

Université de Montréal

**Synthèse et caractérisation de polymères biodégradables
à partir d'acides biliaires à des fins biomédicales**

par
Claire Jaubert

Département de chimie
Faculté des Arts et des Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue
de l'obtention du grade de maîtrise en sciences (M. Sc.) en chimie

Avril 2006

©Claire Jaubert, 2006



QD

3

U54

2007

V. 004

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

**Synthèse et caractérisation de polymères biodégradables
à partir d'acides biliaires à des fins biomédicales**

présenté par
Claire Jaubert

A été évalué par un jury composé des personnes présentes :

Pr. Suzanne Giasson
Président-rapporteur

Pr. Julian Zhu
Directeur de recherche

Pr. William G. Skene
Membre du jury

Résumé

Ce travail s'inscrit dans le besoin actuel d'implants biodégradables pour la libération contrôlée de principes actifs. Le but de ce projet est de synthétiser et de caractériser de nouveaux polymères biodégradables et biocompatibles, des poly(anhydrides), contenant des dérivés de composés endogènes comme les acides biliaires.

La recherche présentée dans ce mémoire inclue la synthèse d'un monomère dérivé de l'acide lithocholique (un acide biliaire) et sa copolymérisation (soit statistique ou bloc) avec l'acide sébacique, un composé connu pour sa biocompatibilité. Ces copolymères sont alors utilisés pour préparer des implants modèles afin de caractériser l'influence de la structure des polymères sur les vitesses de dégradation et de relargage d'une sonde, la *p*-nitroaniline.

Les résultats indiquent que la cinétique de dégradation des implants préparés à partir des copolymères statistiques est irrégulière et montre un pic initial de dégradation assez important. Les implants préparés à partir des copolymères blocs présentent une vitesse de dégradation linéaire et un pic initial moins prononcé. De plus, dans tous les cas, la cinétique de relargage de la *p*-nitroaniline est similaire à celle de la dégradation. La dégradation et le relargage sont contrôlés pour les copolymères blocs, impliquant que ces derniers confèrent aux implants des caractéristiques de relargage adaptés à leur utilisation comme systèmes biodégradables à libération contrôlée.

L'influence de la composition et de la masse molaire des polymères est étudiée. L'augmentation de la proportion d'acide sébacique montre une accélération aussi bien de la vitesse de dégradation que celle de relargage. L'augmentation de la masse molaire des polymères a un effet opposé, qui est plus prononcé pour le relargage que la dégradation.

Pour finir, des copolymères préparés avec différents acides biliaires (porteurs de groupements hydroxyles supplémentaires) et l'acide sébacique sont synthétisés. Ces copolymères ont des structures ramifiées et pourraient potentiellement permettre d'optimiser d'avantage les propriétés d'implants.

Mots clés : Polyanhydrides, polycondensation, acides biliaires, acide sébacique, dégradation, relargage, masse molaire, composition des polymères, structure des polymères, copolymères statistiques, copolymères blocs.

Abstract

This work addresses the current need for biodegradable implant materials for the controlled and sustained release of drugs. The aim of this project is to synthesize and characterize new biodegradable, and biocompatible, poly(anhydrides) containing derivatives of endogenous compounds such as bile acids.

The research presented in this memoir includes the synthesis of a monomer derived from lithocholic acid (a bile acid) and its copolymerization (either random or block) with sebacic acid, a compound known to be biocompatible. These copolymers are then used to prepare model implant materials in order to characterize the influence of polymer structure on degradation and release (of the model drug compound p-nitroaniline) kinetics.

Results indicate that degradation kinetics of implants prepared from random (statistical) copolymers are irregular and show a marked initial degradation peak. The implants prepared with block copolymers display linear degradation kinetics and a smaller initial degradation peak. Concurrently, the release kinetics of p-nitroaniline are similar to the those of the degradation. The degradation and the release are controlled, indicating that block copolymers are more suitable for using as biodegradable system of controlled release.

The influence of copolymer composition and molecular weight was also investigated. Increased sebacic acid content is shown to accelerate degradation as well as release kinetics. Increasing the molecular weight has an opposite effect, which is more pronounced for release than for degradation.

Finally, copolymers prepared with different bile acids (with additional hydroxyl groups) and sebacic acid are synthesized. These copolymers have branched structures, an aspect which may allow for further optimisation of implant performance.

Keywords: Polyanhydrides, polycondensation, bile acids, sebacic acid, degradation, release, molecular weight, polymer composition, polymer architecture, random copolymer, block copolymer.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Table des matières	v
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	xi
Liste des abréviations et définitions	xvi
Liste des composés	xviii
Remerciements	xix
1 Introduction	1
1.1 Les stéroïdes	1
1.1.1 Les stérols	2
1.1.2 Les stéroïdes hormonaux	2
1.1.3 Les vitamines D	3
1.2 Les acides biliaires	4
1.2.1 Formation des différents acides biliaires	5
1.2.2 Propriétés amphiphiles des acides biliaires	8
1.2.3 Rôles des acides biliaires	9
1.3 L'acide lithocholique	14
1.4 Les biomatériaux	14
1.5 Les polymères biodégradables	16
1.5.1 Définition de la biodégradabilité	16
1.5.2 L'utilisation des polymères biodégradables	16
1.5.3 La nature des polymères biodégradables	16
1.5.4 La dégradation des polymères biodégradables	18
1.6 Les implants de polymères à libération contrôlée	22
1.7 Les polyanhydrides	24
1.7.1 Historique	24
1.7.2 Structure générale des polyanhydrides	24

1.7.3	Synthèse des polyanhydrides	25
1.7.4	Biocompatibilité	27
1.7.5	Caractérisation des polyanhydrides	27
1.7.6	Applications	28
1.8	Projet de recherche	31
2	Partie expérimentale	33
2.1	Produits et instruments	33
2.2	Synthèses	34
2.2.1	Synthèse du 3 α -dimère de l'acide lithocholique (4)	34
2.2.2	Synthèse des polymères : polycondensation en solution	37
2.3	Vitesses de dégradation et de relargage	38
2.3.1	Dégradation des polymères <i>in vitro</i>	38
2.3.2	Relargage de la sonde p-nitroaniline contenue dans les polymères <i>in vitro</i>	38
3	Discussion	42
3.1	Synthèse du 3α-dimère de l'acide lithocholique	42
3.1.1	Ester de méthyle de l'acide lithocholique (2)	42
3.1.2	3 α -dimère de méthyle d'acide lithocholique (3)	44
3.1.3	3 α -dimère de l'acide lithocholique (4)	44
3.1.4	Bilan de la synthèse du 3 α -dimère de l'acide lithocholique	47
3.2	Caractérisation des polymères	47
3.2.1	Détermination de la masse molaire par CES	47
3.2.2	Suivi de la dégradation par HPLC	47
3.2.3	Suivi du relargage par spectroscopie UV-Visible	48
3.3	Protocole de la polymérisation	49
3.3.1	Pureté des produits	49
3.3.2	Conditions optimales de la polymérisation : étude avec l'acide sébacique	50
3.3.3	Présence de triéthylamine dans le polymère obtenu	54
3.4	Influence de la masse des polymères sur la dégradation	55
3.4.1	Polymères en partant de l'acide sébacique	55

3.4.2 Copolymères d'acide lithocholique et d'acide sébacique (copolymères (LCA-SA))	60
3.5 Influence de la composition des polymères	66
3.5.1 Composition des polymères en partant de l'acide lithocholique (1)	66
3.5.2 Composition des polymères en partant du dimère d'acide lithocholique (4)	73
3.6 Comparaison des polymères alternés ou statistiques avec les polymères blocs	80
3.7 Polymérisations des autres acides biliaires avec le chlorure de sébacoyl	89
4 Conclusion	97
Références	99

Liste des Tableaux

Tableau 1-1	Différents types de biomatériaux et leurs applications	15
Tableau 1-2	Comparaison d'un relargage contrôlé et d'une administration classique	23
Tableau 1-3	Absorbance des pics correspondant aux liaisons anhydrides et celles des acides carboxyliques	28
Tableau 1-4	Exemples de maladies employant des polyanhydrides à libération contrôlée de principes actifs	31
Tableau 3-1	Signaux ^1H -RMN (Figure 3-1) des dérivés d'acides biliaires définis à la Figure 2-1	42
Tableau 3-2	Signaux ^1H -RMN (Figure 3-2) des fractions 1 et 2 obtenues lors de la purification du composé 4	45
Tableau 3-3	Analyse élémentaire des acides biliaires et l'acide sébacique	49
Tableau 3-4	Masse moléculaire moyenne M_n et propriétés thermiques des polymères d'acide sébacique obtenus en faisant varier les paramètres : temps, volume DCM et ratio des réactifs	56
Tableau 3-5	Changement de la masse molaire moyenne M_n des P(SA), de masses molaires moyennes M_n différentes, au cours de la dégradation à $37,5^\circ\text{C}$ dans une solution tampon de phosphate (pH 7,4)	57
Tableau 3-6	Masse moléculaire moyenne M_n et propriétés thermiques des copolymères (LCA-SA) obtenus en faisant varier le temps de polycondensation	61
Tableau 3-7	Changement de la masse molaire moyenne M_n des copolymères (LCA-SA), (48/52), de masses molaires moyennes M_n différentes, au cours de la dégradation à $37,5^\circ\text{C}$ dans une solution tampon de phosphate (pH 7,4) .	62

Tableau 3-8	Masse molaire moyenne M_n et propriétés thermiques des copolymères (LCA-SA) de compositions molaires différentes	67
Tableau 3-9	Changement de la masse molaire moyenne M_n des copolymères (LCA-SA) de composition molaire différente, au cours de la dégradation à 37,5°C dans une solution tampon de phosphate (pH 7,4)	69
Tableau 3-10	Dégradation des copolymères (LCA-SA) de composition molaire différente	70
Tableau 3-11	Vitesse de relargage de la p-nitroaniline dans les copolymères (LCA-SA) de composition molaire différente	73
Tableau 3-12	Masse molaire moyenne M_n et propriétés thermiques des copolymères (Dimère LCA-SA) de composition molaire différente	73
Tableau 3-13	Changement de la masse molaire moyenne M_n des copolymères (Dimère LCA-SA) de composition molaire différente, au cours de la dégradation à 37,5°C dans une solution tampon de phosphate (pH 7,4)	75
Tableau 3-14	Dégradation des copolymères (Dimère LCA-SA) de composition molaire différente	76
Tableau 3-15	Vitesse de relargage de la p-nitroaniline dans les copolymères (Dimère LCA-SA) de composition molaire différente	79
Tableau 3-16	Masse molaire moyenne M_n et propriétés thermiques des copolymères (Dimère LCA-SA) statistiques et blocs	81
Tableau 3-17	Dégradation des copolymères (Dimère LCA-SA) statistiques et blocs	85
Tableau 3-18	Vitesse de relargage de la p-nitroaniline dans les copolymères (Dimère LCA-SA) statistiques et blocs	88

Tableau 3-19	Masse molaire moyenne M_n et propriétés thermiques des copolymères (acides biliaires-SA)	90
Tableau 3-20	Changement de la masse molaire moyenne M_n des copolymères (acide biliaires-SA), au cours de la dégradation à 37,5°C dans une solution tampon de phosphate (pH 7,4)	92
Tableau 3-21	Dégradation des copolymères (acides biliaires-SA)	94
Tableau 3-22	Vitesse de relargage des copolymères (acides biliaires-SA)	96

Liste des figures

Figure 1-1	Squelette perhydrocyclopentanophénatrène des stéroïdes ...	1
Figure 1-2	Différents stéroïdes existants	1
Figure 1-3	Structure chimique du cholestérol	2
Figure 1-4.	Structure chimique de la testostérone (a), de la progesterone (b), de la cortisone (c)	3
Figure 1-5	Structure chimique de la ergocalciférol (a), de la cholécalficérol (b).....	4
Figure 1-6	Structure chimique générale des acides biliaires.....	4
Figure 1-7	Biosynthèse des acides biliaires primaires et secondaires ...	6
Figure 1-8	Cycle entérohépatique	8
Figure 1-9	Représentation des faces polaire et apolaire des acides et sels biliaires	8
Figure 1-10	Sels biliaires de l'acide cholique	10
Figure 1-11	Hydrolyse des triglycérides	11
Figure 1-12	Diagramme des compositions possible du mélange ternaire cholestérol-lécithine-sels biliaires	13
Figure 1-13	Structure chimique de l'acide lithocholique	14
Figure 1-14.	Différents polymères biodégradables	17
Figure 1-15	Dégradations hétérogène et homogène	21
Figure1-16	Structure chimique générale des polyanhydrides	24
Figure1-17	Polycondensation à l'état fondu de polyanhydrides.....	26
Figure1-18	Polycondensation en solution de polyanhydrides	26
Figure 1-19.	Structure chimique de P(CPP-SA) (a) et de la carmustine (b)	29
Figure 1-20	Structure chimique de la gentamicine (a) et de l'acide érucique (b)	30
Figure 2-1	Synthèse du 3 α -dimère d'acide lithocholique (4)	35
Figure 2-2	Polycondensation en solution de l'acide sébacique (5)	39

Figure 2-3	Polycondensation en solution du dimère de l'acide lithocholique (4), obtention d'un polymère alterné ou statistique	40
Figure 2-4	Polycondensation en solution de l'acide lithocholique (4), obtention d'un polymère alterné ou statistique	41
Figure 3-1	Spectres ^1H -RMN des composés 2, 3 et 4	43
Figure 3-2	Spectres ^1H -RMN des fractions 1 et 2	46
Figure 3-3	Spectre d'absorbance de la p-nitroaniline	48
Figure 3-4	Courbe de calibration de la p-nitroaniline	49
Figure 3-5	Vérification de l'absence d'eau dans le dimère d'acide lithocholique par ATG avant son utilisation	50
Figure 3-6	Influence du volume du solvant sur la polycondensation en solution	51
Figure 3-7	Influence de l'ordre des réactifs sur la polycondensation en solution	53
Figure 3-8	Influence du temps sur la polycondensation en solution	54
Figure 3-9	Spectres ^1H -RMN des P(SA) obtenus sans et avec lavage d'une solution d'acide acétique pH 6	55
Figure 3-10	Suivi de l'hydrolyse des liaisons anhydrides des P(SA) par IR	56
Figure 3-11	Perte de la masse des pastilles des P(SA) de masses molaires moyennes M_n différentes. Dégradation faite à 37,5°C dans une solution tampon de phosphate (pH 7,4) ...	58
Figure 3-12	Pourcentage d'acide sébacique libéré des P(SA) de masses molaires moyennes M_n différentes dans la solution tampon de phosphate (pH 7,4) à 37,5°C, au cours de la dégradation	58
Figure 3-13	Relargage de la sonde contenue dans les P(SA) de masses molaires moyennes M_n différentes dans la solution tampon de phosphate (pH 7,4) à 37,5°C	59

Figure 3-14	Vitesse de relargage de la sonde contenue dans les P(SA) de masses molaires moyennes M_n différentes dans la solution tampon de phosphate (pH 7,4) à 37,5°C	60
Figure 3-15	Perte de la masse des pastilles des copolymères (LCA-SA), (48/52) de masses molaires moyennes M_n différentes. Dégradation faite à 37,5°C dans une solution tampon de phosphate (pH 7,4)	63
Figure 3-16	Pourcentage d'acide sébacique libéré des copolymères (LCA-SA) (48/52) de masses molaires moyennes M_n différentes dans la solution tampon de phosphate (pH 7,4) à 37,5°C, au cours de la dégradation	64
Figure 3-17	Relargage de la sonde contenue dans les copolymères (LCA-SA) (48/52) de masses molaires moyennes M_n différentes dans la solution tampon de phosphate (pH 7,4) à 37,5°C	65
Figure 3-18	Vitesse de relargage de la sonde contenue dans les copolymères (LCA-SA) (48/52) de masses molaires moyennes M_n différentes dans la solution tampon de phosphate (pH 7,4) à 37,5°C	65
Figure 3-19	Suivi de l'hydrolyse des liaisons anhydrides des polymères (LCA-SA) par IR	68
Figure 3-20	Perte de la masse des pastilles des polymères (LCA-SA) de compositions molaires différentes. Dégradation faite à 37,5°C dans une solution tampon de phosphate (pH 7,4) ...	70
Figure 3-21	Pourcentage d'acide sébacique libéré des copolymères (LCA-SA) de compositions molaires différentes dans la solution tampon de phosphate (pH 7,4) à 37,5°C, au cours de la dégradation	71
Figure 3-22	Relargage de la sonde contenue dans les copolymères (LCA-SA) de compositions molaires différentes dans la solution tampon de phosphate (pH 7,4) à 37,5°C	72

Figure 3-23	Vitesse de relargage de la sonde contenue dans les copolymères (LCA-SA) de compositions molaires différentes dans la solution tampon de phosphate (pH 7,4) à 37,5°C	72
Figure 3-24	Suivi de l'hydrolyse des liaisons anhydrides des copolymères (Dimère LCA-SA) par IR	74
Figure 3-25	Perte de la masse des pastilles des copolymères (Dimère LCA-SA) de compositions molaires différentes. Dégradation faite à 37,5°C dans une solution tampon de phosphate (pH 7,4)	76
Figure 3-26	Pourcentage d'acide sébacique libéré des copolymères (Dimère LCA-SA) de compositions molaires différentes dans la solution tampon de phosphate (pH 7,4) à 37,5°C, au cours de la dégradation	77
Figure 3-27	Relargage de la sonde contenue dans les copolymères (Dimère LCA-SA) de compositions molaires différentes dans la solution tampon de phosphate (pH 7,4) à 37,5°C	78
Figure 3-28	Vitesse de relargage de la sonde contenue dans les copolymères (Dimère LCA-SA) de compositions molaires différentes dans la solution tampon de phosphate (pH 7,4) à 37,5°C	78
Figure 3-29	Hydrolyse des liaisons anhydrides des polymères (Dimère LCA-SA) statistiques et blocs au bout de 24 heures	82
Figure 3-30	Comparaison du changement de la masse molaire moyenne M_n des copolymères (Dimères LCA-SA) statistiques et blocs, au cours de la dégradation faite à 37,5°C dans une solution tampon de phosphate (pH 7,4)	83

Figure 3-31	Comparaison de la perte de la masse des pastilles des copolymères (Dimère LCA-SA) statistiques et blocs. Dégradation faite à 37,5°C dans une solution tampon de phosphate (pH 7,4)	84
Figure 3-32	Comparaison du pourcentage d'acide sébacique libéré des copolymères (Dimère LCA-SA) statistiques et blocs dans la solution tampon de phosphate (pH. 7,4) à 37,5°C, au cours de la dégradation	86
Figure 3-33	Comparaison du relargage de la sonde contenue dans les copolymères (Dimères LCA-SA) statistiques et blocs dans la solution tampon de phosphate (pH. 7,4) à 37,5°C	87
Figure 3-34	Suivi de l'hydrolyse des copolymères (acide biliaires-SA) par IR	91
Figure 3-35	Comparaison de la perte de la masse des pastilles des copolymères (acide biliaire-SA). Dégradation faite à 37,5°C dans une solution tampon de phosphate (pH 7,4) ...	93
Figure 3-36	Comparaison du relargage de la sonde contenue dans les copolymères (acide biliaire-SA) dans une solution tampon de phosphate (pH 7,4) à 37,5°C	95

Liste des abréviations et définitions

Abs.	Absorbance
Aq.	Aqueux
ATG	Analyse thermogravimétrique
CES	Chromatographie d'exclusion stérique
cm	Centimètres
CMC	Concentration micellaire critique
CMT	Température micellaire critique
CPP	1,3-(biscarboxyphenoxy)propane
d	Diem (jour)
Da	Daltons
DCM	Dichlorométhane
DSC	Calorimétrie différentielle à balayage
ET ₃ N	Triéthylamine
FA	Acide gras
FAD	Dimère d'acide gras
FDA	Food and Drug Administration
FT-IR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
g	Gramme
HCl	Acide chlorhydrique
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
I.R	Infrarouge
J	Joules
LCA	Acide lithocholique
LiOH	Hydroxyde de lithium
Ln	Longueur moyenne des blocs
MHz	MégaHertz
M _n	Masse molaire en nombre
min	Minutes
mg	Milligramme
mL	Millilitre
mmole	Millimole
N	Normalité
nm	Nanomètre
PAPS	Phosphoadénosine phosphosulfate
P(CPP)	Poly[bis(carboxyphenoxy)propane]
P(SA)	Poly(sébacique acide)
pH	Potentiel d'hydrogène
ppm	Parties par million
RMN	Résonance magnétique nucléaire
s	Seconde
SA	Acide sébacique
SO ₂	Dioxyde de soufre

SOCl ₂	Chlorure de tionyle
T _c	Température de cristallisation
T _f	Température d'ébullition
T _g	Température de transition vitreuse
THF	Tétrahydrofurane
UV	Ultraviolet

Vitesse de dégradation : étude de la perte de masse de la pastille des polymères en fonction du temps d'incubation. La vitesse de dégradation est calculée à partir de la pente ($pente = k_0 SM_{\infty}^{-1}$) de l'équation (2)

Vitesse de relargage : étude de la dérivée première au temps t de la courbe de relargage de la quantité de la sonde (en mg) en fonction du temps d'incubation.
((quantité sonde 2 – quantité sonde 1) / (temps 2 - temps1))

Liste des composés

Composé (1)	Acide lithocholique
Composé (2)	Ester de méthyle de l'acide lithocholique
Composé (3)	3 α -dimère de méthyle de l'acide lithocholique
Composé (4)	3 α -dimère de l'acide lithocholique
Composé (5)	Acide sébacique
Composé (6)	Acide chénodéoxycholique
Composé (7)	Acide cholique
Composé (8)	Acide déoxycholique

Remerciements

Je remercie tout d'abord mon directeur de recherche, le professeur Julian Zhu. Cela fut un plaisir d'être accueilli dans son groupe, de m'avoir fait découvrir une nouvelle application des polymères : leur biodégradabilité dans le domaine biomédicale.

Je tiens à remercier tout particulièrement le docteur Julien Gautrot, pour son aide, ses conseils avisés, son soutien, sa disponibilité sur le développement du sujet. Mes remerciements sont aussi pour Julie Boivin, Marc Gauthier, Héloïse Terrien-Aubien et Guillaume Guiguère pour leur soutien technique et leur patience. Et je tiens aussi à remercier tous les membres du groupe de recherche ainsi que ceux du groupe de recherche du professeur Prud'homme (voisins de bureau) pour tous les bons moments passés ensemble.

Je remercie également Huguette Diné pour toutes les analyses élémentaires de mes produits.

Et un grand merci à Fred pour tout son soutien, sa patience, sa compréhension, ses conseils et d'être là.

1 Introduction

1.1 Les stéroïdes

Les stéroïdes présentent tous un squelette perhydrocyclopentanophénatrène (Figure 1-1): un carbure tétracyclique.

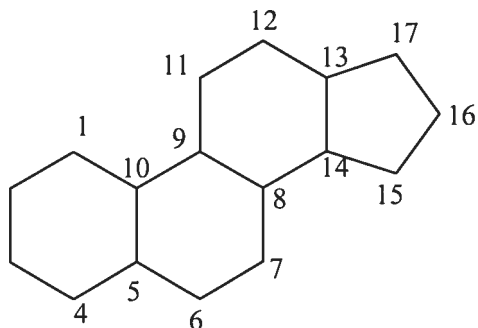


Figure 1-1. Squelette perhydrocyclopentanophénatrène des stéroïdes

Les différences notables entre les différents stéroïdes existants sont :

- la présence de groupements méthyl situés sur le squelette et une chaîne en position C17 généralement.
- la position et la nature des différents groupements comme le groupement hydroxyle, la fonction cétone (les positions C10 et C13 alkyles).
- la présence de doubles liaisons.

Les stéroïdes se retrouvent aussi bien chez les végétaux que chez les animaux. Quatre groupes principaux constituent les stéroïdes (Figure 1-2).

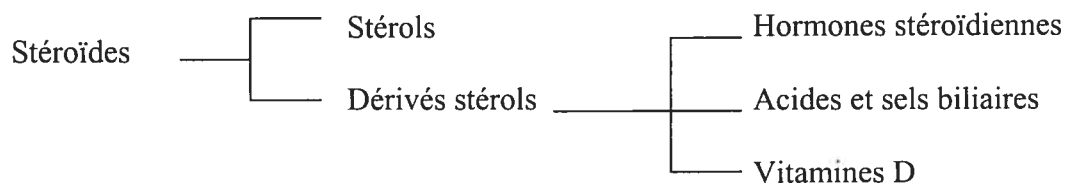


Figure 1-2. Différents stéroïdes existants

1.1.1 Les stérols

Les stérols portent un groupement hydroxyle en position C3. Le plus connu des stérols est le cholestérol (Figure 1-3). Sa découverte remonte au XVIII^{ème} siècle dans des calculs biliaires. Il aura fallu attendre 1888 pour que sa formule soit donnée mais ce n'est que 60 ans après (1955) que sa structure fut établie.

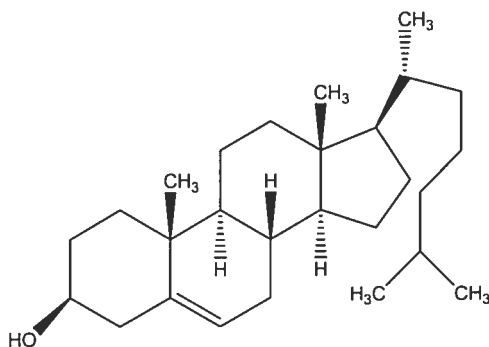


Figure 1-3. Structure chimique du cholestérol

1.1.2 Les stéroïdes hormonaux

Les hormones se trouvent sous différentes structures comme des acides aminées, des polypeptides ou des stéroïdes. Celles-ci sont aussi bien présentes chez les végétaux que chez les mammifères.

Chez les mammifères, les hormones stéroïdiennes sont formées à partir du cholestérol. Elles se situent dans les glandes sexuelles et dans les glandes corticosurrénales. Chez les hommes, elles sont produites par les testicules : ce sont la testostérone (Figure 1-4.a) et l'androstérone. Chez les femmes, ce sont l'oestrone, l'oestradiol et la progestérone (Figure 1-4.b) qui permettent de régler le cycle menstruel et la grossesse. Dans les glandes corticosurrénales, elles jouent un rôle au niveau du métabolisme des glucides et des lipides. La principale est la cortisone (Figure 1-4.c).

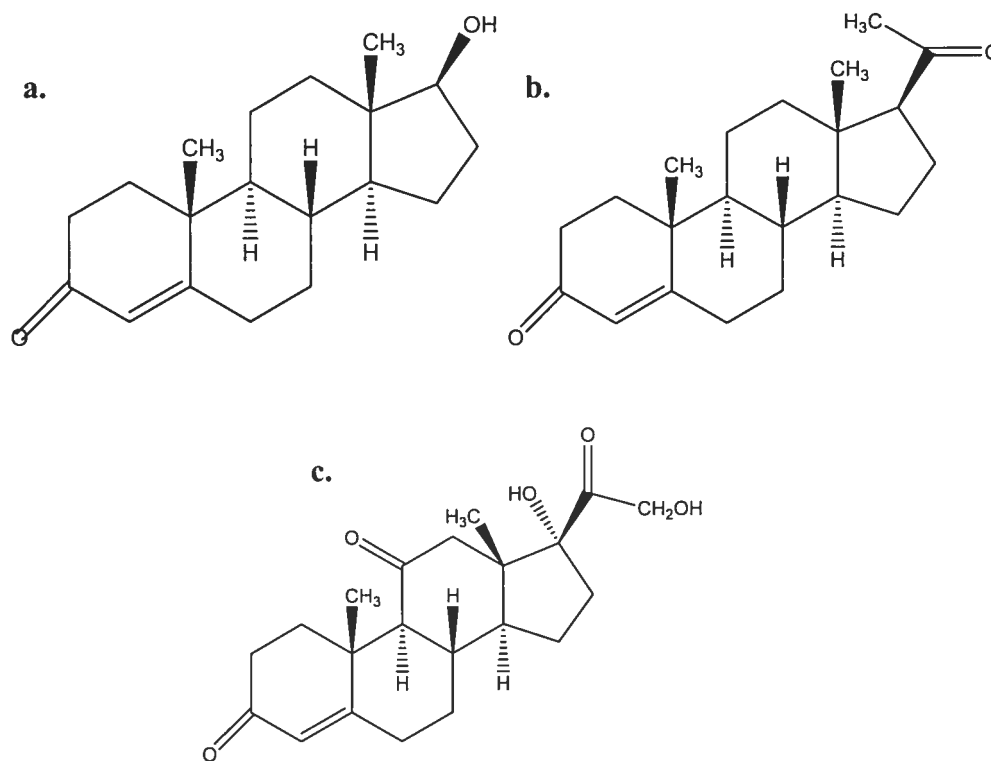


Figure 1-4. Structure chimique de la testostérone (a), de la progestérone (b), de la cortisone (c)

1.1.3 Les vitamines D

Les vitamines D sont des dérivés des stérols qui sont principalement fournis par l'alimentation, mais qui peuvent être produits par la peau sous l'action des rayons solaires ou ultraviolets.

La vitamine D est soit sous la forme:

- vitamine D₂ ou ergocalciférol (Figure 1-5.a), produite par les végétaux.
- vitamine D₃ ou cholécalférol (Figure 1-5.b), produite par les animaux.

Le rôle majeur de ces vitamines est de permettre au corps de maintenir une masse minérale osseuse optimale. En effet les minéraux présents dans l'alimentation dont le calcium et le phosphore sont absorbés par l'intestin grâce aux formes actives de ces vitamines. Ces minéraux, par la suite, peuvent donc être fixés par les os.

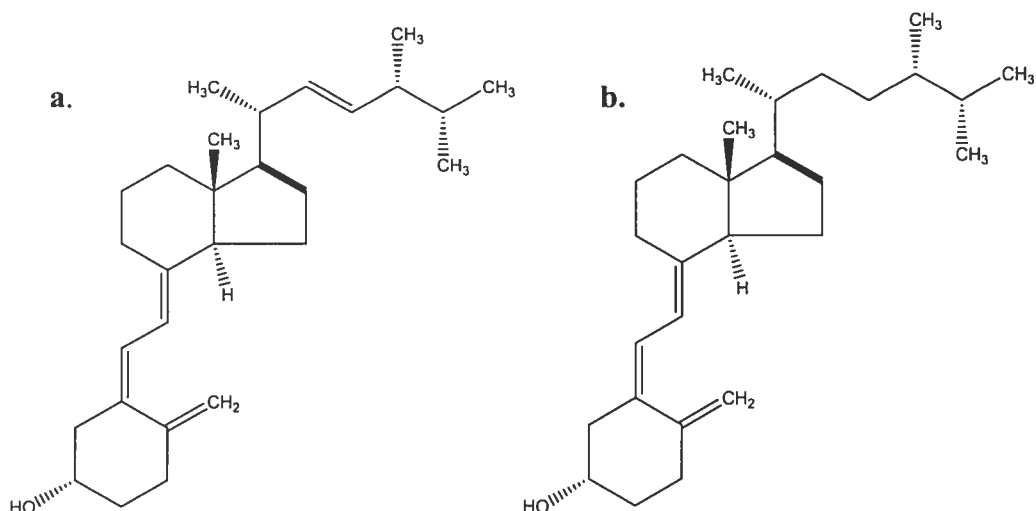
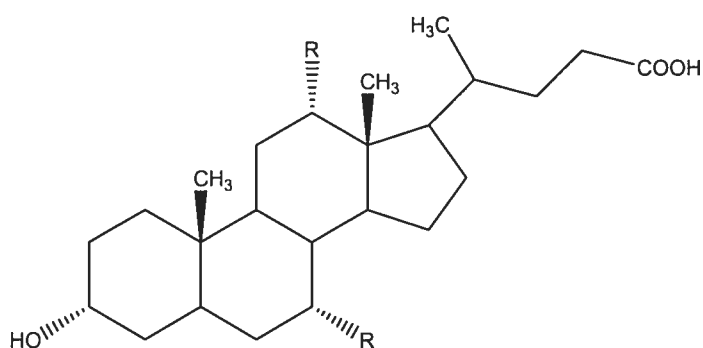


Figure 1-5. Structure chimique de la ergocalciférol (a), de la cholécalciférol (b)

1.2 Les acides biliaires

Les acides biliaires sont le quatrième groupe principal constituant les stéroïdes. De nombreuses revues et livres scientifiques décrivent les propriétés physico-chimiques des acides biliaires ainsi que celles de leurs sels [1-5].

Il existe différents acides biliaires naturels, tous sont dérivés du cholestérol. La structure générale d'un acide biliaire (Figure 1-6) est un stéroïde à 24 atomes de carbone possédant 1, 2 ou 3 groupements hydroxyles situés sur les carbones C3, C7 et C12. Une chaîne alkyle située en position C17 se termine par un acide carboxylique.



