz, 1H), 7.18 – 7.13 (m, 1H), 6.82 – 6.72 (m, 1H), 6.03 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 4.19 – 3.99 (m, 4H), 3.81 – 3.76 (m, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ = 159.1, 137.5, 133.7, 116.8, 113.3, 113.2, 102.6, 65.6 (2C), 55.6.

Data consistent with literature[228]

[228] Xu, G. et al., *Copper-Catalyzed Tandem Cross-Coupling and Alkynylogous Aldol Reaction: Access to Chiral Exocyclic a-Allenols*, Org. Lett., **2021**, Vol. 23 (13), 5175–5179.

***N2*-[2-(1,3-Dioxolan-2-yl)-4-methoxyphenyl]-4-methoxy-*N1*-(3-methoxyphenyl)benzene-1,2-diamine 66**



Chemical Formula: $C_{24}H_{26}N_2O_5$
Molecular weight: 422.48 g/mol

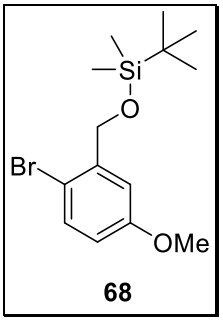
Obtained from **63** (680 mg, 2.78 mmol) and **65** (792 mg, 3.06 mmol), following general procedure E, the product was obtained as a dark green oil. (1.01 g, 73%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.32 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.12 – 7.07 (m, 2H), 7.06 – 7.04 (m, 1H), 6.87 (dd, J = 8.8, 3.0 Hz, 1H), 6.71 (s, 1H), 6.67 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 6.37 – 6.29 (m, 3H), 6.24 (t, J = 2.3 Hz, 1H), 5.64 (s, 1H), 5.12 (s, 1H), 3.89 – 3.85 (m, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.78 – 3.72 (m, 8H)

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 160.9, 158.7, 155.1, 148.6, 142.9, 133.7, 130.1, 129.9, 128.6, 122.9, 121.8, 115.5, 112.4, 107.1, 104.1, 104.0, 101.8, 100.1, 99.9, 65.0 (2C), 55.7, 55.4, 55.2.

HRMS-ESI in progress.

[(2-Bromo-5-methoxyphenyl)methoxy](*tert*- butyl)dimethylsilane 68



Chemical Formula: $C_{14}H_{23}BrO_2Si$
Molecular weight: 331.33 g/mol

Prepared from 2-bromo-5-methoxybenzaldehyde (8 g, 37.2 mmol), following general procedure D, the expected product was obtained as a yellow oil. This resulting oil was diluted in dichloromethane (70 mL), imidazole (3.8 g, 55.8 mmol) and *tert*-butyldimethylsilyl chloride (TBDMSCl) (8.4 g, 55.8 mmol) were added and the mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction was quenched with water, extracted with dichloromethane, washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification over silica gel (cyclohexane/Et_2O 96/4) afforded the product as a colorless oil (12.15 g, 98%).

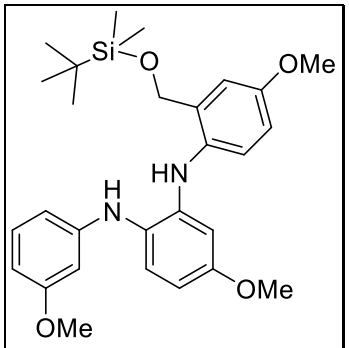
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.37 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.17 (d, J = 3.1 Hz, 1H), 6.68 (dd, J = 8.7, 3.2 Hz, 1H), 4.70 (s, 2H), 3.80 (s, 3H), 1.01 – 0.95 (m, 9H), 0.16 – 0.13 (m, 6H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 159.3, 141.6, 132.7, 114.1, 113.1, 111.2, 64.6, 55.5, 26.0, -5.2.

Data consistent with literature[229]

[229] Nason, D. M. et al., *Substituted 6-Phenyl-Pyridin-2-Ylamines: Selective and Potent Inhibitors of Neuronal Nitric Oxide Synthase*, Bioorganic Med. Chem. Lett., **2004**, Vol. 14 (17), 4511–4514.

***N2*-(2-{[(*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy]methyl}-4-methoxyphenyl)-4-methoxy-*N1*-(3-methoxyphenyl)benzene-1,2-diamine 69**



69

Chemical Formula: $C_{28}H_{38}N_2O_4Si$
Molecular weight: 494.71 g/mol

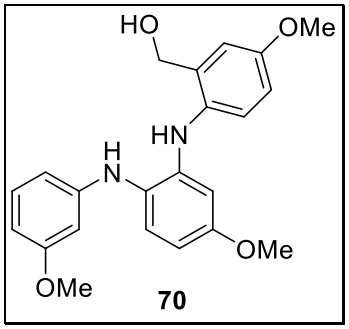
Obtained from **63** (1.7 g, 6.96 mmol) and **68** (2.53 g, 7.65 mmol), following general procedure E, the product was obtained as a brown oil. (3.1 g, 90%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.19 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.07 (ddd, *J* = 12.6, 8.1, 4.6 Hz, 2H), 6.94 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 6.78 (dd, *J* = 8.7, 3.0 Hz, 1H), 6.44 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 6.36 – 6.29 (m, 4H), 6.25 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H), 5.05 (s, 1H), 4.58 (s, 2H), 3.80 (s, *J* = 3.2 Hz, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 0.84 (s, *J* = 2.9 Hz, 9H), -0.02 (s, *J* = 3.1 Hz, 6H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 160.9, 158.5, 155.9, 148.3, 143.5, 135.9, 133.1, 130.1, 127.8, 124.1, 122.2, 113.8, 113.3, 107.7, 104.3, 103.8, 100.7, 100.0, 63.2, 55.6, 55.4, 55.2, 25.9 (3C), 18.4, -5.2 (2C).

HRMS-ESI calculated for $C_{28}H_{38}N_2O_4SiNa$ [M+Na$^+$] 517.2499, found 517.2498.

[5-Methoxy-2-({5-methoxy-2-[(3-methoxyphenyl)amino]phenyl}amino)phenyl]methanol 70



Chemical Formula: $C_{22}H_{24}N_2O_4$
Molecular weight: 380.44 g/mol

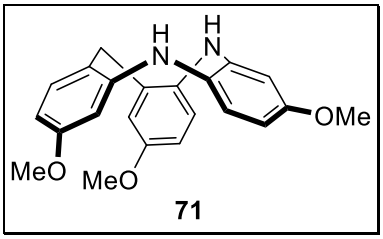
Tetrabutylammonium fluoride (1M in THF, 7.2 mL, 7.2 mmol) was added at 0 °C to a solution of **69** (1.79 g, 3.62 mmol) in THF (30 mL) and the mixture was stirred for 18 h at room temperature. The solution was quenched with saturated aqueous solution of $NaHCO_3$, extracted with ethyl acetate, washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification over silica gel (cyclohexane/Et_2O 5/5) afforded the product as a light yellow oil. (1.03 g, 96%).

^{1}**H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.23 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.11 – 7.05 (m, 2H), 6.85 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 6.81 (dd, *J* = 8.6, 3.0 Hz, 1H), 6.46 (d, *J* = 2.6 Hz, 2H), 6.37 – 6.28 (m, 3H), 6.23 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H), 5.20 (s, 1H), 4.48 (s, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 1.99 (s, 1H).

^{13}**C NMR** (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 160.9, 158.7, 155.9, 148.4, 143.6, 135.0, 133.7, 130.1, 128.6, 124.2, 121.5, 114.8, 114.0, 107.2, 104.0, 103.6, 100.2, 100.0, 63.4, 55.6, 55.4, 55.2.

HRMS-ESI calculated for $C_{22}H_{24}N_2O_4Na$ [M+Na$^+$] 403.1634, found 403.1629.

CTV-2N 71



Chemical Formula: $C_{22}H_{22}N_2O_3$
Molecular weight: 362.43 g/mol

Perchloric acid (60% in water, 0.16 mL) was added dropwise at 0 °C to a solution of **70** (100 mg, 0.26 mmol) in acetonitrile (53mL) and the solution was heated for 1 h at 60 °C. The reaction was quenched with water, extracted with ethyl acetate, washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification over silica gel (cyclohexane/Et_2O 9/1 to 8/2) afforded the product as a white powder (58 mg, 61%).

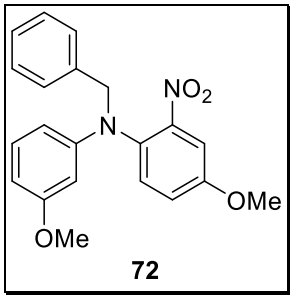
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 6.95 (dd, *J* = 8.3, 7.3 Hz, 2H), 6.86 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.66 (dd, *J* = 8.5, 3.0 Hz, 1H), 6.55 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 6.39 (td, *J* = 8.6, 2.7 Hz, 2H), 6.34 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 6.31 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 5.38 (s, 1H), 4.79 (s, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.73 (s, 6H), 3.63 (s, 2H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 159.1, 157.9, 156.2, 145.4, 142.9, 136.7, 136.2, 132.5, 128.4, 126.6, 124.5, 122.3, 116.7, 111.6, 107.1, 106.6, 106.1, 106.0, 55.5 (2C), 55.3, 34.9.

Melting point 166-168 °C

HRMS-ESI calculated for $C_{22}H_{23}N_2O_3$ [M+H$^+$] 363.1709, found 363.1700.

***N1*-Benzyl-4-methoxy-*N*-(3-methoxyphenyl)-2-nitroaniline 72**



Chemical Formula: $C_{21}H_{20}N_2O_4$
Molecular weight: 364.40 g/mol

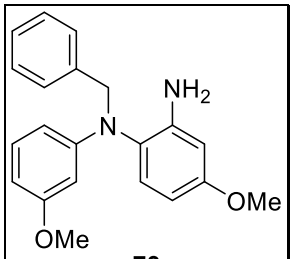
NaH (583 mg, 14.6 mmol) was added to a solution of **62** (2 g, 7.3 mmol) in anhydrous DMF (15 mL), under nitrogen atmosphere at 0 °C and the mixture was stirred for 30 minutes at room temperature. Benzyl bromide (1.73 mL, 14.6 mmol) was added and the solution was heated for 3 h at 80 °C. The reaction was quenched with water, extracted with ethyl acetate, washed with $Na_2S_2O_3$, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification over silica gel (cyclohexane/Et_2O 95/5) afforded the product as a red oil (2.7 g, 99%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.41 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.36 – 7.28 (m, 5H), 7.26 – 7.20 (m, 1H), 7.10 (dd, *J* = 8.8, 3.0 Hz, 1H), 7.03 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.32 (ddd, *J* = 8.2, 2.3, 0.6 Hz, 1H), 6.19 (ddd, *J* = 8.2, 2.4, 0.6 Hz, 1H), 6.13 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 4.83 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.66 (s, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 160.4, 157.8, 149.3, 148.0, 138.2, 133.5, 132.9, 129.8, 128.6 (2C), 127.1 (2C), 127.0, 120.5, 110.2, 107.5, 103.6, 101.3, 56.8, 56.0, 55.1.

HRMS-ESI calculated for $C_{21}H_{21}N_2O_4$ [M+H$^+$] 365.1501, found 365.1501.

***N1*-Benzyl-4-methoxy-*N1*-(3-methoxyphenyl)benzene-1,2-diamine 73**



73

Chemical Formula: $C_{21}H_{22}N_2O_2$
Molecular weight: 334.42 g/mol

72 (2.3 g, 6.3 mmol) and $SnCl_2$ (4.23 g, 31.5 mmol) were dissolved in a 1/1 mixture acetonitrile/water (40 mL) and the solution was stirred for 24 h at room temperature. A saturated solution of potassium carbonate and a 2 M solution of sodium tartrate were added and the solution was stirred for 2 h, extracted with ethyl acetate, washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification over silica gel (cyclohexane/Et_2O 75/25) afforded the product as a brown powder (1.22 g, 61%).

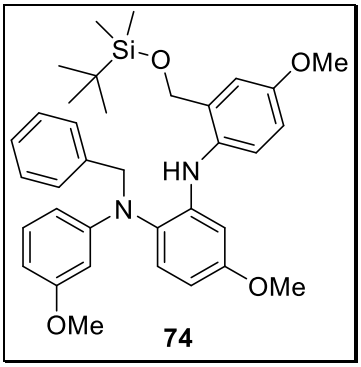
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.38 – 7.34 (m, 2H), 7.32 – 7.28 (m, 2H), 7.25 – 7.20 (m, 1H), 7.06 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 6.33 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.31 (m, 1H), 6.29 – 6.28 (m, 1H), 6.27 (dd, J = 2.4, 0.6 Hz, 1H), 6.25 (dd, J = 2.4, 0.6 Hz, 1H), 6.21 (t, J = 2.4 Hz, 1H), 4.78 (s, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.72 (s, 2H), 3.69 (s, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 160.8, 159.2, 149.9, 145.0, 139.1, 130.4, 130.0, 128.6 (2C), 127.2 (2C), 126.9, 126.0, 106.4, 104.7, 102.3, 101.5, 99.9, 55.9, 55.3, 55.1.

Melting point 106-108 °C

HRMS-ESI calculated for $C_{21}H_{23}N_2O_2$ [M+H$^+$] 335.1760, found 335.1754.

***N1*-Benzyl-N2-(2-{[(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy]methyl}-4-methoxyphenyl)-4-methoxy-*N1*-(3-methoxyphenyl)benzene-1,2-diamine 74**



Chemical Formula: $C_{35}H_{44}N_2O_4Si$
Molecular weight: 584.83 g/mol

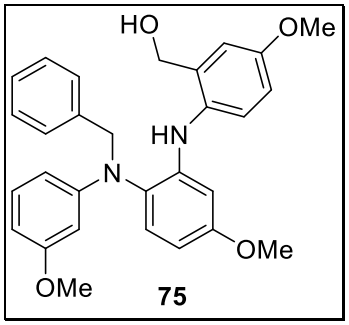
Obtained from **73** (1.6 g, 4.78 mmol) and **68** (1.72 g, 5.2 mmol), following general procedure E, the product was obtained as an orange oil. (2.72 g, 96%).

^{1}**H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.40 – 7.36 (m, 2H), 7.32 – 7.27 (m, 2H), 7.24 (dt, J = 5.1, 2.0 Hz, 1H), 7.11 – 7.08 (m, 1H), 7.07 – 7.05 (m, 1H), 7.03 (d, J = 3.8 Hz, 2H), 6.77 (dd, J = 8.6, 3.0 Hz, 1H), 6.36 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.35 – 6.33 (m, 1H), 6.31 (m, 2H), 6.30 – 6.28 (m, 1H), 5.83 (s, 1H), 4.84 (s, 2H), 4.52 (s, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 0.87 (s, J = 2.9 Hz, 9H), -0.00 (s, J = 3.0 Hz, 6H).

^{13}**C NMR** (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 160.5, 158.9, 156.4, 150.0, 144.2, 138.6, 137.4, 131.3, 130.1, 129.6, 128.3 (2C), 127. (2C), 126.7, 126.0, 125.3, 112.8, 112.7, 106.4, 103.5, 102.4, 99.9, 99.1, 61.9, 55.6, 55.2, 55.0, 54.8, 25.7 (3C), 18.1, -5.52 (2C).

HRMS-ESI calculated for $C_{35}H_{45}N_2O_4Si$ [M+H$^+$] 585.3149, found 585.3127.

[2-({2-[Benzyl(3-methoxyphenyl)amino]-5-methoxyphenyl}amino)-5-methoxyphenyl]methanol 75



Chemical Formula: $C_{29}H_{30}N_2O_4$
Molecular weight: 470.57 g/mol

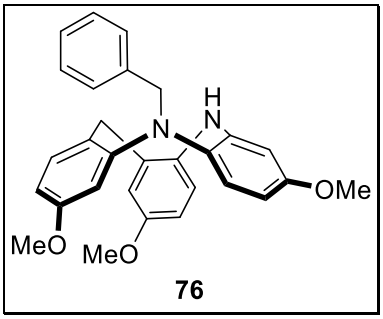
Tetrabutylammonium fluoride (1M in THF, 5.05 mL, 5.1 mmol) was added at 0 °C to a solution of **74** (1.48 g, 3.1 mmol) in THF (30 mL) and the mixture was stirred for 18 h at room temperature. The solution was quenched with saturated aqueous solution of $NaHCO_3$, extracted with ethyl acetate, washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification over silica gel (Cyclohexane/Et_2O 6/4 to 5/5) afforded the product as a yellow oil. (1.12 g, 94%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.37 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.31 – 7.26 (m, 2H), 7.25 – 7.21 (m, 1H), 7.12 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 7.09 (d, J = 6.2 Hz, 1H), 6.83 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 6.79 (dd, J = 8.6, 3.0 Hz, 1H), 6.41 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 6.35 (m, 2H), 6.30 (m, 1H), 6.28 (t, J = 2.3 Hz, 1H), 6.25 (s, 1H), 4.85 (s, 2H), 4.37 (s, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.69 (s, J = 3.3 Hz, 3H), 3.68 (s, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 160.9, 159.3, 156.2, 150.1, 144.0, 139.0, 135.5, 133.2, 130.5, 130.0, 128.6 (2C), 127.5 (2C), 127.0, 126.5, 124.9, 114.7, 114.0, 106.6, 103.8, 102.7, 100.0, 99.5, 63.4, 56.1, 55.6, 55.4, 55.2.