Avec R : H ou OH

Figure 1-6. Structure chimique générale des acides biliaires

1.2.1 Formation des différents acides biliaires

La formation des acides biliaires se fait à partir du cholestérol dans le foie (Figure 1-7). Cette origine a été prouvée par Bloch et al en 1943 [6]. Ils ont démontré que de l'acide cholique deutéré était produit après avoir introduit oralement à un chien du cholestérol deutéré. Dans les années 50, Chaikoff et son équipe [7-8] ont également montré que du cholestérol marqué au carbone 14 injecté à un rat par intraveineuse était transformé en acides biliaires à 80-90%. La conversion du cholestérol en acides biliaires a désormais été démontrée pour plusieurs espèces de mammifères.

La synthèse des acides biliaires est complexe. Elle demande l'intervention de 17 enzymes qui permettent l'ajout des groupes hydroxyles sur le squelette stéroïde du cholestérol ainsi que l'oxydation et la réduction de la chaîne alkyle [9].

Dans le foie, les acides biliaires primaires, l'acide cholique (un trihydroxyle-acide biliaire comportant 3 groupements hydroxyles en positions C-3, 7 et 12 : 3 α , 7 α , 12 α -Trihydroxy, 5 β -acide cholanoïque), le plus abondant, et l'acide chénodéoxycholique (un dihydroxyle-acide biliaire comportant 2 groupements hydroxyles en positions C-3 et 7 : 3 α , 7 α -Dihydroxy, 5 β -acide cholanoïque) sont issus du catabolisme du cholestérol. La première étape de ce processus est la 7 α -hydroxylation du cholestérol. Le mécanisme de synthèse est le même pour les deux acides biliaires primaires à la seule différence que pour le chénodéoxycholique, le groupement hydroxyle en position C12 n'est pas introduit. Dans le foie humain, ces deux acides biliaires primaires produits ont pour proportions 70% d'acide cholique et 30% d'acide chénodéoxycholique.

Les acides biliaires primaires sont conjugués avec la taurine ou le glycofolle, par la suite, dans le foie dans le but de survivre au faible pH de l'intestin. Des études sur cette conjugaison ont été effectuées [10-11]. Le rapport de ces sels conjugués varie en fonction de l'espèce de mammifère et est influencé par le régime alimentaire, les vitamines et les hormones [12-13]. Ceux à partir de la conjugaison avec le glycofolle sont plus abondants.

Ces sels biliaires primaires formés (glycofolate, glycochélate, taurofolate et taurochélate) sont excrétés dans la bile vers l'intestin. Ils vont être déconjugués, sous l'action de bactéries intestinales, dans l'iléon. Le résultat est que l'acide cholique libéré

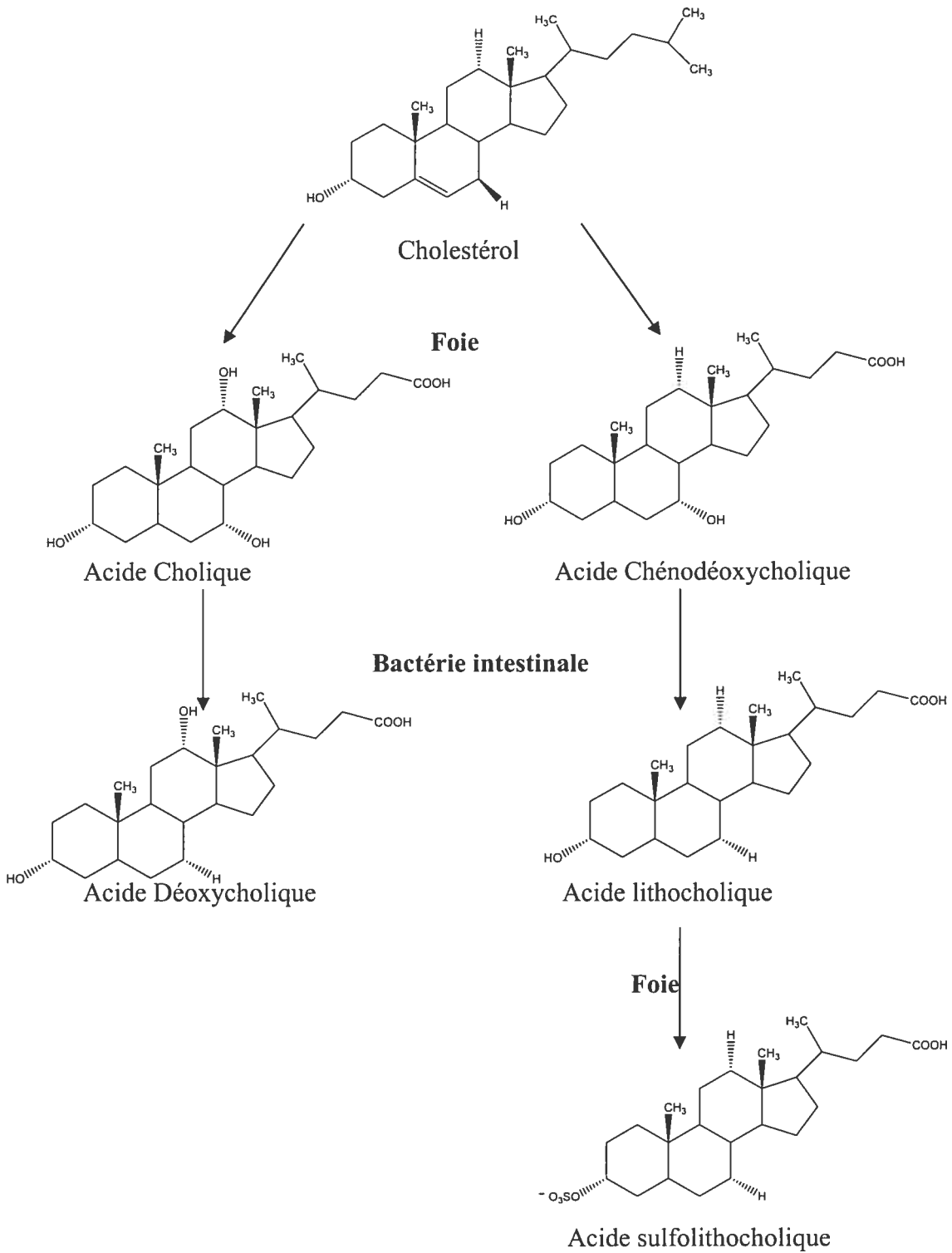


Figure 1-7. Biosynthèse des acides biliaires primaires et secondaires

est soit réabsorbé à 90% soit transformé à 10 % en acide désoxycholique (7 α , 12 α -Dihydroxy, 5 β -acide cholanoïque, acide biliaire secondaire), par les mêmes bactéries par réduction de la fonction alcool en 7 α . De même pour l'acide chénodéoxycholique libéré qui, lui, est transformé à 10% en acide secondaire biliaire, l'acide lithocholique (3 α -Hydroxy, 5 β -acide cholanoïque).

Une fois les acides biliaires secondaires formés, ils sont réabsorbés ainsi que les acides biliaires primaires à 97% par le vaisseau principal amenant tout le sang issu du tube digestif, de la rate et du pancréas, la veine portale, et regagnent le foie.

Dans le foie, les acides biliaires primaires sont de nouveau reconjugués. Il en est de même pour l'acide désoxycholique qui a pour sels biliaires, le glycodésoxycholate et le taurodésoxycholate. L'acide lithocholique n'est pas conjugué à un acide aminé. Il est sulfoconjugué (une sulfotransférase à PAPS (phosphoadénosine phosphosulfate), c'est-à-dire que la fonction alcool en position C3 est estérifiée par un ion sulfate, pour donner le sulfolithocholate). Mais il peut être aussi réoxydé en ursodésoxycholate, acide biliaire tertiaire, rare chez l'homme, plus présent chez des espèces comme l'ours, l'oiseau...

Ces sels biliaires primaires et secondaires sont excrétés de la bile vers l'intestin où les sels sont déconjugués par les bactéries intestinales sauf le sulfolithocholate qui n'est ni déconjugué, ni réabsorbé, donc obligatoirement excrété dans les matières fécales. Les acides biliaires déconjugués sont également excrétés. L'excrétion correspond à 3% des acides biliaires soit environ 600 mg/d. Ces pertes sont compensées par la transformation du cholestérol en acides biliaires primaires par le foie et ceci permet de maintenir une quantité totale constante de 2 à 4 g d'acides biliaires dans l'organisme [14].

Ce mécanisme métabolique constitue le cycle entérohépatique des sels biliaires [15-20], (Figure 1-8). Ce mécanisme a été étudié par Beher *et al.* [21-23]. C'est un processus très efficace, constitué de 6 à 10 recirculations quotidiennes [24] qui permet d'éliminer environ 50% du cholestérol exogène et endogène intestinale et hépatique.

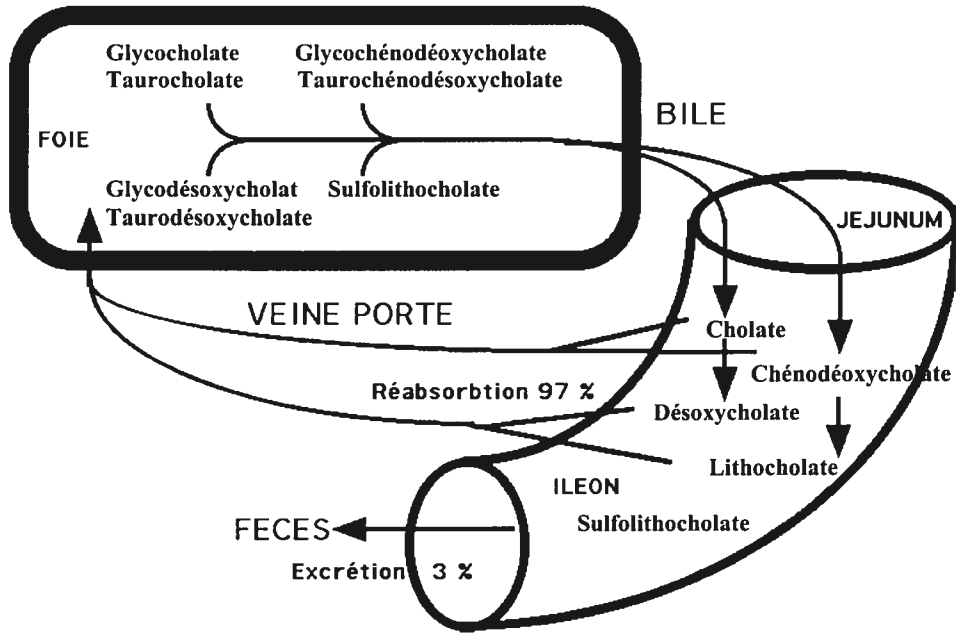


Figure 1-8. Cycle entérohépatique (figure modifiée à partir de la référence [110])

1.2.2 Propriétés amphiphiles des acides biliaires

Les acides biliaires présentent une face apolaire, face concave du squelette stéroïdal, comportant trois radicaux méthyl en position C18, C19 et C21 et une face polaire, face convexe du squelette stéroïdal, comportant des fonctions alcools secondaires en position C3, C7 et C12 (Figure 1-9).

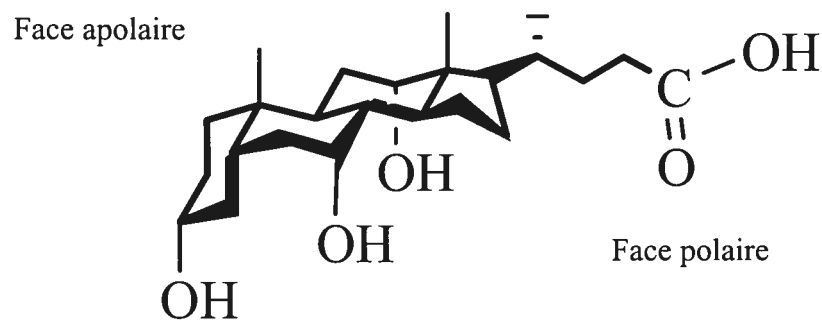


Figure 1-9. Représentation des faces polaire et apolaire des acides et sels biliaires

Cette structure confère aux acides biliaries des propriétés amphiphiles. Ces propriétés interviennent dans les fonctions des acides biliaries.

Dans l'eau, si les conditions sont optimales, les composés amphiphiles vont s'auto-associer pour former des micelles. Ces dernières sont de petits agrégats fortement chargés [3]. Ces micelles d'acides biliaries existent uniquement dans certaines conditions. Il faut être au-delà de la concentration micellaire critique (CMC) et en-dessous de la température micellaire critique (CMT) [25]. Le nombre et la position des groupements hydroxyles sur le squelette stéroïde vont influencer les propriétés des acides biliaries en solution.

1.2.3 Rôles des acides biliaries

Les acides biliaries et leurs sels ont essentiellement des fonctions dans les processus se déroulant au niveau du foie et du petit intestin.

Les acides biliaries, une fois conjugués avec des acides aminés, la glycine et la taurine, deviennent des sels biliaries (Figure 1-10) qui jouent principalement trois rôles dans l'organisme des mammifères.

Les sels biliaries, étant solubles dans l'eau pour un pH supérieur à 6 [1], présentent une solubilité dans des conditions acides telles que celles rencontrées dans le petit intestin supérieur pendant la digestion [26]. Ils permettent le transport de l'eau et de différents électrolytes dans la bile [27], dans le colon et aussi dans les petit et grand intestins [28-29]. Tandis qu'il étudiait les sites de réabsorption des acides biliaries dans l'intestin canin, Tappeiner découvrit dans le lumen, la présence de ces acides biliaries qui semblaient causer une sécrétion d'eau [30]. Depuis les 40 dernières années, de nombreux travaux ont été effectués pour confirmer le rôle des acides biliaries qui influencent les mouvements de l'eau et des électrolytes aussi bien dans les corps sains que malades [28-29].

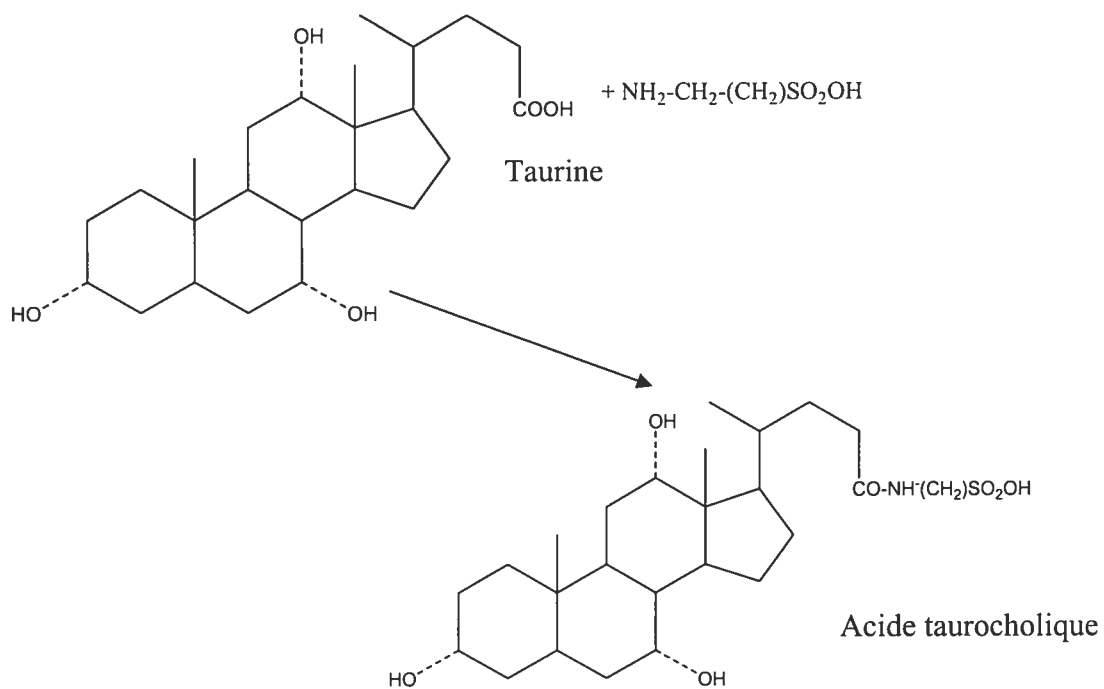
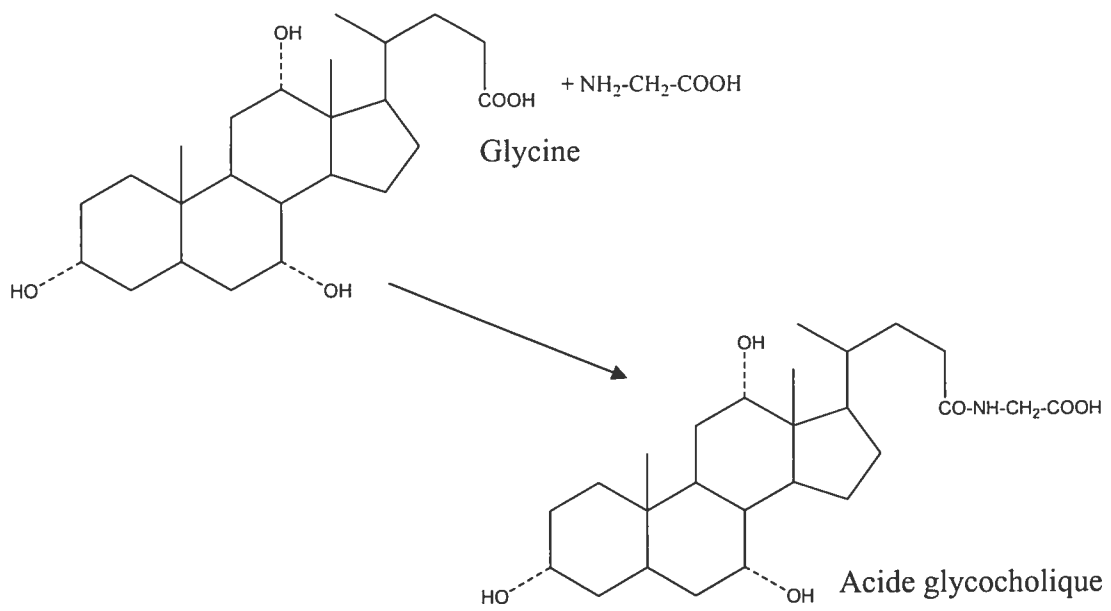


Figure 1-10. Sels biliaries de l'acide cholique

Les sels biliaires jouent le rôle de surfactants. Grâce à leurs propriétés amphiphiles, ils peuvent s'auto-associer dans l'eau. La formation de micelles a donc lieu, ce qui permet la digestion des lipides, ainsi que la solubilisation de la lécithine et du cholestérol. Les sels biliaires forment une micro-émulsion avec les lipides [1, 31]. Par exemple, ils favorisent l'hydrolyse des triglycérides en position 1 et 3 pour obtenir des 2-monoglycérides et acides gras qui sont insolubles durant la lipase pancréatique, enzyme du suc pancréatique. La lipase produit dans un premier temps des diglycérides avant de former les monoglycérides (Figure 1-11).

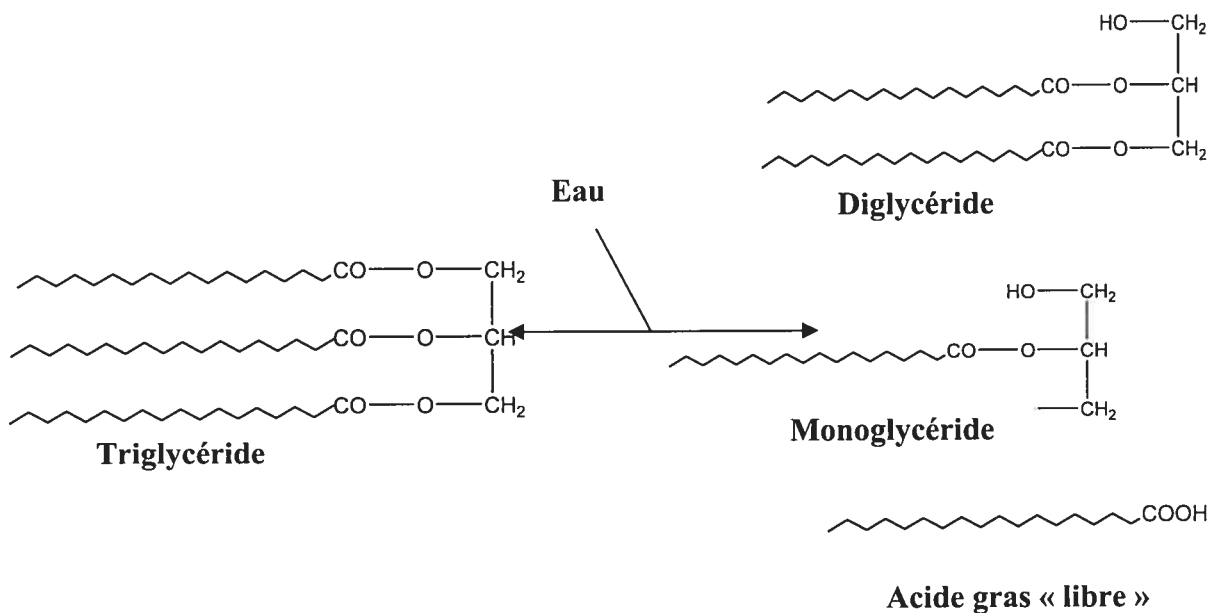


Figure 1-11. Hydrolyse des triglycérides

De plus, les sels biliaires accélèrent la vitesse de l'hydrolyse. Le mécanisme est encore flou, cependant plusieurs propositions ont été faites à ce sujet :

- Les acides biliaires et la lécithine biliaire émulsionnent, ensemble, les triglycérides.
- Les acides biliaires peuvent favoriser l'adsorption de la lipase pancréatique à l'interface huile-eau et peuvent également influencer la conformation de l'enzyme [32].
- Les acides biliaires peuvent former des liens avec les produits lipolytiques formés à l'interface huile-eau et peuvent déplacer la lipase vers une nouvelle interface.

- Les acides biliaires peuvent enlever les produits lipolytiques de l'interface, exposant les molécules de triglycérides intactes.
- Les acides biliaires peuvent disperser les produits lipolytiques sous forme micellaire, augmentant leur diffusion et convection à l'interface des cellules du lumen.
- Les acides biliaires peuvent augmenter l'ionisation des acides gras présents dans les micelles, empêchant la ré-estérification de l'acide gras et ainsi conduisant à une hydrolyse complète des produits lipolytiques.

Pour finir le dernier rôle des acides biliaires est de réguler le niveau sanguin du cholestérol. Deux voies sont possibles. Tout d'abord, le cholestérol permet la biosynthèse des acides biliaires dans le foie [33] et dans le petit intestin [34-36]. Ce mécanisme a été vu dans la formation des acides biliaires. Il permet l'élimination d'environ la moitié de la quantité journalière ingurgitée de cholestérol. La deuxième possibilité est que les acides biliaires permettent aussi de solubiliser la lécithine et le cholestérol [37-40]. En effet entre ces trois composés, il existe un mélange ternaire dont la composition va déterminer la solubilisation de la lécithine et du cholestérol [41-42], (Figure 1-12). Seule une certaine partie de ces compositions permet de maintenir le cholestérol en solution. On reporte sur un diagramme triangulaire avec pour chaque côté la proportion de chaque composé (en bas de droite à gauche, les sels biliaires (0-100%), à droite de haut en bas, la lécithine (0-100%) et à gauche de bas en haut, le cholestérol (0-100%)). Ce diagramme permet d'obtenir toutes les compositions possibles du mélange tertiaire mais seules les compositions se trouvant en bas à gauche du triangle, dans la zone à une seule phase permet de maintenir le cholestérol en solution. Si on sort de cette zone, des risques de calcul vésiculaire apparaissent. Les facteurs les influençant sont une diminution de la concentration des sels biliaires ou une augmentation de la sécrétion du cholestérol.

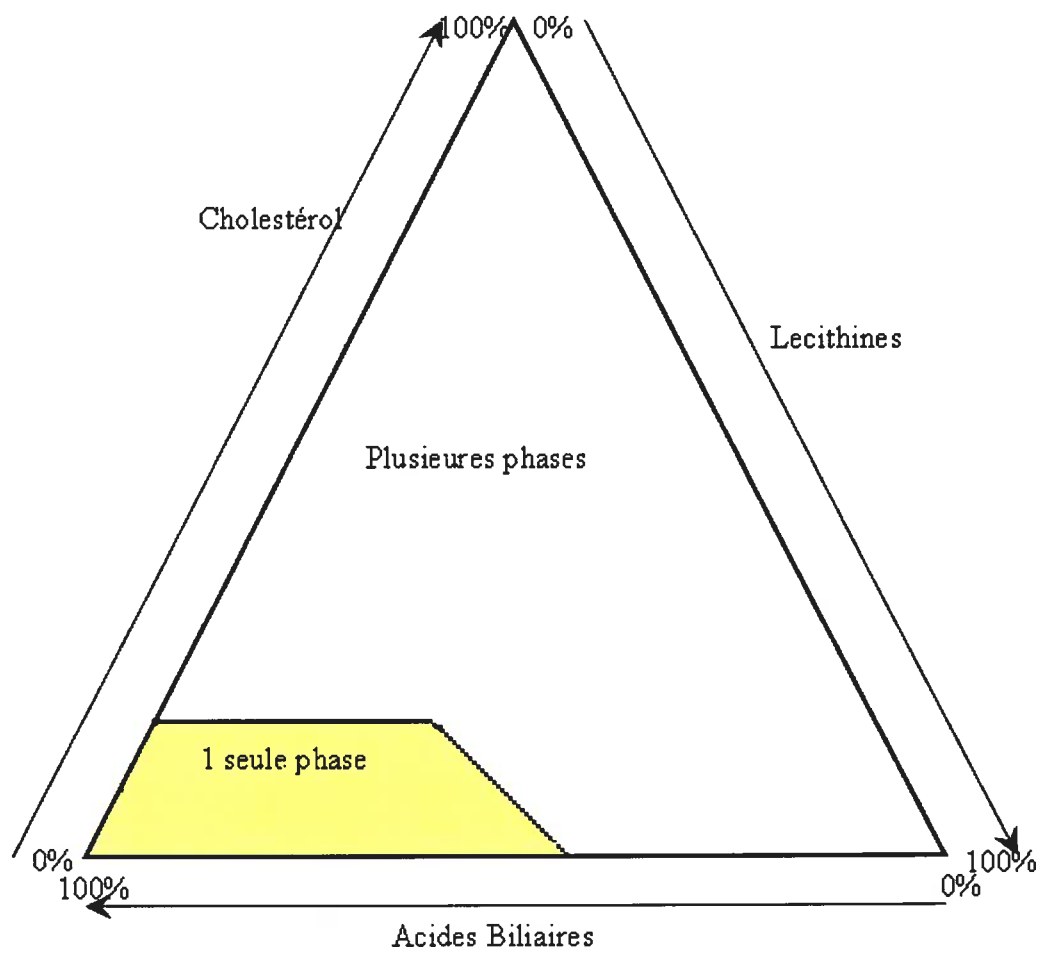


Figure 1-12. Diagramme des compositions possible du mélange ternaire cholestérol-lécithine-sels biliaires

1.3 L'acide lithocholique

L'acide lithocholique (Figure 1-13), 3 α -Hydroxy-5 β -cholan-24-oïque acide, est un acide biliaire secondaire. Il ne présente qu'un groupement hydroxyle en position C3.

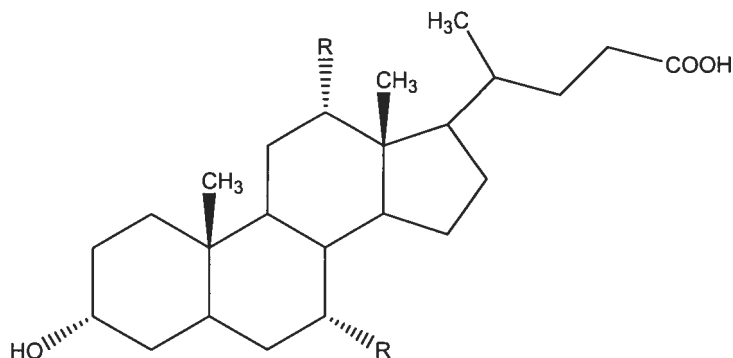


Figure 1-13. Structure chimique de l'acide lithocholique

Il a été isolé pour la première fois à partir d'un calcul biliaire par Fisher en 1911. Il ne fut isolé de la bile de mammifères comme celle du lapin (0.4 g pour 900 ml), du singe et de l'homme que plus tardivement.

Il est important de noter que cet acide biliaire est relativement peu soluble dans l'eau et peut être la cause de maladies du foie. En effet il peut présenter une certaine toxicité au niveau des cellules [43-46].

1.4 Les biomatériaux

Une des définitions des biomatériaux est que ces derniers sont « *des matériaux non vivants utilisés et conçus pour interagir avec des systèmes biologiques* » [47]. Ils sont créés dans le but de remplacer une fonction ou une partie d'organe du corps humain.

Même si le commencement des essais de remplacement d'organes entiers ou non, par des substituts remonte aux Egyptiens, il faudra attendre les années 50 pour que ce domaine se développe. En effet, avant cette date, la connaissance des propriétés biologiques des biomatériaux était très vague et seules leurs propriétés physiques importaient. De nos jours, les propriétés biologiques sont très importantes dans les

critères d'acceptation de biomatériaux. Ils doivent présenter une bonne biotolérance, biocomptabilité et biofonctionnalité. De nombreux groupes de recherche travaillent désormais activement sur ce sujet.

De nos jours, les biomatériaux sont utilisés dans différents domaines : dentaires, ophtalmologiques, articulaires, viscérales, orthopédiques.... (Tableau 1-1)

La nature de ces biomatériaux est variable. Ils peuvent être composés de

- métaux et alliages métalliques,
- polymères,
- matières d'origine naturelle,
- céramique.

Tableau 1-1. Différents types de biomatériaux et leurs applications

Biomatériaux	Domaine d'application
Aciers inoxydables	Plaques et vis d'ostéosynthèse, agrafes diverses
Polytétrafluoroéthylène	Implants vasculaires, chirurgie faciale
Silicone	Urologie, implants mammaires, valves cardiaques
Polyéthylène	Sutures, implants vasculaires, supports de médicaments implantables
Polyester	Sutures, implants vasculaires
Acides polylactiques et polyglycoliques	Sutures, implants biodégradables, supports de médicaments implantables
Collagène	Remplacements tissulaires, cornés, sutures
Corail	Substituts osseux
Alumine	Prothèses articulaires
Phosphates de calcium	Implants orthopédiques, ciment, supports de médicaments implantables

Ces biomatériaux peuvent être résorbables, donc biodégradables, ou non. Pour dire que des matériaux sont biodégradables, ils doivent se dégrader durant leur application ou juste après celle-ci. Les matériaux non dégradables sont ceux qui ont besoin d'un temps de dégradation beaucoup plus long que la durée de leur application.

1.5 Les polymères biodégradables

1.5.1 Définition de la biodégradabilité

La définition de la biodégradabilité, de façon large, peut être la suivante : dans le contexte de la médecine, « *biodegradation means disintegration, erosion, dissolution, breakdown and/or chain scission of polymers into metabolizable or excretable fragments in the human body, in animal models, in ex vivo or in vitro test media, which represent, mimic or approximate the body environment* » [48].

1.5.2 L'utilisation des polymères biodégradables

Depuis plusieurs années, une vague d'intérêt pour la synthèse de polymères biodégradables s'est développée. C'est au cours des années soixante que les premières applications de ces polymères prirent naissance.

Amenant une réponse écologique pour remplacer les plastiques non-biodégradables, ces polymères biodégradables ont aussi une grande importance pour les domaines biomédical et pharmaceutique. En effet leur utilisation pour des durées plus ou moins longues peut toucher des domaines comme les systèmes permettant un remplacement provisoire de tissus du corps humain abîmés, en attendant que la croissance de cellules s'effectue [49-51], la confection de différents types de tissus synthétiques [52-54], les systèmes à libération contrôlée de principes actifs [55-57].

1.5.3 La nature des polymères biodégradables

Les polymères biodégradables ont une origine naturelle ou synthétique. Les polymères synthétiques offrent une grande diversité de propriétés du fait de leur différence de composition et de structure [58], (Figure 1-14).