HRMS-ESI calculated for $C_{29}H_{31}N_2O_4$ [M+H$^+$] 471.2284, found 471.2277.

CTV-2N 76



Chemical Formula: $C_{29}H_{28}N_2O_3$
Molecular weight: 452.55 g/mol

Perchloric acid (60% in water, 0.92 mL) was added dropwise at 0 °C to a solution of **75** (430 mg, 0.64 mmol) in acetonitrile (180 mL) and the solution was heated for 1 h at 60 °C. The reaction was quenched with water, extracted with ethyl acetate, washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification over silica gel (cyclohexane/Et_2O 9/1 to 8/2) afforded the product as a white powder (293 mg, 71%).

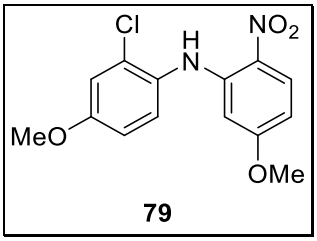
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.07 – 6.96 (m, 4H), 6.82 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.66 (d, J = 1.5 Hz, 2H), 6.49 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 6.47 – 6.43 (m, 3H), 6.39 (dd, J = 8.1, 2.5 Hz, 1H), 6.35 (dd, J = 8.7, 2.8 Hz, 1H), 6.28 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 5.58 (s, 1H), 4.25 (s, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.67 (s, 3H), 3.62 (s, 2H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 158.9, 158.7, 154.9, 148.5, 143.6, 137.8, 136.1, 131.7, 131.4, 130.9, 129.9, 128.7 (2C), 127. (2C), 126.5, 126.4, 121.1, 116.7, 111.7, 106.3, 106.3, 105.7, 103.3, 58.7, 55.7, 55.4, 55.2, 35.9.

Melting point 79-81 °C

HRMS-ESI calculated for $C_{29}H_{29}N_2O_3$ [M+H$^+$] 453.2178, found 453.2163.

2-Chloro-4-methoxy-*N*-(5-methoxy-2-nitrophenyl)aniline 79



Chemical Formula: $C_{14}H_{13}ClN_2O_4$
Molecular weight: 308.72 g/mol

Prepared from 4-bromo-3-chloroanisole (1 g, 4.52 mmol) and 5-methoxy-2-nitroaniline (0.759 g, 4.52 mmol), following general procedure E, the product was obtained as a red powder. (1.04 g, 75%).

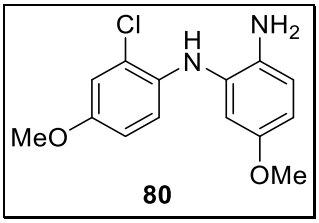
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 9.54 (s, 1H), 8.19 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 7.32 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.07 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 6.88 (dd, *J* = 8.8, 2.9 Hz, 1H), 6.34 (dd, *J* = 9.5, 2.6 Hz, 1H), 6.16 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.72 (s, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 165.7, 158.6, 146.0, 132.1, 129.2, 128.6, 128.5, 127.6, 115.7, 114.0, 106.3, 97.5, 55.9, 55.8.

Melting Point 115-117 °C

HRMS-ESI calculated for $C_{14}H_{14}ClN_2O_4$, $[M+H^+]$ 309.0642, found 309.0641

***N1*-(2-Chloro-4-methoxyphenyl)-5-methoxybenzene-1,2-Diamine 80**



Chemical Formula: $C_{14}H_{15}ClN_2O_2$
Molecular weight: 278.74 g/mol

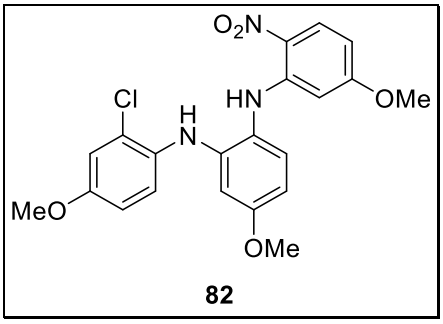
79 (1.04 g, 3.37 mmol) and $SnCl_2$ (7.67 g, 33.7 mmol) were dissolved in a 1/1 mixture acetonitrile/water (40 mL) and the solution was stirred overnight at 80 °C. A saturated solution of potassium carbonate and a 2 M solution of sodium tartrate were added, the solution was stirred for 2 h, extracted with ethyl acetate, washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. The product was obtained without purification as a brown oil (0.94 g, 99%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 6.96 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 6.82 – 6.68 (m, 3H), 6.64 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 6.57 (dd, *J* = 8.5, 2.8 Hz, 1H), 5.50 (s, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 3.44 (s, 2H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 153.58, 153.56, 134.5, 134.1, 130.8, 122.2, 117.7, 117.6, 115.2, 113.9, 110.2, 108.9, 56.0, 55.8.

HRMS-ESI in progress.

***N2*-(2-Chloro-4-methoxyphenyl)-4-methoxy-*N1*-(5-methoxy-2-nitrophenyl)benzene-1,2-diamine 82**



Chemical Formula: $C_{21}H_{20}ClN_3O_5$
Molecular weight: 429.86 g/mol

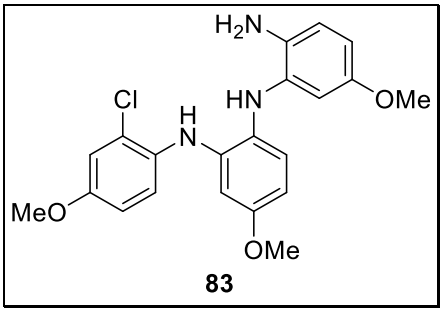
Prepared from **80** (940 mg, 3.4 mmol) and 2-iodo-4-methoxy-1-nitrobenzene (941 mg, 3.4 mmol), following general procedure E, as a red oil. (1.316 g, 90%).

^{1}**H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 9.30 (s, 1H), 8.17 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 7.27 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.12 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.95 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 6.80 (dd, *J* = 8.8, 2.9 Hz, 1H), 6.51 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 6.44 (dd, *J* = 8.6, 2.8 Hz, 1H), 6.31 (dd, *J* = 9.5, 2.6 Hz, 1H), 6.12 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 5.86 (s, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.69 (s, 3H).

^{13}**C NMR** (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 166.0, 159.9, 156.4, 147.5, 142.8, 131.1, 129.7, 129.0, 128.5, 127.3, 124.6, 118.2, 115.4, 113.8, 106.7, 104.9, 100.6, 97.4, 55.9, 55.8, 55.5.

HRMS-ESI calculated for $C_{21}H_{20}ClN_3O_5$, [M+·] 429.1091, found 429.1078

***N1*-(2-Amino-5-methoxyphenyl)-*N2*-(2-chloro-4-methoxyphenyl)-4-methoxybenzene-1,2-diamine 83**



Chemical Formula: $C_{21}H_{22}ClN_3O_3$
Molecular weight: 399.88 g/mol

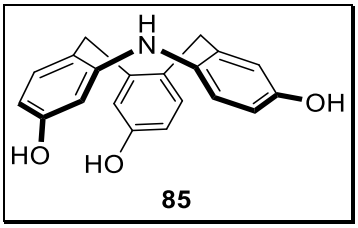
82 (1.32 g, 3.06 mmol) and $SnCl_2$ (6.91 g, 30.6 mmol) were dissolved in a 1/1 mixture acetonitrile/water (40 mL) and the solution was stirred overnight at 80 °C. A saturated solution of potassium carbonate and a 2 M solution of sodium tartrate were added, the solution was stirred for 2 h, extracted with ethyl acetate, washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. The product was obtained without further purification as a brown oil (1.21 g, 99%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.17 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 6.97 – 6.91 (m, 2H), 6.77 (dd, *J* = 8.9, 2.9 Hz, 1H), 6.72 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.62 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 6.45 (dd, *J* = 8.6, 2.8 Hz, 1H), 6.37 (dd, *J* = 8.4, 2.8 Hz, 1H), 6.32 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 5.96 (s, 1H), 5.25 (s, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 3.20 (s, 2H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 157.1, 155.1, 154.6, 138.8, 135.9, 132.9, 129.5, 126.0, 125.7, 124.3, 121.8, 118.4, 115.2, 113.8, 106.2, 106.0, 103.9, 103.2, 55.9, 55.7, 55.6.

HRMS-ESI in progress.

CTV-1N 85



Chemical Formula: $C_{20}H_{17}NO_3$
Molecular weight: 319.36 g/mol

Boron tribromide (1M in DCM, 12.5 mL, 12.5 mmol) was added at 0 °C to a solution of **59** (450 mg, 1.25 mmol) in dichloromethane and the mixture was stirred for 3 h at room temperature. The reaction was quenched at 0 °C with water, extracted with ethyl acetate, washed with brine, dried over $MgSO_4$ and concentrated under vacuum. Purification over silica gel (Et_2O/cyclohexane 7/3) afforded the product as a light pink powder (383 mg, 96%).

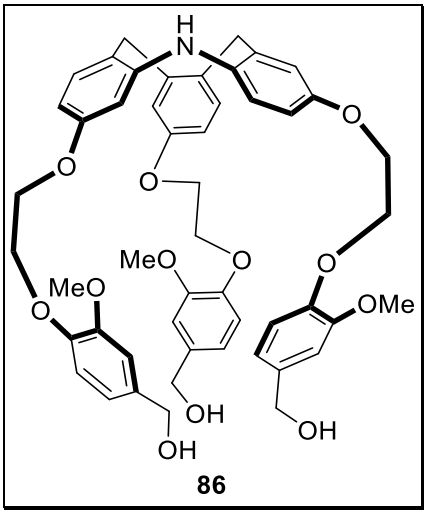
^{1}H NMR (400 MHz, $(CD_3)_2CO$): δ = 8.08 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 6.95 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 6.77 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.65 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.56 (ddd, *J* = 8.6, 2.8, 1.6 Hz, 2H), 6.37 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 6.34 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 6.16 (dd, *J* = 8.2, 2.5 Hz, 1H), 3.81 (s, 2H), 3.64 (s, 2H).

^{13}C NMR (100 MHz, $(CD_3)_2CO$): δ = 155.9, 155.4, 152.0, 145.5, 141.3, 135.4, 133.2, 131.4, 130.5, 130.3, 121.9, 117.4, 116.8, 115.7, 113.8, 111.9, 106.6, 103.7, 35.6, 35.5.

Melting point 210-212 °C

HRMS-ESI calculated for $C_{20}H_{18}NO_3$ [M+H$^+$] 320.1287, found 320.1279.

Compound 86



Chemical Formula: $C_{50}H_{53}NO_{12}$
Molecular weight: 859.97 g/mol

In a round bottom flask placed under nitrogen atmosphere, **6** (3.85 g, 12.5 mmol), was added to a solution of **85** (800 mg, 2.5 mmol) and cesium carbonate (4.6 g, 12.5 mmol) in anhydrous DMF (45 mL) under nitrogen atmosphere. The mixture was stirred overnight at 80 °C. The reaction mixture was quenched with water, extracted with ethyl acetate, washed with brine, dried over $MgSO_4$ and concentrated under vacuum. Purification over silica gel (EtOAc/MeOH, 100/0 to 95/5) afforded the product as a white solid (1.76 g, 82%).

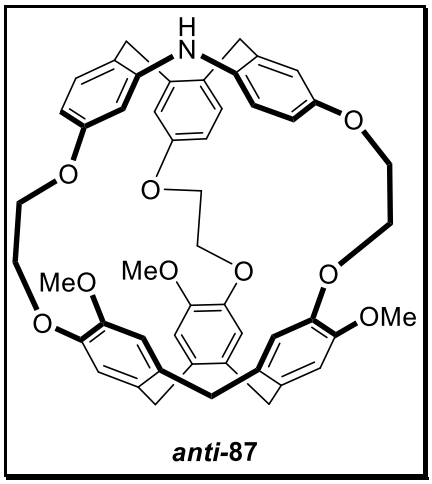
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 6.98 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.93 – 6.75 (m, 11H), 6.73 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 6.68 (ddd, *J* = 8.5, 6.3, 2.8 Hz, 2H), 6.51 (s, 1H), 6.33 (m, 2H), 4.63 – 4.55 (m, 6H), 4.37 – 4.28 (m, 6H), 4.25 (m, 4H), 4.18 (m, 2H), 3.85 – 3.81 (m, 6H), 3.80 (s, 3H),3.78 (s, 2H), 3.64 (s, 2H), 2.11 (s, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 158.0, 157.4, 154.3, 149.9, 149.7, 147.64, 147.59, 144.8, 141.4, 136.5, 134.8, 134.72, 133.9, 132.2, 131.5, 130.9, 122.03, 121.97, 121.5, 119.7, 119.5, 119.4, 118.3, 117.9, 117.3, 114.3, 114.12, 114.09, 113.8, 111.5, 111.2, 111.1, 111.05, 110.8, 106.9, 104.3, 71.5, 67.9, 66.7, 66.5, 66.4, 65.23, 65.21, 65.18, 61.3, 56.0, 55.9, 55.8, 35.5, 35.4.

Melting point 140-142 °C

HRMS-ESI calculated for $C_{50}H_{53}NO_{12}Na$ [M+Na$^+$] 882.3465, found 882.3474.

Cryptophane-1N *Anti* 87



Chemical Formula: $C_{50}H_{47}NO_9$
Molecular weight: 805.92 g/mol

Formic acid (470 mL) was added to a solution of **86** (452 mg, 0.49 mmol) in chloroform (18 mL), in four different batches and the reaction were heated for 3 h at 55 °C. The mixture was evaporated to dryness and purification of the crude residue over silica gel (DCM/Et_2O 95/5 to 80/20) afforded the product (second spot) as a white powder (1.06 g, 67%).

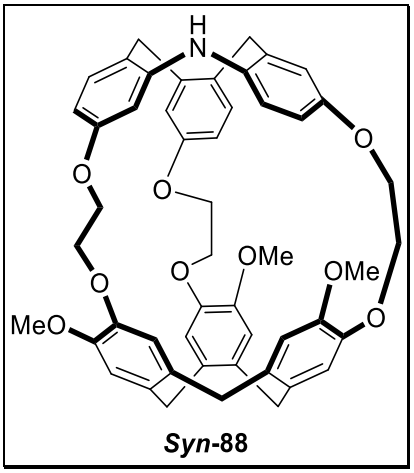
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.13 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.05 (dd, *J* = 8.4, 6.1 Hz, 2H), 6.80 (dd, *J* = 4.6, 2.7 Hz, 2H), 6.72 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 6.69 (s, 1H), 6.67 – 6.63 (m, 4H), 6.59 (s, 1H), 6.38 (dd, *J* = 8.7, 2.9 Hz, 1H), 6.33 (dt, *J* = 8.4, 2.4 Hz, 2H), 4.64 – 4.56 (m, 5H), 4.42 – 4.30 (m, 3H), 4.29 – 4.13 (m, 6H), 4.11 – 3.93 (m, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.47 – 3.35 (m, 5H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 157.8, 156.3, 155.0, 148.72, 148.66, 148.5, 147.4, 147.32, 147.26, 147.2, 140.9, 139.3, 139.0, 133.0, 132.9, 132.7, 132.4, 131.84, 131.82, 131.4, 130.8, 130.5, 129.4, 126.8, 112.0, 119.7, 117.3, 116.8, 116.2, 114.91, 114.89 114.5, 114.4, 112.3, 111.4, 110.4, 67.3, 67.0, 66.5, 65.9, 65.6, 65.2, 56.7, 56.39, 56.37, 36.4, 36.3, 35.1, 35.0, 31.1.

Melting point 257-259 °C

HRMS-ESI calculated for $C_{50}H_{47}NO_9Na$ [M+Na$^+$] 828.3149, found 828.3162.

Cryptophane-1N *Syn* 88



Chemical Formula: $C_{50}H_{47}NO_9$
Molecular weight: 805.92 g/mol

Formic acid (470 mL) was added to a solution of **86** (452 mg, 0.494 mmol) in chloroform (18 mL), in four different batches and the reaction were heated for 3 h at 55 °C. The mixture was evaporated to dryness and purification of the crude residue over silica gel (DCM/Et_2O 95/5 to 80/20) afforded the product (first spot) as a withe powder (365 mg, 23%).

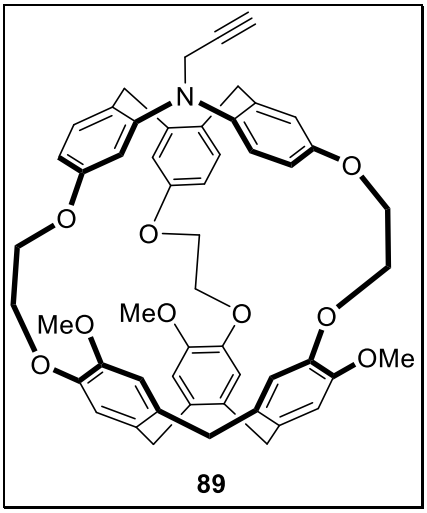
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.14 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 7.09 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.03 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.88 (s, 1H), 6.80 (d, *J* = 2.8 Hz, 2H), 6.71 (m, 7H), 6.62 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 6.54 (dd, *J* = 8.4, 2.5 Hz, 1H), 5.24 (s, 1H), 4.61 (m, 5H), 4.37 – 4.20 (m, 8H), 3.99 – 3.86 (m, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 3.70 – 3.60 (m, 2H), 3.49 – 3.39 (m, 5H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 158.5, 157.0, 155.2, 150.3, 149.9, 149.8, 147.0, 146.9, 146.8, 146.7, 140.6, 139.3, 138.9, 134.9, 134.6, 134.4, 132.1, 131.8, 131.7, 131.4, 131.3, 130.3, 129.8, 126.6, 122.5, 120.5, 120.3, 119.5, 119.0, 114.7, 114.1, 114.0, 113.9, 113.7, 113.3, 111.8, 72.0, 71.3, 71.0, 66.4, 66.3, 66.0, 56.3, 56.1, 56.1, 53.5, 36.4, 36.3, 35.2, 35.1.