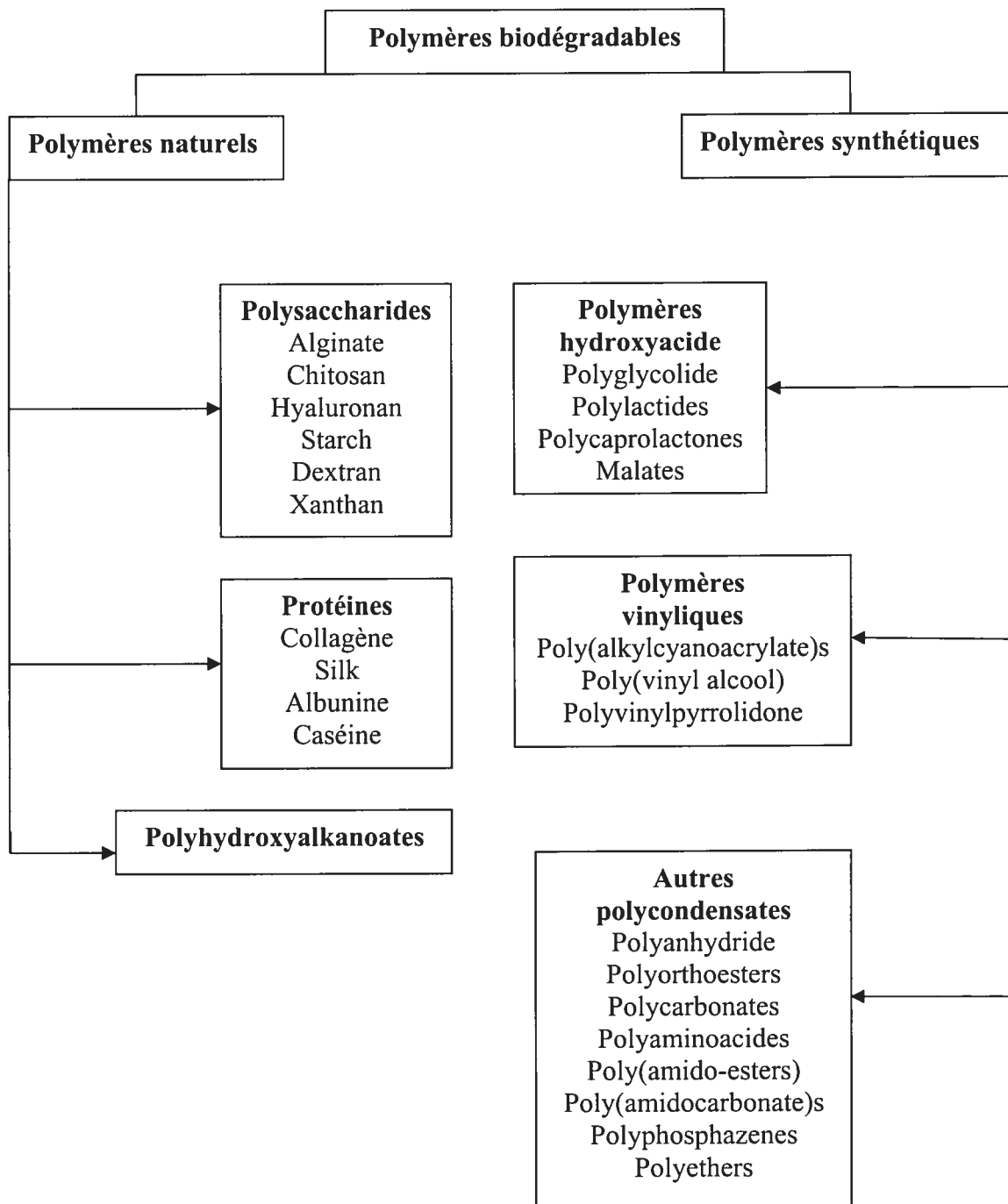


Figure 1-14. Différents polymères biodégradables

1.5.4 La dégradation des polymères biodégradables

Les polymères biodégradables présentent l'avantage de ne pas nécessiter d'opération pour enlever l'implant [59]. De plus, les paramètres de dégradation peuvent être contrôlés précisément par les choix de structures des matériaux.

Deux voies peuvent mener à la dégradation des polymères :

- L'hydrolyse des liaisons chimiques. La majorité des polymères synthétiques sont dégradés selon ce processus.
- L'action enzymatique. Cette voie est possible la plupart du temps pour les polymères naturels dont les enzymes sont disponibles comme par exemple les polysaccharides [60-61] ou le collagène (une protéine) [62].

La dégradation correspond à la formation de polymères de plus faibles poids moléculaires, due à une coupure des liaisons chimiques. Après un nombre de scissions suffisant, les chaînes sont réduites à l'état de monomères ou de petits oligomères solubles, et pouvant donc être évacués, ce qui entraîne une perte de poids du matériau [63]. Ce phénomène est l'érosion des oligomères. Tout au long de la dégradation des polymères, leurs propriétés physiques et chimiques vont changer, comme la cristallinité, la masse molaire, le pH, les propriétés mécaniques.

La dégradation du polymère dépend de plusieurs facteurs :

- La réactivité des liaisons chimiques par rapport à une hydrolyse ou une oxydation peut être classée de la façon suivante du fait des différentes natures des liaisons, de l'encombrement stérique et de la stabilité des molécules:

Polyanhydride> Poly(méthylcyanoacrylate)> Polyorthoesters> Poly-2-Hydroxyacides> Polycarbonates> Autres polyesters> Poly(butylcyanoacrylate)> Polyurethanes> Polysaccharides> Protéines> Polyamides> Polyéthers aliphatiques> Polyméthacrylates> Polydiène>> Polyéthylène [64].

- Le caractère hydrophobe-hydrophile [65-66]

L'utilisation de monomères plus ou moins hydrophiles, joue également sur le temps de dégradation [67-69]. En effet en utilisant l'hydrophobicité des monomères, le polymère obtenu présente une meilleure stabilité et l'eau pénètre moins facilement dans la matrice, ce qui ralentit la dégradation.

Par exemple, les propriétés des polyanhydrides ont été modifiées par incorporation de longues chaînes terminales d'acides gras comme l'acide stérique dans le polymère. Ce changement provoque une augmentation de l'hydrophobicité et diminue la vitesse de dégradation [70].

- La cristallinité des polymères

Le degré de cristallinité des polymères intervient sur leur dégradation en ralentissant la diffusion de l'eau au sein de la matrice. La cristallinité dépend de la composition des polymères. Le degré de cristallinité diminue dans le cas de polymères alternés, de façon aléatoires, par exemple [71-72].

- La composition des copolymères

Les polyanhydrides aliphatiques se dégradent très rapidement, en quelques jours alors que les polyanhydrides aromatiques se dégradent plus lentement, voir en plusieurs années. La combinaison de ces deux types de monomères permet d'obtenir une gamme de temps de dégradations très large [73]. Les polymères aliphatiques sont rigides, cristallins et leur point de fusion augmente avec la longueur de la chaîne du monomère. Les polymères aromatiques ont un point de fusion souvent plus élevé, comme par exemple le poly[bis(carboxyphenoxy)propane] (P(CPP)) qui fond à 240°C et se dégrade extrêmement lentement [74].

- Le poids moléculaire

De façon générale, plus le polymère a un faible poids moléculaire, plus vite se fera la dégradation.

- Le pH

Le pH influence la dégradation. Pour les polyanhydrides, plus le pH est élevé (milieu basique), plus la dégradation sera rapide. Par exemple, la dégradation du P(CPP) est d'environ 3 ans à pH.7,4 et moins de 100 jours à pH.10,0 [73].

- La présence d'une substance.

L'ajout d'un composé, tel un médicament ou une protéine, peut accélérer la dégradation de la matrice des polymères biodégradables. Sandor et al ont remarqué, par exemple, qu'en ajoutant 2% de bovine serum albumin aux copolymères (FA/SA, 20/80), la dégradation était accélérée [75-76].

- La géométrie de l'implant

Un grand intérêt a été porté sur l'effet de la géométrie de l'implant sur la dégradation du polymère. Ces recherches multiples ont pour but d'apporter un meilleur contrôle du relargage des médicaments. Hopfenberg a orienté ses recherches sur des systèmes à géométrie définie. Il a montré qu'une équation générale permet de déterminer la quantité libérée d'une sonde par le système en fonction du temps. Cette équation s'applique pour des systèmes de géométries différentes (sphère, cylindre, cône) avec une dégradation hétérogène [77].

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left(1 - \frac{k_0 t}{c_0 a}\right)^n \quad \text{Equation (1)}$$

Avec :

M_t et M_∞ : quantités de sonde libérée au temps t et au temps infini, lors de la dégradation complète

c_0 : concentration initiale de la sonde (mg.cm^{-3})

a : rayon du cylindre ou de la sphère ou de la demi-largeur du cône (cm)

n : facteur de taille, 3 pour les sphères, 2 pour les cylindres et 1 pour les cônes

k_0 : vitesse de dégradation du polymère ($\text{mg.cm}^{-2}.\text{d}^{-1}$ avec d :diam)

La dégradation peut être de deux types : homogène et hétérogène [78-79], (Figure 1-15). Cette façon de classer les polymères suivant leur type de dégradation remonte au début des années 1980 [63]. La dégradation homogène est une érosion qui se passe aussi bien à la surface du polymère qu'à l'intérieur de ce dernier. Ce phénomène est dû au fait que la diffusion de l'eau au sein de l'échantillon est plus rapide que la dégradation du polymère. La vitesse de perte de masse est non-linéaire et présente des discontinuités [80]. La dégradation hétérogène est limitée à une dégradation de surface. Ce phénomène s'explique par le fait que la vitesse de la pénétration de l'eau dans la matrice du polymère est plus lente que celle de la dégradation. Dans le cas idéal, la vitesse de perte de poids de la matrice est linéaire. La matrice devient de plus en plus

petite mais elle garde sa forme d'origine. Pour présenter ce type de dégradation, un polymère doit posséder un caractère hydrophobe pour limiter la diffusion des molécules

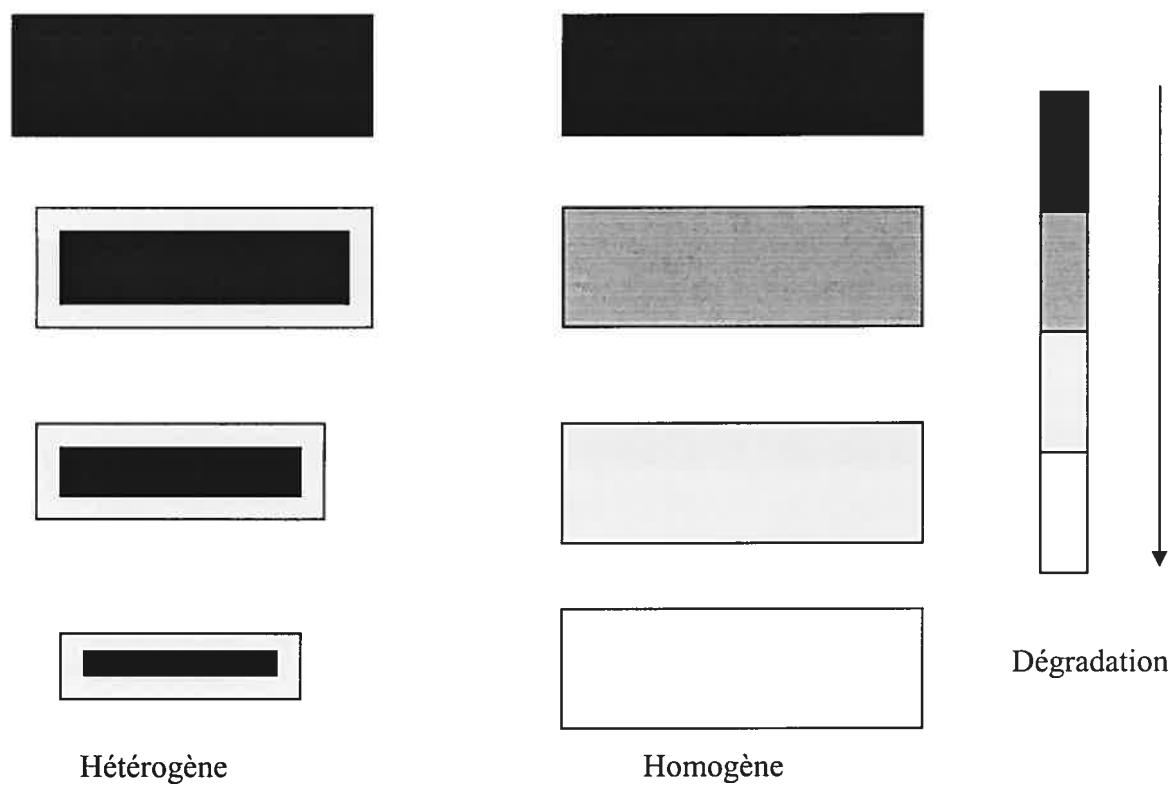


Figure 1-15. Dégradations hétérogène et homogène (figure modifiée à partir de la référence [79])

d'eau, mais des liaisons facilement hydrolysables entre ses monomères. De plus, les produits de dégradation doivent être relativement solubles pour faciliter l'érosion. Le grand avantage de cette dégradation est de permettre la prédiction du processus, et de sa vitesse. Ceci permet par exemple, dans le cas d'utilisation de polymères biodégradables pour des implants à libération de principes actifs, de corréler directement le taux de principes actifs libérés par rapport à la vitesse de dégradation [81]. Les meilleurs exemples de polymères présentant ce type de dégradation sont les polyanhydrides et les poly(orthoesters) [82]. Hopfenberg a proposé une équation décrivant la dégradation hétérogène pour des systèmes solides [77] :

$$M_t = k_0 St \quad \text{Equation (2)}$$

Avec :

M_t : masse du polymère dégradée au temps t (mg)

k_0 : vitesse de dégradation ($\text{mg.cm}^{-2}.\text{d}^{-1}$)

S : surface de l'échantillon (cm^2)

t : temps (d)

1.6 Les implants de polymères à libération contrôlée

Le domaine du relargage contrôlé est l'un des plus prolifiques dans le champ de l'ingénierie biomédicale. L'utilisation d'implants de polymères à libération contrôlée de principes actifs présente de nombreux avantages comparée à l'utilisation d'une administration classique [83]. Ceux-ci sont regroupés dans le Tableau 1-2.

L'implant polymérique à libération contrôlée de principes actifs, pour répondre à ces critères, doit présenter un squelette hydrophobe, être stable, flexible, avoir un point de fusion bas et doit se dégrader linéairement avec le temps en milieu aqueux [85]. L'utilisation de cet implant permet la dégradation du polymère en même temps que la libération des principes actifs. La diffusion des molécules d'eau dans le réseau entraîne la dégradation du polymère. Les produits de cette dégradation, les monomères sont relativement solubles, ce qui entraîne la libération des principes actifs qui ne sont plus piégés dans l'implant. Plus la diffusion de l'eau dans l'implant est lente, plus la dégradation du polymère est lente donc plus la libération des principes actifs est lente.

Le mécanisme de libération des principes actifs est la diffusion de ces derniers à travers la matrice du polymère. Ce qui évite une nouvelle opération au patient [86]. Les polyanhydrides présentent typiquement une bonne combinaison de ces différents critères.

Tableau 1-2. Comparaison d'un relargage contrôlé et d'une administration classique

Relargage contrôlé	Administration classique
<ul style="list-style-type: none"> • Concentration des principes actifs dans une région localisée, l'organe malade. <p>⇒ Principes actifs provoquent moins d'effets secondaires.</p> <ul style="list-style-type: none"> • La pharmacocinétique des principes actifs est plus homogène entre tous les patients. <p>⇒ Réduction de la variabilité de l'efficacité des principes actifs selon les patients.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Libération contrôlée des principes actifs sur une large gamme de temps (de quelques jours à quelques années). <p>⇒ Concentration constante des principes actifs, effets thérapeutiques constants.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Principes actifs non localisés. • Répartition uniforme dans tout le corps. <p>⇒ Organes sains peuvent être atteints. Effets secondaires.</p> <ul style="list-style-type: none"> • La pharmacocinétique des principes actifs est inégale d'un patient à l'autre. <p>⇒ Différences d'efficacité des principes actifs selon les patients.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Injection du médicament à un temps donné. <p>⇒ A l'injection : augmentation de la concentration des principes actifs . Effets néfastes de cette concentration trop élevée.</p> <p>⇒ Diminution progressive de la concentration des principes actifs : effets non-thérapeutiques à ces concentrations trop faibles.</p> <p>⇒ Profil de l'administration en dent de scie, [84].</p>

1.7 Les polyanhydrides

1.7.1 Historique

La première synthèse de polyanhydrides remonte à 1909. Bucher et Slade synthétisèrent des polyanhydrides aromatiques composés d'acide isophtalique et d'acide téréphtalique [87]. Dans les années 30, Hill et Carothers en synthétisèrent de nouveaux à partir de diacides aliphatiques [88-89]. Conix [90] et Yoda [91-92], dans les années 50 et 60, synthétisèrent plus de 100 nouveaux polyanhydrides à partir de diacides aromatiques et hétérocycliques. Toutes ces explorations avaient pour but d'utiliser les polyanhydrides dans le milieu du textile afin de remplacer les polyesters. Mais, à cause de leur instabilité hydrolytique, leur utilisation dans ce domaine fut un échec. Langer proposa en 1980 d'utiliser cette sensibilité hydrolytique des polyanhydrides à des fins biomédicales et plus exactement comme polymères à libération contrôlée de principes actifs [93]. Depuis ces 20 dernières années, la recherche sur les polyanhydrides s'est accrue considérablement, de nombreuses publications, brevets et livres ont été publiés à ce sujet [94-105]. Ce type de polymères est l'un des plus étudiés.

1.7.2 Structure générale des polyanhydrides

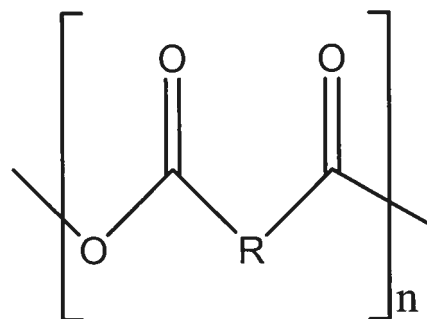


Figure1-16. Structure chimique générale des polyanhydrides (exemple $\text{R} = (\text{CH}_2)_n$)

Les polyanhydrides possèdent un groupement fonctionnel très réactif (Figure 1-16). La liaison anhydride est très facilement hydrolysable et son hydrolyse entraîne la formation de diacides carboxyliques [94].

1.7.3 Synthèse des polyanhydrides

Diverses routes de synthèse de polyanhydrides existent.

- Polycondensations à l'état fondu [67], (Figure 1-17)

La plupart des polyanhydrides sont synthétisés selon cette voie. Il s'agit d'une auto-polycondensation, du fait que ce sont deux mêmes fonctions qui vont réagir ensemble. Une première étape intervient lors de cette synthèse. Il faut au préalable former des prépolymères, dans ce cas-ci des dianhydrides provenant de la réaction de diacides en présence d'un excès d'anhydride acétique. Cette étape est très simple à mettre en place, il suffit de porter à reflux le diacide dans l'anhydride acétique pendant quelques heures. Ces prépolymères avec un degré de polymérisation entre 1 et 20, sont ensuite chauffés sous azote et lorsque tous les prépolymères sont à l'état fondu, le montage est mis sous vide [91]. Les polymères obtenus ont un degré de polymérisation compris entre 100 et 1000 et ils présentent une structure tendant vers des copolymères blocs. Le poids moléculaire des polymères obtenus par cette synthèse peut être affecté par différents facteurs comme la pureté des monomères, le temps de réaction, la température de la réaction et la présence d'anhydride acétique [67].

- Polycondensations en solution (Figure 1-18)

Cette route de synthèse est aussi connue comme la Schotten-Baumann technique. Elle est surtout employée pour la synthèse de polyamide, polyester et polycarbonate. Cette réaction demande la mise en solution du diacide dans un solvant ou un mélange de solvants de type dichlorométhane (DCM), benzène, chloroforme ou autres. Cette solution est mélangée avec un accepteur d'acide comme la triéthylamine, ce qui favorisera la réaction. A ce mélange, est ajouté très lentement goutte à goutte le dichlorure. Dès l'ajout du dichlorure, la polymérisation commence et la cinétique de la polycondensation est très rapide, la réaction est achevée en moins d'une heure. Cette polycondensation présente des limites pour la synthèse de polyanhydrides, souvent des masses molaires faibles sont obtenus. Elle requière une très grande pureté des produits. De plus, comme le groupement carboxylique est moins réactif que les groupements

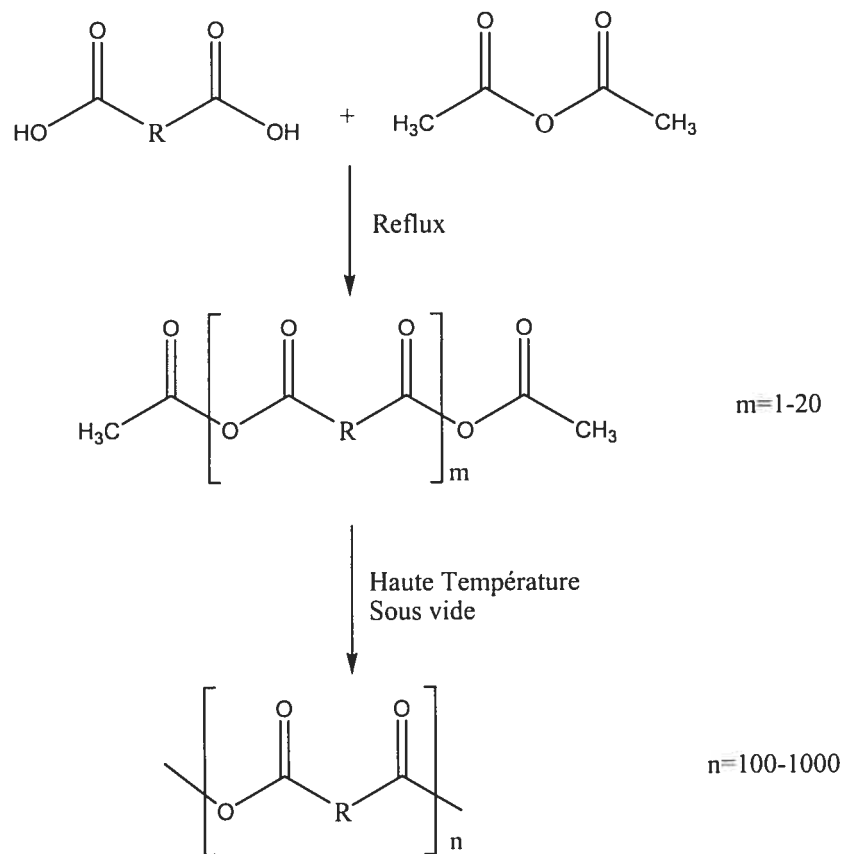


Figure 1-17. Polycondensation à l'état fondu de polyanhydrides [67]

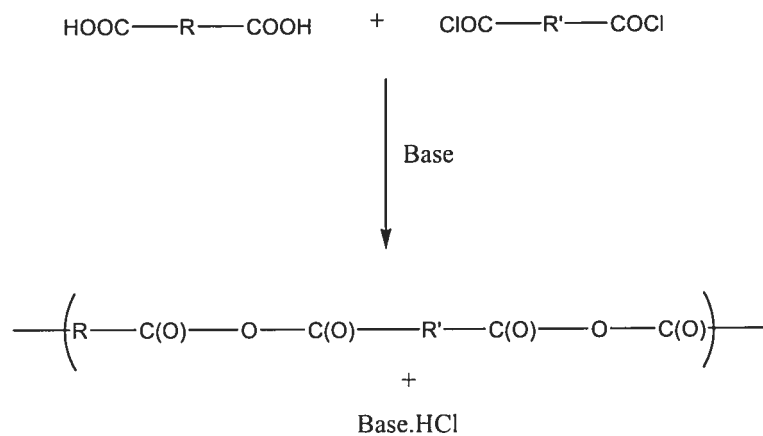


Figure 1-18. Polycondensation en solution de polyanhydrides

amine et mercaptane, la réaction est moins efficace. On peut aussi noter que des phénomènes de dépolymérisation due à la cinétique intrinsèque de polycondensation sont d'autres facteurs limitants pour cette technique.

- Polymérisation avec ouverture du cycle

Cette synthèse se déroule en deux étapes. Dans un premier temps, il faut préparer le monomère cyclique puis la seconde étape consiste à polymériser ce monomère.

1.7.4 Biocompatibilité

De nombreuses études ont été réalisées sur la biocompatibilité des polyanhydrides. Elles portaient sur différents polyanhydrides et ont montré qu'ils étaient non toxiques, non-inflammatoires et non mutagènes [95-98]. En 1986, la Food and Drug Administration (FDA) a approuvé de nombreux membres pour cette famille. Ce sont les seuls polymères biodégradables à libération contrôlée de principes actifs avec une dégradation hétérogène du réseau reconnue.

1.7.5 Caractérisations des polyanhydrides

L'analyse de la composition des polyanhydrides peut se faire par ^1H -RMN. Cette technique permet dans certains cas d'obtenir le degré des blocs, la longueur moyenne des blocs (L_n), la fréquence des séquences. La ^{13}C -RMN permet de suivre la dégradation des polyanhydrides.

La spectroscopie infra-rouge permet d'obtenir les liaisons anhydrides et la dégradation des polyanhydrides en comparant l'intensité des pics correspondant aux liaisons anhydrides à celle des acides formés (Tableau1-3).

Tableau 1-3. Absorbance des pics correspondant aux liaisons anhydrides et celles des acides carboxyliques

Type	Polyanhydride Aliphatique (cm ⁻¹)	Polyanhydride Aromatique (cm ⁻¹)	Polyanhydrides aliphatique et aromatique (cm ⁻¹)	Groupe acide carboxylique (cm ⁻¹)
Absorbance	1740 et 1810	1720 et 1780	1810, 1780 et 1720-40	1700

La chromatographie d'exclusion stérique (CES) permet d'obtenir une approximation des masses molaires moyennes en nombre (M_n) et en poids (M_w) des polyanhydrides. Une courbe de calibration est faite à partir de polystyrènes.

La température de fusion (T_f), la température de cristallinité (T_c) et la température de transition vitreuse (T_g) des polyanhydrides sont déterminées par calorimétrie différentielle à balayage (DSC).

1.7.6 Applications

La plus importante application des polyanhydrides est comme implants biodégradables à libération contrôlée de principes actifs. Langer, Rosen *et al.* ont été les premiers à les utiliser en 1983 pour cette application [93].

Deux exemples ayant eu un grand impact sont:

- GliadelTM, implant biodégradable contenant de la carmustine (Figure 1-19.b) qui sert pour le traitement des tumeurs au cerveau. Cet implant est un copolymère bloc de 1,3-(biscarboxyphenoxy)propane (CPP) et d'acide sébacique (SA) avec pour ratio 20/80 (Figure 1-19.a) [100]. L'implant est introduit chirurgicalement, ce qui permet une chimiothérapie locale agissant directement sur le site de la tumeur. Les produits de la dégradation du polyanhydride sont non toxiques. De plus, le processus hétérogène (érosion de surface) permet de réguler la libération de la substance active à un taux connu [79, 101].

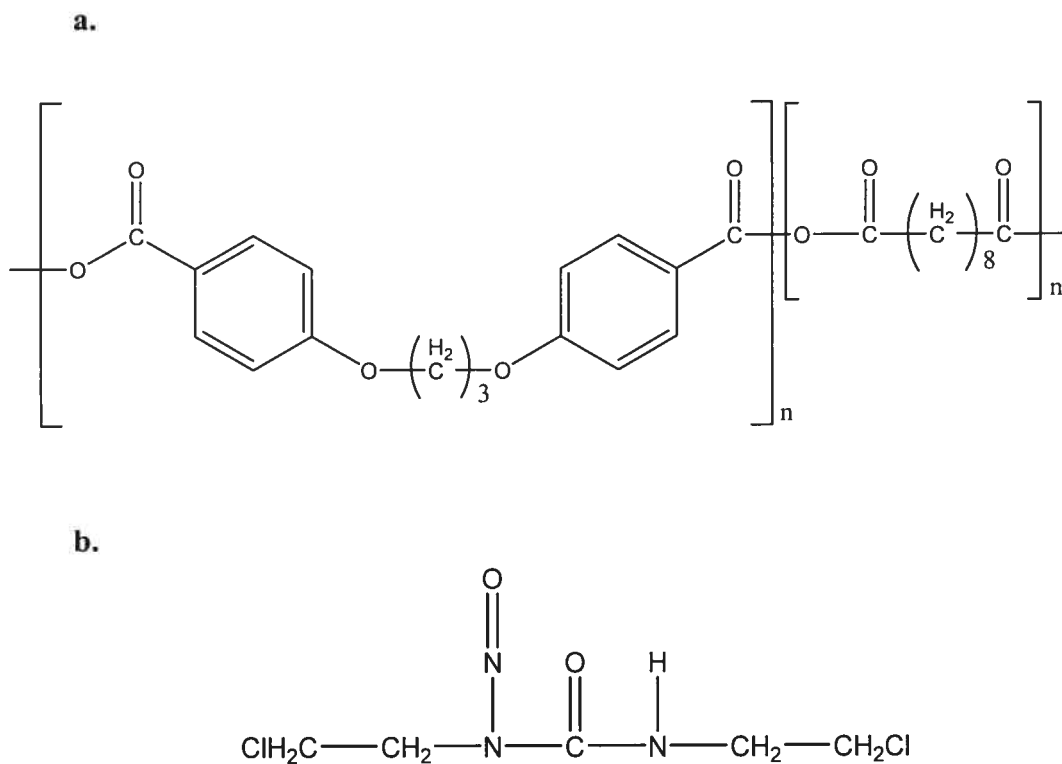
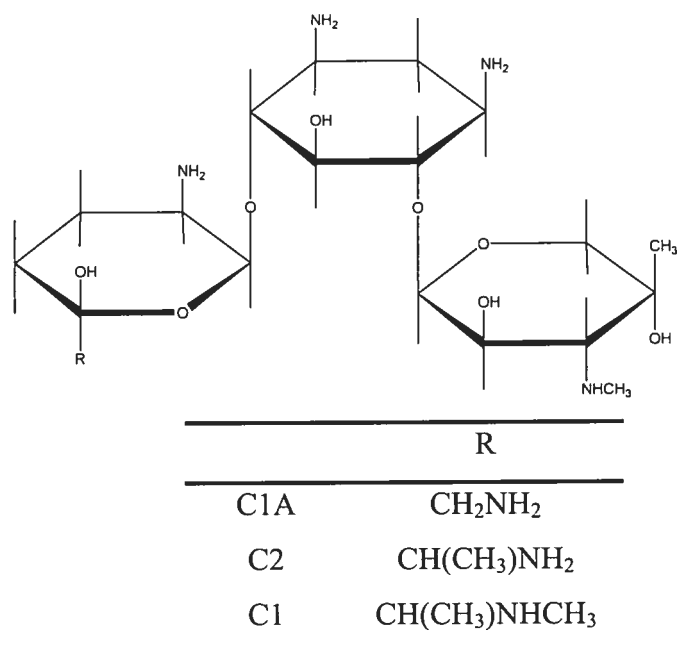


Figure 1-19. Structure chimique de P(CPP-SA) (a) et de la carmustine (b)

- SeptacinTM, implant biodégradable contenant de la gentamicine (Figure 1-20.a) qui sert pour les traitements des infections chroniques des os [102]. La gentamicine commercialisée est un mélange de 3 gentamicines : gentamicines C1, C1A, C2 avec pour ratio 30/30/40 [103]. Cet implant est un copolymère bloc de dimère d'acide érucique et d'acide sébacique. L'acide érucique (Figure 1-20.b) est un acide gras mono-insaturé à 22 carbones. Dans le copolymère, l'acide sébacique est le composé le plus hydrophile et l'acide érucique est le composé le plus hydrophobe. Plusieurs publications montrent les résultats positifs de la libération de la gentamicine par la matrice polyanhydride sur les infections osseuses chez les animaux [104-105].

a.



b.

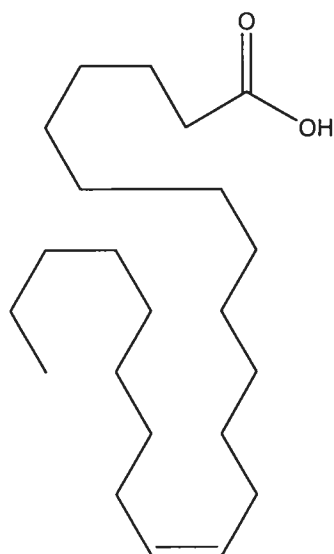


Figure 1-20. Structure chimique de la gentamicine (a) et de l'acide érucique (b)

Ces polyanhydrides à libération contrôlée de principes actifs sont utilisés pour différentes maladies (Tableau 1-4).

Tableau 1-4. Exemples de maladies employant des polyanhydrides à libération contrôlée de principes actifs

Maladie	Polymère	Système de libération	Principe actif
Cancer	Copolymère à base d'acide ricinoléique [106]	Matrice	Methotrexate
Maladie d'alzheimer	Copolymère d'acide sébacique [107]	Microsphères	Bétanechol
Infection locale	P(FAD-SA) [108]	Implant	Cefazolin sodium

1.8 Projet de recherche

Le but du projet est de synthétiser et caractériser des polyanhydrides à partir d'acides biliaries. Le projet est dans la continuité de la thèse de Sébastien Gouin [109], et constitue le point de départ du projet. Dans un premier temps, un dimère d'acide biliaire est synthétisé en additionnant deux acides biliaries en position C3 par un dichlorure d'acide ayant une chaîne alkyle comportant 8 carbones. L'acide biliaire utilisé est l'acide lithocholique, celui-ci permet d'obtenir des meilleurs rendements du fait qu'il porte seulement un groupement hydroxyle en position C3. Un grand intérêt est porté sur la purification du dimère de l'acide lithocholique. Des étapes de purification sont ajoutées.

Dans un deuxième temps, la synthèse des polymères a lieu. Afin d'élargir la recherche effectuée par Sébastien Gouin, la méthode utilisée pour synthétiser les

dimères d'acide lithocholique est la polycondensation en solution, peu utilisée pour la synthèse des polyanhydrides du fait qu'elle donne souvent de faibles masses molaires et qu'il est important de travailler avec des produits d'une grande pureté. Différents copolymères sont synthétisés avec différentes compositions d'acide sébacique et de dimère d'acide lithocholique. Les propriétés physicochimiques comme la masse molaire, la T_g , la T_f , la T_c , la composition, la vitesse de dégradation, la vitesse de relargage des polymères obtenus par polycondensation en solution soit des copolymères alternés ou statistiques sont comparées avec celles des polymères obtenus par polycondensation fondue soit des copolymères blocs.

De plus, l'influence du poids moléculaire et celle de la composition des copolymères sont étudiées. Plusieurs copolymères sont synthétisés pour cette étude : des polymères d'acide sébacique et des copolymères d'acide sébacique et d'acide lithocholique.

Enfin, une comparaison entre les copolymères obtenus à partir des acides biliaries : acide cholique, acide déoxycholique, acide chénodéoxycholique et acide lithocholique, et de l'acide sébacique est réalisée.

2 Partie expérimentale

2.1 Produits et instruments

La triéthylamine, l'acide sébacique (5), l'acide acétique, l'hydroxyde de lithium (LiOH), le méthanol, l'acétate d'éthyle, l'éther de pétrole, le toluène et l'hexane sont achetés chez Aldrich. Ils sont utilisés tels quels sauf la triéthylamine qui est distillée sous azote et l'acide acétique qui est recristallisé. Les acides biliaires sont recristallisés avant leur utilisation : l'acide cholique (7), l'acide chénodéoxycholique (6), l'acide déoxycholique (8) et l'acide lithocholique (1), le tampon phosphate à pH 7,4 sont achetés chez SIGMA. L'acide chlorhydrique, HCl, concentré est acheté chez EMD. Le chlorure de thionyle, SOCl₂, est acheté chez Fluka. Le chlorure de sébacoyl est synthétisé à partir de l'acide sébacique et du chlorure de thionyle, puis purifié par distillation sous vide. Le dichlorométhane (DCM) et le tétrahydrofurane (THF) sont séchés au moyen d'un appareil de séchage de solvants (GlassContour). La p-nitroaniline, la sonde, est achetée chez Kodak et est utilisée telle quelle.

Les spectres RMN sont enregistrés à partir d'un spectromètre RMN Bruker Avance 400 opérant à 400,13 MHz et à 22°C. Le solvant utilisé pour la RMN est le chloroforme deutéré dont le signal sort à 7,26 ppm dans la région des protons. Les points de fusion sont réalisés sur un appareil à point de fusion SMP10 (Barloworld-scientific). La chromatographie sur couche mince sert à vérifier la pureté des produits ainsi que le suivi des réactions. Des plaques d'aluminium recouvertes de gel de silices (60 mesh) (EMD Chemicals Inc.) sont utilisées avec un mélange d'éluants contenant l'acétate d'éthyle et l'éther de pétrole. La chromatographie sur colonne sert à purifier les produits obtenus. Elle est réalisée sur du gel de silice (60-100 mesh) (EMD Chemicals Inc.) avec un mélange d'éluants contenant l'acétate d'éthyle et l'éther de pétrole. L'analyse thermogravimétrique, ATG, (2950, TAINstruments) permet de vérifier si les produits sont bien secs avant leur utilisation et de déterminer leur température de décomposition. La vitesse de chauffe est de 5°C/min. La détermination des masses molaires moyennes M_n et M_w ainsi que la polydispersité s'est faite grâce à la chromatographie d'exclusion stérique (CES) par rapport à des étalons de polystyrènes. L'éluant utilisé est le THF. Les analyses sont effectuées à 33°C dans un système constitué d'une pompe (Waters 1525)

fournissant un débit de 1 ml/min, de 3 colonnes (Waters, Styragel HR3, 7,8*300 mm, Part No. WAT044222, gamme de poids allant de 500 à 30 000 g/mol, Styragel HR4, 7,8*300 mm, Part No. WAT044225, gamme de poids allant de 5 000 à 600 000 g/mol, Styragel HR6, 7,8*300 mm, Part No. WAT054468, gamme de poids allant de 200 000 à 6 000 000 g/mol) et d'un détecteur d'indice de réfraction (Waters 2410). La courbe de calibration est faite à partir d'échantillons de polystyrène comprenant la gamme de poids de 1 280 à 3 150 000 g/mol. Le calorimètre différentiel à balayage, DSC (2910, TAinstruments) permet de déterminer les températures de transitions des polymères comme la température de transition vitreuse (T_g), la température de fusion (T_f) et la température de cristallisation (T_c). La méthode est un cycle de chauffe d'une vitesse de 5°C/min avec un cycle de refroidissement d'une vitesse de 5°C/min. Le spectromètre UV-Visible (Cary 300, Varian) sert à déterminer la concentration de la p-nitroaniline relarguée dans le milieu de dégradation en enregistrant son absorption UV-Visible à 405 nm. Pour déterminer celle de l'acide sébacique relargué lors de la même étude, une HPLC est utilisée. Le mélange d'éluants utilisé est acétonitrile/eau (70/30) à pH=3, celui-ci étant ajusté avec l'acide phosphorique. Les analyses sont effectuées à 33°C dans un système Waters constitué d'une pompe (Waters 1525) fournissant un débit de 1 ml/min, de 2 colonnes (Waters, Symmetry C18,5 μ m, 4,6*150 mm, Part No. WAT045905) d'un détecteur d'indice de réfraction (Waters 2414). L'infrarouge (Excalibur HE Series, Varian) permet de suivre la dégradation des polymères solubilisés dans le DCM et étalés sur des pastilles de chlorure de sodium.

2.2 Synthèses

2.2.1 Synthèse du 3 α -dimère de l'acide lithocholique (4) (Figure 2-1)

Cette synthèse s'est effectuée en trois étapes.

La première étape est la synthèse de l'ester de méthyle de l'acide lithocholique (2). Dans le méthanol (125 ml), le composé **1** (25 g, 66,39 μ moles) est acidifié avec HCl concentré (1 ml). Le mélange, sous forte agitation, est amené à ébullition pendant 2 heures puis refroidi à 0°C jusqu'à cristallisation complète de l'ester. Le solide est filtré

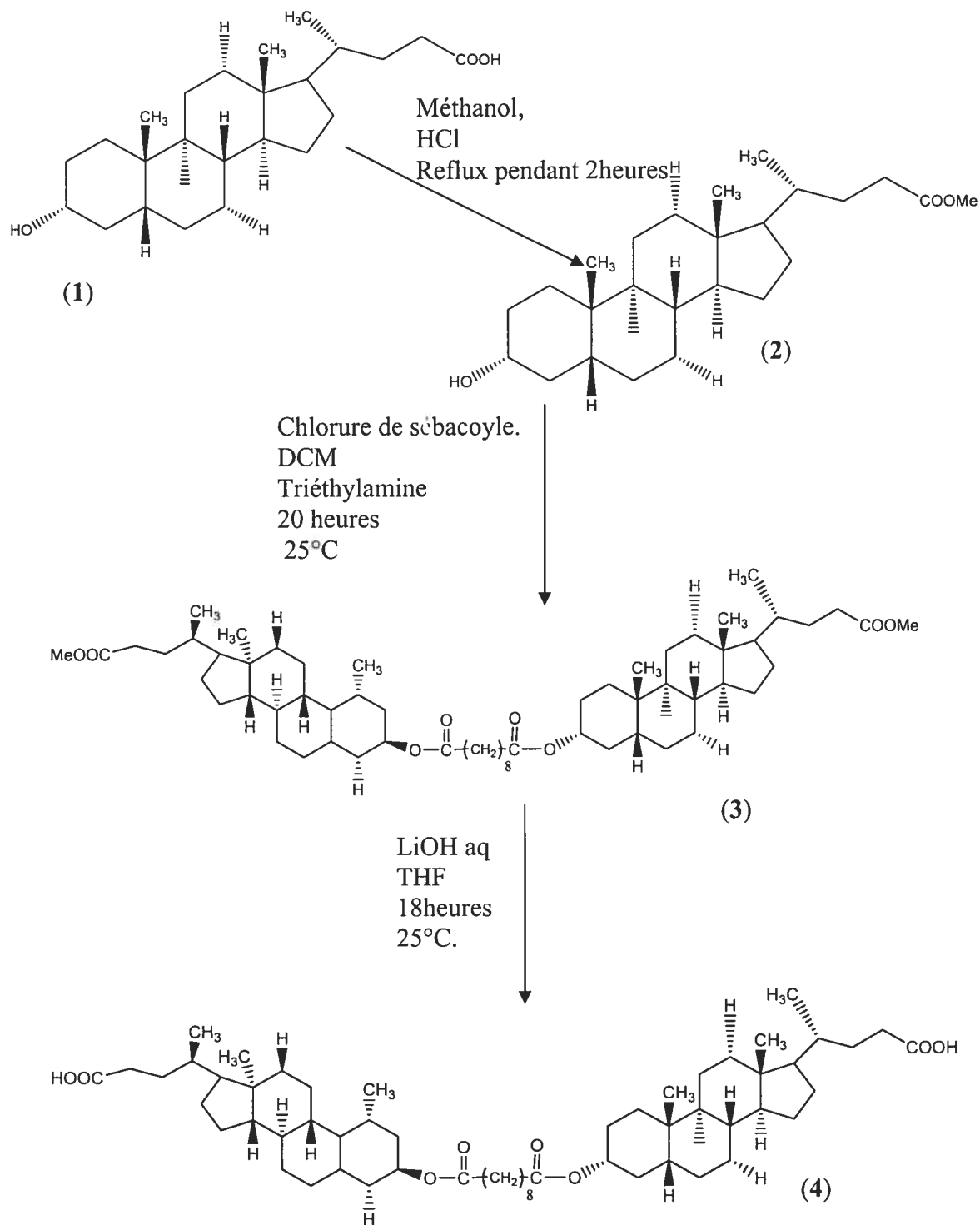


Figure 2-1. Synthèse du 3 α -dimère d'acide lithocholique (4)

sous vide et lavé avec deux portions de méthanol froid. Le produit obtenu est un solide blanc (23,4 g, 60 mmoles, 90,24%), T_f : 121-122°C, 3 α -hydroxy-5 β -cholan-42-ate de méthyle appelé plus couramment ester de méthyle de l'acide lithocholique (**2**).

La deuxième étape est la synthèse du 3 α -dimère de méthyle de l'acide lithocholique (**3**). Dans le DCM sec (110 ml), le composé **2** (25 g, 64 mmoles) et la triéthylamine anhydre (11 g, 109 mmoles) sont refroidis sous agitation dans un bain de glace sous atmosphère inerte. Une solution de dichlorure d'acide (chlorure de sébacoyl : 7,65 g, 32 mmoles, 0,5 équivalent) dans le DCM sec (20 ml) est ajoutée, goutte à goutte, pendant 10 min. Le mélange se réchauffant jusqu'à température ambiante, pendant 20 heures est laissé sous agitation vigoureuse. Le chlorure de triéthylammonium est extrait par filtration sous vide. Le filtrat est alors évaporé à sec sous pression réduite. Le résidu obtenu est dissous dans le THF sec. Le chlorure de triéthylammonium restant est de nouveau filtré et le filtrat de nouveau évaporé à sec sous pression réduite. Le solide obtenu dissous dans un minimum de chloroforme est purifié par chromatographie sur colonne avec pour solvant un mélange d'acétate d'éthyle et d'éther de pétrole (20/80). Le sébacate de bis(24-méthoxycarbonyl-5 β -cholan-3 α -yl) appelé plus couramment 3 α -dimère d'ester de méthyle d'acide lithocholique (**3**), solide blanc, est obtenu après évaporation à sec sous pression réduite (21,23 g, 22,4 mmoles, 70%), T_f : 124-125°C.

La dernière étape est la synthèse du 3 α -dimère de l'acide lithocholique (**4**). Dans le THF (500 ml), le composé **3** (24 g, 26 mmoles) est ajouté et le tout est agité vigoureusement. Une solution aqueuse (250 ml) de LiOH (2 N) est ajoutée. Le mélange est laissé sous forte agitation à température ambiante pendant 18 heures. Le solvant est évaporé sous pression réduite. La solution est neutralisée par une solution de HCl 10%. Par filtration sous vide, le 3 α -dimère d'acide lithocholique brut est récupéré. Il est lavé avec 2 portions d'eau froide. Le solide restant est séché sous vide puis purifié par chromatographie sur colonne avec pour solvant un mélange d'acétate d'éthyle et d'éther de pétrole (65/35). Le sébacate de bis(24-carboxy-5 β -cholan-3 α -yl), appelé plus couramment 3 α -dimère d'acide lithocholique, est obtenu par évaporation à sec sous pression réduite et recristallisé dans un mélange de toluène et d'hexane. Le 3 α -dimère

d'acide lithocholique (**4**), (17,93 g, 19,5 mmoles, 75%), solide blanc, est séché sous vide dans l'étuve à 100°C. T_f : 142-143°C.

2.2.2 Synthèse des polymères : polycondensation en solution (Figures 2-2 à 2-4)

Avant de commencer la polycondensation, chaque produit est purifié. Le composé **5** est recristallisé dans le toluène. Le composé **4** est purifié comme cité dans le paragraphe 2.2.1. Afin de vérifier qu'il est sec, une TGA est effectuée avant chaque utilisation. Les composés **1**, **6**, **7** et **8** sont recristallisés dans un mélange de THF et d'hexane. Le chlorure de sébacoyle est synthétisé à partir du SOCl_2 et du composé **5**. Sous azote, SOCl_2 en excès et le composé **5** sont portés à reflux pendant deux heures. Un piège de soude pour le SO_2 est installé. Le pH est surveillé tout au long de la synthèse afin que ce dernier reste basique. Une fois la réaction finie, des peroxydes sont ajoutés à la solution alcaline et le montage de la distillation est installé. Dans un premier temps, la distillation de l'excès de SOCl_2 sous azote a lieu ; puis le montage est placé sous vide et le chlorure de sébacoyle est distillé. Ce dernier est ensuite conservé dans le congélateur. Il est distillé de nouveau avant chaque utilisation. La triéthylamine est placée sous forte agitation toute la nuit en présence de potasse puis est distillée sous azote.

Le protocole de la polycondensation est le suivant. L'acide seul ou un mélange d'acides (composé **1** : 0,94 g, composé **4** : 2,3 g, composé **5** : 0,51 g, composé **6** : 0,97 g, composé **7** : 1 g, composé **8** : 0,97 g, 2,5 mmoles) est introduit sous atmosphère inerte dans un ballon (25 ml, 1 col). Le DCM (15 ml) et la triéthylamine (0,63 g, 6,25 mmoles, 2,5 équivalent) sont ajoutés sous agitation. Le chlorure de sébacoyle (0,71 g, 2,95 mmoles, 1,18 équivalent) est ajouté lentement à la solution (1 goutte/s). Le tout est agité pendant 5 min. La solution est filtrée, le filtrat tombant goutte à goutte dans de l'hexane sous agitation. Le polymère précipite dans l'hexane. Sous filtration sous vide, le polymère est recueilli et il est séché sous vide. Pour enlever l'excédant de triéthylamine, le polymère est dissout dans un minimum de DCM. Il est rapidement lavé avec une solution d'acide acétique pH 6. La solution est de nouveau filtrée et le filtrat tombe goutte à goutte dans de l'hexane sous agitation, le polymère précipite. Il est ensuite séché et conservé sous vide.

2.3 Vitesses de dégradation et de relargage

2.3.1 Dégradation des polymères *in vitro*

Les échantillons des polymères sont préparés en solubilisant dans un minimum de DCM sec les polymères. Le solvant est ensuite évaporé et le polymère est séché sous vide. Le polymère est ensuite introduit dans un moule entre 2 pastilles sous une pression de 8 tonnes pendant 30 minutes. La forme de l'échantillon obtenue est cylindrique. Les dimensions des échantillons sont d'environ 0,7 mm d'épaisseur et 1,32 cm² de surface. Les échantillons pèsent environ 100-120 mg. Ils sont ensuite introduits dans une solution tampon de phosphate pH 7,4 (10 ml) qui est contenue dans des flacons de 20 ml. Ces derniers sont mis sous agitation à une température de 37,5°C.

La dégradation des polymères est suivie de différentes façons.

- Détermination des concentrations des acides libérés dans la solution tampon de phosphate pH 7,4 par HPLC.
- Détermination de la perte de masse des échantillons par gravimétrie après séchage à 40°C pendant 24 heures sous vide.
- Détermination du taux d'hydrolyse des polymères par FT-IR en observant les pics correspondant aux groupements anhydres et aux groupements acides.
- Détermination de la perte de masse des polymères par CES après séchage à 40°C pendant 24 heures sous vide.

2.3.2 Relargage de la sonde p-nitroaniline contenue dans les polymères *in vitro*

Les échantillons sont préparés de la même manière que pour la dégradation. Mais avec le polymère, 5% en masse de p-nitroaniline est ajoutée afin d'obtenir un mélange homogène au moment de la solubilisation du polymère dans le DCM. Ce dernier est ensuite évaporé et le mélange est séché sous vide avant de faire la pastille. La détermination de la concentration de la p-nitroaniline dans la solution tampon est faite par UV-Visible à 405 nm en mesurant l'absorption. Une courbe de calibration est effectuée dans un premier temps pour des concentrations de p-nitroaniline allant de 4,43 µg/ml à 49 µg/ml.

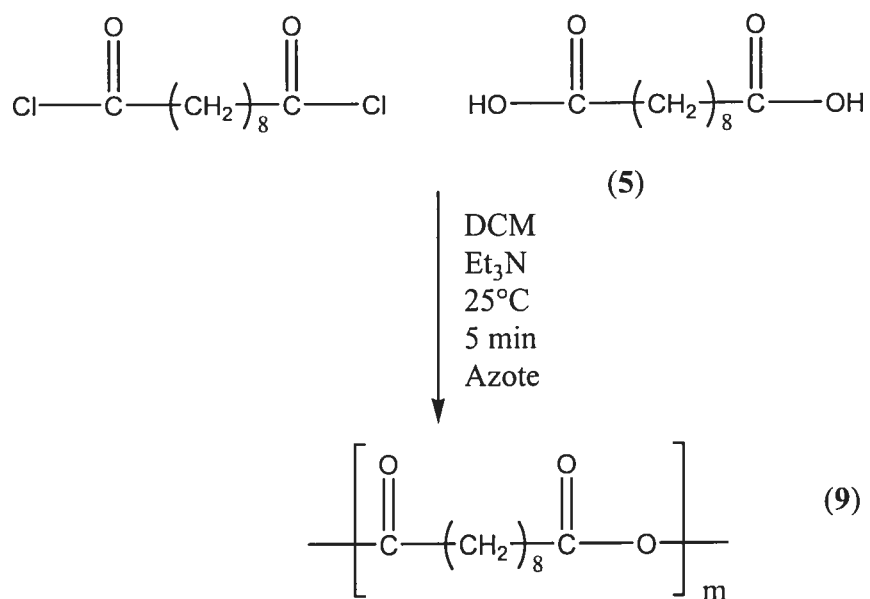


Figure 2-2. Polycondensation en solution de l'acide sébacique (5)

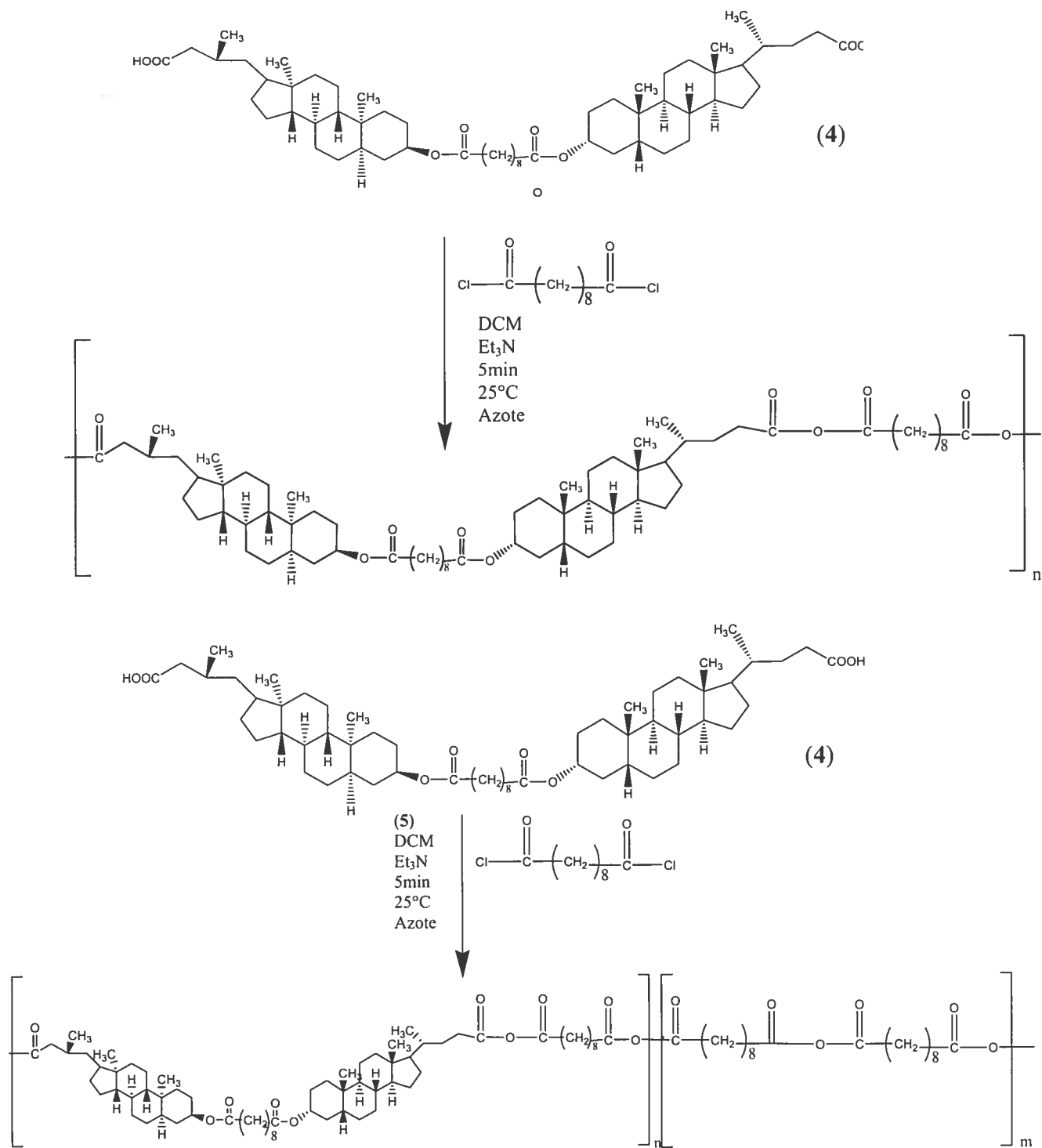


Figure 2-3. Polycondensation en solution du dimère de l'acide lithocholique (4), obtention d'un polymère alterné ou statistique.

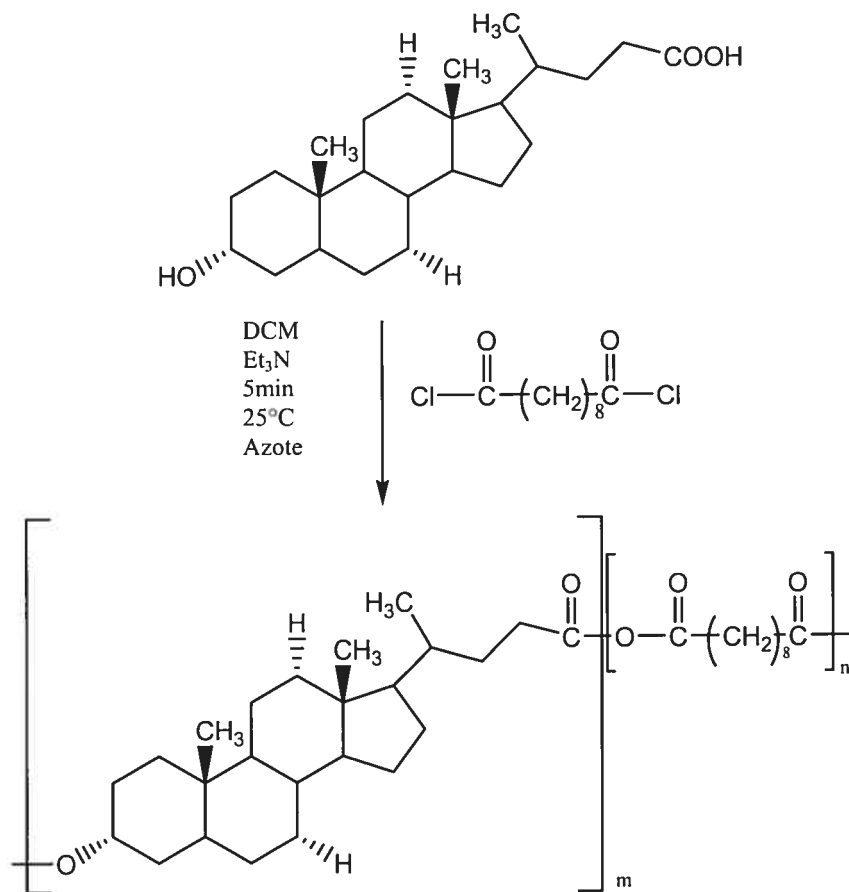


Figure 2-4. Polycondensation en solution de l'acide lithocholique (4), obtention d'un polymère alterné ou statistique.

3 Discussion

3.1 Synthèse du 3 α -dimère de l'acide lithocholique

L'attribution des signaux de la RMN dont le déplacement chimique est exprimé en ppm des produits obtenus est effectuée en se référant à la littérature (Tableau 3-1) [111].

Tableau 3-1. Signaux ^1H -RMN (Figure 3-1) des dérivés d'acides biliaires définis à la Figure 2-1

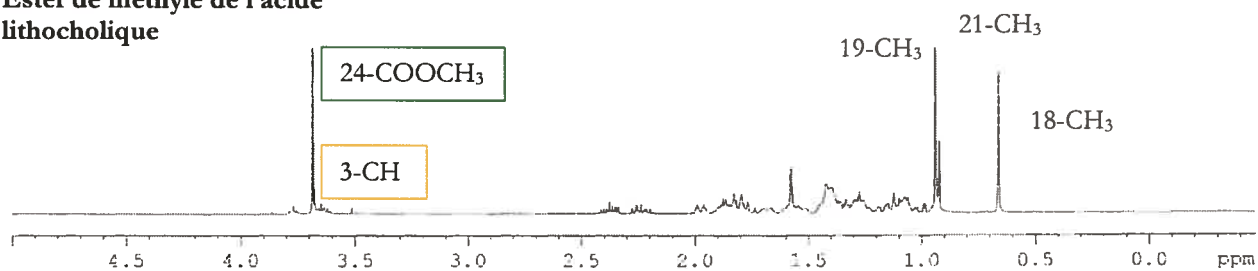
	Composé 2	Composé 3	Composé 4
3 α -CH	3,66	4,72	4,73
18-CH ₃	0,64	0,64	0,65
19-CH ₃	0,91	0,91	0,91
21-CH ₃	0,95	0,96	0,96
CH ₃	3,69	3,69	
CH ₂ COO-		2,24	2,24
CH ₂		1,31	1,31

Le spectre RMN des stéroïdes comporte une majorité de pics dans une zone comprise entre 1 et 2,5 ppm. Cette zone est complexe due au recouvrement des signaux des différents protons [111].

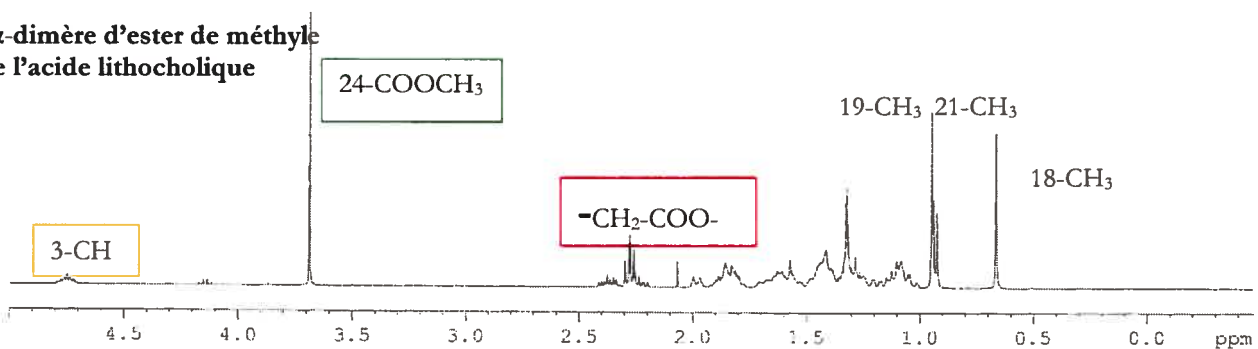
3.1.1 Ester de méthyle de l'acide lithocholique (2)

Le rôle majeur de la synthèse de l'ester de méthyle de l'acide lithocholique (2) est de protéger le groupement acide pour la suite des réactions. Cette protection va empêcher, d'une part, que la fonction acide ne soit attaquée et, d'autre part, va augmenter la solubilité des différents composés dans les solvants organiques usuels comme le DCM, le THF et le chloroforme. Cette dernière propriété entraîne de meilleurs rendements, mais aussi une meilleure purification des produits. Nous pouvons voir que le spectre ^1H RMN du composé 3 par rapport à celui du composé 1 pris dans la littérature [111] présente un pic additionnel correspondant au groupement méthyle, 3,66 ppm.

Ester de méthyle de l'acide lithocholique



3 α -dimère d'ester de méthyle de l'acide lithocholique



3 α -dimère de l'acide lithocholique

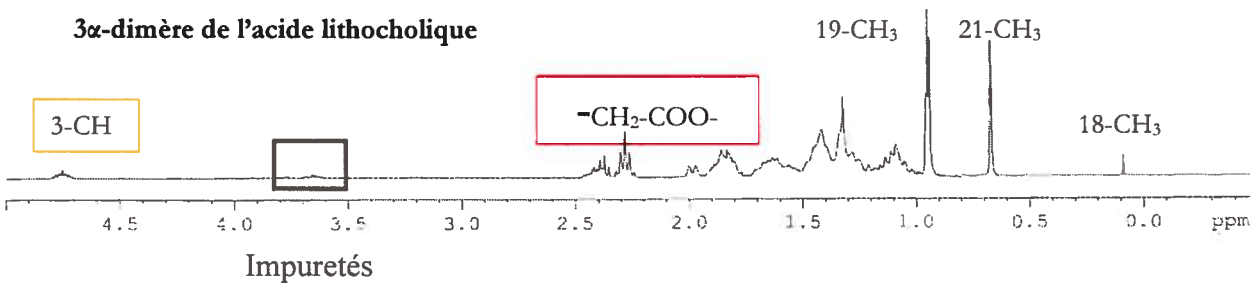


Figure 3-1. Spectres ^1H -RMN des composés 2, 3 et 4

3.1.2 3 α -dimère de méthyle d'acide lithocholique (3)

La synthèse du 3 α -dimère de méthyle d'acide lithocholique (3) demande un milieu anhydre afin d'empêcher le chlorure de sébacoyl de se transformer en acide sébacique par hydrolyse. Afin de satisfaire ces conditions, le chlorure de sébacoyl est synthétisé à partir de l'acide sébacique et du chlorure de thionyle afin d'obtenir une grande pureté. Il est distillé de nouveau avant chaque utilisation.

L'ester de méthyle par son groupement hydroxyle en position C3 effectue une attaque nucléophile sur le chlorure de sébacoyl, activé par la triéthylamine. Afin d'améliorer le rendement de la réaction et que celle-ci se fasse dans les meilleures conditions, il est important d'ajouter lentement le chlorure de sébacoyl dans le mélange réactionnel, à 0,05 ml/s.

Le spectre ¹H-RMN du composé 3 montre le déplacement des signaux du carbone C3 vers les champs faibles. De plus, ce spectre met en avant les signaux du groupement ester. Tous ces changements sont dus à la dimérisation et à la formation de liens esters.