Melting point 205-207 °C

HRMS-ESI calculated for $C_{50}H_{47}NO_9Na$ [M+Na$^+$] 828.3149, found 828.3162.

Cryptophane-1N propargyl 89



Chemical Formula: $C_{53}H_{49}NO_9$
Molecular weight: 843.97 g/mol

Sodium hydride (60 %, 15 mg, 0.37 mmol) was added at 0 °C to a solution of **87** (100 mg, 0.12 mmol) in anhydrous DMF (3 mL) under nitrogen atmosphere, and the mixture was stirred for 30 min at room temperature. Propargyl bromide (36 µL, 0.372 mmol) was added and the solution was stirred for 3 h at 80 °C. The reaction was quenched with a saturated solution of ammonium chloride, extracted with ethyl acetate, washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification over silica gel (DCM/Et_2O 10/0 to 80/20) afforded the product as a light-yellow powder (68 mg, 65%).

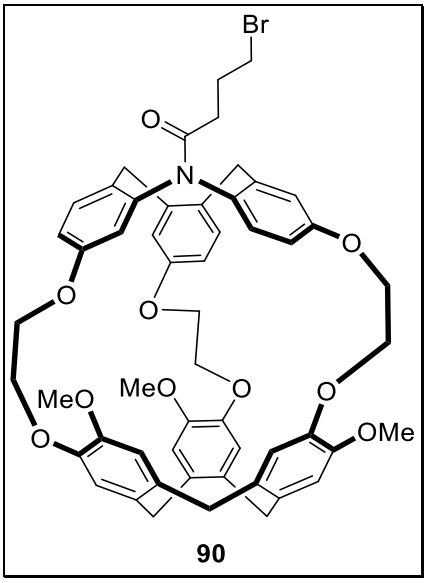
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.38 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.14 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.05 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.03 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 6.81 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 6.75 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 6.67 (s, 1H), 6.66 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 6.63 (s, 1H), 6.61 (d, *J* = 3.7 Hz, 2H), 6.45 – 6.39 (m, 2H), 6.34 (dd, *J* = 8.4, 2.6 Hz, 1H), 5.09 (dd, *J* = 12.2, 10.7 Hz, 2H), 4.60 (dd, *J* = 13.7, 3.7 Hz, 3H), 4.40 – 4.30 (m, 3H), 4.31 – 4.15 (m, 6H), 4.11 (dd, *J* = 5.5, 2.4 Hz, 2H), 4.03 (m, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.38 (d, *J* = 13.8 Hz, 3H), 3.30 (d, *J* = 13.5 Hz, 2H), 2.13 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 157.1, 156.2, 156.1, 150.0, 148.7, 148.6, 148.5, 147.5, 147.4, 147.3, 143.81, 141.84, 141.6, 134.5, 132.87 (2C), 132.83, 132.4, 132.1, 132.09, 132.06, 130.8, 130.6, 128.0, 119.5, 119.3, 118.1, 117.0, 116.6, 116.4, 114.7, 114.6, 114.5, 112.3, 112.1, 111.4, 80.9, 71.6, 67.1, 66.9, 66.8, 66.0, 65.8, 65.6, 65.4, 56.6, 56.5, 56.4, 47.1, 36.4, 35.0, 34.9, 15.4.

Melting point 274-276 °C

HRMS-ESI calculated for $C_{53}H_{49}NO_9Na$ [M+Na$^+$] 866.3305, found 866.3312.

Cryptophane-1N bromobutyryl 90



Chemical Formula: $C_{54}H_{52}BrNO_{10}$
Molecular weight: 859.97 g/mol

Sodium hydride (60 %, 10 mg, 0.25 mmol) was added at 0 °C to a solution of **87** (100 mg, 0.12 mmol) in anhydrous THF (5 mL) under nitrogen atmosphere, and the mixture was stirred for 30 min at room temperature. 4-Bromobutyryl Chloride (44 µL, 0.37 mmol) was added and the solution was stirred overnight at room temperature. The reaction was quenched with a water, extracted with ethyl acetate, washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification over silica gel (DCM/Et_2O 9/1 to 7/3) afforded the product as a white powder (90 mg, 76%).

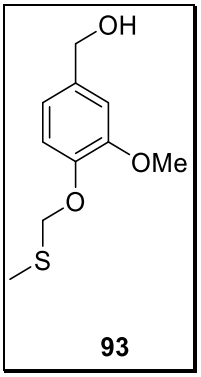
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) 1:1 mixture of rotamers : δ = 7.24 (m, 1H), 7.22 – 7.13 (m, 2H), 7.11 – 7.00 (m, 3H), 6.92 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 6.86 (dd, *J* = 4.7, 2.6 Hz, 2H), 6.77 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 6.73 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 6.67 (d, *J* = 4.4 Hz, 6H), 6.61 (t, *J* = 4.2 Hz, 6H), 6.56 (dd, *J* = 8.5, 2.4 Hz, 1H), 6.47 (ddd, *J* = 13.5, 8.6, 2.6 Hz, 2H), 6.39 (ddt, *J* = 13.3, 7.9, 2.7 Hz, 3H), 4.60 (dt, *J* = 13.6, 4.1 Hz, 4H), 4.48 – 4.16 (m, 24H), 4.00 (ddd, *J* = 10.0, 6.7, 2.5 Hz, 6H), 3.83 – 3.73 (m, 18H), 3.58 – 3.26 (m, 14H), 2.56 – 2.39 (m, 4H), 2.34 – 2.17 (m, 4H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) 1:1 mixture of rotamers : δ = 172.6, 172.5, 157.9, 157.5, 157.4, 157.3, 156.6, 156.4, 148.63 (2C), 148.56 (4C), 148.54, 147.52, 147.47, 147.45, 147.4, 147.3, 147.2, 142.2, 142.1, 142.0 (2C), 141.2, 140.0, 133.8, 133.7, 132.83, 132.78, 132.73 (2C), 132.69 (2C), 132.5, 132.4, 132.01, 131.96, 131.93 (2C), 131.88, 131.81 (2C), 131.6, 131.1, 130.8, 130.6, 130.5, 130.2, 120.5, 120.0, 119.4, 119.3, 119.2, 118.5, 116.7, 116.6, 116.52, 116.46, 116.37, 116.29, 114.8, 114.72, 114.68, 114.6, 114.5, 114.3, 113.8, 113.4, 112.4, 112.3, 111.8, 111.8, 68.6, 67.0, 66.92, 66.86, 66.77, 66.73, 66.67, 65.70, 65.66, 65.58, 65.4, 65.3, 56.6, 56.51, 56.49, 56.47 (2C), 56.3, 53.9, 36.3 (2C), 35.1, 35.0, 34.9, 34.0, 33.9, 31.88, 31.86, 31.1, 30.4, 29.4, 27.9, 27.8, 22.3.

Melting point 267-269 °C

HRMS-ESI calculated for $C_{54}H_{53}NO_{10}Br$ [M+H$^+$] 954.2853, found 954.2852.

{3-Methoxy-4-[(methylsulfanyl)methoxy]phenyl}methanol 93



Chemical Formula: $C_{10}H_{14}O_3S$
Molecular weight: 214.28 g/mol

Potassium carbonate (13.4 g, 97.2 mmol) was added to a solution of vanillyl alcohol (5 g, 32.4 mmol) in DMF and the solution was stirred for 1 h at room temperature. Chloromethyl methyl sulfide (3 mL, 35.6 mmol) was added dropwise at 0 °C and the solution was stirred overnight at room temperature. The reaction was quenched with cold water, extract with dichloromethane, washed with brine, dried over $MgSO_4$ and concentrated under vacuum. Purification over silica gel (cyclohexane/EtOAc 7/3 to 6/4) afforded the product as a colorless oil (4.47 g, 65%).

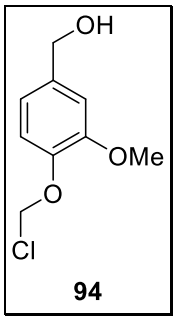
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 6.98 – 6.92 (m, 2H), 6.87 (dd, *J* = 8.1, 1.9 Hz, 1H), 5.22 (s, 2H), 4.62 (d, *J* = 3.5 Hz, 2H), 3.87 (s, 3H), 2.25 (s, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 150.8, 145.3, 135.7, 119.2, 117.0, 111.1, 74.3, 65.3, 55.9, 14.8.

HRMS-ESI calculated for $C_{10}H_{14}O_3SNa$ [M+Na$^+$] 237.0561, found 237.0556

Data consistent with literature.[219]

[4-(Chloromethoxy)-3-methoxyphenyl]methanol 94



Chemical Formula: $C_9H_{11}ClO_3$
Molecular weight: 202.63 g/mol

Sulfuryl chloride (2.51 mL, 31.2 mmol) was added dropwise at 0 °C to a solution of **93** (4.45 g, 20.7 mmol) in dichloromethane and the solution was stirred 1 h at room temperature. The solvent was removed under vacuum, purification over silica gel afforded the product as a white solid (2.93 g, 70%).

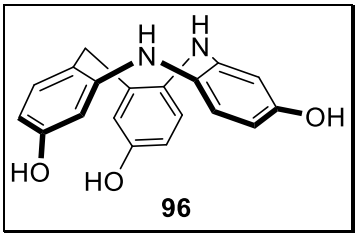
^{1}**H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.13 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.99 – 6.94 (m, 2H), 5.91 (s, 2H), 4.56 (s, 2H), 3.89 (s, 3H).

^{13}**C NMR** (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 150.3, 144.6, 133.7, 121.0, 117.1, 112.7, 78.3, 56.1, 46.2.

Melting point 66-68 °C

Data consistent with literature.[219]

CTV-2N 96



Chemical Formula: $C_{19}H_{16}N_2O_3$
Molecular weight: 320.35 g/mol

Boron tribromide (1M in DCM, 4.6 mL, 4.6 mmol) was added at 0 °C to a solution of **71** (475 mg, 1.3 mmol) in dichloromethane (7 mL) and the mixture was stirred for 3 h at room temperature. The reaction was quenched at 0 °C with water, extracted with ethyl acetate, washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification over silica gel (Cyclohexane/Et_2O 5/5 to 7/3) afforded the product as a light brown powder (295 mg, 70%).

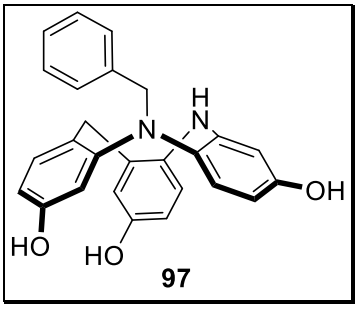
^{1}H NMR (400 MHz, $(CD_3)_2CO$): δ = 7.94 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.71 (s, 1H), 6.88 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.76 (dd, J = 10.6, 8.4 Hz, 2H), 6.51 (dd, J = 8.4, 2.9 Hz, 1H), 6.42 (m, 3H), 6.33 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.28 (dd, J = 8.1, 2.5 Hz, 1H), 6.22 (dd, J = 8.4, 2.8 Hz, 1H), 5.49 (s, 1H), 3.58 (s, 2H).

^{13}C NMR (100 MHz, $(CD_3)_2CO$): δ = 158.1, 157.1, 154.5, 148.7, 146.0, 137.8, 136.5, 133.2, 131.3, 126.6, 124.9, 123.4, 118.8, 114.4, 108.9, 108.7, 108.4, 107.4, 35.9.

Melting point 68-70 °C

HRMS-ESI calculated for $C_{19}H_{17}N_2O_3$ [M+H$^+$] 321.1239, found 321.1241.

CTV-2N 97



Chemical Formula: $C_{26}H_{22}N_2O_3$
Molecular weight: 410.47 g/mol

Boron tribromide (1M in DCM, 18.5 mL, 18.5 mmol) was added at 0 °C to a solution of **76** (1.4 g, 3.1 mmol) in dichloromethane (30 mL) and the mixture was stirred for 3 h at room temperature. The reaction was quenched at 0 °C with water, extracted with ethyl acetate, washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification over silica gel (Cyclohexane/Et_2O 5/5 to 7/3) afforded the product as a withe powder (828 mg, 66%).

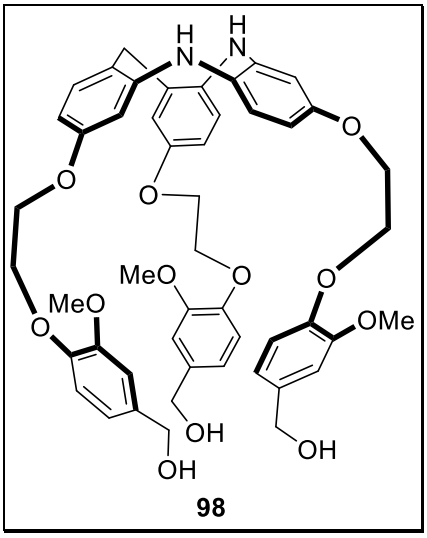
^{1}H NMR (400 MHz, $(CD_3)_2CO$): δ = 8.09 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.08 (s, 1H), 7.00 – 6.92 (m, 4H), 6.70 (dd, J = 8.4, 7.0 Hz, 2H), 6.58 (dd, J = 8.5, 2.9 Hz, 1H), 6.53 (dd, J = 7.4, 1.8 Hz, 2H), 6.44 (dd, J = 4.8, 2.5 Hz, 2H), 6.36 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 6.29 (dd, J = 8.0, 2.4 Hz, 1H), 6.23 (dd, J = 8.5, 2.7 Hz, 1H), 4.23 (s, 2H), 3.58 (s, 2H).

^{13}C NMR (100 MHz, $(CD_3)_2CO$): δ = 158.6, 158.5, 154.2, 150.7, 146.5, 140.7, 138.0, 133.9, 133.1, 132.9, 131.3, 130.4 (2C), 129.8 (2C), 128.2, 127.5, 123.4, 119.8, 115.1, 109.8, 109.2, 109.0, 106.4, 60.5, 37.5.

Melting point 136-138 °C

HRMS-ESI calculated for $C_{26}H_{23}N_2O_3$ [M+H$^+$] 411.1709, found 411.1711.

Compound 98



Chemical Formula: $C_{49}H_{52}N_2O_{12}$
Molecular weight: 860.96 g/mol

In a round bottom flask placed under nitrogen atmosphere, **6** (1.67 g, 5.4 mmol), was added to a solution of **96** (290 mg, 0.9 mmol) and cesium carbonate (1.76 g, 5.4 mmol) in anhydrous DMF (14 mL) under nitrogen atmosphere. The mixture was stirred overnight at 80 °C. The reaction was quenched with water, extracted with ethyl acetate, washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification over silica gel (EtOAc/MeOH, 100/0 to 96/4) afforded the product as a pink powder (485 mg, 62%).

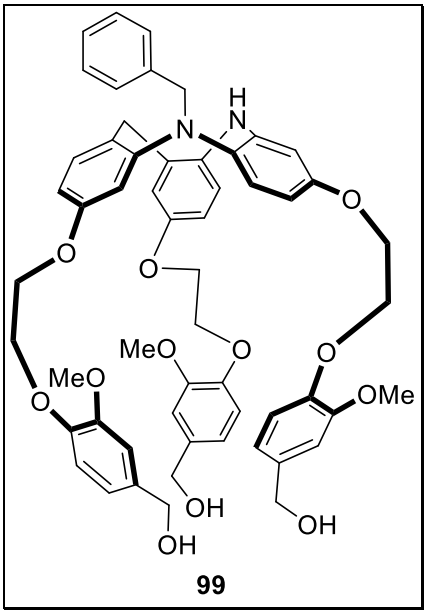
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO): δ = 7.58 (s, 1H), 7.03 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.99 – 6.94 (m, 5H), 6.86 – 6.83 (m, 3H), 6.80 (dd, J = 8.8, 3.5 Hz, 3H), 6.68 (dd, J = 8.6, 2.9 Hz, 1H), 6.53 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 6.48 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 6.43 – 6.39 (m, 2H), 6.36 (dd, J = 8.6, 2.8 Hz, 1H), 6.06 (s, 1H), 4.45 (m, 6H), 4.26 (m, 4H), 4.24 – 4.19 (m, 6H), 4.14 – 4.12 (m, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.55 (s, 2H).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO): δ = 157.5, 156.6, 152.9, 148.8 (2C), 147.7, 146.9, 146.58, 146.55, 144.5, 137.2, 135.7, 135.61, 135.60, 135.3, 131.7, 131.1, 131.0, 125.7, 123.9, 121.3, 121.1, 118.5 (2C), 116.9, 113.14, 113.12 (2C), 113.0, 111.9, 110.8, 110.72, 110.69, 106.3, 105.7, 104.7, 70.3, 67.3, 67.2, 66.4, 66.3, 66.1, 62.79, 62.76, 59.6, 55.41, 55.36, 55.32, 34.0.