Le rendement de cette réaction est de 70%. Une valeur tout à fait acceptable qui s'explique par le fait que l'acide biliaire utilisé au départ, l'acide lithocholique ne porte qu'un groupement hydroxyle en position C3 sur son squelette stéroïde. Ce seul groupement en position équatorial permet d'avoir beaucoup moins de produits secondaires se formant lors de la réaction que s'il ne s'agissait de l'acide cholique, par exemple.

3.1.3 3 α -dimère de l'acide lithocholique (4)

Lors de la synthèse du 3 α -dimère de l'acide lithocholique (4), les groupements ester de méthyle sont transformés en groupements acides. Cependant, il ne faut pas hydrolyser les liens ester formés lors de l'étape précédente.

L'hydroxyde de lithium est connue pour son pouvoir hydrolysant relativement faible et fut donc choisi pour cette réaction [109]. Cette hydrolyse s'effectue en trois étapes. La plus importante est la première qui est une attaque nucléophile du groupement hydroxyle sur l'ester, réactif électrophile. L'attaque nucléophile a lieu majoritairement

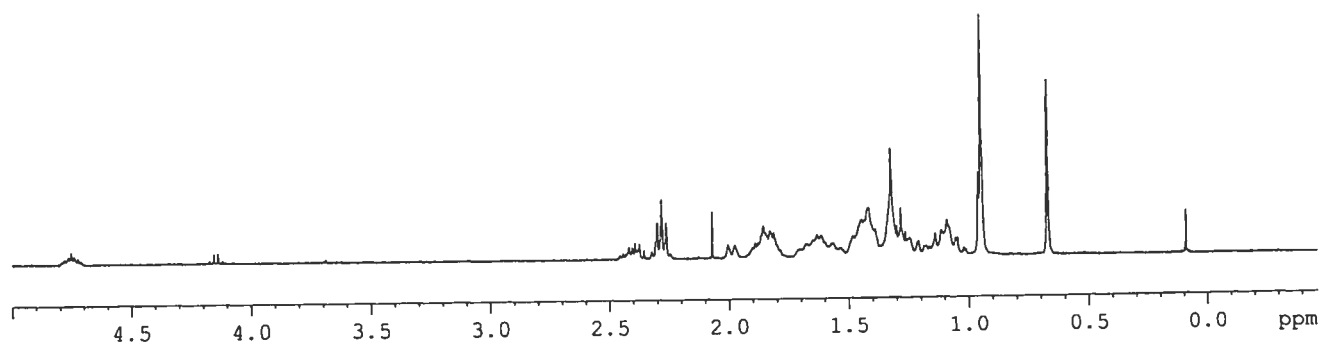
sur l'ester présentant un encombrement stérique minimale. Le composé **4** présente deux esters : un en position C24 et l'autre en position C3. Le premier étant peu encombré, l'attaque intervient principalement à cette position. Mais les liens esters de la position C3 peuvent, eux aussi, être minoritairement attaqués. La RMN du proton montre que le pic correspondant au groupement ester de méthyle à 3,69 ppm est inexistant dans le produit obtenu. Par contre à 3,66 ppm, nous pouvons observer la présence du carbone C3 (Figure 3.1). Ceci nous indique qu'une faible proportion de composé **1** s'est formée, donc qu'une faible proportion de liens ester reliant la position C3 au chlorure de sébacoyl s'est hydrolysée.

Un des facteurs les plus importants en polycondensation en solution est la grande pureté des produits. En effet les impuretés peuvent empêcher la polymérisation ou affaiblir les masses molaires. C'est pourquoi il est primordial d'obtenir le composé **4** pur. Dans un premier temps, le produit brut est purifié par chromatographie sur colonne, avec pour éluant, un mélange d'acétate d'éthyle et d'éther de pétrole (65/35 en volume). Deux fractions sont obtenues: la première étant le composé **4** et la deuxième représentant les impuretés qui sont principalement du composé **1**. L'attribution des signaux de la RMN dont le déplacement chimique est exprimé en ppm des fractions obtenues a été effectuée en se référant à la littérature [2], (Figure 3.2 et Tableau 3-2).

Tableau 3-2. Signaux ^1H -RMN (Figure 3-2) des fractions 1 et 2 obtenues lors de la purification du composé **4**

	Fraction 1	Fraction 2
	Composé 4	Composé 1
3 α -CH	4,73	3,66
18-CH ₃	0,65	0,64
19-CH ₃	0,91	0,91
21-CH ₃	0,96	0,95
CH ₂ COO-	2,24	
CH ₂	1,31	

Première fraction:
Dimère d'acide lithocholique



Deuxième fraction:
Impuretés: acide lithocholique

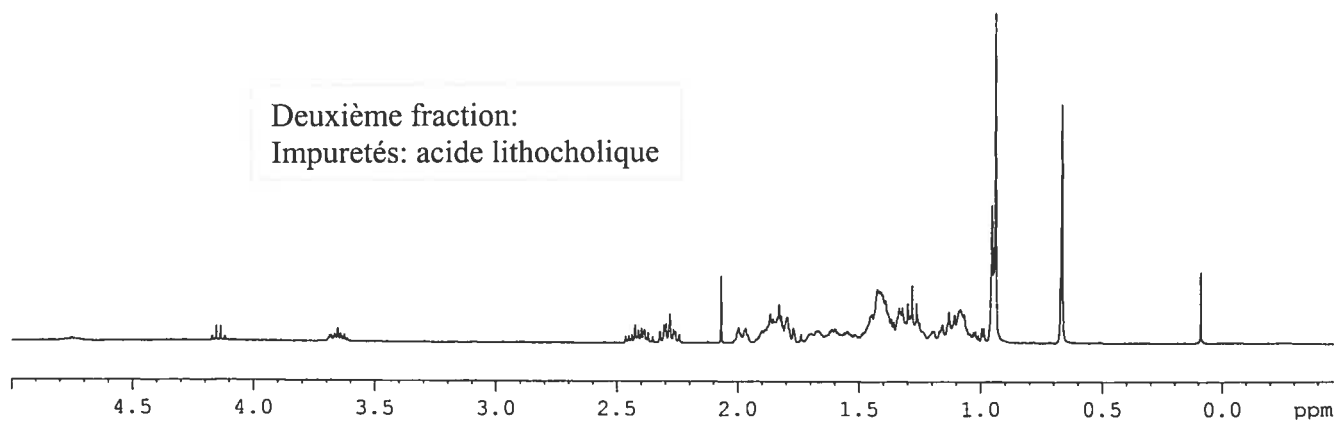


Figure 3-2. Spectres ^1H -RMN des fractions 1 et 2

Le composé **4** est obtenu par évaporation sous pression réduite. Il est ensuite recristallisé en le solubilisant dans un premier temps dans le toluène et l'hexane. Le rendement de cette étape est de 75%.

3.1.4 Bilan de la synthèse du 3 α -dimère de l'acide lithocholique

Le rendement global de la synthèse est de 47%. Le 3 α -dimère de l'acide lithocholique obtenu peut être utilisé dans la suite du projet, c'est-à-dire pour la polycondensation en solution où il va réagir avec un dichlorure d'acide : le chlorure de sébacoyl.

3.2 Caractérisations des polymères

3.2.1 Détermination de la masse molaire par CES

Pour déterminer les masses molaires, une courbe de calibration à partir de standards de polystyrène est utilisée. Il est important de noter que cette technique nous permet de donner un ordre de grandeur des masses molaires obtenues étant donné que le polystyrène ne possède pas la même structure que celle des polymères étudiés. La masse molaire est faussée. Néanmoins, en ce qui concerne la comparaison des différents polymères préparés dans cette étude, la calibration par rapport au polystyrène est suffisante.

3.2.2 Suivi de la dégradation par HPLC

Dans un premier temps, l'étude s'est effectuée avec un mélange méthanol/eau (90/10 en volume). L'acide sébacique (**5**) sort à 4,26 min. Cependant le tampon phosphate sort juste un peu avant l'acide sébacique, ce qui fausse l'air du pic de ce dernier.

Dans un deuxième temps, la séparation s'est effectuée avec un mélange d'acétonitrile/eau (70/30 en volume) avec un pH=3,4. Le pH est ajusté en ajoutant de l'acide phosphorique au mélange d'éluants. L'acide sébacique (**5**) sort à 3,25 min. Avec ce mélange d'éluants, le tampon phosphate sort à 2,38 min. Il ne vient donc pas perturber l'étude. De plus, le composé sort plus rapidement, ce qui est préférable en HPLC.

Afin de pouvoir calculer la concentration d'acide sébacique dans la solution, nous utilisons un standard, l'acide cholique, dont la concentration est connue dans l'échantillon étudié. Son temps de rétention est 4,26 min.

3.2.3 Suivi du relargage par spectroscopie UV-Visible

La para-nitroaniline est un chromophore dont l'absorbance est maximale à la longueur d'onde de 380 nm (Figure 3-3). Pour cette longueur d'onde, le spectrophotomètre sature pour une concentration ne dépassant pas 0,03 mg/ml de para-nitroaniline. Il est donc préférable de travailler à la longueur d'onde 405 nm où la saturation n'est que pour une concentration de 0,05 mg/ml, ce qui nous permet de tracer une courbe de calibration pour des concentrations allant de 0,004 à 0,05 mg/ml (Figure 3-4).

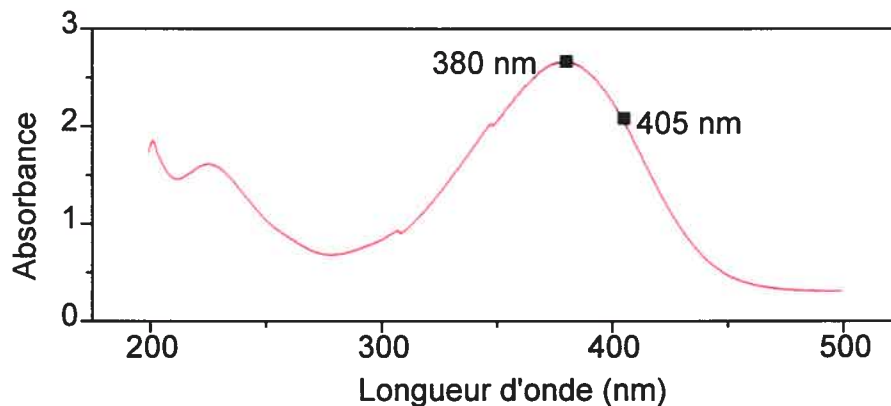


Figure 3-3. Spectre d'absorbance de la p-nitroaniline

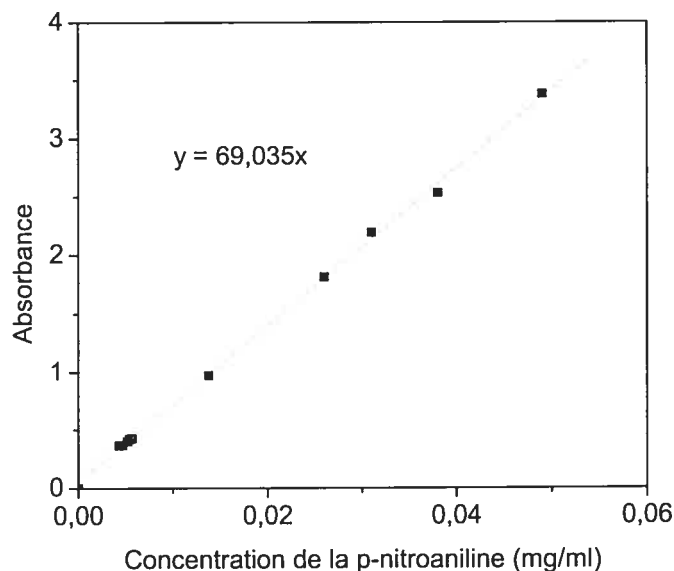


Figure 3-4. Courbe de calibration de la p-nitroaniline

3.3 Protocole de la polymérisation

3.3.1 Pureté des produits

La polycondensation en solution nécessite des produits d'une grande pureté et ne contenant pas de traces d'eau.

L'acide sébacique (**5**) et les acides biliaries : l'acide lithocholique (**1**), l'acide cholique (**7**), l'acide déoxycholique (**8**), l'acide chénodéoxycholique (**6**) sont passés à l'analyse élémentaire (Tableau 3-3). Les résultats nous montrent que les produits obtenus sont purs.

Tableau 3-3. Analyse élémentaire des acides biliaries et l'acide sébacique

	Théorique		Expérimental	
	(%)		(%)	
	C	H	C	H
Acide sébacique	59,39	8,97	59,59	9,29
Acide lithocholique	76,54	10,71	76,50	11,06
Acide cholique	70,55	9,87	70,37	10,71
Acide déoxycholique	73,43	10,27	73,42	10,62
Acide chénodéoxycholique	73,43	10,27	73,06	10,61

Le chlorure de sébacoyl est le produit dont la pureté a une très grande importance. Il est très facilement hydrolysable, il est important de ne pas le conserver longtemps afin que son taux de conversion en acide sébacique reste le plus faible possible. Pour éviter son hydrolyse, le chlorure de sébacoyl est distillé avant chaque utilisation. Nous n'avons pas utilisé l'EDC du fait qu'il n'est pas assez réactif.

Le dimère d'acide lithocholique (4) est utilisé après sa synthèse décrite au paragraphe 2.2.1. Afin d'éviter que le composé ne contienne de l'eau, il est séché 24 heures sous vide à 110°C avant son utilisation et l'absence d'eau est vérifiée par ATG (Figure 3-5).

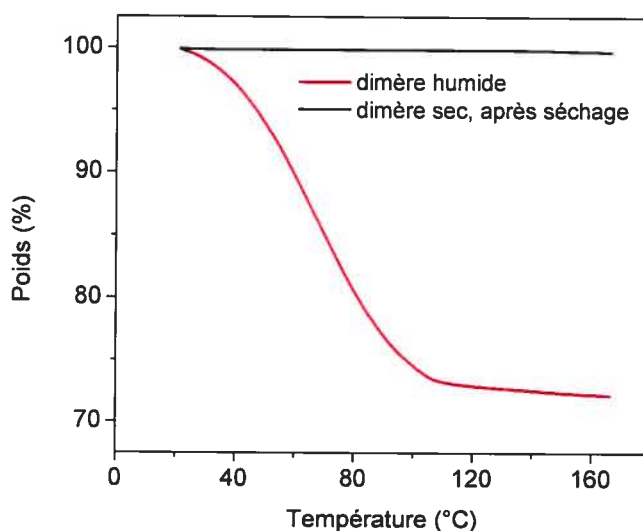


Figure 3-5. Vérification de l'absence d'eau dans le dimère d'acide lithocholique par ATG avant son utilisation

3.3.2 Conditions optimales de la polymérisation : étude avec l'acide sébacique

La polymérisation de l'acide sébacique est réalisée dans le but de trouver les conditions optimales.

Plusieurs paramètres sont étudiés comme le volume de DCM, le débit d'ajout du chlorure de sébacoyle, le ratio acide sébacique/chlorure de sébacoyle, l'ordre de l'ajout des réactifs et le temps de réaction.

- Le volume de DCM

Le volume de solvant utilisé est étudié. Deux protocoles identiques à l'exception du volume de solvant contenant le même nombre de moles d'acide sébacique (**5**) (0,5 g, 2,47 mmoles) sont comparés. Les meilleurs résultats (Figure 3-6) sont obtenus pour un volume de DCM de 15 ml. Ce phénomène peut s'expliquer par l'arrêt de la polycondensation du à la viscosité du milieu réactionnel avec 5 ml de DCM. En effet, par l'augmentation des chaînes des polymères, la viscosité du milieu augmente au cours du temps. La réaction de polycondensation étant rapide, la masse des polymères augmente très rapidement.

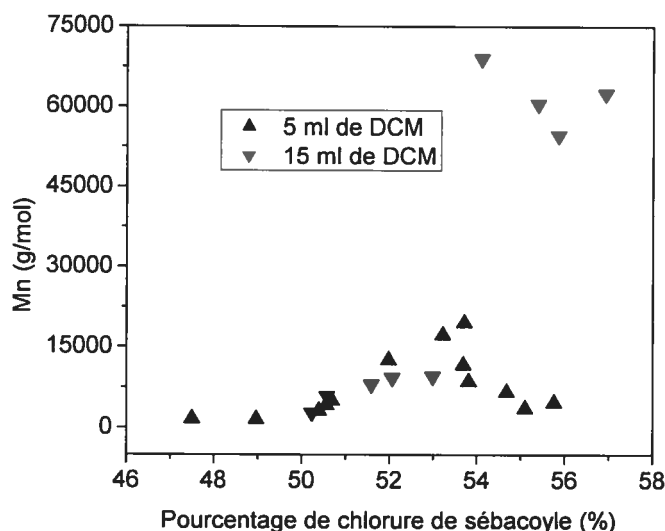


Figure 3-6. Influence du volume du solvant sur la polycondensation en solution

- Le ratio acide sébacique/chlorure de sébacoyle

D'après la Figure 3-6, nous pouvons constater que la plus importante masse molaire obtenue tient compte aussi d'autres facteurs comme le ratio entre l'acide sébacique et le chlorure de sébacoyle. L'incertitude sur le ratio acide sébacique/chlorure de sébacoyle est de $\pm 0,5$. En effet selon le ratio, les masses molaires obtenues diffèrent. Il est important d'avoir un petit excès de chlorure de sébacoyle. Ce phénomène peut s'expliquer par la présence de traces d'eau présentes dans le milieu réactionnel. C'est le

paramètre le plus difficile à contrôler tout au long de ces polycondensations. En effet la présence de l'eau peut aussi bien transformer le chlorure de sébacoylé en acide sébacique (réduction des sites réactifs pour la polymérisation, ce qui entraîne des plus faibles masses molaires) que casser les liaisons polyanhydrides créées. Pour essayer de limiter ce phénomène, la pureté des produits est fortement contrôlée. De plus, pour éviter les traces d'eau sur la vaisselle utilisée, un grand soin dans la préparation de cette dernière est apporté afin de travailler dans un environnement sec. Malgré toutes ces précautions prises, le volume d'eau nécessaire pour faire chuter les masses molaires est très faible. Des traces d'eau sont toujours présentes. C'est pourquoi, il est préférable de travailler avec un excès de chlorure de sébacoylé pour que la présence d'eau ne prenne pas le dessus sur la réaction.

- Le débit d'ajout du chlorure de sébacoylé

L'ajout du chlorure de sébacoylé s'est fait selon différents débits. Aucun changement sur les masses molaires n'est observé. Il suffit de rajouter le chlorure de sébacoylé lentement goutte à goutte (débit environ 0,01 ml/s).

- L'ordre des réactifs inversé

Nous nous sommes aussi demandés si l'ordre d'ajouts des réactifs avait une influence sur les masses molaires obtenues comme Subramanyam le soulignait [66]. Des essais sont réalisés en ajoutant le diacide goutte à goutte dans le chlorure de sébacoylé. Les masses molaires obtenues dans ce procédé sont plus faibles (Figure 3-7). Dans ce cas, l'utilisation de la verrerie est plus importante. Ceci peut augmenter la présence de traces d'eau donc entraîner une diminution des masses molaires. Il est donc préférable d'ajouter le chlorure de sébacoylé au diacide.

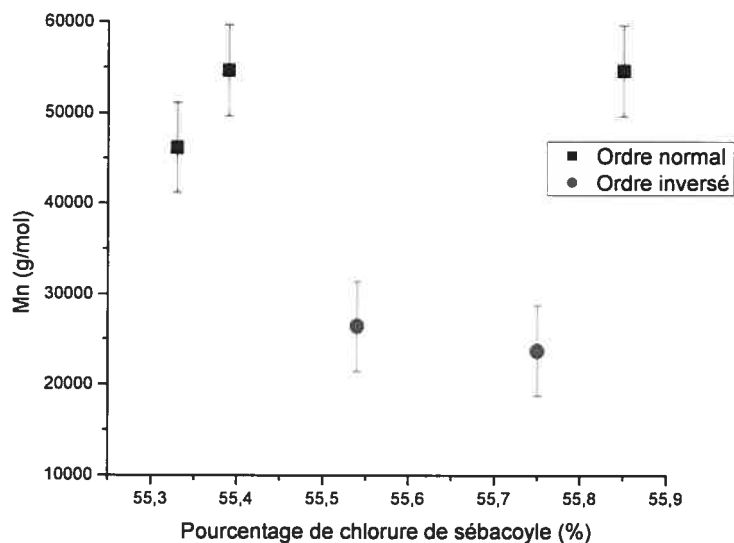


Figure 3-7. Influence de l'ordre des réactifs sur la polycondensation en solution

- Le temps de réaction

Un dernier paramètre important à étudier est le temps de la polycondensation. Différents échantillons sont obtenus après différents temps de réaction (Figure 3-8). Dès l'ajout du chlorure de sébacoyle, la polymérisation commence, beaucoup de sites de réaction sont disponibles, la cinétique est donc très rapide. Nous constatons qu'au bout de 5 minutes, les masses molaires ont atteint leur maximum. Il est donc préférable de ne pas laisser la polycondensation trop longtemps pour éviter que l'eau ne vienne briser les chaînes et donc diminuer les masses molaires. La cinétique de polycondensation est très rapide mais ensuite intervient la cinétique de dégradation, plus lente. La masse molaire des polymères se stabilise au bout de 30 minutes. Nous pouvons remarquer qu'au bout de 18 heures, la masse molaire n'a pas changé.

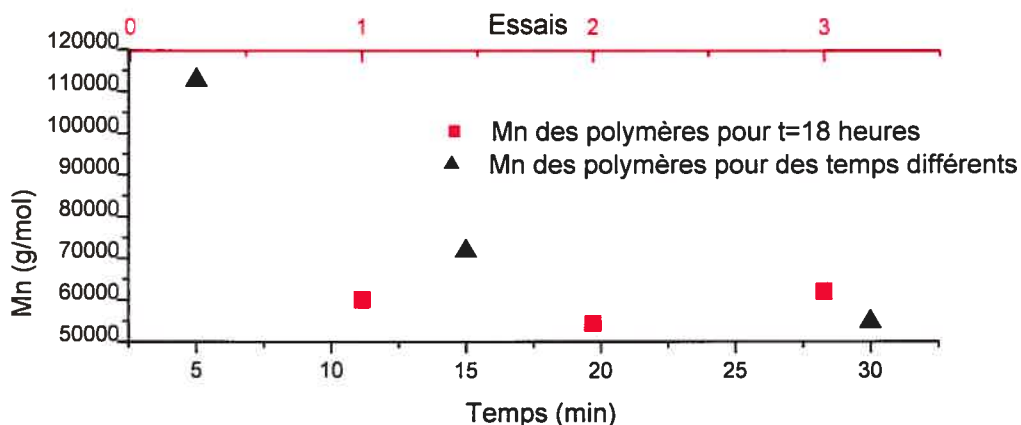


Figure 3-8. Influence du temps sur la polycondensation en solution

Pour l'obtention de masses molaires moyennes M_n aux alentours de 100 000 g/mol, les opérations optimales utilisées avec l'acide sébacique (5) (0,5 g, 2,47 mmol) sont :

- De prendre un volume de 15 ml de DCM
- D'ajouter goutte à goutte le chlorure de sébacoyl avec un ration 46/54 (acide sébacique/chlorure de sébacoyl)
- Laisser polymériser 5 min

Ces paramètres donnent un rendement de $75 \pm 5\%$.

3.3.3 Présence de triéthylamine dans le polymère obtenu

Les polymères synthétisés ont pour but d'être utilisés à des fins biomédicales. Il est important d'avoir une toxicité la plus faible possible. La triéthylamine est utilisée en excès lors de la synthèse. Nous la retrouvons donc dans le composé final. Pour enlever l'excès de triéthylamine, des lavages d'une solution d'acide acétique pH 6 sont effectués rapidement sur la solution du polymère solubilisé dans le DCM [72]. Environ 87% de triéthylamine est enlevé lors de ce lavage (Figure 3-9). L'efficacité du lavage est non négligeable. Il faudrait peut être augmenter le nombre de lavages pour enlever totalement l'excès de triéthylamine mais il faut tenir compte du fait que lors des lavages, le rendement du polymère isolé diminue. D'autres pistes à explorer sont d'utiliser une

autre amine, moins toxique, voire même reconnue par la FDA, s'il en est ou du fait que la triéthylamine est volatile d'utiliser une rampe à vide pour l'enlever.

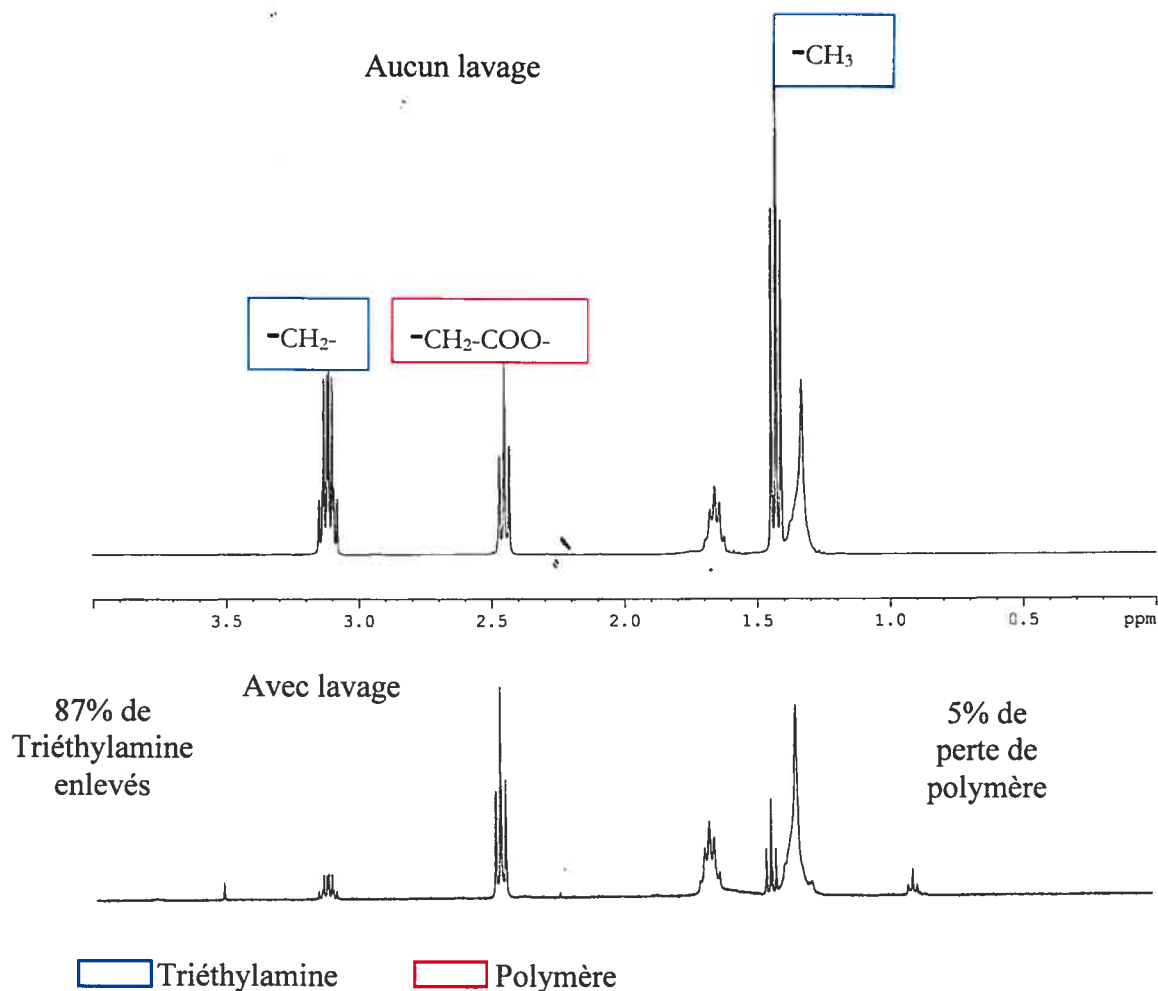


Figure 3-9. Spectres $^1\text{H-RMN}$ des P(SA) obtenus sans et avec lavage d'une solution d'acide acétique pH 6

3.4 Influence de la masse des polymères sur la dégradation

3.4.1 Polymères en partant de l'acide sébacique

Différents polymères avec des masses molaires différentes sont synthétisés en faisant varier le temps de polymérisation, le volume de DCM et le ratio en moles acide sébacique/chlorure de sébacoyle avec un rendement de $75 \pm 5\%$ (Tableau 3-4).

Le P(SA) est un polymère très cristallin, aucune transition vitreuse n'apparaît.

Tableau 3-4. Masse moléculaire moyenne M_n et propriétés thermiques des polymères d'acide sébacique obtenus en faisant varier les paramètres : temps, volume DCM et ratio des réactifs

I_p	M_n (g/mol)	T_f (°C)	T_c (°C)	t (min)	Volume DCM (ml)	Ratio Acide sébacique /Chlorure de sébacoyle
1,68	75 000	82,2	63,1	10	15	45,7/54,3
3,25	54 000	80,3	63,9	30	15	43,9/56,1
3,63	36 000	78,8	65,9	120	15	48,7/51,3
2,79	16 500	80,0	64,9	120	5	44,9/55,1
3,03	4 500	80,3	66,0	120	5	50,1/49,9
1,37	1 500	79,2	57,7	120	5	52,0/48,0

- Dégradation des polymères

Toutes les liaisons anhydrides correspondant au pic à 1810 cm^{-1} n'ont pas été hydrolysées au bout de 4 jours dans le P(SA) (Figure 3-10). Ce phénomène indique qu'une dégradation de surface prédomine par rapport à la diffusion de l'eau dans le cœur de la pastille. Les liaisons anhydrides au cœur de la pastille ne sont pas toutes hydrolysées au bout de 4 jours.

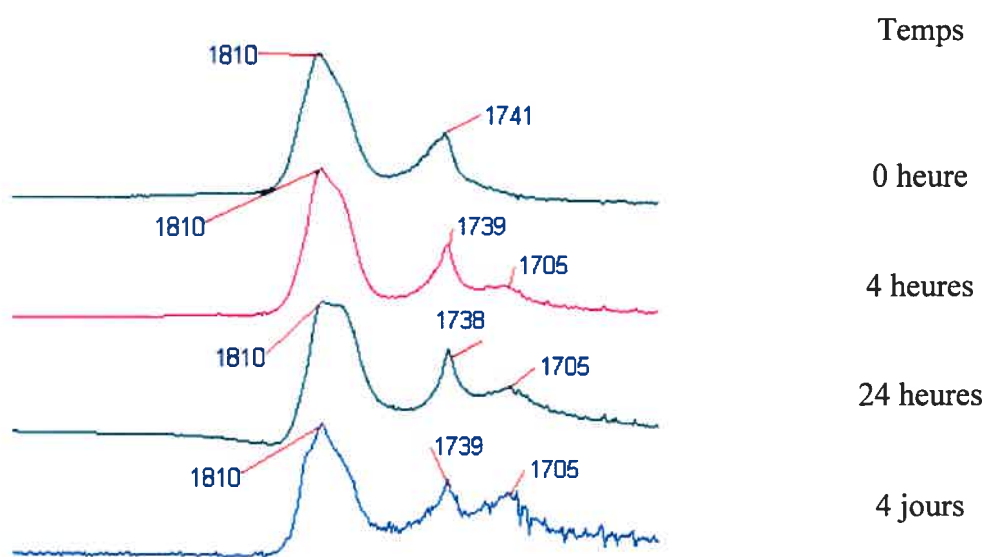


Figure 3-10. Suivi de l'hydrolyse des liaisons anhydrides des P(SA) par IR

Au bout d'environ 24 heures, tous les polymères présentent une masse molaire M_n avoisinant les 1 500 g/mol (Tableau 3-5). L'évolution de la masse molaire lors de la dégradation est indépendante de la masse molaire initiale des polymères.

Tableau 3-5. Changement de la masse molaire moyenne M_n des P(SA), de masses molaires moyennes M_n différentes, au cours de la dégradation à 37,5°C dans une solution tampon de phosphate (pH 7,4)

Masse molaire des polymères (g/mol)	
Début	24 heures
54 000	1 500
36 000	1 500
4 500	1 500

D'après les deux méthodes utilisées pour étudier la dégradation des P(SA), nous constatons dans un premier temps que les P(SA) sont complètement dégradés (Figure 3-11) en une semaine, la vitesse de dégradation du polymère est rapide. Ce phénomène s'explique par l'hydrophilie de l'acide sébacique et sa grande solubilité dans le tampon. Les polymères composés de monomères aliphatiques de poids faibles se dégradent donc très rapidement. La vitesse de dégradation est quasi linéaire (d'ordre zéro), la diffusion de l'eau au sein de la pastille est plus lente que la dégradation en surface des polymères, ce qui signifie que le mécanisme de dégradation des P(SA) est hétérogène. La vitesse de dégradation est calculée à partir de la pente ($\text{pente} = k_0 S M_\infty^{-1}$) de l'équation (2) et elle est d'environ 14,115 mg.cm⁻².d⁻¹ pour tous les polymères avec $R^2 \cong 0,94$.