Melting point 99-101 °C

HRMS-ESI calculated for $C_{49}H_{52}N_2O_{12}Na$ [M+Na$^+$] 883.3418, found 883.3428.

Compound 99



Chemical Formula: $C_{56}H_{58}N_2O_{12}$
Molecular weight: 951.08 g/mol

In a round bottom flask placed under nitrogen atmosphere, **6** (1.67 g, 4.9 mmol), was added to a solution of **97** (400 mg, 0.97 mmol) and cesium carbonate (1.59 g, 4.9 mmol) in anhydrous DMF (14 mL) under nitrogen atmosphere. The mixture was stirred overnight at 80 °C. The reaction was quenched with water, extracted with ethyl acetate, washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. Purification over silica gel (EtOAc/MeOH, 100/0 to 96/4) afforded the product as a brown powder (722 mg, 78%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.03 – 6.97 (m, 3H), 6.95 – 6.90 (m, 5H), 6.89 (m, 2H), 6.87 – 6.83 (m, 3H), 6.78 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.69 (dd, J = 8.6, 2.9 Hz, 1H), 6.60 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 6.54 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 6.49 (d, J = 2.9 Hz,1H), 6.47 – 6.40 (m, 3H), 6.37 (dd, J = 8.6, 2.7 Hz, 1H), 6.31 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 5.54 (s, 1H), 4.62 (m, 6H), 4.37 – 4.24 (m, 10H), 4.23 – 4.19 (m, 4H), 3.86 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.58 (s, 2H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 157.5, 157.4, 153.4, 149.6, 149.53, 149.51, 148.2, 147.38, 147.35, 147.33, 147.32, 143.3, 137.3, 136.1, 134.4, 134.32, 134.27, 131.1, 131.0, 130.6, 129.7, 128.3, 128.2, 127.50, 127.46, 126.4, 126.2, 120.7, 119.1 (2C), 117.2, 113.83, 113.75 (2C), 112.2, 110.81 (2C), 110.78, 106.6, 106.5, 106.4, 104.0, 67.7, 67.6, 67.5, 66.5, 66.2, 66.0, 64.9 (2C), 58.3, 55.67, 55.66, 55.65, 55.61, 35.5.

Melting point 85-87 °C

HRMS-ESI calculated for $C_{56}H_{58}N_2O_{12}Na$ [M+Na$^+$] 973.3887, found 973.3914.

Références Bibliographiques

(1) Webb, S., *The Contribution, History, Impact and Future of Physics in Medicine*, *Acta Oncol. (Madr).*, **2009**, *Vol.* 48 (2), 169–177. https://doi.org/10.1080/02841860802244158.

(2) Schultz-Sikma, E. A., Meade, T. J., *Supramolecular Chemistry in Biological Imaging In Vivo*, . In *Supramolecular Chemistry*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, **2012**, ; 1–26. https://doi.org/10.1002/9780470661345.smc178.

(3) Shen, X., Liu, P., Liu, Y., Liu, Y., Dai, B., *One-Pot Reductive Coupling Reactions of Acetyl Naphthalene Derivatives, Tosylhydrazide, with Arylboronic Acids*, *Tetrahedron*, **2017**, *Vol.* 73 (6), 785–793. https://doi.org/10.1016/j.tet.2016.12.068.

(4) Delacroix, D., Guerre, J.-P., Leblanc, P., *Guide Pratique Radionucléides et Radioprotection*; **2020**, . https://doi.org/10.1051/978-2-7598-0145-9.

(5) Kelloff, G. J., Hoffman, J. M., Johnson, B., Scher, H. I., Siegel, B. A., Cheng, E. Y., Cheson, B. D., O'Shaughnessy, J., Guyton, K. Z., Mankoff, D. A., Shankar, L., Larson, S. M., Sigman, C. C., Schilsky, R. L., Sullivan, D. C., *Progress and Promise of FDG-PET Imaging for Cancer Patient Management and Oncologic Drug Development*, *Clin. Cancer Res.*, **2005**, *Vol.* 11 (8), 2785–2808. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2626.

(6) Wong, D. F., Moghekar, A. R., Rigamonti, D., Brašić, J. R., Rousset, O., Willis, W., Buckley, C., Smith, A., Gok, B., Sherwin, P., Grachev, I. D., *An in Vivo Evaluation of Cerebral Cortical Amyloid with [18F]Flutemetamol Using Positron Emission Tomography Compared with Parietal Biopsy Samples in Living Normal Pressure Hydrocephalus Patients*, *Mol. Imaging Biol.*, **2013**, *Vol.* 15 (2), 230–237. https://doi.org/10.1007/s11307-012-0583-x.

(7) Castellucci, P., Fuccio, C., Rubello, D., Schiavina, R., Santi, I., Nanni, C., Allegri, V., Montini, G. C., Ambrosini, V., Boschi, S., Martorana, G., Marzola, M. C., Fanti, S., *Is There a Role for 11C-Choline PET/CT in the Early Detection of Metastatic Disease in Surgically Treated Prostate Cancer Patients with a Mild PSA Increase <1.5 Ng/Ml?*, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2011**, *Vol.* 38 (1), 55–63. https://doi.org/10.1007/s00259-010-1604-0.

(8) Pichler, B. J., Wehrl, H. F., Judenhofer, M. S., *Latest Advances in Molecular Imaging Instrumentation*, *J. Nucl. Med.*, **2008**, *Vol.* 49 (SUPPL.6), 5–23. https://doi.org/10.2967/jnumed.108.045880.

(9) Anger, H. O., *Scintillation Camera with Multichannel Collimators*, *J. Nucl. Med.*, **1964**, *Vol.* 3170–86.

(10) Sharp, S. E., Trout, A. T., Weiss, B. D., Gelfand, M. J., *MIBG in Neuroblastoma Diagnostic Imaging and Therapy*, *Radiographics*, **2016**, *Vol.* 36 (1), 258–278. https://doi.org/10.1148/rg.2016150099.

(11) Benamer, H. T. S., Patterson, J., Grosset, D. G., Booij, J., de Bruin, K., van Royen, E., Speelman, J. D., Horstink, M. H. I. M., Sips, H. J. W. A., Dierckx, R. A., Versijpt, J., Decoo, D., Van Der Linden, C., Hadley, D. M., Doder, M., Lees, A. J., Costa, D. C., Gacinovic, S., Oertel, W. H., Pogarell, O., Hoeffken, H., Joseph, K., Tatsch, K., Schwarz, J., Ries, V., *Accurate Differentiation of Parkinsonism and Essential Tremor Using Visual Assessment of [123I]-FP-CIT SPECT Imaging: The [123I]-FP-CIT Study Group*, *Mov. Disord.*, **2000**, *Vol.* 15 (3), 503–510. https://doi.org/10.1002/1531-8257(200005)15:3<503::AID-MDS1013>3.0.CO;2-V.

(12) Moretti, J. L., Defer, G., Cinotti, L., Cesaro, P., Degos, J. D., Vigneron, N., Ducassou, D., Holman, B. L., *"Luxury Perfusion" With99mTc-HMPAO And123I-IMP SPECT Imaging during the Subacute Phase of Stroke*, *Eur. J. Nucl. Med.*, **1990**, *Vol.* 16 (1), 17–22. https://doi.org/10.1007/BF01566007.

(13) Packard, A. B., Roach, P. J., Davis, R. T., Carmant, L., Davis, R., Riviello, J., Holmes, G., Barnes, P. D., O'Tuama, L. A., Bjornson, B., Treves, S. T., *Ictal and Interictal Technetium-99m-Bicisate Brain SPECT in Children with Refractory Epilepsy*, *J. Nucl. Med.*, **1996**, *Vol.* 37 (7), 1101–1106.

(14) Sinak, L. J., Hoffman, E. A., Julsrud, P. R., Mair, D. D., Seward, J. B., Hagler, D. J., Harris, L.

D., Robb, R. A., Ritman, E. L., *The Dynamic Spatial Reconstructor: Investigating Congenital Heart Disease in Four Dimensions*, *Cardiovasc. Intervent. Radiol.*, **1984**, *Vol.* 7 (3–4), 124–137. https://doi.org/10.1007/BF02552812.

(15) Katzberg, R. W., *Urography into the 21st Century: New Contrast Media, Renal Handling, Imaging Characteristics, and Nephrotoxicity.*, *Radiology*, **1997**, *Vol.* 204 (2), 297–312. https://doi.org/10.1148/radiology.204.2.9240511.

(16) Li, K. C. P., Tart, R. P., Fitzsimmons, J. R., Storm, B. L., Mao, J., Rolfes, R. J., *Barium Sulfate Suspension as a Negative Oral MRI Contrast Agent: In Vitro and Human Optimization Studies*, *Magn. Reson. Imaging*, **1991**, *Vol.* 9 (2), 141–150. https://doi.org/10.1016/0730-725X(91)90002-4.

(17) Yao, Z., Zhang, B. S., Prescher, J. A., *Advances in Bioluminescence Imaging: New Probes from Old Recipes*, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2018**, *Vol.* 45148–156. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.05.009.

(18) Joshi, B. P., Wang, T. D., *Targeted Optical Imaging Agents in Cancer: Focus on Clinical Applications*, *Contrast Media Mol. Imaging*, **2018**, *Vol.* 2018. https://doi.org/10.1155/2018/2015237.

(19) Haque, A., Faizi, M. S. H., Rather, J. A., Khan, M. S., *Next Generation NIR Fluorophores for Tumor Imaging and Fluorescence-Guided Surgery: A Review*, *Bioorganic Med. Chem.*, **2017**, *Vol.* 25 (7), 2017–2034. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.02.061.

(20) Bokor, D., *Diagnostic Efficacy of SonoVue*, *Am. J. Cardiol.*, **2000**, *Vol.* 86 (4), 19–24. https://doi.org/10.1016/S0002-9149(00)00985-1.

(21) Bertolotto, M., Pozzato, G., Crocè, L. S., Nascimben, F., Gasparini, C., Cova, M. A., Tiribelli, C., *Blood Flow Changes in Hepatocellular Carcinoma After the Administration of Thalidomide Assessed by Reperfusion Kinetics During Microbubble Infusion*, *Invest. Radiol.*, **2006**, *Vol.* 41 (1), 15–21. https://doi.org/10.1097/01.rli.0000188363.93670.45.

(22) Kiessling, F., Fokong, S., Koczera, P., Lederle, W., Lammers, T., *Ultrasound Microbubbles for Molecular Diagnosis, Therapy, and Theranostics*, *J. Nucl. Med.*, **2012**, *Vol.* 53 (3), 345–348. https://doi.org/10.2967/jnumed.111.099754.

(23) Lauterbur, P. C., *Image Formation by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance*, *Nature*, **1973**, *Vol.* 242 (5394), 190–191. https://doi.org/10.1038/242190a0.

(24) Hinshaw, W. S., Bottomley, P. A., Holland, G. N., *Radiographic Thin-Section Image of the Human Wrist by Nuclear Magnetic Resonance*, *Nature*, **1977**, *Vol.* 270 (5639), 722–723. https://doi.org/10.1038/270722a0.

(25) Merbach, A., Helm, L., Tóth, É., *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging: Second Edition*; **2013**, . https://doi.org/10.1002/9781118503652.

(26) Jung, B. A., Weigel, M., *Spin Echo Magnetic Resonance Imaging*, *J. Magn. Reson. Imaging*, **2013**, *Vol.* 37 (4), 805–817. https://doi.org/10.1002/jmri.24068.

(27) Detre, J. A., Wang, J., *Technical Aspects and Utility of FMRI Using BOLD and ASL*, *Clin. Neurophysiol.*, **2002**, *Vol.* 113 (2002), 621–634. https://doi.org/10.1016/s1388-2457(02)00038-x.

(28) Neuwelt, E. A., Hamilton, B. E., Varallyay, C. G., Rooney, W. R., Edelman, R. D., Jacobs, P. M., Watnick, S. G., *Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxides (USPIOs): A Future Alternative Magnetic Resonance (MR) Contrast Agent for Patients at Risk for Nephrogenic Systemic Fibrosis (NSF)?*, *Kidney Int.*, **2009**, *Vol.* 75 (5), 465–474. https://doi.org/10.1038/ki.2008.496.

(29) Caravan, P., Ellison, J. J., McMurry, T. J., Lauffer, R. B., *Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications*, *Chem. Rev.*, **1999**, *Vol.* 99 (9), 2293–2352. https://doi.org/10.1021/cr980440x.

(30) Magerstädt, M., Gansow, O. A., Brechbiel, M. W., Colcher, D., Baltzer, L., Knop, R. H., Girton, M. E., Naegele, M., *Gd(DOTA): An Alternative to Gd(DTPA) as a T1,2 Relaxation Agent for NMR Imaging or Spectroscopy*, *Magn. Reson. Med.*, **1986**, *Vol.* 3 (5), 808–812. https://doi.org/10.1002/mrm.1910030517.

(31) Weinmann, H., Brasch, R., Press, W., Wesbey, G., *Characteristics of Gadolinium-DTPA Complex: A Potential NMR Contrast Agent*, *Am. J. Roentgenol.*, **1984**, *Vol.* 142 (3), 619–624. https://doi.org/10.2214/ajr.142.3.619.

(32) Wagoner, M. . V., Otoole, M., Quay, S. C., *Nonionic Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents Clinical Trial Experience of Safety, Tolerance, and Efficacy of Gadodiamide Injection*, *Invest. Radiol.*, **1990**, *Vol.* 25S39–S41. https://doi.org/10.1097/00004424-199009001-00018.

(33) Grossman, R., Kuhn, M. J., Maravilla, K., Lee, D., Schild, H., Ethier, R., Reiser, M., Yuh, W. T. C., Olukotun, A. Y., *Multicenter Evaluation of the Safety, Tolerance, and Efficacy of OptiMARK in Magnetic Resonance Imaging of the Brain and Spine*, *Acad. Radiol.*, **1998**, *Vol.* 5S154–S155. https://doi.org/10.1016/S1076-6332(98)80089-5.

(34) Vogler, H., Platzek, J., Schuhmann-Giampieri, G., Frenzel, T., Weinmann, H.-J., Radüchel, B., Press, W.-R., *Pre-Clinical Evaluation of Gadobutrol: A New, Neutral, Extracellular Contrast Agent for Magnetic Resonance Imaging*, *Eur. J. Radiol.*, **1995**, *Vol.* 21 (1), 1–10. https://doi.org/10.1016/0720-048X(95)00679-K.

(35) Swaminathan, S., Shah, S. V., *New Insights into Nephrogenic Systemic Fibrosis*, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **2007**, *Vol.* 18 (10), 2636–2643. https://doi.org/10.1681/ASN.2007060645.

(36) Hilal, S. K., Maudsley, A. A., Ra, J. B., Simon, H. E., Roschmann, P., Wittekoek, S., Cho, Z. H., Mun, S. K., *In Vivo NMR Imaging of Sodium-23 in the Human Head*, *J. Comput. Assist. Tomogr.*, **1985**, *Vol.* 9 (1), 1–7. https://doi.org/10.1097/00004728-198501000-00001.

(37) Niesporek, S. C., Nagel, A. M., Platt, T., *Multinuclear MRI at Ultrahigh Fields*, *Top. Magn. Reson. Imaging*, **2019**, *Vol.* 28 (3), 173–188. https://doi.org/10.1097/RMR.0000000000000201.

(38) Modo, M., *19F Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy in Neuroscience*, *Neuroscience*, **2021**, . https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2021.03.016.

(39) Bible, E., Dell'Acqua, F., Solanky, B., Balducci, A., Crapo, P. M., Badylak, S. F., Ahrens, E. T., Modo, M., *Non-Invasive Imaging of Transplanted Human Neural Stem Cells and ECM Scaffold Remodeling in the Stroke-Damaged Rat Brain by 19F- and Diffusion-MRI*, *Biomaterials*, **2012**, *Vol.* 33 (10), 2858–2871. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.12.033.

(40) Thulborn, K. R., *Quantitative Sodium MR Imaging: A Review of Its Evolving Role in Medicine*, *Neuroimage*, **2018**, *Vol.* 168250–268. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2016.11.056.

(41) Bangerter, N. K., Tarbox, G. J., Taylor, M. D., Kaggie, J. D., *Quantitative Sodium Magnetic Resonance Imaging of Cartilage, Muscle, and Tendon*, *Quant. Imaging Med. Surg.*, **2016**, *Vol.* 6 (6), 699–714. https://doi.org/10.21037/qims.2016.12.10.

(42) Atkinson, I. C., Thulborn, K. R., *Feasibility of Mapping the Tissue Mass Corrected Bioscale of Cerebral Metabolic Rate of Oxygen Consumption Using 17-Oxygen and 23-Sodium MR Imaging in a Human Brain at 9.4T*, *Neuroimage*, **2010**, *Vol.* 51 (2), 723–733. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.02.056.

(43) Hoffmann, S. H., Radbruch, A., Bock, M., Semmler, W., Nagel, A. M., *Direct 17O MRI with Partial Volume Correction: First Experiences in a Glioblastoma Patient*, *Magn. Reson. Mater. Physics, Biol. Med.*, **2014**, *Vol.* 27 (6), 579–587. https://doi.org/10.1007/s10334-014-0441-8.

(44) Manoharan, S., Guillemin, G. J., Abiramasundari, R. S., Essa, M. M., Akbar, M., Akbar, M. D., *The Role of Reactive Oxygen Species in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Huntington's Disease: A Mini Review*, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2016**, *Vol.* 20161–15. https://doi.org/10.1155/2016/8590578.

(45) Ward, K. ., Aletras, A. ., Balaban, R. ., *A New Class of Contrast Agents for MRI Based on Proton*

Chemical Exchange Dependent Saturation Transfer (CEST), *J. Magn. Reson.*, **2000**, *Vol.* 143 (1), 79–87. https://doi.org/10.1006/jmre.1999.1956.

(46) Zhou, J., Payen, J.-F., Wilson, D. A., Traystman, R. J., van Zijl, P. C. M., *Using the Amide Proton Signals of Intracellular Proteins and Peptides to Detect PH Effects in MRI*, *Nat. Med.*, **2003**, *Vol.* 9 (8), 1085–1090. https://doi.org/10.1038/nm907.

(47) Wang, J., Weygand, J., Hwang, K. P., Mohamed, A. S. R., Ding, Y., Fuller, C. D., Lai, S. Y., Frank, S. J., Zhou, J., *Magnetic Resonance Imaging of Glucose Uptake and Metabolism in Patients with Head and Neck Cancer*, *Sci. Rep.*, **2016**, . https://doi.org/10.1038/srep30618.

(48) Tóth, éva, Bonnet, C. S., *Responsive ParaCEST Contrast Agents*, *Inorganics*, **2019**, *Vol.* 7 (5), 68. https://doi.org/10.3390/inorganics7050068.

(49) McVicar, N., Li, A. X., Suchý, M., Hudson, R. H. E., Menon, R. S., Bartha, R., *Simultaneous in Vivo PH and Temperature Mapping Using a PARACEST-MRI Contrast Agent*, *Magn. Reson. Med.*, **2013**, *Vol.* 70 (4), 1016–1025. https://doi.org/10.1002/mrm.24539.

(50) Angelovski, G., Chauvin, T., Pohmann, R., Logothetis, N. K., Tóth, É., *Calcium-Responsive Paramagnetic CEST Agents*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2011**, *Vol.* 19 (3), 1097–1105. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.07.023.

(51) Ivanov, K. L., Pravdivtsev, A. N., Yurkovskaya, A. V., Vieth, H.-M., Kaptein, R., *The Role of Level Anti-Crossings in Nuclear Spin Hyperpolarization*, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **2014**, *Vol.* 811–36. https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2014.06.001.

(52) Maly, T., Debelouchina, G. T., Bajaj, V. S., Hu, K.-N., Joo, C.-G., Mak–Jurkauskas, M. L., Sirigiri, J. R., van der Wel, P. C. A., Herzfeld, J., Temkin, R. J., Griffin, R. G., *Dynamic Nuclear Polarization at High Magnetic Fields*, *J. Chem. Phys.*, **2008**, *Vol.* 128 (5), 052211. https://doi.org/10.1063/1.2833582.

(53) Blazina, D., Dunne, J. P., Aiken, S., Duckett, S. B., Elkington, C., McGrady, J. E., Poli, R., Walton, S. J., Anwar, M. S., Jones, J. A., Carteret, H. A., *Contrasting Photochemical and Thermal Reactivity of Ru(CO)2(PPh3)(Dppe) towards Hydrogen Rationalised by Parahydrogen NMR and DFT Studies*, *Dalt. Trans.*, **2006**, No. 172072. https://doi.org/10.1039/b510616h.

(54) Adams, R. W., Aguilar, J. A., Atkinson, K. D., Cowley, M. J., Elliott, P. I. P., Duckett, S. B., Green, G. G. R., Khazal, I. G., Lopez-Serrano, J., Williamson, D. C., *Reversible Interactions with Para-Hydrogen Enhance NMR Sensitivity by Polarization Transfer*, *Science (80-.).*, **2009**, *Vol.* 323 (5922), 1708–1711. https://doi.org/10.1126/science.1168877.

(55) Khan, A. S., Harvey, R. L., Birchall, J. R., Irwin, R. K., Nikolaou, P., Schrank, G., Emami, K., Dummer, A., Barlow, M. J., Goodson, B. M., Chekmenev, E. Y., *Enabling Clinical Technologies for Hyperpolarized Xenon-129 MRI and Spectroscopy*, *Angew. Chemie*, **2021**, ange.202015200. https://doi.org/10.1002/ange.202015200.

(56) Berthault, P., Boutin, C., Martineau-Corcos, C., Carret, G., *Use of Dissolved Hyperpolarized Species in NMR: Practical Considerations*, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **2020**, *Vol.* 118–11974–90. https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2020.03.002.

(57) Kurhanewicz, J., Vigneron, D. B., Brindle, K., Chekmenev, E. Y., Comment, A., Cunningham, C. H., DeBerardinis, R. J., Green, G. G., Leach, M. O., Rajan, S. S., Rizi, R. R., Ross, B. D., Warren, W. S., Malloy, C. R., *Analysis of Cancer Metabolism by Imaging Hyperpolarized Nuclei: Prospects for Translation to Clinical Research*, *Neoplasia*, **2011**, *Vol.* 13 (2), 81–97. https://doi.org/10.1593/neo.101102.

(58) Golman, K., Ardenkjaer-Larsen, J. H., Petersson, J. S., Mansson, S., Leunbach, I., *Molecular Imaging with Endogenous Substances*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2003**, *Vol.* 100 (18), 10435–10439. https://doi.org/10.1073/pnas.1733836100.

(59) Golman, K., Petersson, J. S., *Metabolic Imaging and Other Applications of Hyperpolarized 13C1*, *Acad. Radiol.*, **2006**, *Vol.* 13 (8), 932–942. https://doi.org/10.1016/j.acra.2006.06.001.

(60) Gallagher, F. A., Kettunen, M. I., Day, S. E., Hu, D., Ardenkjær-Larsen, J. H., Zandt, R. in 't, Jensen, P. R., Karlsson, M., Golman, K., Lerche, M. H., Brindle, K. M., *Magnetic Resonance Imaging of PH in Vivo Using Hyperpolarized 13C-Labelled Bicarbonate*, *Nature*, **2008**, *Vol.* 453 (7197), 940–943. https://doi.org/10.1038/nature07017.

(61) Tooker, A. C., Hong, K. S., McKinstry, E. L., Costello, P., Jolesz, F. A., Albert, M. S., *Distal Airways in Humans: Dynamic Hyperpolarized 3 He MR Imaging—Feasibility*, *Radiology*, **2003**, *Vol.* 227 (2), 575–579. https://doi.org/10.1148/radiol.2272012146.

(62) Ramsay, W., Travers, M. W., *Argon and Its Companions*, *Proc. R. Soc. London*, **1901**, *Vol.* 67 (435–441), 329–333. https://doi.org/10.1098/rspl.1900.0037.

(63) Oros, A.-M., Shah, N. J., *Hyperpolarized Xenon in NMR and MRI*, *Phys. Med. Biol.*, **2004**, *Vol.* 49 (20), R105–R153. https://doi.org/10.1088/0031-9155/49/20/R01.

(64) Goodson, B. M., *Nuclear Magnetic Resonance of Laser-Polarized Noble Gases in Molecules, Materials, and Organisms*, *J. Magn. Reson.*, **2002**, *Vol.* 155 (2), 157–216. https://doi.org/10.1006/jmre.2001.2341.

(65) Nikolaou, P., Goodson, B. M., Chekmenev, E. Y., *NMR Hyperpolarization Techniques for Biomedicine*, *Chem. – A Eur. J.*, **2015**, *Vol.* 21 (8), 3156–3166. https://doi.org/10.1002/chem.201405253.

(66) Yokoe, K., Satoh, K., Yamamoto, Y., Nishiyama, Y., Asakura, H., Haba, R., Ohkawa, M., *Usefulness of 99mTc-Technegas and 133Xe Dynamic SPECT in Ventilatory Impairment*, *Nucl. Med. Commun.*, **2006**, *Vol.* 27 (11), 887–892. https://doi.org/10.1097/01.mnm.0000239484.76651.6f.

(67) Mugler, J. P., Altes, T. A., *Hyperpolarized 129Xe MRI of the Human Lung*, *J. Magn. Reson. Imaging*, **2013**, *Vol.* 37 (2), 313–331. https://doi.org/10.1002/jmri.23844.

(68) Nikolaou, P., Coffey, A. M., Walkup, L. L., Gust, B. M., Whiting, N., Newton, H., Barcus, S., Muradyan, I., Dabaghyan, M., Moroz, G. D., Rosen, M. S., Patz, S., Barlow, M. J., Chekmenev, E. Y., Goodson, B. M., *Near-Unity Nuclear Polarization with an Open-Source 129Xe Hyperpolarizer for NMR and MRI*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2013**, *Vol.* 110 (35), 14150–14155. https://doi.org/10.1073/pnas.1306586110.

(69) Grist, J. T., Chen, M., Collier, G. J., Raman, B., AbuEid, G., McIntyre, A., Matthews, V., Fraser, E., Ho, L.-P., Wild, J. M., Gleeson, F., *Hyperpolarized 129 Xe MRI Abnormalities in Dyspneic Participants 3 Months after COVID-19 Pneumonia: Preliminary Results*, *Radiology*, **2021**, 210033. https://doi.org/10.1148/radiol.2021210033.

(70) Norquay, G., Leung, G., Stewart, N. J., Wolber, J., Wild, J. M., *129 Xe Chemical Shift in Human Blood and Pulmonary Blood Oxygenation Measurement in Humans Using Hyperpolarized 129 Xe NMR*, *Magn. Reson. Med.*, **2017**, *Vol.* 77 (4), 1399–1408. https://doi.org/10.1002/mrm.26225.

(71) Hane, F., Li, T., Plata, J.-A., Hassan, A., Granberg, K., Albert, M., *Inhaled Xenon Washout as a Biomarker of Alzheimer's Disease*, *Diagnostics*, **2018**, *Vol.* 8 (2), 41. https://doi.org/10.3390/diagnostics8020041.

(72) Rao, M. R., Norquay, G., Stewart, N. J., Hoggard, N., Griffiths, P. D., Wild, J. M., *Assessment of Brain Perfusion Using Hyperpolarized 129 Xe MRI in a Subject with Established Stroke*, *J. Magn. Reson. Imaging*, **2019**, *Vol.* 50 (3), 1002–1004. https://doi.org/10.1002/jmri.26686.

(73) Chacon-Caldera, J., Maunder, A., Rao, M., Norquay, G., Rodgers, O. I., Clemence, M., Puddu, C., Schad, L. R., Wild, J. M., *Dissolved Hyperpolarized Xenon-129 MRI in Human Kidneys*, *Magn. Reson. Med.*, **2020**, *Vol.* 83 (1), 262–270. https://doi.org/10.1002/mrm.27923.

(74) Kastler, A., *Quelques Suggestions Concernant La Production Optique et La Détection Optique d'une Inégalité de Population Des Niveaux de Quantifigation Spatiale Des Atomes. Application à l'expérience de Stern et Gerlach et à La Résonance Magnétique*, *J. Phys. le Radium*, **1950**, . https://doi.org/10.1051/jphysrad:01950001106025500.

(75) Hughes-Riley, T., Six, J. S., Lilburn, D. M. L., Stupic, K. F., Dorkes, A. C., Shaw, D. E., Pavlovskaya, G. E., Meersmann, T., *Cryogenics Free Production of Hyperpolarized 129Xe and 83Kr for Biomedical MRI Applications*, *J. Magn. Reson.*, **2013**, *Vol.* 23723–33. https://doi.org/10.1016/j.jmr.2013.09.008.

(76) Birchall, J. R., Nikolaou, P., Coffey, A. M., Kidd, B. E., Murphy, M., Molway, M., Bales, L. B., Goodson, B. M., Irwin, R. K., Barlow, M. J., Chekmenev, E. Y., *Batch-Mode Clinical-Scale Optical Hyperpolarization of Xenon-129 Using an Aluminum Jacket with Rapid Temperature Ramping*, *Anal. Chem.*, **2020**, *Vol.* 92 (6), 4309–4316. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05051.

(77) Han, S.-I., Garcia, S., Lowery, T. J., Ruiz, E. J., Seeley, J. A., Chavez, L., King, D. S., Wemmer, D. E., Pines, A., *NMR-Based Biosensing with Optimized Delivery of Polarized 129 Xe to Solutions*, *Anal. Chem.*, **2005**, *Vol.* 77 (13), 4008–4012. https://doi.org/10.1021/ac0500479.

(78) Truxal, A. E., Slack, C. C., Gomes, M. D., Vassiliou, C. C., Wemmer, D. E., Pines, A., *Nondisruptive Dissolution of Hyperpolarized 129 Xe into Viscous Aqueous and Organic Liquid Crystalline Environments*, *Angew. Chemie Int. Ed.*, **2016**, *Vol.* 55 (15), 4666–4670. https://doi.org/10.1002/anie.201511539.

(79) Rao, M. R., Stewart, N. J., Griffiths, P. D., Norquay, G., Wild, J. M., *Imaging Human Brain Perfusion with Inhaled Hyperpolarized 129 Xe MR Imaging*, *Radiology*, **2018**, *Vol.* 286 (2), 659–665. https://doi.org/10.1148/radiol.2017162881.

(80) Stevens, T. K., Ramirez, R. M., Pines, A., *Nanoemulsion Contrast Agents with Sub-Picomolar Sensitivity for Xenon NMR*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *Vol.* 135 (26), 9576–9579. https://doi.org/10.1021/ja402885q.

(81) Schnurr, M., Volk, I., Nikolenko, H., Winkler, L., Dathe, M., Schröder, L., *Functionalized Lipopeptide Micelles as Highly Efficient NMR Depolarization Seed Points for Targeted Cell Labelling in Xenon MRI*, *Adv. Biosyst.*, **2020**, *Vol.* 4 (3), 1900251. https://doi.org/10.1002/adbi.201900251.

(82) Cleveland, Z. I., Möller, H. E., Hedlund, L. W., Nouls, J. C., Freeman, M. S., Qi, Y., Driehuys, B., *In Vivo MR Imaging of Pulmonary Perfusion and Gas Exchange in Rats via Continuous Extracorporeal Infusion of Hyperpolarized 129Xe*, *PLoS One*, **2012**, *Vol.* 7 (2), e31306. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031306.

(83) Schroder, L., Lowery, T. J., Hilty, C., Wemmer, D. E., Pines, A., *Molecular Imaging Using a Targeted Magnetic Resonance Hyperpolarized Biosensor*, *Science (80-.).*, **2006**, *Vol.* 314 (5798), 446–449. https://doi.org/10.1126/science.1131847.

(84) Schröder, L., *Xenon Biosensor HyperCEST MRI*, . In *Hyperpolarized and Inert Gas MRI*; Elsevier, **2017**, ; 263–277. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803675-4.00017-8.

(85) Mecozzi, S., Rebek, Jr., J., *The 55 % Solution: A Formula for Molecular Recognition in the Liquid State*, *Chem. - A Eur. J.*, **1998**, *Vol.* 4 (6), 1016–1022. https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3765(19980615)4:6<1016::AID-CHEM1016>3.0.CO;2-B.

(86) Spence, M. M., Rubin, S. M., Dimitrov, I. E., Ruiz, E. J., Wemmer, D. E., Pines, A., Yao, S. Q., Tian, F., Schultz, P. G., *Functionalized Xenon as a Biosensor*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2001**, *Vol.* 98 (19), 10654–10657. https://doi.org/10.1073/pnas.191368398.

(87) Berthault, P., Huber, G., Desvaux, H., *Biosensing Using Laser-Polarized Xenon NMR/MRI*, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **2009**, *Vol.* 55 (1), 35–60. https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2008.11.003.

(88) Wang, Y., Dmochowski, I. J., *An Expanded Palette of Xenon-129 NMR Biosensors*, *Acc. Chem. Res.*, **2016**, *Vol.* 49 (10), 2179–2187. https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00309.

(89) Shepelytskyi, Y., Newman, C. J., Grynko, V., Seveney, L. E., DeBoef, B., Hane, F. T., Albert, M. S., *Cyclodextrin-Based Contrast Agents for Medical Imaging*, *Molecules*, **2020**, *Vol.* 25 (23), 5576. https://doi.org/10.3390/molecules25235576.

(90) Bartik, K., Luhmer, M., Heyes, S. J., Ottinger, R., Reisse, J., *Probing Molecular Cavities in a-Cyclodextrin Solutions by Xenon NMR*, *J. Magn. Reson. Ser. B*, **1995**, *Vol.* 109 (2), 164–168. https://doi.org/10.1006/jmrb.1995.0005.

(91) Song, Y.-Q., Goodson, B. M., Taylor, R. E., Laws, D. D., Navon, G., Pines, A., *Selective Enhancement of NMR Signals Fora-Cyclodextrin with Laser-Polarized Xenon*, *Angew. Chemie Int. Ed. English*, **1997**, *Vol.* 36 (21), 2368–2370. https://doi.org/10.1002/anie.199723681.

(92) Hane, F. T., Fernando, A., Prete, B. R. J., Peloquin, B., Karas, S., Chaudhuri, S., Chahal, S., Shepelytskyi, Y., Wade, A., Li, T., DeBoef, B., Albert, M. S., *Cyclodextrin-Based Pseudorotaxanes: Easily Conjugatable Scaffolds for Synthesizing Hyperpolarized Xenon-129 Magnetic Resonance Imaging Agents*, *ACS Omega*, **2018**, *Vol.* 3 (1), 677–681. https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01744.