De plus, nous pouvons voir que les deux méthodes : détermination de la masse perdue par gravimétrie (Figure 3-11) et détermination de l'acide sébacique libéré dans la solution tampon par HPLC (Figure 3-12) nous donnent des résultats tout à fait analogues.

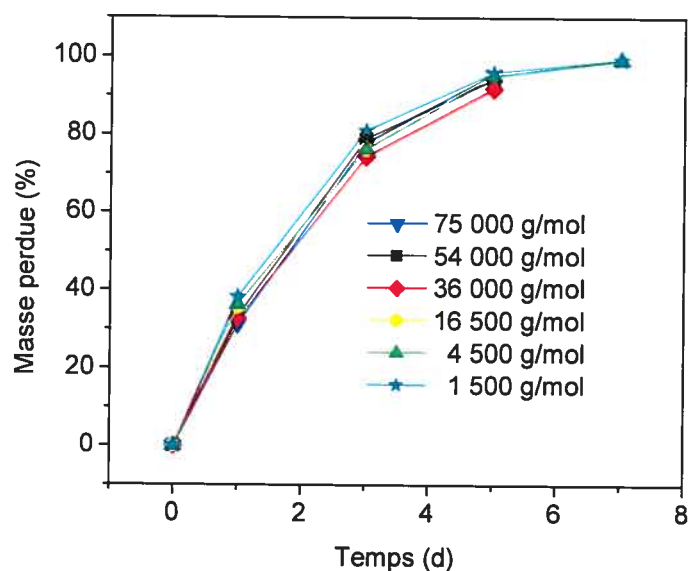


Figure 3-11. Perte de la masse des pastilles des P(SA) de masses molaires moyennes M_n différentes. Dégradation faite à 37,5°C dans une solution tampon de phosphate (pH 7,4)

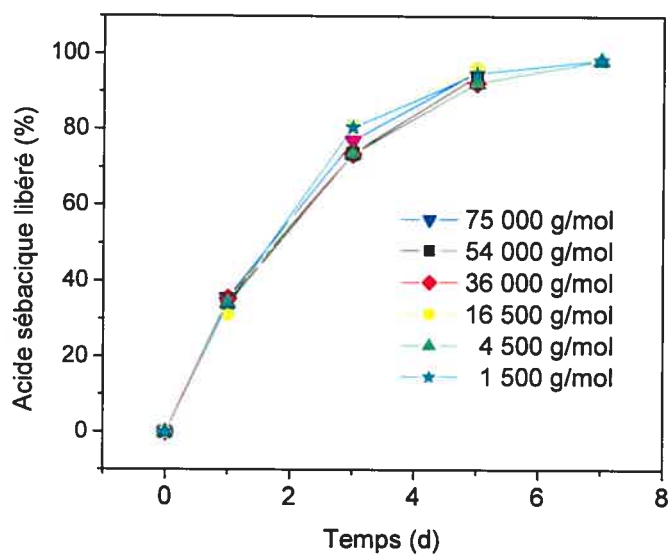


Figure 3-12. Pourcentage d'acide sébacique libéré des P(SA) de masses molaires moyennes M_n différentes dans la solution tampon de phosphate (pH 7,4) à 37,5°C, au cours de la dégradation

- Vitesse de relargage

Le relargage de la sonde atteint entre 80 et 70% selon la masse des polymères, en moins de 20 jours (Figure 3-13). Nous pouvons constater que dans ce cas (Figure 3-14), la vitesse de libération varie en fonction de la masse molaire des polymères dans les premières 24 heures, plus la masse molaire est faible, plus la vitesse de libération est élevée : elle varie entre 2,310 et 0,827 mg/d. Après les premières 24 heures, la libération de la sonde présente une vitesse variant entre 0,107 mg/d et 0,163 mg/d plus la masse molaire de départ est élevée. Ensuite, après le dix-septième jour, la vitesse de libération de la sonde est approximativement la même quelque soit le polymère : 0,020 mg/d avec $R^2 = 0,98$.

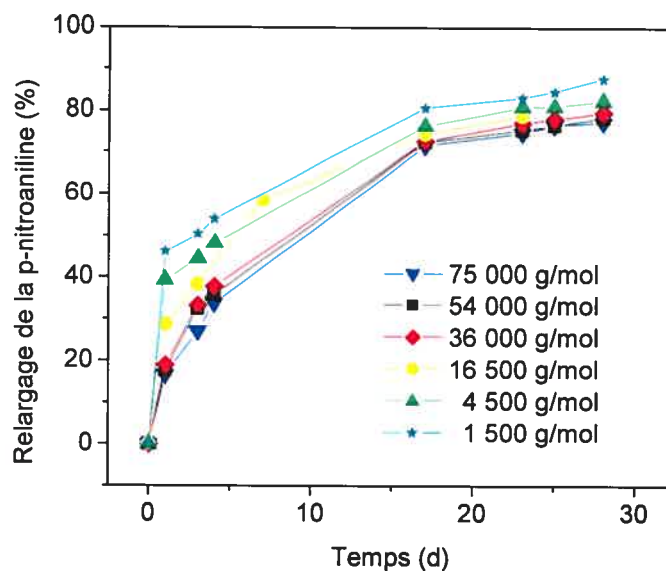


Figure 3-13. Relargage de la sonde contenue dans les P(SA) de masses molaires moyennes M_n différentes dans la solution tampon de phosphate (pH 7,4) à 37,5°C

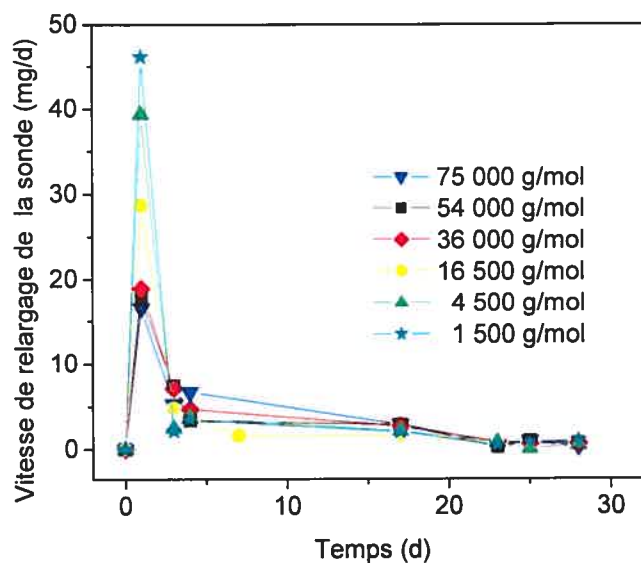


Figure 3-14. Vitesse de relargage de la sonde contenue dans les P(SA) de masses molaires moyennes M_n différentes dans la solution tampon de phosphate (pH 7,4) à 37,5°C

La masse molaire joue un rôle important lors des premières 24 heures. Ensuite, tous les polymères présentent une masse molaire moyenne M_n avoisinant 1 500 g/mol, la masse molaire perd donc de son influence sur la vitesse de relargage. La masse molaire perd donc de son influence sur la vitesse de relargage. Le facteur limitant influençant cette dernière est donc la solubilité des oligomères qui ralentit l'érosion de la pastille donc le relargage de la sonde. Le profil de libération pour l'ensemble des polymères est approximativement semblable après un jour d'étude.

Une étude sur les P(SA) a déjà été réalisée par Domb et al [94] où ils étudiaient différents polyanhydrides aliphatiques. Les résultats de dégradation et de relargage pour le P(SA) sont similaires.

3.4.2 Copolymères d'acide lithocholique et d'acide sébacique (copolymères (LCA-SA))

Cette polycondensation donne un copolymère polyanhydride-polyester. En effet l'acide lithocholique (1) possède une fonction acide en position C24 et une fonction alcool secondaire en position C3. L'hydrogène du groupement carboxylique est plus

labile que celui des alcools, la réaction avec le dichlorure d'acyle est donc favorisée avec le groupement carboxylique. De plus, le rendement de l'estérification dépend fortement de la classe de l'alcool. Ayant un alcool secondaire, le rendement n'excède pas 60%. La fonction alcool de l'acide lithocholique (1) est un facteur limitant pour la polycondensation. Le rendement de cette dernière n'excède pas les $40 \pm 5\%$. Cependant, la fonction ester est, une fois formée, plus robuste et moins facilement hydrolysable.

Trois polymères de masses molaires différentes sont synthétisés avec pour composition molaire : LCA/SA (48/52) (Tableau 3-6). Pour obtenir des masses molaires différentes, le paramètre qui varie dans le protocole est le temps de la polymérisation.

Tableau 3-6. Masse moléculaire moyenne M_n et propriétés thermiques des Copolymères (LCA-SA) obtenus en faisant varier le temps de polycondensation

M_n (g/mol)	T_g (°C)	Temps de polycondensation (min)
8 000	47,9	5
7 000	40,9	10
1 600	22,4	120

Les polymères obtenus sont des polymères amorphes. Nous pouvons constater que la T_g dépend de la masse molaire des polymères obtenus. Plus la masse molaire diminue, plus la T_g diminue. En effet, plus la masse molaire des polymères augmente, plus le nombre de bouts de chaîne qui ont une plus grande mobilité par rapport au squelette intérieur du polymère diminue, plus la mobilité moléculaire diminue. Ce qui entraîne une augmentation de la température de transition vitreuse. Ce phénomène est présent dans la littérature [112]. Mais cette dépendance de la T_g à la masse molaire moyenne des polymères amorphes peut être affectée par d'autres paramètres tels que la cristallinité du produit, la complexité du squelette du polymère, les effets des bouts de chaînes, l'enchevêtrement des chaînes.

- Dégradation des polymères

Quelque soit la masse molaire moyenne M_n des polymères synthétisés, l'évolution de la masse molaire moyenne M_n est la même. En 24 heures, la masse molaire atteint les 1 500 g/mol (Tableau 3-7).

Tableau 3-7. Changement de la masse molaire moyenne M_n des copolymères (LCA-SA), (48/52), de masses molaires moyennes M_n différentes, au cours de la dégradation à 37,5°C dans une solution tampon de phosphate (pH 7,4)

Masse molaire des polymères (g/mol)	
Début	24 heures
8 000	1 700
7 000	1 700
1 600	1 500

Nous pouvons constater que la perte de masse est plus rapide pour le polymère avec une masse molaire de 1 600 g/mol alors que les deux autres polymères présentent le même profil de dégradation (Figure 3-15). Ce phénomène s'explique par les propriétés thermiques des polymères. En effet, ils sont tous les trois des polymères amorphes qui sont étudiés à 37,5°C, conditions physiologiques. Le polymère de 1 600 g/mol a une T_g inférieure aux conditions physiologiques. Il se trouve donc dans son état de transition à cette température, ce qui entraîne une plus grande flexibilité, une meilleure diffusion des molécules d'eau dans le matériel et donc une hydrolyse accélérée. De plus, du fait du poids moléculaire plus faible, la « concentration » en bouts de chaînes et donc en fonctions acides est plus importante dans la première phase de dégradation, ce qui contribue à catalyser l'hydrolyse. Pour ce type de copolymère : LCA-SA (48/52), plus la masse molaire est élevée, plus la température de transition est élevée. Les polymères avec une T_g supérieure à 37,5°C sont donc plus lentement dégradés.

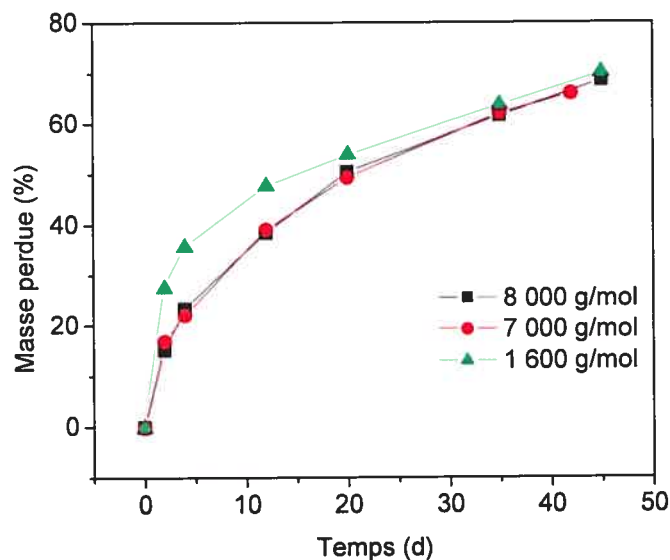


Figure 3-15. Perte de la masse des pastilles des copolymères (LCA-SA), (48/52) de masses molaires moyennes M_n différentes. Dégradation faite à 37,5°C dans une solution tampon de phosphate (pH 7,4)

L'étude par HPLC vient compléter l'analyse par gravimétrie. En effet, une corrélation existe entre les deux figures 3-15 et 3-16. Les vitesses de dégradation et de libération de l'acide sébacique sont très rapides dans les cinq premiers jours puis elles ralentissent. Ce phénomène s'explique par le fait que l'acide sébacique est beaucoup plus hydrophile et plus soluble que l'acide lithocholique, il passe donc plus facilement et rapidement dans la solution de tampon phosphate. Donc la masse perdue dans les cinq premiers jours correspond principalement à de l'acide sébacique.

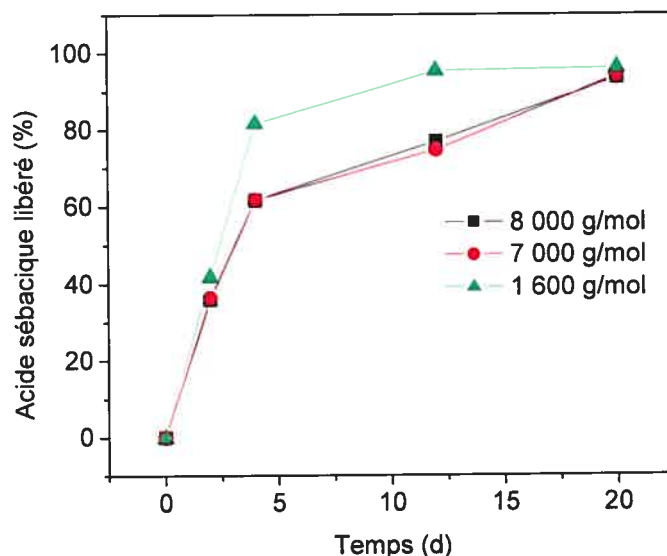


Figure 3-16. Pourcentage d'acide sébacique libéré des copolymères (LCA-SA), (48/52) de masses molaires moyennes M_n différentes dans la solution tampon de phosphate (pH 7,4) à 37,5°C, au cours de la dégradation

- Vitesse de relargage

Dans un premier temps, nous pouvons constater que plus la masse molaire du polymère est élevée, plus la libération de la sonde est lente (Figure 3-17). Mais en étudiant la vitesse, nous pouvons voir que c'est dans les premières 24 heures que ce phénomène est plus marqué (Figure 3-18). En effet, pendant les 24 premières heures, une grande différence apparaît au niveau de la vitesse de libération, pour le polymère de 1 500 g/mol, la vitesse de libération est de 1,622 mg/d alors que pour le polymère de 8 000 g/mol, elle est de 0,848 mg/d. Ensuite la vitesse de libération présente la même vitesse quelque soit le polymère étudié, nous pouvons constater qu'elle est linéaire. En traçant une régression linéaire après les premières 24 heures, la vitesse de relargage de la sonde obtenue pour les trois polymères est 0,0250 mg/d avec des valeurs de R^2 de 0,94.

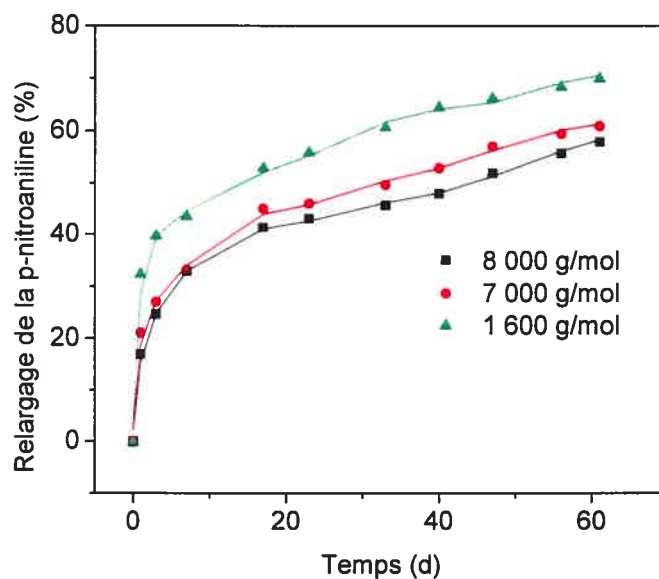


Figure 3-17. Relargage de la sonde contenue dans les copolymères (LCA-SA), (48/52) de masses molaires moyennes M_n différentes dans la solution tampon de phosphate (pH 7,4) à 37,5°C

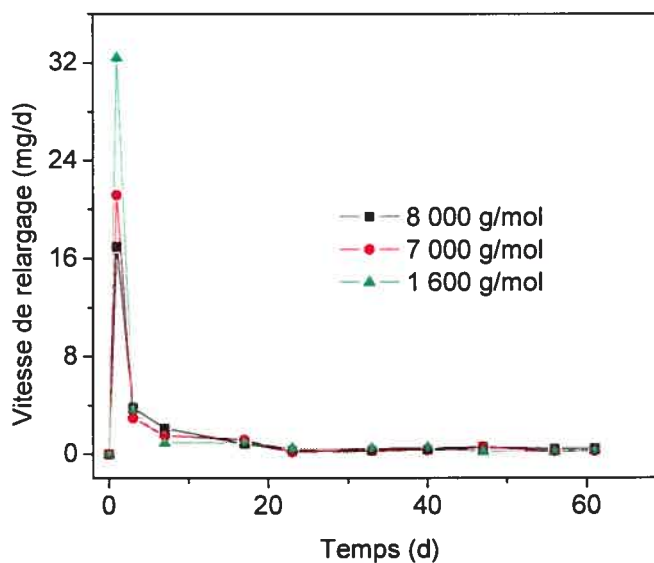


Figure 3-18. Vitesse de relargage de la sonde contenue dans les copolymères (LCA-SA), (48/52) de masses molaires moyennes M_n différentes dans la solution tampon de phosphate (pH 7,4) à 37,5°C

Nous pouvons constater qu'avec les deux études effectuées, l'influence de la masse molaire intervient plus sur le relargage de la sonde que sur la dégradation des polymères. La masse molaire ayant une influence sur les propriétés thermiques, joue un rôle sur la dégradation si on est en présence de polymères amorphes présentant une T_g inférieure aux conditions physiologiques soit $37,5^\circ\text{C}$. L'hydrophobicité et le nombre de « bouts de chaînes » acides jouent également un rôle.

Nous pouvons voir que dans les premières 24 heures, la masse molaire du polymère intervient fortement sur la vitesse de relargage de la sonde : plus elle est élevée, plus la vitesse de libération diminue. Par contre dans la seconde phase, l'influence est moindre. Ceci s'explique par l'évolution de la masse molaire des polymères au cours de la dégradation. En effet, la masse molaire diminue fortement au bout de 24 heures quelque soit le polymère étudié. Ce phénomène correspond à l'hydrolyse des liaisons chimiques des polymères. Après un nombre de scissions suffisantes, les chaînes sont réduites à l'état de monomères ou de petits oligomères soluble, ce qui entraîne le relargage de la sonde qui est mélangée au polymère. Plus la masse molaire de départ des polymères est faible, plus la formation d'oligomères est rapide, plus vite est le relargage de la sonde. La masse molaire étant la même après 24 heures pour tous les polymères, son influence est moindre sur le relargage. En effet tous les polymères présentent les mêmes caractéristiques physicochimiques.

3.5 Influence de la composition des polymères

3.5.1 Composition des polymères en partant de l'acide lithocholique (1)

Des polymères de compositions différentes sont synthétisés en faisant varier la composition molaire acide lithocholique/acide sébacique avec un rendement de $40 \pm 5\%$. Les polymères obtenus sont soit alternés soit statistiques (Tableau 3-8).

Tableau 3-8. Masse molaire moyenne M_n et propriétés thermiques des copolymères (LCA-SA) de compositions molaires différentes

M_n (g/mol)	LCA (%)	SA (%)	T_g (°C)	T_f (°C)	T_c (°C)	ΔH (J/g)
8 000	48	52	47,9	/	/	/
7 500	42	58	42,9	/	/	/
15 000	38	62	32,6	/	/	/
8 000	33	67	14,1	47,1	29,5	6,28
15 000	20	80	12,5	54,5	37,5	21,63
18 000	6	94	3,7	74,5	54,8	23,62

La rigidité des chaînes des polymères intervient sur la T_g . En effet plus la rigidité est importante, plus la T_g est élevée. L'acide lithocholique est le monomère le plus rigide, donc plus sa proportion est élevée dans le polymère, plus la T_g est élevée. De plus, comme les polymères sont statistiques, il est plus difficile d'obtenir des polymères semi-cristallins. Le premier polymère présentant une température de fusion et une température de cristallisation contient 67,5% d'acide sébacique. Les températures de fusion et de cristallisation ainsi que l'énergie à fournir pour la fusion de la phase cristalline ΔH augmentent avec l'augmentation de la proportion d'acide sébacique dans le polymère. Ce phénomène concorde avec la littérature [113, 114]. Ces différences de propriétés physicochimiques vont jouer un rôle sur la dégradation des polymères.

- Dégradation des polymères

Le suivi de la dégradation par Infra-rouges (Figure 3-19) met bien en évidence l'hydrolyse des liaisons anhydrides, du fait de la disparition du pic à 1816 cm^{-1} et de la formation d'acide par l'apparition du pic à 1709 cm^{-1} . L'hydrolyse des liens anhydrides,

elle, est pratiquement complète en 24 heures. Ceci nous indique que la pénétration de l'eau au cœur de la matrice des polymères est très rapide.

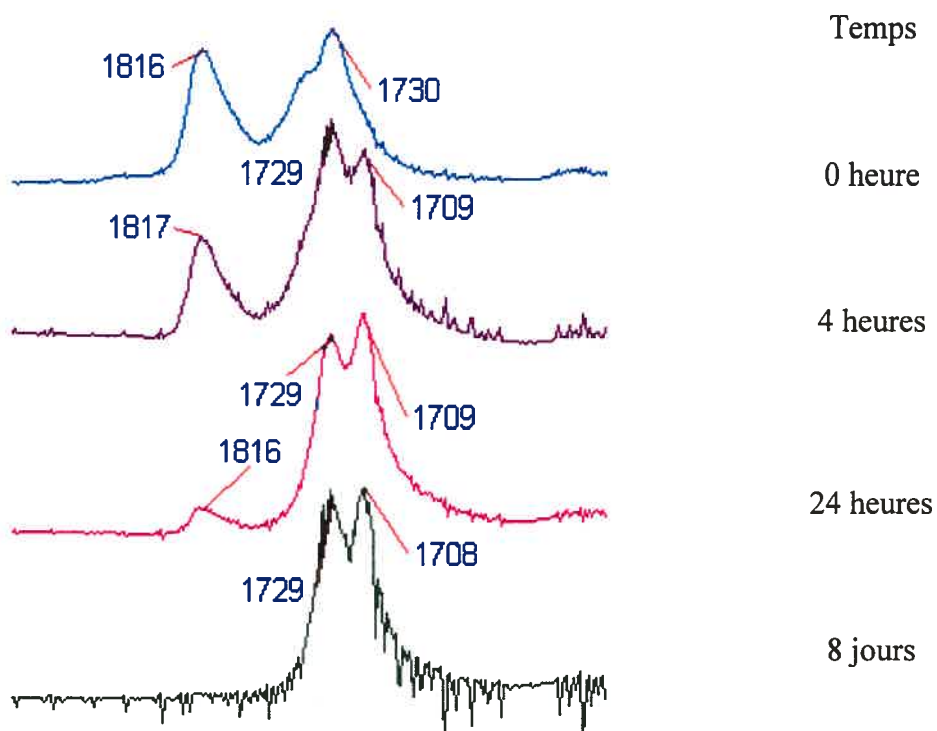


Figure 3-19. Suivi de l'hydrolyse des liaisons anhydrides des copolymères (LCA-SA) par IR

Les polymères, quelque soit leur composition, ont une masse molaire moyenne M_n avoisinant les 1 500 g/mol en 24 heures (Tableau 3-9). La formation d'oligomères indique l'hydrolyse des liens anhydrides. Cette chute de la masse molaire est en corrélation avec l'évolution du pic des liaisons anhydrides à 1816 cm^{-1} qui disparaît pratiquement au bout de 24 heures.

Tableau 3-9. Changement de la masse molaire moyenne M_n des copolymères (LCA-SA) de composition molaire différente, au cours de la dégradation à 37,5°C dans une solution tampon de phosphate (pH 7,4)

Composition molaire des copolymères (LCA-SA)	Masse molaire des polymères (g/mol)	
	Début	24 heures
48/52	8 000	1 700
20/80	15 200	1 500
6/94	17 800	1 500

Nous pouvons constater que plus les polymères ont une composition riche en acide sébacique, plus leur dégradation est rapide (Figure 3-20). Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que l'acide sébacique est plus hydrophile et plus soluble que l'acide lithocholique et il passe donc plus facilement dans le tampon. La vitesse de dégradation des polymères peut être divisée en deux parties linéaires (Tableau 3-10). La différence de vitesse de dégradation entre les différents polymères est plus marquée entre le premier et le cinquième jour, ensuite elle est environ du même ordre pour tous les polymères.

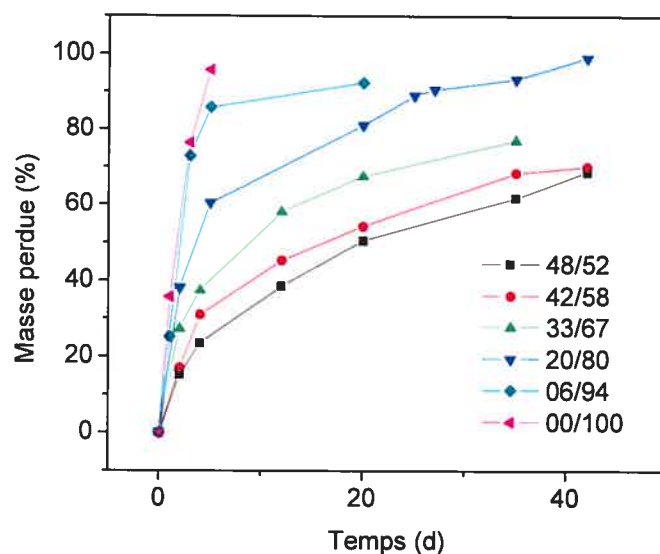


Figure 3-20. Perte de la masse des pastilles des polymères (LCA-SA) de composition molaire différente. Dégradation faite à 37,5°C dans une solution tampon de phosphate (pH 7,4)

Tableau 3-10. Dégradation des copolymères (LCA-SA) de composition molaire différente

Pourcentage en acide sébacique contenu dans le polymère (%)	Dégradation du premier au cinquième jour (mg.cm ⁻² .d ⁻¹)	Dégradation après le cinquième jour (mg.cm ⁻² .d ⁻¹)
100	14,167	/
94	13,300	0,326
80	8,886	0,705
67,5	7,083	0,684
57,7	5,871	0,712
52	4,465	0,729

En suivant la dégradation par HPLC (Figure 3-21), nous pouvons constater que pratiquement la totalité de l'acide sébacique, environ 93%, passe en solution au bout de 20 jours mais la majorité est partie au bout du cinquième jour. Le profil de la vitesse de la perte d'acide sébacique est similaire à celui de la perte de masse des polymères.

Quelque soit la composition initiale des polymères, l'acide sébacique, le composé le plus sensible à l'érosion, se solubilise en premier; ce qui explique le fait que plus le polymère en contient, plus rapide est sa dégradation. De plus, plus le polymère contient d'acide sébacique, plus vite s'effectue le relargage de l'acide lithocholique.

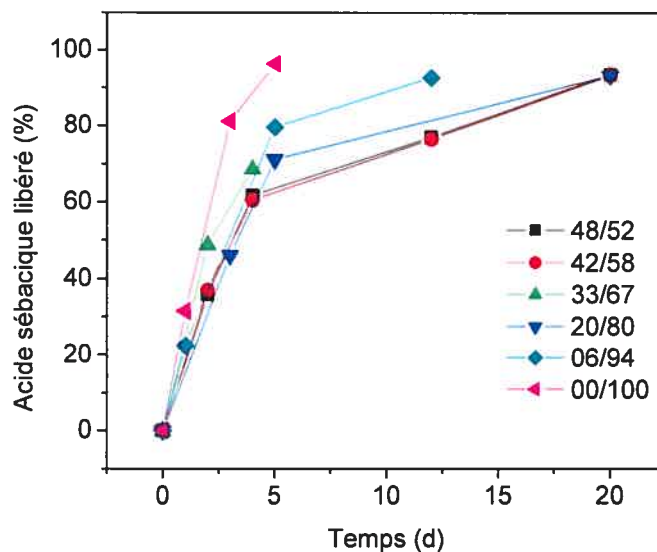


Figure 3-21. Pourcentage d'acide sébacique libéré des copolymères (LCA-SA) de composition molaire différente dans la solution tampon de phosphate (pH. 7,4) à 37,5°C, au cours de la dégradation

- Vitesse de relargage

Nous pouvons constater que ce sont les premières 24 heures qui déterminent l'influence du relargage de la sonde (Figures 3-22 et 3-23). La vitesse de relargage varie fortement en fonction de la composition du polymère. Plus ce dernier contient de l'acide sébacique, plus important est le relargage (Tableau 3-11). En effet, en 24 heures, une différence de 10% est à noter entre le polymère ayant 94% d'acide sébacique et celui avec 52% d'acide sébacique, la vitesse est pratiquement le double. La différence de la vitesse de relargage s'atténue avec le temps, les polymères ensuite présentent approximativement la même vitesse. Ceci peut s'expliquer en regardant les profils des vitesses de dégradation et de relargage. En effet ils présentent une corrélation. Le relargage de la sonde est dépendant de la dégradation. Plus vite se dégrade le polymère, plus vite est son relargage. Au début, le pic de relargage correspond à la rapide

dégradation de l'acide sébacique et à sa dissolution. Ensuite, restent des îlots riches en acides biliaires qui relarguent plus lentement. Plus la composition en acide sébacique est élevée, plus le pic initial de relargage est important. L'érosion, la dégradation et le relargage s'effectuent à la même vitesse.

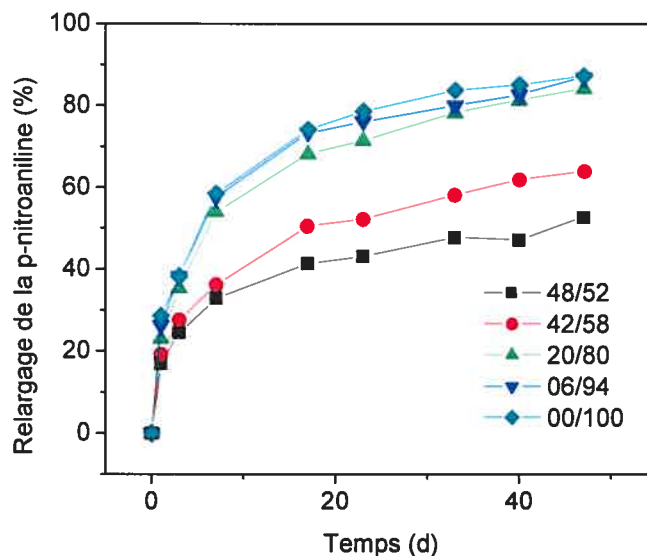


Figure 3-22. Relargage de la sonde contenue dans les copolymères (LCA-SA) de composition molaire différente dans la solution tampon de phosphate (pH 7,4) à 37,5°C

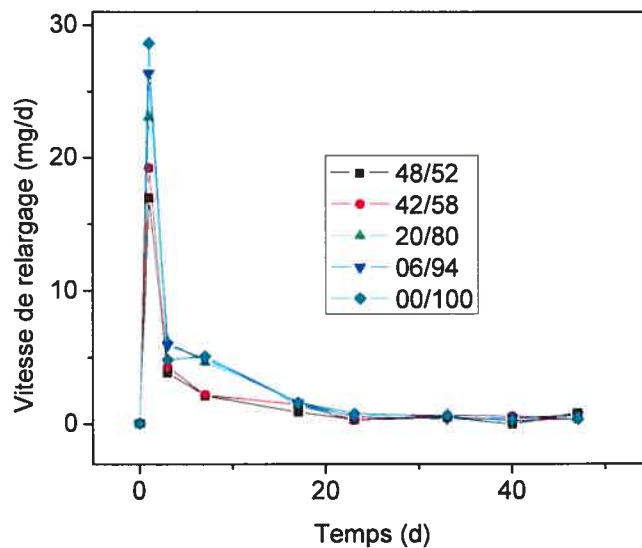


Figure 3-23. Vitesse de relargage de la sonde contenue dans les copolymères (LCA-SA) de composition molaire différente dans la solution tampon de phosphate (pH 7,4) à 37,5°C

Tableau 3-11. Vitesse de relargage de la p-nitroaniline dans les copolymères (LCA-SA) de composition molaire différente

Jours	Vitesse de relargage de la sonde (mg/d)
Entre 0 et 1	Entre 0,853 et 1,438
Entre 1 et 7	Entre 0,130 et 0,259
Après 7	Entre 0,022 et 0,029

3.5.2 Composition des polymères en partant du dimère d'acide lithocholique (4)

Des copolymères alternés, statistiques dans des compositions molaires différentes (Dimère LCA-SA) avec un rendement de $50 \pm 5\%$ sont synthétisés (Tableau 3-12).