(93) Cram, D. J., Tanner, M. E., Knobler, C. B., *Host-Guest Complexation. 58. Guest Release and Capture by Hemicarcerands Introduces the Phenomenon of Constrictive Binding*, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *Vol.* 113 (20), 7717–7727. https://doi.org/10.1021/ja00020a039.

(94) Fukutomi, J., Adachi, Y., Kaneko, A., Kimura, A., Fujiwara, H., *Inclusion Complex Formation of Thiacalix[4]Arene and Xe in Aqueous Solution Studied by Hyperpolarized 129Xe NMR*, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **2007**, *Vol.* 58 (1–2), 115–122. https://doi.org/10.1007/s10847-006-9130-1.

(95) Robbins, T. A., Knobler, C. B., Bellew, D. R., Cram, D. J., *Host-Guest Complexation. 67. A Highly Adaptive and Strongly Binding Hemicarcerand*, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *Vol.* 116 (1), 111–122. https://doi.org/10.1021/ja00080a014.

(96) Branda, N., Grotzfeld, R. M., Valdes, C., Rebek, J. J., *Control of Self-Assembly and Reversible Encapsulation of Xenon in a Self-Assembling Dimer by Acid-Base Chemistry*, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *Vol.* 117 (1), 85–88. https://doi.org/10.1021/ja00106a010.

(97) Giri, N., Del Pópolo, M. G., Melaugh, G., Greenaway, R. L., Rätzke, K., Koschine, T., Pison, L., Gomes, M. F. C., Cooper, A. I., James, S. L., *Liquids with Permanent Porosity*, *Nature*, **2015**, *Vol.* 527 (7577), 216–220. https://doi.org/10.1038/nature16072.

(98) Nie, S.-X., Guo, H., Huang, T.-Y., Ao, Y.-F., Wang, D.-X., Wang, Q.-Q., *Xenon Binding by a Tight yet Adaptive Chiral Soft Capsule*, *Nat. Commun.*, **2020**, *Vol.* 11 (1), 6257. https://doi.org/10.1038/s41467-020-20081-8.

(99) Ogoshi, T., Kanai, S., Fujinami, S., Yamagishi, T., Nakamoto, Y., *Para -Bridged Symmetrical Pillar[5]Arenes: Their Lewis Acid Catalyzed Synthesis and Host–Guest Property*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *Vol.* 130 (15), 5022–5023. https://doi.org/10.1021/ja711260m.

(100) Adiri, T., Marciano, D., Cohen, Y., *Potential 129Xe-NMR Biosensors Based on Secondary and Tertiary Complexes of a Water-Soluble Pillar[5]Arene Derivative*, *Chem. Commun.*, **2013**, *Vol.* 49 (63), 7082. https://doi.org/10.1039/c3cc43253j.

(101) Fernando, P. U. A. I., Shepelytskyi, Y., Cesana, P. T., Wade, A., Grynko, V., Mendieta, A. M., Seveney, L. E., Brown, J. D., Hane, F. T., Albert, M. S., *Decacationic Pillar[5]Arene: A New Sca Ff Old for the Development of 129 Xe MRI Imaging Agents*, *ACS Omega*, **2020**, *Vol.* 527783–27788. https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02565.

(102) Miyahara, Y., Abe, K., Inazu, T., *"Molecular" Molecular Sieves: Lid-Free Decamethylcucurbit[5]Uril Absorbs and Desorbs Gases Selectively*, *Angew. Chemie Int. Ed.*, **2002**, *Vol.* 41 (16), 3020. https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020816)41:16<3020::AID-ANIE3020>3.0.CO;2-4.

(103) Kim, B. S., Ko, Y. H., Kim, Y., Lee, H. J., Selvapalam, N., Lee, H. C., Kim, K., *Water Soluble Cucurbit[6]Uril Derivative as a Potential Xe Carrier for 129Xe NMR-Based Biosensors*, *Chem. Commun.*, **2008**, No. 242756. https://doi.org/10.1039/b805724a.

(104) Truxal, A. E., Cao, L., Isaacs, L., Wemmer, D. E., Pines, A., *Directly Functionalized Cucurbit[7]Uril as a Biosensor for the Selective Detection of Protein Interactions by 129 Xe*

HyperCEST NMR, *Chem. – A Eur. J.*, **2019**, *Vol.* 25 (24), 6108–6112. https://doi.org/10.1002/chem.201900610.

(105) Slack, C. C., Finbloom, J. A., Jeong, K., Bruns, C. J., Wemmer, D. E., Pines, A., Francis, M. B., *Rotaxane Probes for Protease Detection by 129 Xe HyperCEST NMR*, *Chem. Commun.*, **2017**, *Vol.* 53 (6), 1076–1079. https://doi.org/10.1039/C6CC09302G.

(106) Wang, Y., Dmochowski, I. J., *Cucurbit[6]Uril Is an Ultrasensitive 129 Xe NMR Contrast Agent*, *Chem. Commun.*, **2015**, *Vol.* 51 (43), 8982–8985. https://doi.org/10.1039/C5CC01826A.

(107) Gabard, J., Collet, A., *Synthesis of a (D3)-Bis(Cyclotriveratrylenyl) Macrocage by Stereospecific Replication of a (C3)-Subunit*, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1981**, No. 211137–1139. https://doi.org/10.1039/c39810001137.

(108) Zemerov, S. D., Dmochowski, I. J., *Cryptophane-Xenon Complexes For129Xe MRI Applications*, *RSC Adv.*, **2021**, *Vol.* 11 (13), 7693–7703. https://doi.org/10.1039/d0ra10765d.

(109) Fogarty, H. A., Berthault, P., Brotin, T., Huber, G., Desvaux, H., Dutasta, J.-P., *A Cryptophane Core Optimized for Xenon Encapsulation*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *Vol.* 129 (34), 10332–10333. https://doi.org/10.1021/ja073771c.

(110) Robinson, G. M., *A Reaction of Homopiperonyl and of Homoveratryl Alcohols*, *J. Chem. Soc., Trans.*, **1915**, *Vol.* 107267–276. https://doi.org/10.1039/CT9150700267.

(111) Lindsey, A. S., *The Structure of Cyclotriveratrylene (10,15-Dihydro-2,3,7,8,12,13-Hexamethoxy-5H-Tribenzo[a,d,g]Cyclononene) and Related Compounds*, *J. Chem. Soc.*, **1965**, 1685–1692. https://doi.org/10.1039/jr9650001685.

(112) Collet, A., *Cyclotriveratrilenes and Cryptophanes*, *Tetrahedron*, **1987**, *Vol.* 43 (24), 5725–5759.

(113) White, J. D., Gesner, B. D., *Cyclotetraveratrylene : Characterisation and Conformational Properties*, *Tetrahedron*, **1974**, *Vol.* 30 (15), 2273–2277. https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)97092-9.

(114) Collet, A., Jacques, J., *Chromophores Chiraux Possedant La Symetrie C3. Synthese de Derives Optiquement Actifs Du Cyclotriveratrylene*, *Tetrahedron Lett.*, **1978**, *Vol.* 19 (15), 1265–1268. https://doi.org/10.1016/0040-4039(78)80102-6.

(115) Canceill, J., Collet, A., Gabard, J., Gottarelli, G., Spada, G. P., *Exciton Approach to the Optical Activity of C3-Cyclotriveratrylene Derivatives*, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *Vol.* 107 (5), 1299–1308. https://doi.org/10.1021/ja00291a033.

(116) Fernandes, P. F., Mishra, D. R., *A Novel Sensor from Cyclotriveratrylene Derivative for Rapid Detection of 4-Nitrophenol Based on Fluorescence*, *Asian J. Chem.*, **2020**, *Vol.* 32 (9), 2139–2142. https://doi.org/10.14233/ajchem.2020.22720.

(117) Chen, S., Guo, H., Geng, X., Yang, F., *Bowl Liquid Crystal Based on Cyclotriveratrylene Derivatives with Multiple Triphenylene Units: The Influences of the Numbers of Triphenylene Units on Mesomorphic Behaviors*, *J. Mol. Liq.*, **2018**, *Vol.* 252145–150. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.12.147.

(118) Dam, H. H., Reinhoudt, D. N., Verboom, W., *Influence of the Platform in Multicoordinate Ligands for Actinide Partitioning*, *New J. Chem.*, **2007**, *Vol.* 31 (9), 1620. https://doi.org/10.1039/b704667g.

(119) Kai, S., Kojima, T., Thorp-Greenwood, F. L., Hardie, M. J., Hiraoka, S., *How Does Chiral Self-Sorting Take Place in the Formation of Homochiral Pd 6 L 8 Capsules Consisting of Cyclotriveratrylene-Based Chiral Tritopic Ligands?*, *Chem. Sci.*, **2018**, *Vol.* 9 (17), 4104–4108. https://doi.org/10.1039/C8SC01062E.

(120) Brotin, T., Dutasta, J. P., *Cryptophanes and Their Complexes - Present and Future*, *Chem. Rev.*, **2009**, *Vol.* 109 (1), 88–130. https://doi.org/10.1021/cr0680437.

(121) Zhang, D., Martinez, A., Dutasta, J., *Emergence of Hemicryptophanes: From Synthesis to Applications for Recognition, Molecular Machines, and Supramolecular Catalysis*, *Chem. Rev.*, **2017**, *Vol.* 117 (6), 4900–4942. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00847.

(122) Milanole, G., Gao, B., Mari, E., Berthault, P., Pieters, G., Rousseau, B., *A Straightforward Access to Cyclotriveratrylene Analogues with C1 Symmetry: Toward the Synthesis of Monofunctionalizable Cryptophanes*, *European J. Org. Chem.*, **2017**, *Vol.* 2017 (47), 7091–7100. https://doi.org/10.1002/ejoc.201701353.

(123) Song, J. R., Huang, Z. T., Zheng, Q. Y., *Synthesis of Functionalized Cyclotriveratrylene Analogues with C 1-Symmetry and the Application for 1,4-Michael Addition of Alcohols to Unsaturated Aryl Ketone*, *Tetrahedron*, **2013**, *Vol.* 69 (35), 7308–7313. https://doi.org/10.1016/j.tet.2013.06.077.

(124) Lutz, M. R., Zeller, M., Becker, D. P., *Beckmann Rearrangement of Cyclotriveratrylene (CTV) Oxime: Tandem Beckmann-Electrophilic Aromatic Addition*, *Tetrahedron Lett.*, **2008**, *Vol.* 49 (34), 5003–5005. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.06.056.

(125) Long, A., Colomban, C., Jean, M., Albalat, M., Vanthuyne, N., Giorgi, M., Di Bari, L., Górecki, M., Dutasta, J. P., Martinez, A., *Enantiopure C 1 -Cyclotriveratrylene with a Reversed Spatial Arrangement of the Substituents*, *Org. Lett.*, **2019**, *Vol.* 21 (1), 160–165. https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b03621.

(126) Zimmermann, H., Tolstoy, P., Limbach, H.-H., Poupko, R., Luz, Z., *The Saddle Form of Cyclotriveratrylene*, *J. Phys. Chem. B*, **2004**, *Vol.* 108 (48), 18772–18778. https://doi.org/10.1021/jp040482r.

(127) Götz, S., Schneider, A., Lützen, A., *Efficient Resolution of Racemic Crown-Shaped Cyclotriveratrylene Derivatives and Isolation and Characterization of the Intermediate Saddle Isomer*, *Beilstein J. Org. Chem.*, **2019**, *Vol.* 151339–1346. https://doi.org/10.3762/bjoc.15.133.

(128) Haberhauer, G., Woitschetzki, S., Bandmann, H., *Strongly Underestimated Dispersion Energy in Cryptophanes and Their Complexes*, *Nat. Commun.*, **2014**, *Vol.* 5 (1), 3542. https://doi.org/10.1038/ncomms4542.

(129) Thorp-Greenwood, F. L., Howard, M. J., Kuhn, L. T., Hardie, M. J., *Fully Collapsed Imploded Cryptophanes in Solution and in the Solid State*, *Chem. – A Eur. J.*, **2019**, *Vol.* 25 (14), 3536–3540. https://doi.org/10.1002/chem.201900269.

(130) Mough, S. T., Goeltz, J. C., Holman, K. T., *Isolation and Structure of an "Imploded" Cryptophane*, *Angew. Chemie Int. Ed.*, **2004**, *Vol.* 43 (42), 5631–5635. https://doi.org/10.1002/anie.200460866.

(131) Taratula, O., Hill, P. A., Khan, N. S., Carroll, P. J., Dmochowski, I. J., *Crystallographic Observation of "induced Fit" in a Cryptophane Host-Guest Model System*, *Nat. Commun.*, **2010**, *Vol.* 1 (1), 148. https://doi.org/10.1038/ncomms1151.

(132) Joseph, A. I., El-Ayle, G., Boutin, C., Léonce, E., Berthault, P., Travis Holman, T., *Rim-Functionalized Cryptophane-111 Derivatives via Heterocapping, and Their Xenon Complexes*, *Chem. Commun.*, **2014**, *Vol.* 50 (100), 15905–15908. https://doi.org/10.1039/c4cc08001g.

(133) Little, M. A., Donkin, J., Fisher, J., Halcrow, M. A., Loder, J., Hardie, M. J., *Synthesis and Methane-Binding Properties of Disulfide-Linked Cryptophane-0.0.0*, *Angew. Chemie Int. Ed.*, **2012**, *Vol.* 51 (3), 764–766. https://doi.org/10.1002/anie.201106512.

(134) Kotera, N., Delacour, L., Traoré, T., Tassali, N., Berthault, P., Buisson, D. A., Dognon, J. P., Rousseau, B., *Design and Synthesis of New Cryptophanes with Intermediate Cavity Sizes*, *Org. Lett.*, **2011**, *Vol.* 13 (9), 2153–2155. https://doi.org/10.1021/ol2005215.

(135) Collet, A., Dutasta, J. P., Lozach, B., Canceill, J., *Cyclotriveratrylenes and Cryptophanes: Their Synthesis and Applications to Host-Guest Chemistry and to the Design of New Materials*; **1993**, ; Vol. 165. https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004.

(136) Canceill, J., Cesario, M., Collet, A., Guilhem, J., Riche, C., Pascard, C., *Selective Recognition of Neutral Molecules: 1H n.m.r. Study of the Complexation of CH2Cl2 and CH2Br2 by Cryptophane-D in Solution and Crystal Structure of Its CH2Cl2 Cavitate*, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1986**, No. 4339. https://doi.org/10.1039/c39860000339.

(137) Doll, M., Berthault, P., Léonce, E., Boutin, C., Buffeteau, T., Daugey, N., Vanthuyne, N., Jean, M., Brotin, T., De Rycke, N., *Are the Physical Properties of Xe@Cryptophane Complexes Easily Predictable? The Case of Syn - and Anti -Tris-Aza-Cryptophanes*, *J. Org. Chem.*, **2021**, *Vol.* 86 (11), 7648–7658. https://doi.org/10.1021/acs.joc.1c00701.

(138) Darzac, M., Brotin, T., Bouchu, D., Dutasta, J. P., *Cryptophanols, New Versatile Compounds for the Synthesis of Functionalized Cryptophanes and Polycryptophanes*, *Chem. Commun.*, **2002**, *Vol.* 2 (1), 48–49. https://doi.org/10.1039/b109301k.

(139) Brotin, T., Dutasta, J.-P., *Xe@cryptophane Complexes with C2 Symmetry: Synthesis and Investigations by 129Xe NMR of the Consequences of the Size of the Host Cavity for Xenon Encapsulation*, *European J. Org. Chem.*, **2003**, *Vol.* 2003 (6), 973–984. https://doi.org/10.1002/ejoc.200390153.

(140) Chapellet, L.-L., Cochrane, J. R., Mari, E., Boutin, C., Berthault, P., Brotin, T., *Synthesis of Cryptophanes with Two Different Reaction Sites: Chemical Platforms for Xenon Biosensing*, *J. Org. Chem.*, **2015**, *Vol.* 80 (12), 6143–6151. https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b00653.

(141) Baydoun, O., De Rycke, N., Léonce, E., Boutin, C., Berthault, P., Jeanneau, E., Brotin, T., *Synthesis of Cryptophane-223-Type Derivatives with Dual Functionalization*, *J. Org. Chem.*, **2019**, *Vol.* 84 (14), 9127–9137. https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b01093.

(142) Holman, K. T., Drake, S. D., Steed, J. W., Orr, G. W., Atwood, J. L., *Anion Binding, Aryl-Extended Cyclotriguaiacylenes and an Aryl-Bridged Cryptophane That Provides Snapshots of a Molecular Gating Mechanism*, *Supramol. Chem.*, **2010**, *Vol.* 22 (11–12), 870–890. https://doi.org/10.1080/10610278.2010.514615.

(143) Roy, V., Brotin, T., Dutasta, J. P., Charles, M. H., Delair, T., Mallet, F., Huber, G., Desvaux, H., Boulard, Y., Berthault, P., *A Cryptophane Biosensor for the Detection of Specific Nucleotide Targets through Xenon NMR Spectroscopy*, *ChemPhysChem*, **2007**, *Vol.* 8 (14), 2082–2085. https://doi.org/10.1002/cphc.200700384.

(144) Wei, Q., Seward, G. K., Hill, P. A., Patton, B., Dimitrov, I. E., Kuzma, N. N., Dmochowski, I. J., *Designing129Xe NMR Biosensors for Matrix Metalloproteinase Detection*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *Vol.* 128 (40), 13274–13283. https://doi.org/10.1021/ja0640501.

(145) Schlundt, A., Kilian, W., Beyermann, M., Sticht, J., Günther, S., Höpner, S., Falk, K., Roetzschke, O., Mitschang, L., Freund, C., *A Xenon-129 Biosensor for Monitoring MHC-Peptide Interactions*, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, **2009**, *Vol.* 48 (23), 4142–4145. https://doi.org/10.1002/anie.200806149.

(146) Boutin, C., Stopin, A., Lenda, F., Brotin, T., Dutasta, J. P., Jamin, N., Sanson, A., Boulard, Y., Leteurtre, F., Huber, G., Bogaert-Buchmann, A., Tassali, N., Desvaux, H., Carrire, M., Berthault, P., *Cell Uptake of a Biosensor Detected by Hyperpolarized 129Xe NMR: The Transferrin Case*, *Bioorganic Med. Chem.*, **2011**, *Vol.* 19 (13), 4135–4143. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.05.002.

(147) Taratula, O., Hill, P. A., Bai, Y., Khan, N. S., Dmochowski, I. J., *Shorter Synthesis of Trifunctionalized Cryptophane - A Derivatives*, *Org. Lett.*, **2011**, *Vol.* 13 (6), 1414–1417. https://doi.org/10.1021/ol200088f.

(148) A. Hill, P., Wei, Q., Troxler, T., Dmochowski, I. J., *Substituent Effects on Xenon Binding Affinity and Solution Behaviour of Water-Soluble Cryptophanes*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *Vol.* 131 (8), 3069–3077. https://doi.org/10.1021/ja8100566.

(149) Hill, P. A., Wei, Q., Eckenhoff, R. G., Dmochowski, I. J., *Thermodynamics of Xenon Binding to Cryptophane in Water and Human Plasma*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *Vol.* 129 (30), 9262–9263.

https://doi.org/10.1021/ja072965p.

(150) Taratula, O., Kim, M. P., Bai, Y., Philbin, J. P., Riggle, B. A., Haase, D. N., Dmochowski, I. J., *Synthesis of Enantiopure, Trisubstituted Cryptophane-A Derivatives*, *Org. Lett.*, **2012**, *Vol.* 14 (14), 3580–3583. https://doi.org/10.1021/ol300943w.

(151) Canceill, J., Lacombe, L., Collet, A., *Water-Soluble Cryptophane Binding Lipophilic Guests in Aqueous Solution*, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1987**, No. 3219. https://doi.org/10.1039/c39870000219.

(152) Dubost, E., Kotera, N., Garcia-Argote, S., Boulard, Y., Léonce, E., Boutin, C., Berthault, P., Dugave, C., Rousseau, B., *Synthesis of a Functionalizable Water-Soluble Cryptophane-111*, *Org. Lett.*, **2013**, *Vol.* 15 (11), 2866–2868. https://doi.org/10.1021/ol4012019.

(153) Berthault, P., Desvaux, H., Wendlinger, T., Gyejacquot, M., Stopin, A., Brotin, T., Dutasta, J.-P., Boulard, Y., *Effect of PH and Counterions on the Encapsulation Properties of Xenon in Water-Soluble Cryptophanes*, *Chem. - A Eur. J.*, **2010**, *Vol.* 16 (43), 12941–12946. https://doi.org/10.1002/chem.201001170.

(154) Brotin, T., Montserret, R., Bouchet, A., Cavagnat, D., Linares, M., Buffeteau, T., *High Affinity of Water-Soluble Cryptophanes for Cesium Cations*, *J. Org. Chem.*, **2012**, *Vol.* 77 (2), 1198–1201. https://doi.org/10.1021/jo202259r.

(155) Canceill, J., Lacombe, L., Collet, A., *Analytical Optical Resolution of Bromochlorofluoromethane by Enantioselective Inclusion into a Tailor-Made "Cryptophane" and Determination of Its Maximum Rotation*, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *Vol.* 107 (24), 6993–6996. https://doi.org/10.1021/ja00310a041.

(156) Canceill, J., Cesario, M., Collet, A., Guilhem, J., Lacombe, L., Lozach, B., Pascard, C., *Structure and Properties of the Cryptophane-E/CHCl3 Complex, a Stable van Der Waals Molecule*, *Angew. Chemie Int. Ed. English*, **1989**, *Vol.* 28 (9), 1246–1248. https://doi.org/10.1002/anie.198912461.

(157) Canceill, J., Cesario, M., Collet, A., Guilhem, J., Pascard, C., *A New Bis-Cyclotribenzyl Cavitand Capable of Selective Inclusion of Neutral Molecules in Solution. Crystal Structure of Its CH2Cl2 Cavitate*, *J. Chem. Soc. - Ser. Chem. Commun.*, **1985**, No. 6361–363. https://doi.org/10.1039/C39850000361.

(158) Benounis, M., Jaffrezic-Renault, N., Dutasta, J.-P., Cherif, K., Abdelghani, A., *Study of a New Evanescent Wave Optical Fibre Sensor for Methane Detection Based on Cryptophane Molecules*, *Sensors Actuators B Chem.*, **2005**, *Vol.* 107 (1), 32–39. https://doi.org/10.1016/j.snb.2004.10.063.

(159) Jacobson, D. R., Khan, N. S., Collé, R., Fitzgerald, R., Laureano-Pérez, L., Bai, Y., Dmochowski, I. J., *Measurement of Radon and Xenon Binding to a Cryptophane Molecular Host*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2011**, *Vol.* 108 (27), 10969–10973. https://doi.org/10.1073/pnas.1105227108.

(160) Garel, L., Dutasta, J.-P., Collet, A., *Complexation of Methane and Chlorofluorocarbons by Cryptophane-A in Organic Solution*, *Angew. Chemie Int. Ed. English*, **1993**, *Vol.* 32 (8), 1169–1171. https://doi.org/10.1002/anie.199311691.

(161) Brotin, T., Cavagnat, D., Berthault, P., Montserret, R., Buffeteau, T., *Water-Soluble Molecular Capsule for the Complexation of Cesium and Thallium Cations*, *J. Phys. Chem. B*, **2012**, *Vol.* 116 (35), 10905–10914. https://doi.org/10.1021/jp305110k.

(162) Eggers, D. K., Fu, S., Ngo, D. V., Vuong, E. H., Brotin, T., *Thermodynamic Contribution of Water in Cryptophane Host-Guest Binding Reaction*, *J. Phys. Chem. B*, **2020**, *Vol.* 124 (30), 6585–6591. https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.0c05354.

(163) Wong, T. H., Chang, J. C., Lai, C. C., Liu, Y. H., Peng, S. M., Chiu, S. H., *Hemicarceplexes Modify the Solubility and Reduction Potentials of C 60*, *J. Org. Chem.*, **2014**, *Vol.* 79 (8), 3581–3586. https://doi.org/10.1021/jo500405v.

(164) Ku, M. Y., Huang, S. J., Huang, S. L., Liu, Y. H., Lai, C. C., Peng, S. M., Chiu, S. H., *Hemicarceplex Formation Allows Ready Identification of the Isomers of the Metallofullerene Sc3N@C80 Using 1H and 13C NMR Spectroscopy*, *Chem. Commun.*, **2014**, *Vol.* 50 (79), 11709–11712. https://doi.org/10.1039/c4cc04695a.

(165) Bartik, K., Luhmer, M., Dutasta, J. P., Collet, A., Reisse, J., *129Xe and 1H NMR Study of the Reversible Trapping of Xenon by Cryptophane-A in Organic Solution*, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *Vol.* 120 (4), 784–791. https://doi.org/10.1021/ja972377j.

(166) Huber, G., Beguin, L., Desvaux, H., Brotin, T., Fogarty, H. A., Dutasta, J.-P., Berthault, P., *Cryptophane-Xenon Complexes in Organic Solvents Observed through NMR Spectroscopy*, *J. Phys. Chem. A*, **2008**, *Vol.* 112 (45), 11363–11372. https://doi.org/10.1021/jp807425t.

(167) Fairchild, R. M., Joseph, A. I., Holman, K. T., Fogarty, H. A., Brotin, T., Dutasta, J., Boutin, C., Huber, G., Berthault, P., *A Water-Soluble Xe@cryptophane-111 Complex Exhibits Very High Thermodynamic Stability and a Peculiar 129 Xe NMR Chemical Shift*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *Vol.* 132 (44), 15505–15507. https://doi.org/10.1021/ja1071515.

(168) Huber, G., Brotin, T., Dubois, L., Desvaux, H., Dutasta, J. P., Berthault, P., *Water Soluble Cryptophanes Showing Unprecedented Affinity for Xenon: Candidates as NMR-Based Biosensors*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *Vol.* 128 (18), 6239–6246. https://doi.org/10.1021/ja060266r.

(169) Lowery, T. J., Garcia, S., Chavez, L., Ruiz, E. J., Wu, T., Brotin, T., Dutasta, J. P., King, D. S., Schultz, P. G., Pines, A., Wemmer, D. E., *Optimization of Xenon Biosensors for Detection of Protein Interactions*, *ChemBioChem*, **2006**, *Vol.* 7 (1), 65–73. https://doi.org/10.1002/cbic.200500327.

(170) Hilty, C., Lowery, T. J., Wemmer, D. E., Pines, A., *Spectrally Resolved Magnetic Resonance Imaging of a Xenon Biosensor*, *Angew. Chemie Int. Ed.*, **2006**, *Vol.* 45 (1), 70–73. https://doi.org/10.1002/anie.200502693.

(171) Schilling, F., Schröder, L., Palaniappan, K. K., Zapf, S., Wemmer, D. E., Pines, A., *MRI Thermometry Based on Encapsulated Hyperpolarized Xenon*, *ChemPhysChem*, **2010**, *Vol.* 11 (16), 3529–3533. https://doi.org/10.1002/cphc.201000507.

(172) Mynar, J. L., Lowery, T. J., Wemmer, D. E., Pines, A., Fréchet, J. M. J., *Xenon Biosensor Amplification via Dendrimer−Cage Supramolecular Constructs*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *Vol.* 128 (19), 6334–6335. https://doi.org/10.1021/ja061735s.

(173) Meldrum, T., Seim, K. L., Bajaj, V. S., Palaniappan, K. K., Wu, W., Francis, M. B., Wemmer, D. E., Pines, A., *A Xenon-Based Molecular Sensor Assembled on an MS2 Viral Capsid Scaffold*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *Vol.* 132 (17), 5936–5937. https://doi.org/10.1021/ja100319f.

(174) Jeong, K., Netirojjanakul, C., Munch, H. K., Sun, J., Finbloom, J. A., Wemmer, D. E., Pines, A., Francis, M. B., *Targeted Molecular Imaging of Cancer Cells Using MS2-Based 129 Xe NMR*, *Bioconjug. Chem.*, **2016**, *Vol.* 27 (8), 1796–1801. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00275.

(175) Stevens, T. K., Palaniappan, K. K., Ramirez, R. M., Francis, M. B., Wemmer, D. E., Pines, A., *HyperCEST Detection of a 129 Xe-Based Contrast Agent Composed of Cryptophane-A Molecular Cages on a Bacteriophage Scaffold*, *Magn. Reson. Med.*, **2013**, *Vol.* 69 (5), 1245–1252. https://doi.org/10.1002/mrm.24371.

(176) Palaniappan, K. K., Ramirez, R. M., Bajaj, V. S., Wemmer, D. E., Pines, A., Francis, M. B., *Molecular Imaging of Cancer Cells Using a Bacteriophage-Based 129 Xe NMR Biosensor*, *Angew. Chemie*, **2013**, *Vol.* 125 (18), 4949–4953. https://doi.org/10.1002/ange.201300170.

(177) Aaron, J. A., Chambers, J. M., Jude, K. M., Di Costanzo, L., Dmochowski, I. J., Christianson, D. W., *Structure of a 129Xe-Cryptophane Biosensor Complexed with Human Carbonic Anhydrase II*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *Vol.* 130 (22), 6942–6943. https://doi.org/10.1021/ja802214x.

(178) Chambers, J. M., Hill, P. A., Aaron, J. A., Han, Z., Christianson, D. W., Kuzma, N. N., Dmochowski, I. J., *Cryptophane Xenon-129 Nuclear Magnetic Resonance Biosensors Targeting Human Carbonic Anhydrase*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *Vol.* 131 (2), 563–569. https://doi.org/10.1021/ja806092w.

(179) Taratula, O., Bai, Y., D'Antonio, E. L., Dmochowski, I. J., *Enantiopure Cryptophane-129Xe Nuclear Magnetic Resonance Biosensors Targeting Carbonic Anhydrase*, *Supramol. Chem.*, **2015**, *Vol.* 27 (February 2015), 65–71. https://doi.org/10.1080/10610278.2014.906601.

(180) Zemerov, S. D., Roose, B. W., Greenberg, M. L., Wang, Y., Dmochowski, I. J., *Cryptophane Nanoscale Assemblies Expand 129 Xe NMR Biosensing*, *Anal. Chem.*, **2018**, *Vol.* 90 (12), 7730–7738. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01630.

(181) Zemerov, S. D., Lin, Y., Dmochowski, I. J., *Monomeric Cryptophane with Record-High Xe Affinity Gives Insights into Aggregation-Dependent Sensing*, *Anal. Chem.*, **2021**, *Vol.* 93 (3), 1507–1514. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03776.

(182) Seward, G. K., Wei, Q., Dmochowski, I. J., *Peptide-Mediated Cellular Uptake of Cryptophane*, *Bioconjug. Chem.*, **2008**, *Vol.* 19 (11), 2129–2135. https://doi.org/10.1021/bc8002265.

(183) Seward, G. K., Bai, Y., Khan, N. S., Dmochowski, I. J., *Cell-Compatible, Integrin-Targeted Cryptophane-129XeNMR Biosensors*, *Chem. Sci.*, **2011**, *Vol.* 2 (6), 1103–1110. https://doi.org/10.1039/C1SC00041A.

(184) Riggle, B. A., Wang, Y., Dmochowski, I. J., *A "Smart" 129Xe NMR Biosensor for PH-Dependent Cell Labeling*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, *Vol.* 137 (16), 5542–5548. https://doi.org/10.1021/jacs.5b01938.

(185) Sloniec, J., Schnurr, M., Witte, C., Resch-Genger, U., Schröder, L., Hennig, A., *Biomembrane Interactions of Functionalized Cryptophane-A: Combined Fluorescence and 129Xe NMR Studies of a Bimodal Contrast Agent*, *Chem. - A Eur. J.*, **2013**, *Vol.* 19 (9), 3110–3118. https://doi.org/10.1002/chem.201203773.

(186) Rossella, F., Rose, H. M., Witte, C., Jayapaul, J., Schröder, L., *Design and Characterization of Two Bifunctional Cryptophane A-Based Host Molecules for Xenon Magnetic Resonance Imaging Applications*, *Chempluschem*, **2014**, *Vol.* 79 (10), 1463–1471. https://doi.org/10.1002/cplu.201402179.

(187) Klippel, S., Döpfert, J., Jayapaul, J., Kunth, M., Rossella, F., Schnurr, M., Witte, C., Freund, C., Schröder, L., *Cell Tracking with Caged Xenon: Using Cryptophanes as MRI Reporters upon Cellular Internalization*, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, **2014**, *Vol.* 53 (2), 493–496. https://doi.org/10.1002/anie.201307290.

(188) Witte, C., Martos, V., Rose, H. M., Reinke, S., Klippel, S., Schröder, L., Hackenberger, C. P. R., *Live-Cell MRI with Xenon Hyper-CEST Biosensors Targeted to Metabolically Labeled Cell-Surface Glycans*, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, **2015**, *Vol.* 54 (9), 2806–2810. https://doi.org/10.1002/anie.201410573.

(189) Rose, H. M., Witte, C., Rossella, F., Klippel, S., Freund, C., Schröder, L., *Development of an Antibody-Based, Modular Biosensor for 129Xe NMR Molecular Imaging of Cells at Nanomolar Concentrations*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2014**, *Vol.* 111 (32), 11697–11702. https://doi.org/10.1073/pnas.1406797111.

(190) Schnurr, M., Sydow, K., Rose, H. M., Dathe, M., Schröder, L., *Brain Endothelial Cell Targeting Via a Peptide-Functionalized Liposomal Carrier for Xenon Hyper-CEST MRI*, *Adv. Healthc. Mater.*, **2015**, *Vol.* 4 (1), 40–45. https://doi.org/10.1002/adhm.201400224.

(191) Kotera, N., Tassali, N., Léonce, E., Boutin, C., Berthault, P., Brotin, T., Dutasta, J. P., Delacour, L., Traoré, T., Buisson, D. A., Taran, F., Coudert, S., Rousseau, B., *A Sensitive Zinc-Activated 129Xe MRI Probe*, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, **2012**, *Vol.* 51 (17), 4100–4103. https://doi.org/10.1002/anie.201109194.

(192) Tassali, N., Kotera, N., Boutin, C., Léonce, E., Boulard, Y., Rousseau, B., Dubost, E., Taran,

F., Brotin, T., Dutasta, J. P., Berthault, P., *Smart Detection of Toxic Metal Ions, Pb2+ and Cd2+, Using a 129Xe NMR-Based Sensor*, *Anal. Chem.*, **2014**, *Vol.* 86 (3), 1783–1788. https://doi.org/10.1021/ac403669p.