Tableau 3-12. Masse molaire moyenne M_n et propriétés thermiques des copolymères (Dimère LCA-SA) de composition molaire différente

M_n (g/mol)	Dimère LCA (%)	SA (%)	T_g (°C)	T_f (°C)	T_c (°C)	ΔH (J/g)
23 300	45,8	54,2	39,6	/	/	
29 700	28,1	71,9	28,6	66,1	47,3	5,9
12 500	19,4	80,6	16,0	68,4	50,6	17,3
20 300	8,6	91,4	11,5	69,0	54,0	27,9

Au niveau des propriétés thermiques, les mêmes conclusions que pour les polymères à partir de l'acide lithocholique peuvent être tirées. En effet plus le polymère contient de l'acide sébacique, le monomère le plus flexible, plus la T_g décroît et plus les températures de fusion et cristallisation augmentent.

Nous pouvons noter aussi que plus le polymère contient de l'acide sébacique, plus le polymère est cristallin. En effet, pour le polymère ayant 91,4% d'acide

sébacique, l'énergie à fournir pour la fusion de la phase cristalline est de 27,9 J/g alors qu'elle n'est que de 5,9 J/g pour celui avec 71,9% d'acide sébacique. De plus comme ce sont des polymères alternés, statistiques, ils présentent de façon générale une structure peu cristalline.

- Dégradation des polymères

A peine en 24 heures, pratiquement la totalité des liens anhydrides est hydrolysée. En effet nous pouvons voir par Infra-rouges la diminution du pic à 1816 cm^{-1} et en même temps l'apparition du pic correspondant aux acides carboxyliques à 1709 cm^{-1} , ce qui signifie que la pénétration de l'eau est rapide (Figure 3-24).

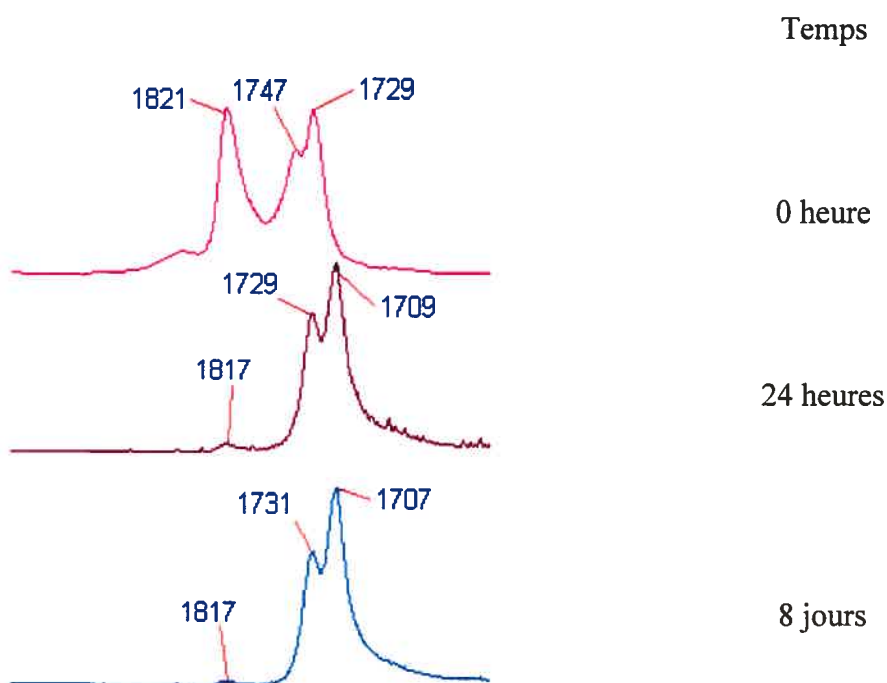


Figure 3-24. Suivi de l'hydrolyse des liaisons anhydrides des copolymères (Dimère LCA-SA) par I

Au bout de 24 heures, nous sommes en présence d'oligomères, ce qui signifie que les liens anhydrides sont hydrolysés. Le suivi de la masse molaire des polymères (Tableau 3-13) est en parfait accord avec le suivi de la dégradation par Infra-rouge (Figure 3-24). Comme pour les polymères à partir de l'acide lithocholique, nous

pouvons dire que quelque soit la composition des polymères, l'évolution de la masse molaire des polymères est la même après un jour.

Tableau 3-13. Changement de la masse molaire moyenne M_n des copolymères (Dimère LCA-SA) de composition molaire différente, au cours de la dégradation à 37,5°C dans une solution tampon de phosphate (pH 7,4)

Composition molaire des copolymères (LCA-SA)	Masse molaire des polymères (g/mol)	
	Début	24 heures
45,8/54,2	23 300	1 600
28,1/71,9	29 700	1 500
19,4/80,6	12 500	1 500
8,6/91,4	20 300	1 400

Plus les polymères ont une composition riche en acide sébacique, plus vite la perte de masse est importante (Figure 3-25). En 48 heures, la différence de perte est d'environ 40% entre le polymère contenant 91,4% d'acide sébacique et celui en contenant 54,20%. La dégradation n'est pas linéaire, chaque polymère présentent deux parties : une dégradation rapide jusqu'au cinquième jour et ensuite une dégradation beaucoup plus lente, approximativement similaire pour tous les polymères (Tableau 3-14). La dégradation des polymères à partir du dimère de l'acide lithocholique est similaire aux polymères à partir d'acide lithocholique.

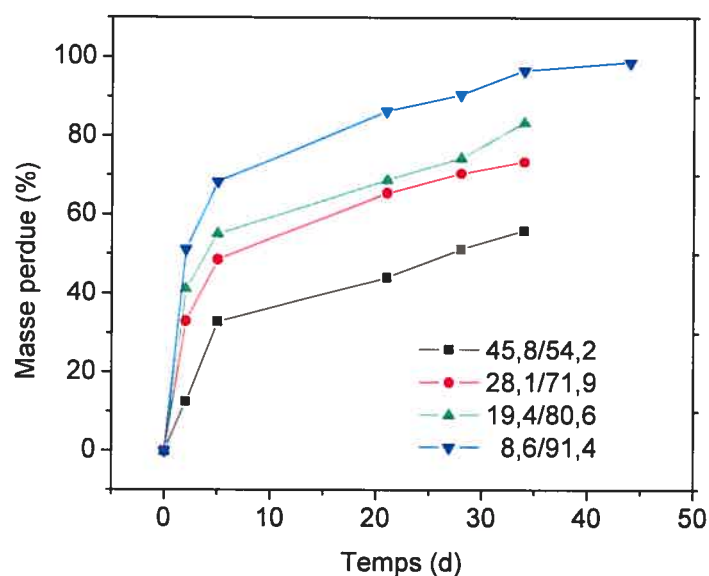


Figure 3-25. Perte de la masse des pastilles des copolymères (Dimère LCA-SA) de composition molaire différente. Dégradation faite à 37,5°C dans une solution tampon de phosphate (pH 7,4)

Tableau 3-14. Dégradation des copolymères (Dimère LCA-SA) de composition molaire différente

Pourcentage en acide sébacique contenu dans le polymère (%)	Dégradation du premier au cinquième jour (mg.cm ⁻² .d ⁻¹)	Dégradation après le cinquième jour (mg.cm ⁻² .d ⁻¹)
100	14,167	/
91,4	9,894	0,610
80,6	7,984	0,720
71,9	7,113	0,667
54,2	5,000	0,750

En une vingtaine de jours, tous les polymères pratiquement perdent tout l'acide sébacique qu'ils contiennent (Figure 3-26). Nous pouvons voir, au niveau de la dégradation, que la perte de masse d'acide sébacique est très rapide jusqu'au cinquième jour. En effet au cinquième jour, entre 82 et 89% d'acide sébacique est érodé.

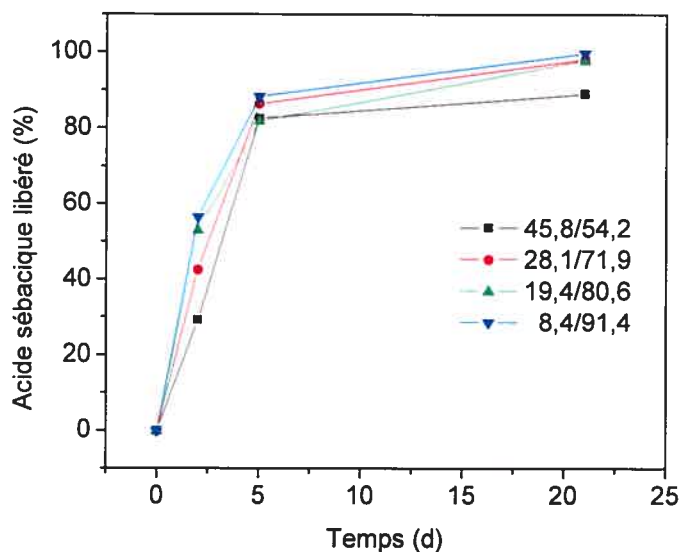


Figure 3-26. Pourcentage d'acide sébacique libéré des copolymères (Dimère LCA-SA) de composition molaire différente dans la solution tampon de phosphate (pH 7,4) à 37,5°C, au cours de la dégradation

- Vitesse de relargage

Le relargage de la sonde est influencé par la composition du polymère. Plus ce dernier contient de l'acide sébacique, plus le relargage est important (Figures 3-27 et 3-28). Plus exactement c'est la vitesse des 4 premiers jours qui varie selon le polymère. Nous pouvons noter une différence de 25% entre le polymère ayant 91,4% d'acide sébacique et celui avec 54,2% d'acide sébacique. Ensuite la vitesse de relargage est approximativement similaire (Tableau 3-15). Comme pour la première étude avec les polymères d'acide lithocholique, nous pouvons noter une certaine corrélation entre la vitesse de dégradation des polymères et la vitesse de relargage.

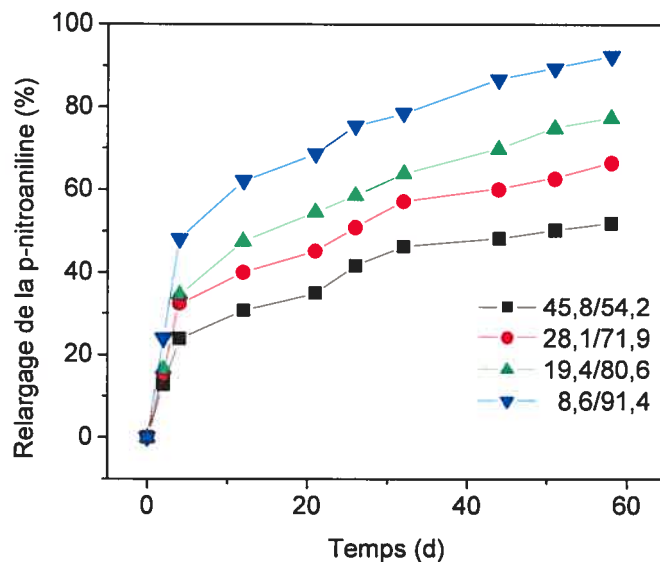


Figure 3-27. Relargage de la sonde contenue dans les copolymères (Dimère LCA-SA) de composition molaire différente dans la solution tampon de phosphate (pH 7,4) à 37,5°C

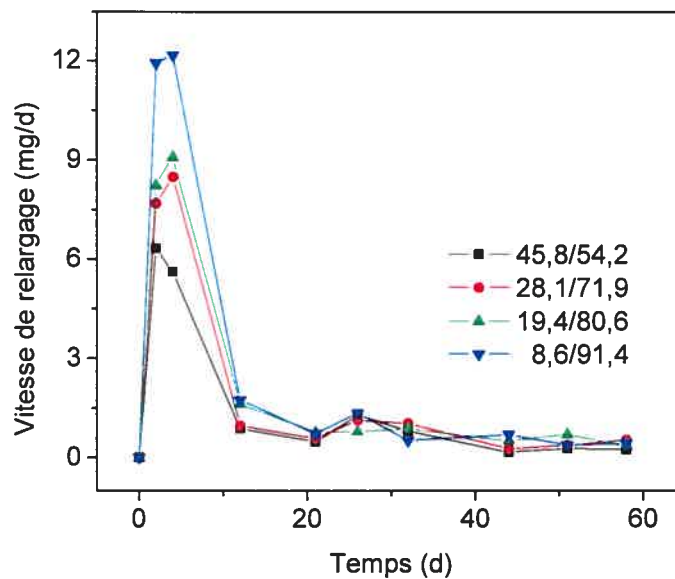


Figure 3-28. Vitesse de relargage de la sonde contenue dans les copolymères (Dimère LCA-SA) de composition molaire différente dans la solution tampon de phosphate (pH 7,4) à 37,5°C

Tableau 3-15. Vitesse de relargage de la p-nitroaniline dans les copolymères (Dimère LCA-SA) de composition molaire différente

Jours	Vitesse de relargage de la sonde (mg/d)
Entre 0 et 4	Entre 0,299 et 0,604
Après 4	Entre 0,026 et 0,039

Les résultats obtenus grâce à ces deux études sont similaires : copolymères (LCA-SA) et copolymères (Dimère LCA-SA). Nous avons pu constater que dans un premier temps, plus les polymères contiennent de l'acide sébacique, plus la T_g diminue, et les températures de fusion et de cristallisation augmentent. De plus, la composition des polymères influence la dégradation des polymères et le relargage de la sonde. Plus la composition en acide sébacique est importante, plus la dégradation et le relargage sont importants. Pour les deux études, nous constatons que les liaisons anhydrides sont hydrolysées rapidement, pratiquement toutes les liaisons en 24 heures. La pastille de polymère ne contient plus que des oligomères au bout d'un jour d'étude. Cela montre que l'érosion des polymères se passe aussi bien à la surface qu'à l'intérieur de la matrice, la diffusion de l'eau au sein de la matrice a lieu.

D'après ces deux études de l'effet de composition, il est donc apparent que le mécanisme de dégradation des copolymères alternés se divise en deux parties. Le premier, les cinq premiers jours, est caractérisée par un pic d'érosion du polymère et de relargage de la sonde. En effet l'hydrolyse des liaisons chimiques du polymère entraîne la formation d'oligomères d'acide sébacique et d'acide lithocholique. L'acide sébacique étant un monomère très flexible, hydrophile et très soluble, nous observons initialement, en majeure partie, la dissolution de l'acide sébacique. C'est pourquoi les polymères plus riches en acide sébacique se dégradent plus vite et ont une vitesse de dégradation plus rapide dans les premiers jours et que le relargage est plus rapide aussi du fait que plus de monomères vont dans la solution tampon, plus d'espace libre se crée pour faciliter le relargage de la sonde.

La seconde phase, plus lente et s'étalant sur plusieurs semaines, est caractérisée par des vitesses d'érosion et de relargage à peu près identiques quelque soit la composition initiale. Ce qui suggère une dégradation dominée par la dissolution de

l'acide lithocholique ou du dimère d'acide lithocholique, présentant un caractère hydrophobe, bien moins solubles que l'acide sébacique dans le milieu tampon. La sonde restant est emprisonnée par les îlots d'acides biliaires, la vitesse de relargage de la sonde est donc suivant la vitesse de dissolution des acides biliaires.

Ces profils indiquent une dégradation homogène du fait que la vitesse de dégradation n'est pas linéaire dans le temps.

Nous pouvons constater qu'il n'y a pas une grande différence entre les deux types de copolymères. L'utilisation de l'acide lithocholique ou du dimère de l'acide lithocholique pour former des copolymères alternés ou statistiques donne les mêmes profils de dégradation et de relargage.

3.6 Comparaison des polymères alternés, statistiques avec les polymères blocs

Différents polymères sont synthétisés selon deux méthodes : la polycondensation en solution produisant des polymères alternés, statistiques avec un rendement de $50 \pm 5\%$ et celle à l'état fondu d'après le mode opératoire développé par Sébastien Guoin [118] produisant des polymères blocs avec un rendement de $90 \pm 5\%$ (Tableau 3-16)

Tableau 3-16. Masse molaire moyenne M_n et propriétés thermiques des copolymères (Dimère LCA-SA) statistiques et blocs

Type de polcondensation	M_n (g/mol)	Dimère LCA (%)	SA (%)	T_g (°C)	T_f (°C)	T_c (°C)	ΔH (J/g)
En solution	23 300	45,8	54,2	39,6	/	/	/
Etat fondu	5 100	39,2	60,8	35,3	/	/	/
En solution	29 700	28,1	71,9	28,6	66,1	47,3	5,9
En solution	12 500	19,4	80,6	16,0	78,4	50,6	17,3
Etat fondu	15 800	15,6	84,4	11,2	68,5	50,0	28,8
En solution	20 300	8,6	91,4	11,5	69,0	54,0	27,9
Etat fondu	10 600	8,1	91,9	6,1	77,2	54,7	50,02

Nous pouvons constater que les propriétés thermiques des polymères blocs sont influencées par les mêmes paramètres que pour celles des polymères statistiques. En effet, plus la composition en acide sébacique augmente, plus la T_g diminue.

De plus nous pouvons noter que pour le polymère bloc avec 91,9% d'acide sébacique, l'énergie qu'il faut fournir pour la fusion de la phase cristalline du polymère est de 50,02 J/g alors que pour le polymère statistique ayant une composition similaire, 91,4% d'acide sébacique, il ne faut que 27,9 J/g. Nous pouvons donc voir que le pourcentage de la phase cristalline est beaucoup plus important pour des polymères blocs que pour des polymères statistiques.

De plus, plus la composition en acide sébacique augmente, plus la fusion de la partie cristalline demande d'énergie : le polymère bloc avec 91,9% d'acide sébacique : 50,02 J/g, pour celui avec 84,4% : 28,8 J/g. Et comme dans les études précédentes, les températures de fusion et de cristallisation augmentent aussi plus la composition en acide sébacique augmente.

- Dégradation des polymères

Au bout de 24 heures, nous pouvons constater (Figure 3-29) que le taux d'hydrolyse des liens anhydrides n'est pas le même si on est en présence de polymères blocs ou statistiques. L'hydrolyse est beaucoup plus rapide avec les polymères statistiques. Cette différence indique un mécanisme différent de dégradation. Ceci peut s'expliquer de deux façons. En effet, plus un polymère est cristallin, plus la pénétration de l'eau est difficile, ce qui a pour conséquence de diminuer la vitesse d'hydrolyse des liens anhydrides. De même, plus une phase contient d'éléments hydrophobes, plus la pénétration de l'eau est lente. Ces deux phénomènes (cristallinité et hydrophobicité) sont potentiellement plus marqués dans les copolymères blocs, comme l'indiquent les plus grandes énergies de fusion nécessaires : il existerait donc des phases riches en acide sébacique, plus cristallines et des phases plus riches en dimère d'acide lithocholique, plus hydrophobes. Toutes deux devraient limiter la pénétration de l'eau au cœur de la pastille du polymère et donc la dégradation.

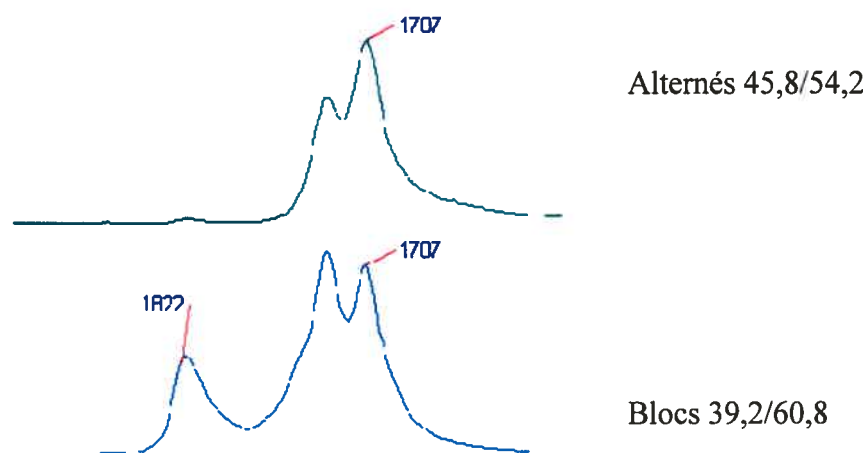


Figure 3-29. Hydrolyse des liaisons anhydrides des polymères (Dimère LCA-SA) statistiques et blocs au bout de 24 heures

Nous pouvons voir qu'au bout de 24 heures, nous sommes en présence d'oligomères pour les deux types de polymères (Figure 3-30). Ce phénomène s'explique dans un premier temps par la dégradation du polymère : il y a des coupures des liaisons chimiques uniformes du squelette du polymère entre les unités de répétition. Cette

dégradation entraîne une hausse d'oligomères donc la hausse de la masse molaire moyenne M_n . Mais la masse molaire moyenne M_n des polymères statistiques continue à diminuer dans le temps alors que celle des polymères blocs se stabilise. Cette différence complète l'information de l'étude IR (Figure 3-29). En effet, ceci indique que la diffusion de l'eau dans la pastille pour les polymères statistiques est plus rapide que la dégradation du polymère à la surface, ce qui entraîne une dégradation totale du polymère (surface et cœur de la pastille) alors que pour les polymères blocs, la dégradation de surface de la pastille est plus rapide que la diffusion de l'eau dans le cœur de la pastille. Cette étude de la diminution de la masse molaire M_n sur les polymères blocs a été effectuée par d'autres groupes de recherches et leurs conclusions sont semblables [66, 115].

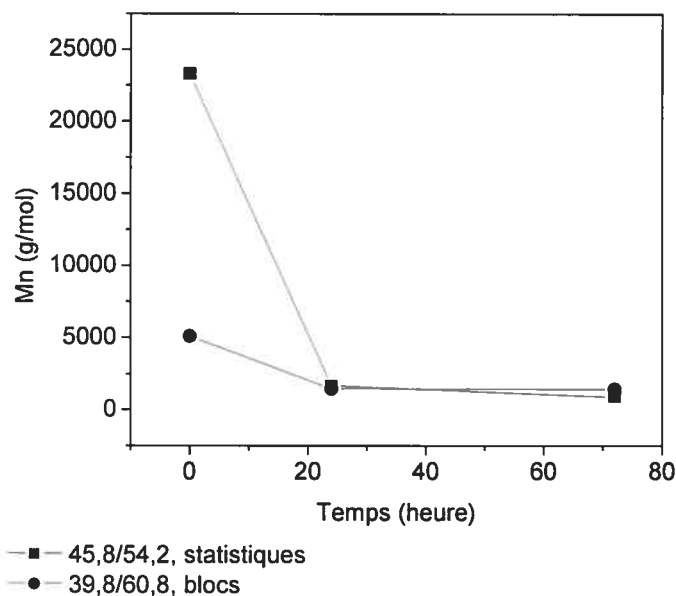


Figure 3-30. Comparaison du changement de la masse molaire moyenne M_n des copolymères (Dimères LCA-SA) statistiques et blocs, au cours de la dégradation à 37,5°C dans une solution tampon de phosphate (pH 7,4)

Nous pouvons constater que la dégradation est plus rapide pour les polymères statistiques que blocs (Figure 3-31 et Tableau 3-17). Cet écart augmente avec la proportion d'acide biliaire dans le polymère. De plus, plus les polymères blocs approchent d'une composition 50/50, plus leur vitesse de dégradation est linéaire. Ce qui indique une dégradation au caractère hétérogène plus marqué (dégradation de surface de la pastille), ce que les résultats des analyses IR (Figure 3-29) et de CES (Figure 3-30) laissaient supposer.

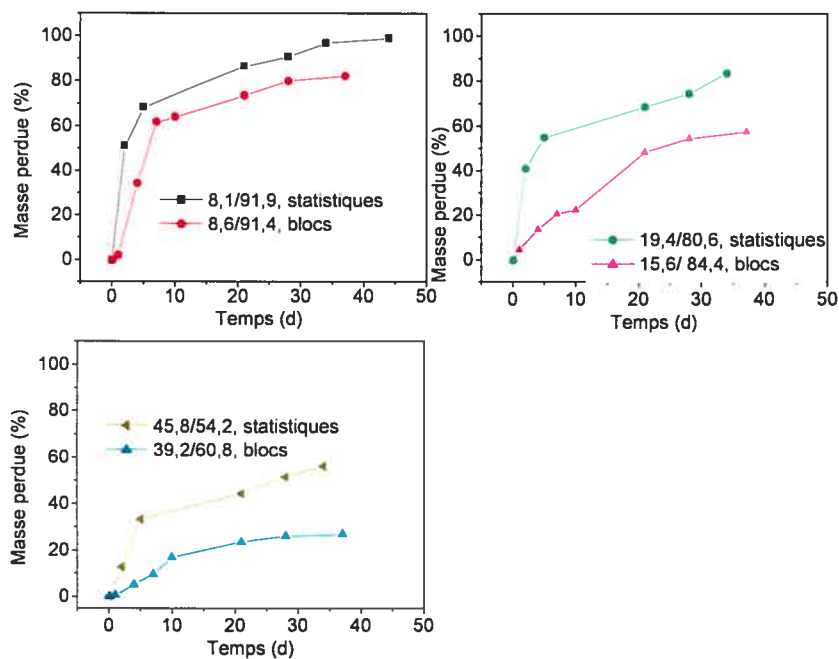


Figure 3-31. Comparaison de la perte de la masse des pastilles des copolymères (Dimère LCA-SA) statistiques et blocs. Dégradation faite à 37,5°C dans une solution tampon de phosphate (pH 7,4)

Tableau 3-17. Dégradation des copolymères (Dimère LCA-SA) statistiques et blocs

Pourcentage en acide sébacique contenu dans le polymère (%)	Polycondensation	Dégradation du premier au cinquième jour (mg.cm ⁻² .d ⁻¹)	Dégradation après le cinquième jour (mg.cm ⁻² .d ⁻¹)
100	En solution	14,167	/
91,9	Etat fondu	6,916	0,537
91,4	En solution	9,894	0,610
84,4	Etat fondu	1,262	1,262
80,6	En solution	7,984	0,720
71,9	En solution	7,113	0,667
60,8	Etat fondu	0,577	0,577
54,2	En solution	5,000	0,750

La perte de masse d'acide sébacique est plus rapide pour les polymères statistiques (Figure 3-32). Cela vient du fait que dans les polymères blocs, l'acide sébacique est mieux retenu, il reste emprisonné dans la pastille. En effet comme la dégradation est hétérogène, elle ne se passe qu'en surface donc l'acide sébacique se trouvant au cœur de la pastille est mieux retenu.

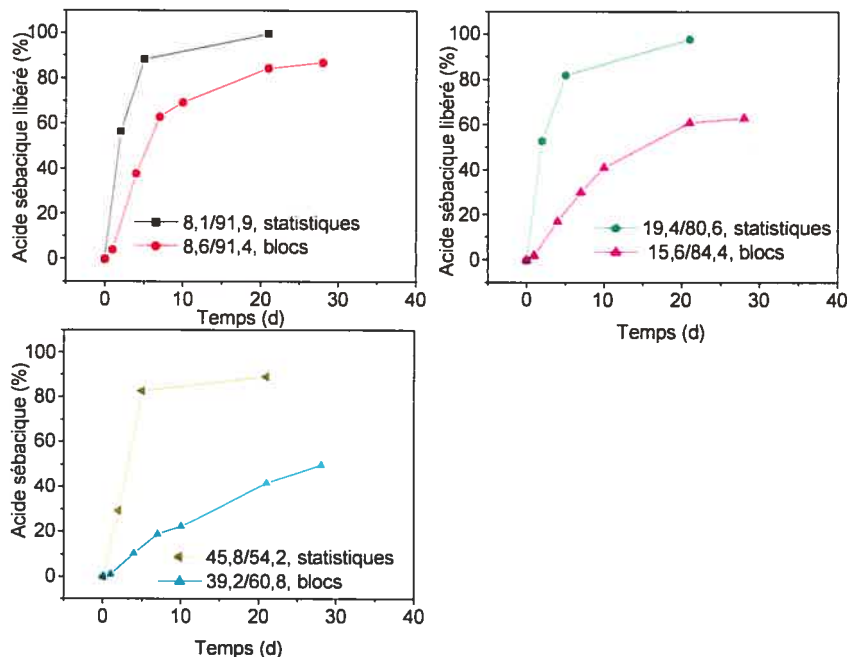


Figure 3-32. Comparaison du pourcentage d'acide sébacique libéré des copolymères (Dimère LCA-SA) statistiques et blocs dans la solution tampon de phosphate (pH. 7,4) à 37,5°C, au cours de la dégradation

- Vitesse de relargage

Le relargage de la sonde est plus rapide pour les polymères statistiques. La vitesse de relargage pour les polymères alternés suit deux vitesses. La première est très rapide jusqu'au cinquième jour, plus le polymère contient de l'acide sébacique, plus le relargage de la sonde est important. Ceci provient du pic d'érosion dû à la dissolution rapide de l'acide sébacique. Une vitesse plus lente et linéaire s'installe ensuite à des vitesses allant de 0,026 à 0,039 mg/d pour des pourcentages en acide sébacique croissant (Tableau 3-18).

Nous pouvons constater que la vitesse de relargage pour les polymères blocs est à peu près constante et que le premier pic d'érosion est plus faible. La vitesse de libération dans la partie linéaire, c'est à dire après le deuxième jour, varie entre 0,037 et 0,017 mg/d en fonction du pourcentage d'acide sébacique présent dans le polymère. La vitesse de libération de la sonde pour les polymères blocs est aussi en corrélation avec la vitesse de dégradation des polymères. En effet, elle a un comportement parallèle au profil de dégradation du polymère (Tableau 3-18).

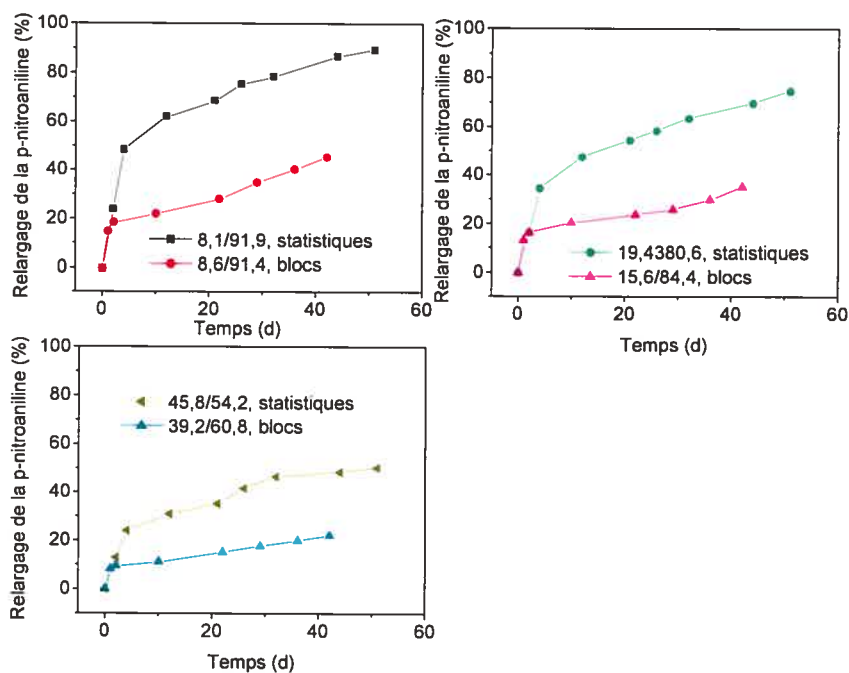


Figure 3-33. Comparaison du relargage de la sonde contenue dans les copolymères (Dimères LCA-SA) statistiques et blocs dans la solution tampon de phosphate (pH. 7,4) à 37,5°C

Tableau 3-18. Vitesse de relargage de la p-nitroaniline dans les copolymères (Dimère LCA-SA) statistiques et blocs

Type de polycondensation	Dimère LCA (%)	SA (%)	Commencement de la deuxième phase	Vitesse de libération (mg/d)	R ²
En solution	45,8	54,2	4 ^{ème} jour	0,026	0,90
Etat fondu	39,2	60,8	2 ^{ème} jour	0,017	1
En solution	28,1	71,9	4 ^{ème} jour	0,031	0,95
En solution	19,4	80,6	4 ^{ème} jour	0,038	0,98
Etat fondu	15,6	84,4	2 ^{ème} jour	0,022	0,94
En solution	8,6	91,4	4 ^{ème} jour	0,039	0,97
Etat fondu	8,1	91,9	4 ^{ème} jour	0,037	0,98

La comparaison entre les polymères blocs et les polymères statistiques nous a permis de mettre en avant plusieurs différences.