(193) Kotera, N., Dubost, E., Milanole, G., Doris, E., Gravel, E., Arhel, N., Brotin, T., Dutasta, J. P., Cochrane, J. R., Mari, E., Boutin, C., Léonce, E., Berthault, P., Rousseau, B., *A Doubly Responsive Probe for the Detection of Cys4-Tagged Proteins*, *Chem. Commun.*, **2015**, *Vol.* 51 (57), 11482–11484. https://doi.org/10.1039/c5cc04721h.

(194) Mari, E., Bousmah, Y., Boutin, C., Léonce, E., Milanole, G., Brotin, T., Berthault, P., Erard, M., *Bimodal Detection of Proteins by 129Xe NMR and Fluorescence Spectroscopy*, *ChemBioChem*, **2019**, *Vol.* 20 (11), 1450–1457. https://doi.org/10.1002/cbic.201800802.

(195) Léonce, E., Dognon, J.-P., Pitrat, D., Mulatier, J.-C., Brotin, T., Berthault, P., *Accurate PH Sensing Using Hyperpolarized 129 Xe NMR Spectroscopy*, *Chem. - A Eur. J.*, **2018**, *Vol.* 24 (25), 6534–6537. https://doi.org/10.1002/chem.201800900.

(196) Guo, Q., Zeng, Q., Jiang, W., Zhang, X., Luo, Q., Zhang, X., Bouchard, L.-S., Liu, M., Zhou, X., *A Molecular Imaging Approach to Mercury Sensing Based on Hyperpolarized 129 Xe Molecular Clamp Probe*, *Chem. - A Eur. J.*, **2016**, *Vol.* 22 (12), 3967–3970. https://doi.org/10.1002/chem.201600193.

(197) Yang, S., Jiang, W., Ren, L., Yuan, Y., Zhang, B., Luo, Q., Guo, Q., Bouchard, L.-S., Liu, M., Zhou, X., *Biothiol Xenon MRI Sensor Based on Thiol-Addition Reaction*, *Anal. Chem.*, **2016**, *Vol.* 88 (11), 5835–5840. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00403.

(198) Zeng, Q., Guo, Q., Yuan, Y., Yang, Y., Zhang, B., Ren, L., Zhang, X., Luo, Q., Liu, M., Bouchard, L.-S., Zhou, X., *Mitochondria Targeted and Intracellular Biothiol Triggered Hyperpolarized 129 Xe Magnetofluorescent Biosensor*, *Anal. Chem.*, **2017**, *Vol.* 89 (4), 2288–2295. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03742.

(199) Zeng, Q., Guo, Q., Yuan, Y., Zhang, X., Jiang, W., Xiao, S., Zhang, B., Lou, X., Ye, C., Liu, M., Bouchard, L.-S., Zhou, X., *A Small Molecular Multifunctional Tool for PH Detection, Fluorescence Imaging, and Photodynamic Therapy*, *ACS Appl. Bio Mater.*, **2020**, *Vol.* 3 (3), 1779–1786. https://doi.org/10.1021/acsabm.9b01080.

(200) Zhang, H., Yu, Q., Li, Y., Yang, Z., Zhou, X., Chen, S., Jiang, Z.-X., *Fluorinated Cryptophane-A and Porphyrin-Based Theranostics for Multimodal Imaging-Guided Photodynamic Therapy*, *Chem. Commun.*, **2020**, *Vol.* 56 (25), 3617–3620. https://doi.org/10.1039/D0CC00694G.

(201) Gauberti, M., Montagne, A., Quenault, A., Vivien, D., *Molecular Magnetic Resonance Imaging of Brain-Immune Interactions*, *Front. Cell. Neurosci.*, **2014**, *Vol.* 8 (November), 1–20. https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00389.

(202) Wu, F., Liu, L., Zhou, H., *Endothelial Cell Activation in Central Nervous System Inflammation*, *J. Leukoc. Biol.*, **2017**, *Vol.* 101 (5), 1119–1132. https://doi.org/10.1189/jlb.3RU0816-352RR.

(203) Wee Yong, V., *Inflammation in Neurological Disorders: A Help or a Hindrance?*, *Neurosci.*, **2010**, *Vol.* 16 (4), 408–420. https://doi.org/10.1177/1073858410371379.

(204) Pober, J. S., Sessa, W. C., *Evolving Functions of Endothelial Cells in Inflammation*, . *Nature Reviews Immunology*. 2007. https://doi.org/10.1038/nri2171.

(205) García-Berrocoso, T., Penalba, A., Boada, C., Giralt, D., Cuadrado, E., Colomé, N., Dayon, L., Canals, F., Sanchez, J.-C., Rosell, A., Montaner, J., *From Brain to Blood: New Biomarkers for Ischemic Stroke Prognosis*, *J. Proteomics*, **2013**, *Vol.* 94138–148. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.09.005.

(206) Novakova, L., Axelsson, M., Khademi, M., Zetterberg, H., Blennow, K., Malmeström, C., Piehl, F., Olsson, T., Lycke, J., *Cerebrospinal Fluid Biomarkers of Inflammation and Degeneration as Measures of Fingolimod Efficacy in Multiple Sclerosis*, *Mult. Scler. J.*, **2017**, *Vol.* 23 (1), 62–71. https://doi.org/10.1177/1352458516639384.

(207) Albrecht, D. S., Granziera, C., Hooker, J. M., Loggia, M. L., *In Vivo Imaging of Human Neuroinflammation*, *ACS Chem. Neurosci.*, **2016**, *Vol.* 7 (4), 470–483. https://doi.org/10.1021/acschemneuro.6b00056.

(208) Herranz, E., Giannì, C., Louapre, C., Treaba, C. A., Govindarajan, S. T., Ouellette, R., Loggia, M. L., Sloane, J. A., Madigan, N., Izquierdo-Garcia, D., Ward, N., Mangeat, G., Granberg, T., Klawiter, E. C., Catana, C., Hooker, J. M., Taylor, N., Ionete, C., Kinkel, R. P., Mainero, C., *Neuroinflammatory Component of Gray Matter Pathology in Multiple Sclerosis*, *Ann. Neurol.*, **2016**, *Vol.* 80 (5), 776–790. https://doi.org/10.1002/ana.24791.

(209) Fournier, A. P., Quenault, A., Martinez de Lizarrondo, S., Gauberti, M., Defer, G., Vivien, D., Docagne, F., Macrez, R., *Prediction of Disease Activity in Models of Multiple Sclerosis by Molecular Magnetic Resonance Imaging of P-Selectin*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2017**, *Vol.* 114 (23), 6116–6121. https://doi.org/10.1073/pnas.1619424114.

(210) Canceill, J., Collet, A., Gottarelli, G., *Optical Activity Due to Isotopic Substitution. Synthesis, Stereochemistry, and Circular Dichroism of (+)- and (−)-[2,7,12-2H3]Cyclotribenzylene*, *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, *Vol.* 106 (20), 5997–6003. https://doi.org/10.1021/ja00332a042.

(211) Darzac, M., Brotin, T., Rousset-Arzel, L., Bouchu, D., Dutasta, J. P., *Synthesis and Application of Cryptophanol Hosts: 129Xe NMR Spectroscopy of a Deuterium-Labeled (Xe)2@bis-Cryptophane Complex*, *New J. Chem.*, **2004**, *Vol.* 28502–512. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2547-2_5.

(212) Conde, J., Dias, J. T., Grazú, V., Moros, M., Baptista, P. V., de la Fuente, J. M., *Revisiting 30 Years of Biofunctionalization and Surface Chemistry of Inorganic Nanoparticles for Nanomedicine*, *Front. Chem.*, **2014**, *Vol.* 2. https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00048.

(213) Barluenga, J., Tomás-Gamasa, M., Aznar, F., Valdés, C., *Metal-Free Carbon–Carbon Bond-Forming Reductive Coupling between Boronic Acids and Tosylhydrazones*, *Nat. Chem.*, **2009**, *Vol.* 1 (6), 494–499. https://doi.org/10.1038/nchem.328.

(214) Traoré, T., Delacour, L., Berthault, P., Cintrat, J. C., Rousseau, B., *Scalable Synthesis of Cryptophane-1.1.1 and Its Functionalization*, *Org. Lett.*, **2010**, *Vol.* 12 (5), 960–962. https://doi.org/10.1021/ol902952h.

(215) Traoré, T., Delacour, L., Kotera, N., Merer, G., Buisson, D., Dupont, C., Rousseau, B., *Scalable Synthesis of Cyclotriphenolene*, *Org. Process Res. Dev.*, **2011**, *Vol.* 15 (2), 435–437. https://doi.org/10.1021/op100260w.

(216) Vigier, C., Fossé, P., Fabis, F., Cailly, T., Dubost, E., *Controlled Access to C 1 -Symmetrical Cyclotriveratrylenes (CTVs) by Using a Sequential Barluenga Boronic Coupling (BBC) Approach*, *Adv. Synth. Catal.*, **2021**, *Vol.* 363 (15), 3756–3761. https://doi.org/10.1002/adsc.202100547.

(217) Hara, H., Hayashi, K., Inoue, S., Shimizu, H., Kobayashi, A., Ishizaki, M., Matsuoka, Y., Nishitani, K., *Synthetic Studies on Azacyclotribenzylenes*, *Heterocycles*, **2005**, *Vol.* 65 (1), 1. https://doi.org/10.3987/COM-04-10249.

(218) Panagopoulos, A. M., Zeller, M., Becker, D. P., *Synthesis of an Ortho -Triazacyclophane: N , N ′, N ″-Trimethyltribenzo-1,4,7-Triazacyclononatriene*, *J. Org. Chem.*, **2010**, *Vol.* 75 (22), 7887–7892. https://doi.org/10.1021/jo1017074.

(219) Traoré, T., *Synthèse de Nouvelles Molécules Cages et Applications Pour l'Imagerie Par RMN Xénon.*, **2011**, .

(220) Berthault, P., Boutin, C., Léonce, E., Jeanneau, E., Brotin, T., *Role of the Methoxy Groups in Cryptophanes for Complexation of Xenon: Conformational Selection Evidence from 129Xe-1H NMR SPINOE Experiments*, *ChemPhysChem*, **2017**, *Vol.* 18 (12), 1561–1568. https://doi.org/10.1002/cphc.201700266.

(221) Suffert, J., *Simple Direct Titration of Organolithium Reagents Using N-Pivaloyl-o-Toluidine and/or N-Pivaloyl-o-Benzylaniline*, *J. Org. Chem.*, **1989**, *Vol.* 54 (2), 509–510. https://doi.org/10.1021/jo00263a052.

(222) Spence, M. M., Ruiz, E. J., Rubin, S. M., Lowery, T. J., Winssinger, N., Schultz, P. G., Wemmer, D. E., Pines, A., *Development of a Functionalized Xenon Biosensor*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *Vol.* 126 (46), 15287–15294. https://doi.org/10.1021/ja0483037.

(223) Brotin, T., Devic, T., Lesage, A., Emsley, L., Collet, A., *Synthesis of Deuterium-Labeled Cryptophane-A and Investigation of Xe@Cryptophane Complexation Dynamics by 1D-EXSY NMR Experiments*, *Chemistry (Easton).*, **2001**, *Vol.* 7 (7), 1561–1573. https://doi.org/10.1002/1521-3765(20010401)7:7<1561::AID-CHEM1561>3.0.CO;2-9.

(224) Blasco, V., Murga, J., Falomir, E., Carda, M., Royo, S., Cuñat, A. C., Sanz-Cervera, J. F., Marco, J. A., *Synthesis and Biological Evaluation of Cyclic Derivatives of Combretastatin A-4 Containing Group 14 Elements*, *Org. Biomol. Chem.*, **2018**, *Vol.* 16 (32), 5859–5870. https://doi.org/10.1039/C8OB01148F.

(225) Xie, S., Li, X., Yu, H., Zhang, P., Wang, J., Wang, C., Xu, S., Wu, Z., Liu, J., Zhu, Z., Xu, J., *Design, Synthesis and Biological Evaluation of Isochroman-4-One Hybrids Bearing Piperazine Moiety as Antihypertensive Agent Candidates*, *Bioorganic Med. Chem.*, **2019**, *Vol.* 27 (13), 2764–2770. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.05.004.

(226) Clark, R., Matsuura, F., Kira, K., Hirota, S., Azuma, H., Nagakura, T., Horizoe, T., Tabata, K., Kusano, K., Omae, T., Inoue, A., *Preparation of Triazolone Derivatives as Blood Coagulation Factor VIIa Inhibitors*, , 2007.

(227) Wales, S. M., Rivinoja, D. J., Gardiner, M. G., Bird, M. J., Meyer, A. G., Ryan, J. H., Hyland, C. J. T., *Benzoazepine-Fused Isoindolines via Intramolecular (3 + 2)-Cycloadditions of Azomethine Ylides with Dinitroarenes*, *Org. Lett.*, **2019**, *Vol.* 21 (12), 4703–4708. https://doi.org/10.1021/acs.orglett.9b01580.

(228) Xu, G., Wang, Z., Shao, Y., Sun, J., *Copper-Catalyzed Tandem Cross-Coupling and Alkynylogous Aldol Reaction: Access to Chiral Exocyclic a-Allenols*, *Org. Lett.*, **2021**, *Vol.* 23 (13), 5175–5179. https://doi.org/10.1021/acs.orglett.1c01712.

(229) Nason, D. M., Heck, S. D., Bodenstein, M. S., Lowe, J. A., Nelson, R. B., Liston, D. R., Nolan, C. E., Lanyon, L. F., Ward, K. M., Volkmann, R. A., *Substituted 6-Phenyl-Pyridin-2-Ylamines: Selective and Potent Inhibitors of Neuronal Nitric Oxide Synthase*, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, **2004**, *Vol.* 14 (17), 4511–4514. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.06.043.

Conception et synthèse d'une sonde à base de cryptophane pour l'exploration de la neuro-inflammation par IRM du Xénon hyperpolarisé

La neuro-inflammation est un phénomène physiopathologique du système nerveux central (SNC), impliquée dans plusieurs pathologies, qui se traduit par l'apparition précoce de nombreux marqueurs biologiques comme les molécules d'adhésion VCAM-1 et P-selectine. Leur détection et quantification sont des enjeux importants à la fois dans le but d'obtenir un diagnostic précoce et une réponse thérapeutique adaptée. En imagerie médicale, seules la tomographie par émission mono photonique (TEMP) et la tomographie par émission de positrons (TEP) sont utilisées chez l'Homme pour le diagnostic clinique de la neuro-inflammation. L'imagerie par résonnance magnétique (IRM) moléculaire émerge comme une alternative valable et parmi les agents de contraste disponibles, l'utilisation de xénon hyperpolarisé apparaît depuis quelques années comme une option prometteuse. Inerte, non toxique et soluble dans les fluides biologiques, il est détectable à très faible concentration et avec un très bon rapport signal/bruit. Toutefois le xénon reste non spécifique d'une cible biologique, et pour être un agent de contraste utilisable, il doit être vectorisé par un hôte moléculaire capable de l'encapsuler. Parmi ces hôtes, les cryptophanes montrent de très bonnes propriétés d'encapsulation du xénon.

Dans une première partie, deux structures de cryptophane comportant des fonctions NHS et maléimide ont donc été synthétisées et greffés sur des anticorps spécifiques de VCAM-1 pour obtenir deux biosondes de la neuro-inflammation. Dans une deuxième partie, une nouvelle méthode de synthèse de cyclotrivératrylènes (CTV) de symétrie C_1, intermédiaire clé dans la synthèse de cryptophane, a pu être mise au point. Enfin, elle a été utilisée pour développer une famille originale de cryptophanes comportant un ou plusieurs azotes. Leurs propriétés ont été étudiées par cristallographie et RMN du xénon.

Mots clés : neuro-inflammation, biosonde, cryptophane, chimie hôte-invité, xénon, CTV

Design and synthesis of cryptophane-based probe for neuro-inflammation exploration by hyperpolarized xenon MRI

Neuroinflammation is a physiopathological phenomenon of the central nervous system (CNS), involved in several pathologies, which is expressed through the early appearance of many biological markers, such as the adhesion molecules VCAM-1 and P-selectin. Detection and quantification are both important issues in order to obtain an early diagnostic and an appropriate therapeutic response. In medical imaging, only single photon emission computed tomography (SPECT) and positron emission tomography (PET) are used in Human for the clinical diagnosis of neuroinflammation. Molecular magnetic resonance imaging (MRI) has emerged as a valid alternative, and among the available contrast agents, the use of hyperpolarized xenon has appeared as a promising option since several years. Inert, non-toxic and soluble in organic fluids, it's detectable at very low concentration, with a very good signal/noise ratio. However, xenon is non-specific for a biological target, and to be a valuable contrast agent, has to be vectorized using a molecular host. Among these hosts, cryptophanes show very good xenon encapsulation properties.

In a first part, two cryptophane structures bearing NHS and maleimide functions were synthesized and grafted onto specific VCAM-1 antibodies to afford two neuroinflammation biosensors. In a second part, a new synthetic method for C_1-symmetry CTV's obtention, key intermediate in cryptophane synthesis, has been developed. Finally, this method was applied to synthesize an original family of cryptophane bearing one or more nitrogen atoms. Their properties have been studied by crystallography and xenon NMR.

Keys words: neuroinflammation, biosensor, cryptophane, host-guest chemistry, xenon, CTV