Dans un premier temps, au niveau de la synthèse, la polycondensation à l'état fondu est plus facile à mettre en œuvre, moins de paramètres doivent être contrôlés. De plus, elle donne de meilleurs rendements et il est plus aisé d'obtenir des poids moléculaires élevés. Il est aussi plus aisé d'avoir une meilleure reproductibilité des poids moléculaires avec la polycondensation à l'état fondu. On peut noter aussi que la polymérisation à l'état fondu ne demande pas l'utilisation de la triéthylamine, ce qui est un fort avantage pour une utilisation biomédicale. D'après la littérature, la majorité des synthèses de polyanhydrides à des fins biomédicales utilisées est la polycondensation à l'état fondu [72, 93, 113-117].

Les polymères blocs obtenus par polycondensation à l'état fondu présentent une cristallinité plus élevée en les comparant avec des polymères statistiques de même composition. La cristallinité et l'hydrophobicité sont des paramètres influents dans la dégradation du polymère, limitant la pénétration de l'eau. Nous le constatons lors de l'étude de la dégradation des polymères où nous voyons nettement que les polymères

blocs se dégradent beaucoup moins vite. Ce phénomène s'explique par la structure des polymères. Les polymères blocs présentent une plus grande hydrophobicité que les polymères statistiques. Cette hydrophobicité apporte une stabilité à la matrice, ce qui permet de limiter la diffusion de l'eau au sein de la matrice. La formation d'oligomères est donc ralentie, elle a lieu à la surface, puis petit à petit vers le centre de la matrice. Les polymères blocs présentent donc une érosion de surface alors que les polymères statistiques présentent une érosion de surface et en même temps au sein de la matrice.

La structure des polymères a également une influence similaire sur le relargage: le relargage de la sonde est moins rapide avec les polymères blocs. L'érosion des copolymères blocs étant plus lente, moins d'oligomères sont solubilisés donc la sonde est moins vite relarguée.

Les polymères blocs tendent vers une dégradation de profil hétérogène alors que les polymères statistiques tendent vers une dégradation homogène. En conclusion, le type de dégradation des polyanhydrides est un facteur important dans une utilisation biomédicale où il est préférable d'avoir un profil de dégradation et de relargage constant avec le temps pour un système à libération contrôlée d'un principe actif. Pour cette fin, les polyanhydrides préparés par polycondensation à l'état fondu sont des meilleurs candidats que ceux préparés par polycondensation en solution.

3.7 Polymérisations des autres acides biliaires avec le chlorure de sébacoyl

Pour cette polymérisation, deux types d'échantillons sont obtenus. Le premier type est le résultat de la polycondensation 46/54 diacide/dichlorure d'acyle. Pour le deuxième type d'échantillons, le ratio des réactifs de départ est modifié, le but est d'avoir l'équivalent de fonctions acides/alcools par rapport aux fonctions chlorure d'acyle. Nous avons tenu compte du fait que l'acide cholique possédait 1 fonction acide et 3 fonctions alcools et que, de ce fait, pour avoir autant de fonctions chlorure d'acyle, il faut avoir le double de chlorure de sébacoyl. Pour les deux autres acides biliaires, le surplus est de 3/2 du fait qu'ils possèdent une fonction alcool en moins.

L'acide cholique a du mal à se solubiliser, à cause de ses 3 fonctions alcools dans le DCM et la triéthylamine, ce qui ralentit la réaction avec le chlorure de sébacoyl. Pour

le même temps de polymérisation que les autres acides biliaires, les masses molaires obtenues sont beaucoup plus faibles (Tableau 3-19).

Tableau 3-19. Masse molaire moyenne M_n et propriétés thermiques des copolymères (acides biliaires/SA)

Ratio environ 46/54			
Acide biliaire	Position(s) des OH	M_n (g/mol)	T_g (°C)
Acide lithocholique	3 α -CH	8 000	47,9
Acide cholique	3 α -CH, 7 α -CH, 12 α -CH	3 200	3,8
Acide chénodéoxycholique	3 α -CH, 7 α -CH	7 900	26,7
Acide déoxycholique	3 α -CH, 12 α -CH	8 600	19,5
Même nombre de fonctions			
Acide lithocholique	3 α -CH	8 000	47,9
Acide cholique	3 α -CH, 7 α -CH, 12 α -CH	4 000	7,7
Acide chénodéoxycholique	3 α -CH, 7 α -CH	9 500	54,3
Acide déoxycholique	3 α -CH, 12 α -CH	9 000	46,7

Dans un premier temps, nous pouvons constater que les polymères obtenus sont des polymères amorphes. Certains ont des T_g inférieures à celle utilisée pour les études de relargage et de dégradation qui correspond aux conditions physiologiques : 37,5°C. Se trouvant donc à l'état viscoélastique lors des études, ils risquent d'être plus sensibles à la dégradation et au relargage. En effet ils présenteront une plus grande mobilité. Il est important de noter que les polymères à partir de l'acide cholique ont des T_g très basses, du au fait que la polymérisation n'a pas très bien marché pour cet acide, et que les masses molaires obtenues sont faibles.

De plus, la deuxième remarque intéressante est que nous n'obtenons pas les mêmes T_g lors des deux études avec: ratio environ 46/54 et même nombre de fonctions. Les T_g sont plus élevées pour la deuxième étude. Cela signifie que le polymère obtenu

présente moins de mobilité, le polymère est plus rigide. Nous pouvons supposer que des ramifications se sont formées lors de la deuxième étude.

- Dégradation des polymères

Quelque soit l'étude (même nombre de fonctions ou ratio 46/54), les infrarouges obtenus (Figure 3-34) sont les mêmes pour le même acide biliaire. De plus l'hydrolyse des liaisons anhydrides est rapide. En effet au bout de 24 heures, toutes les liaisons ont été hydrolysées : disparition du pic à 1816 cm^{-1} et apparition du pic à 1709 cm^{-1} correspondant à la formation d'acide. Nous pouvons conclure que la pénétration de l'eau au cœur de la pastille des polymères est très rapide même si ils sont ramifiés.

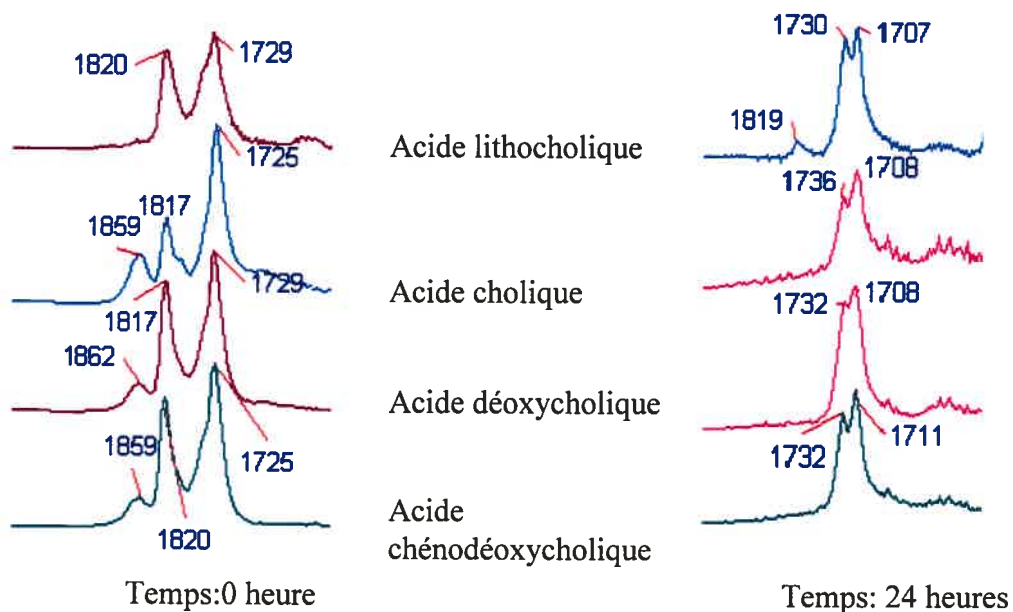


Figure 3-34. Suivi de l'hydrolyse des copolymères (acide biliaires-SA) par IR

Nous pouvons noter que quelque soit le copolymère étudié, la masse molaire moyenne M_n évolue de la même façon. Au bout de 24 heures, elle atteint les 1 500 g/mol (Tableau 3-20). L'hydrolyse des liens anhydrides a donc bien lieu, ce qui confirme la figure 3-34. Le type d'acide biliaire utilisé pour la composition du polymère n'intervient pas sur l'évolution de la masse molaire moyenne M_n au cours de la dégradation.

Tableau 3-20. Changement de la masse molaire moyenne M_n des copolymères (acide biliaires-SA), au cours de la dégradation à 37,5°C dans une solution tampon de phosphate (pH 7,4)

Type d'acide biliaire	Masse molaire des polymères (g/mol)	
	Début	24 heures
Acide cholique	4 000	1 500
Acide déoxycholique	9 000	1 400
Acide chénodéoxycholique	9 000	1 400
Acide lithocholique	8 000	1 600

La dégradation des polymères obtenus avec les acides biliaires possédant deux groupements hydroxyles est plus lente avec les polymères possédant une T_g plus élevée, c'est-à-dire en les polymérisant avec la même équivalence au niveau des réactifs (Figure 3-35 et Tableau 3-21).

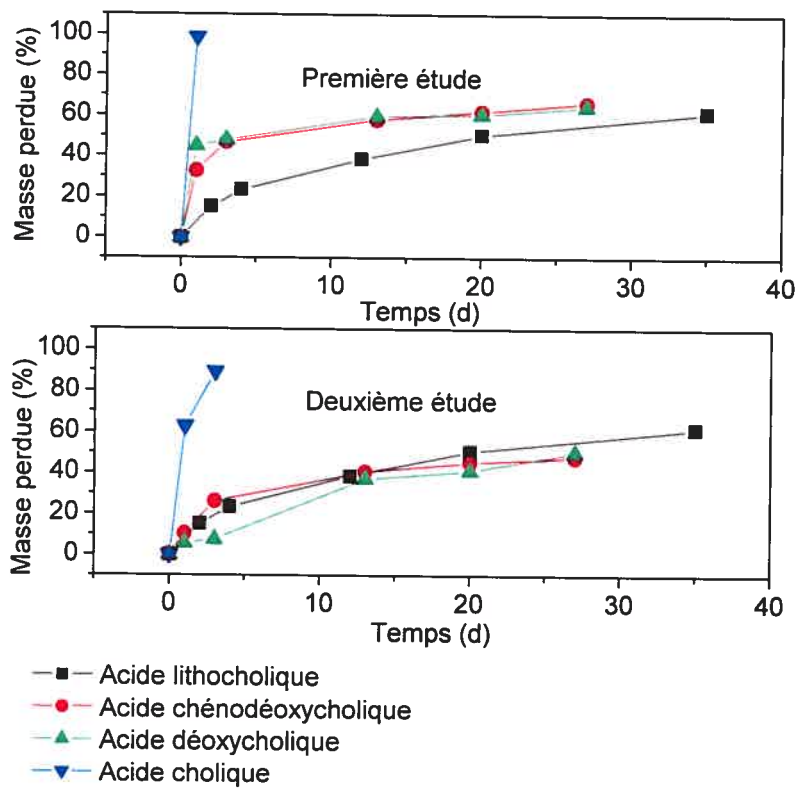


Figure 3-35. Comparaison de la perte de la masse des pastilles des copolymères (acide biliaire-SA). Dégradation faite à 37,5°C dans une solution tampon de phosphate (pH 7,4)

Tableau 3-21. Dégradation des copolymères (acides biliaires-SA)

Polymère étudié	Dégradation du premier au cinquième jour ($\text{mg.cm}^{-2}.\text{d}^{-1}$)	Dégradation après le cinquième jour ($\text{mg.cm}^{-2}.\text{d}^{-1}$)
Acide lithocholique	4,465	0,729
Acide déoxycholique	10,621	0,271
Première étude		
Acide déoxycholique	1,757	0,380
Deuxième étude		
Acide chénéodéoxycholique	10,893	0,684
Première étude		
Acide chénéodéoxycholique	6,512	0,800
Deuxième étude		
Acide cholique	74,82	/
Première étude		
Acide cholique	20,83	/
Deuxième étude		

- Vitesse de relargage

L'exemple le plus intéressant est celui avec l'acide déoxycholique. En effet le relargage est plus lent avec la deuxième étude. Ceci s'explique par le fait que le polymère obtenu est un peu ramifié, ce qui lui donne une T_g plus élevée (Tableau 3-22).

De plus le relargage de la sonde est très élevé durant les premières 24 heures. Plus la T_g des polymères est faible, plus le relargage est élevé à ce moment.

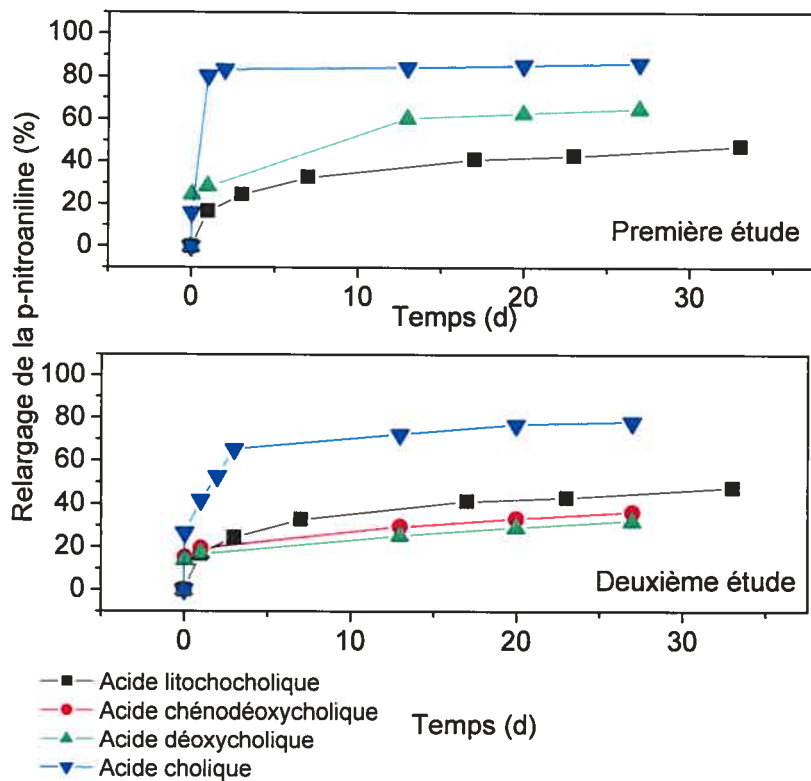


Figure 3-36. Comparaison du relargage de la sonde contenue dans les copolymères (acide biliaire-SA) dans une solution tampon de phosphate (pH 7,4) à 37,5

Tableau 3-22. Vitesse de relargage des copolymères (acides biliaires-SA)

Polymère étudié	Vitesse de libération du premier au cinquième jour (mg.cm ⁻² .d ⁻¹)	Vitesse de libération après le cinquième jour (mg.cm ⁻² .d ⁻¹)
Acide lithocholique	0,2990	0,0260
Acide déoxycholique	0,8700	0,0143
Première étude		
Acide déoxycholique	0,5396	0,0237
Deuxième étude		
Acide chénéodéoxycholique		
Première étude	Etude non réalisée, manque de matériel	
Acide chénéodéoxycholique	0,6265	0,0238
Deuxième étude		
Acide cholique	2,0690	0,0060
Première étude		
Acide cholique	0,8900	0,0204
Deuxième étude		

Cette étude est intéressante sur plusieurs points. Tout d'abord au niveau de la synthèse même, nous avons pu constater que la vitesse de polycondensation de l'acide cholique est très différente de celles des autres acides biliaires. Par conséquence, les masses molaires obtenues sont faibles, ce qui ne nous a pas permis de l'inclure dans l'analyse des études. Avec l'acide cholique, il serait intéressant de faire varier le paramètre temps de la polycondensation afin d'optimiser la masse molaire et donc de pouvoir tirer des conclusions des polymères obtenus.

De plus, pour les polycondensations avec l'acide lithocholique, nous pouvons constater que plus on ajoute de l'acide sébacique dans la composition du polymère, plus la T_g diminue. Le cas contraire se présente pour les autres acides biliaires qui comportent plus de groupements hydroxyles. Ce phénomène provient de la formation de polymères plus ou moins ramifiés. Il serait intéressant afin de pousser l'étude sur ces acides

biliaires de faire une étude complète pour chaque acide biliaire (comme celle faite pour l'acide lithocholique) afin de voir l'évolution des caractéristiques des polymères.

4 Conclusion

Lors de ce projet, plusieurs facteurs qui peuvent influencer la dégradation des polyanhydrides biodégradables et leur relargage sont étudiés. Ces études permettent de mettre en avant les meilleurs candidats pour une utilisation dans les domaines biomédicaux.

Les polyanhydrides statistiques ne sont pas des candidats intéressants pour une utilisation biomédicale. En effet, dans un premier temps, la synthèse, la polycondensation en solution, est plus complexe à mettre en place que la polycondensation à l'état fondu, et les rendements obtenus sont inférieurs. De plus, elle demande l'utilisation de la triéthylamine qui n'est pas enlevée complètement lors du lavage avec la solution d'acide acétique pH 6. Ce dernier point pourrait être amélioré en utilisant une autre amine, moins toxique, voire même reconnue par la FDA. Ils ne peuvent pas être utilisés comme implant biodégradable à libération contrôlée du fait que leur vitesse de dégradation n'est pas constante dans le temps.

Afin de les employer dans des systèmes biodégradables à libération contrôlée, il est préférable d'avoir une vitesse de dégradation constante dans le temps. Les seuls polymères étudiés dans ce projet présentant ce profil sont les polyanhydrides (Dimère LCA-SA) blocs et les P(SA). Ces différents polymères, en fonction de leur composition molaire, présentent des temps de dégradation différents. Plus le polyanhydride est riche en acide sébacique, monomère le plus hydrophile, le plus soluble, plus la dégradation est accélérée. En fonction de leur utilisation, le temps de dégradation des implants à libération contrôlée n'est pas le même. Ce paramètre peut être contrôlé par la composition des polyanhydrides.

Même si dans notre étude avec tous les acides biliaires en polycondensation en solution, nous voyons que la dégradation est homogène, il serait intéressant de les étudier en polycondensation à l'état fondu afin d'obtenir des polymères blocs, ce qui leur donnera des meilleures propriétés pour une utilisation comme implant biodégradable à libération contrôlée. De plus, nous pouvons voir que pour les acides biliaires

présentant 2 ou 3 groupements hydroxyde, des polymères ramifiés se forment, ce qui peut apporter de nouvelles propriétés comme de meilleures propriétés mécaniques.

Afin d'élargir la recherche, une étude est en train de se dérouler avec un dimère d'acide lithocholique où le spacer est un monomère avec une chaîne aliphatique plus longue que celle de l'acide sébacique. En parallèle, une étude de polymérisation de ce monomère avec l'acide sébacique est en cours. Le profil de ces deux études tend à montrer que la dégradation est hétérogène mais qu'elle est plus lente que celles où l'acide sébacique est utilisé comme spacer. Ces études sont intéressantes car elles permettent de mettre en avant qu'en changeant un monomère qui est plus ou moins hydrophobe, nous pouvons élargir la gamme de temps de dégradation des implants à libération contrôlée.

Une étude *in vivo* doit être apportée à ces candidats potentiels qui ont une dégradation hétérogène et donc un relargage mieux contrôlé, c'est à dire une vitesse de relargage constante dans le temps. En effet, il est important de vérifier si les profils de dégradation et de relargage sont similaires entre eux, de voir si ce sont toujours des candidats intéressants pour une utilisation à des fins biomédicales comme implants biodégradables à libération contrôlée. Ils seront intéressants s'ils ont une vitesse de relargage constante dans le temps.

Références

- [1] Hofmann, A.F.; Small, D.M.; *Annu. Rev. Med.* **18**, 433, 1967
- [2] Carey, M.C.; Small, D.M.; *Am. J. Med* **49**, 590, 1970
- [3] Carey, M.C.; Small, D.M.; *Arch. Intern. Med.* **130**, 506, 1972
- [4] Small, D.M; *The Bile Acids (Nair, P.P.; Kritchevsky, D.; Eds)*, Plenum Press, New York, 249, 1971
- [5] Carey, M.C.; *Bile Acids in Gastroenterology (Barbara, L.; Dowling, R.H.; Hofmann, A.F.; Roda, E.; Eds)*, MTP Press, Boston, MA, 19, 1983
- [6] Bloch, K.; Berg, B.N.; Rittenberg, D.; *J. Bio. Chem.* **149**, 511, 1943
- [7] Chaikoff, I.M.; Siperstein, M.D.; Dauben, W.G.; *J. Bio. Chem.* **194**, 413, 1952
- [8] Siperstein, M.D.; Chaikoff, I.M.; *J. Bio. Chem.* **198**, 93, 1952
- [9] Russell, D.W.; *Annu. Rev. Biochem* **72**, 137, 2003
- [10] Admirand, W.H.; Trey, C.; *Clin. Res.* **16**, 2778, 1968
- [11] Schick, M.J.; *Non Ionic Surfactants*, Marcel Dekker, New York, 1967
- [12] Danielsson, H.; Einarsson, K.; *The Biological Basis of Medicine (E.E. Bittar and N. Bittar, Eds)*, Academic Press, London, 279, 1969
- [13] Danielsson, H.; *Adv. Lipid Res.*, **1**, 335, 1963
- [14] Linstedt, S.; The turnover of cholic acid in man. *Acta Physiol Scand* **40**, 1, 1957
- [15] Carey, M.C.; Duane, W.C.; *The Liver: Biology and Pathobiology (3ième édition, Arias, I.M.; Boyer, J.L.; Fausto, N.; Jakoby, W.B.; Schachter, D.A.; Shafritz, D.A.; 3^{ième} Eds)*, Raven Press Ltd, New York, chap. 39, 1994
- [16] Hofmann, A.F.; *Hepatology* **4**, 1984
- [17] Matern, S.; Gerok, W.; *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **85**, 126, 1979
- [18] Small, D.M.; Dowling, R.H.; Redinger, R.N.; *Arch. Intern. Med.* **130**, 552, 1972
- [19] Hofmann, A.F.; *Clin. Gastroenterol* **6**, 3, 1977
- [20] Hofmann, A.F.; *Adv. Intern. Med.* **21**, 501, 1976
- [21] Beher, W.T.; Baker, G.D.; Anthony, W.L.; *Am. J. Physiol.* **199**, 736, 1960
- [22] Beher, W.T.; Baker, G.D.; Anthony, W.L.; Beher, M.E.; *Henry Ford Hosp. Med. Bull.* **9**, 201, 1961
- [23] Beher, W.T.; Baker, G.D.; Anthony, W.L.; *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **109**, 63, 1962
- [24] Dietschy, J.M.; *Arch. Intern. Med.* **130**, 473, 1972
- [25] McBain, M.E.L.; Hutchinson, E.; *Solubilization and Related Phenomena*, Academic Press, New York, 1955
- [26] Hofmann, A.F.; Borgström, B.; *Fed. Proc.* **21**, 43, 1962
- [27] Forker, E.; *Ann. Rev. Physiol* **39**, 323, 1977
- [28] Mekhjian, H.S.; Phillips, S.F.; Hofmann, A.F.; *J. Clin. Invest.* **50**, 1569, 1971
- [29] Forth, W.; Rummel, W.; Glassner, H.; *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. Exptl. Pathol.* **254**, 364, 1966
- [30] Tappeiner, A.J.F.H.; Poley, J.R.; *New. Engl. J. Med.* **281**, 397, 1969
- [31] Hofmann, A.F.; *Handbook of Physiology (C.F. Code, Ed)* **5**, 2507, Williams & Wilkins, Baltimore, 1968
- [32] Benzonana, G.; Desnuelle, P.; *Biochim. Biophys. Acta* **105**, 121, 1965

- [33] Shefer, S.; Hauser, S.; Bekersky, I.; Mosbach, E.H.; *J. Lipid. Res.* **10**, 646, 1969
- [34] Dietschy, J.M.; *Gastroenterology* **57**, 461, 1969 Dietschy, J.M.; *Fed. Proc.* **26**, 1589-1598, 1967)
- [35] Dietschy, J.M.; *J. Clin. Invest.* **47**, 286, 1968
- [36] Dietschy, J.M.; *Fed. Proc.* **26**, 1589, 1967
- [37] Small, D.M.; Bourges, M.; Dervichian, D.G.; *Nature* **211**, 816, 1966
- [38] Small, D.M.; Bourges, M.; *Mol. Crystals* **1**, 541, 1966
- [39] Small, D.M.; Bourges, M.; Dervichian, D.G.; *Biochim. Biophys. Acta.* **137**, 157, 1967
- [40] Small, D.M.; *Adv. Intern. Med.* **16**, 243, 1970
- [41] Redinger, R.N.; Small, D.M.; *Arch. Intern. Med.* **130**, 618, 1972
- [42] Admirand, W.H., Small, D.M.; *J. Clin. Invest.* **47**; 1043-1052, 1968
- [43] Palmer, R.H.; Ruban, Z.; *J. Clin. Invest.* **45**, 1255, 1966
- [44][45] Hunt, R.D.; Leveille, G.A.; Sauberlich, H.E.; *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.* **116**, 92, 1964
- [46] Javitt, N.B.; Emerman, S.; *J. Clin. Invest.* **47**, 1002, 1968
- [47] Sedel, L.; Janot, C.; *Biomatériaux, Cahier de synthèse du programme MATERIAUX du CNRS*, 1995
- [48] Arshady, R.; *Biodegradable Polymers (Arshady, R.; Eds)*, Citus Books, London, 15, 2003
- [49] Bowald, S.; Bush, C.; Erikson, I.; *Lancet* **153**, 1, 1978
- [50] Delany, H.M.; Solanki, B.; Driscoll, W.B.; *Cont. Surg.* **27**, 6, 1985
- [51] Merendino, J.; Sertl, G.; Skondia, J.; *J. Int. Med. Res.* **12**, 351, 1984
- [52] Ratner, B.D. ; Hoffman, A.S. ; Schoen, F.J. ; Lemons, J.E. ; *An Introduction to Materials in Medicine*, Academic Press, San Diego, CA, 1996.
- [53] Domb, A.J.; Schwartz, J.; Perkin, C.; Yipchuck, G.; Broxup, B.; Villemure, J.G.; *Biomaterials* **15**, 681-688, 1994
- [54] Vainionpää, S.; Rockkanen, P.; Törmälä, P.; *Prog. Polym. Sci.* **14**, 679, 1989
- [55] Sawa, T.; Sahoo, S.K.; Hiroshi Meda, H.; *The PBM Series, Vol.1: Introduction to Polymeric Biomaterials (Arshady, R.; Eds)*, Citus Books, London, 233, 2003
- [56] Wu, X.Y.; Zhang, Q.; Arshady, R.; *The PBM Series, Vol.1: Introduction to Polymeric Biomaterials (Arshady, R.; Eds)*, Citus Books, London, 157, 2003
- [57] Arshady, R.; *MML Series, Vol.2, Preparation & Chemical Application*, Citus Books, London, 1999
- [58] Arshady, R.; *Biodegradable Polymers (Arshady, R.; Eds)*, Citus Books, London, 7, 2003
- [59] Langer, R.; Peppas, N.A.; *Biomaterials* **2**, 195, 1981
- [60] Doi, Y.; *Microbial Polyester*, VCH, New York, 1990
- [61] Berkeley, R.C.W.; Gooday, G.W.; Elwood, D.C.; *Microbial Polysaccharides and Polysaccharase*, Society for General Microbiology, New York, 1979
- [62] Tomihata, K.; Burczak, K.; Shiraki, K.; Ikada, Y.; *Polym. Prepr* **33**, 534-535, 1992
- [63] Tamada, J.; Langer, R.; *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **90**, 379-391, 1993.
- [64] Arshady, R.; *Biodegradable Polymers (Arshady, R.; Eds)*, Citus Books, London, 17, 2003
- [65] Albertsson, A.; Lundmark, S.; *J. Macromol. Sci. Chem.* **A27**, 397, 1990

- [66] Subramanyam, R.; Pinkus, A.G.; *J. Macromol. Sci. Chem.* **A23**, 23, 1985
- [67] Domb, A.J.; Langer, R.; *J. Polym. Sci., A, Polym. Chem.* **25**, 3373, 1987
- [68] Domb, A.J.; Langer, R.; *Macromolecules* **22**, 3200, 1989
- [69] Leong, K.W.; Brott, B.C.; Langer, R.; *J. Biomed. Mater. Res.* **19**, 941, 1985
- [70] Uhrich, K.E.; Cannizzaro, S.M.; Langer, R.S.; Shakesheff, K.M.; *Chem. Rev.* **99**, 3181, 1999
- [71] Ron, E.; Mathiowitz, E.; Mathiowitz, G.; Domb, A.J.; Langer, R.; *Macromolecules* **24**, 2278, 1991
- [72] Domb, A.J.; Mathiowitz, E.; Ron, E.; Giannos, S.; Langer, R.; *J. Polym. Sci.* **29**, 571, 1991
- [73] Leong, K.W.; Brott, B.C.; Langer, R.; Maniar, M.; *J. Biomed. Mater. Res.* **19**, 941, 1985
- [74] Tamada, J.; Langer, R.; *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **3**, 315-353, 1992
- [75] Sandor, M.; Bailey, N.A.; Mathiowitz, E.; *Polymer* **43**, 279-288, 2001
- [76] Li, S.; Girod-Holland, S.; Vert, M.; *J. Control. Release* **40**, 41-53, 1996
- [77] Hopfenberg, H.B.; *Controlled Release Polymeric Formulations (Paul, D.R.; Harris, F.W.; Eds)*, Vol.33, American Chemical Society, Washington, DC, 1976
- [78] Gopferich, A.; *Biomaterials* **17**, 103-114, 1996
- [79] Gopferich, A.; Tessmar, J.; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**, 911-931, 2002
- [80] Gopferich, A.; *Macromolecules* **30**, 2598-2604, 1997
- [81] Gopferich, A.; Langer, R.S.; *AIChE J.* **41**, 2292-2200, 1995
- [82] Heller, J.; Himmelstein, K.J.; *Biodegradable Poly(orthoesters) As Drug Delivery Forms (Borchardt, R.T.; Arnold, J.; Stella, V.J.; Eds)*, Directed Drug Delivery, Humana, Clifton, NJ, 171, 1985
- [83] Dhanikula, A.B.; Panchagnula, R.; *Int. J. Pharm* **183(2)**, 85, 1999
- [84] Langer, R.; *Chem. Eng. Commun.* **6**, 1, 1980
- [85] Domb, A.J.; Maniar, M.; Haffer, A.S.T.; U.S. Patent 5, 919, 835, 1999
- [86] Vogelhuber, W.; Rotunno, P.; Magni, E.; Gazzaniga, A.; Spruß, T.; Bernhardt, G.; Buschauer, A.; Gopferich, A.; *J. Control. Release* **73(1)**, 75, 2001
- [87] Bucher, J.E.; Slade, W.C.; *J. Am. Chem. Soc.* **31**, 1319, 1909
- [88] Hill, J.W.; *J. Am. Chem. Soc.* **52**, 4110, 1930
- [89] Hill, J.W.; Carothers, H.W.; *J. Am. Chem. Soc.* **54**, 1569, 1932
- [90] Conix, A.; *J. Polym. Sci.* **29**, 343, 1958
- [91] Yoda, N.; *J. Polym. Sci. Part A* **1**, 1323, 1963
- [92] Yoda, N.; *Makromol. Chem.* **55**, 174, 1962
- [93] Rosen, H.B.; Chang, J.; Wnek, G.E.; Lindhardt, R.J.; Langer, R.; *Biomaterials* **4**, 131, 1983
- [94] Domb, A.; Nudelman, R.; *Biomaterials* **16**, 319, 1991
- [95] Leong, K.W.; D'Amore, P.; Marletta, M.; Langer, R.; *J. Biomed. Mater. Res.* **19**, 941, 1985
- [96] Leong, K.; D'Amore, P.; Langer, R.; *J. Biomed. Mater. Res.* **20**, 51-64, 1986
- [97] Braun, A.G.; Buckner, C.A.; Emerson, D.J.; Nicholson, B.B.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 2056, 1982
- [98] Laurencin, C.T.; Domb, A.J.; Morris, C.; Brown, V.; Chasin, M.; McConnell, R.; Lange, N.; Langer, R.; *J. Biomed. Mater. Res.* **24**, 1463, 1990
- [99] Ron, E.; Mathiowitz, G.; Domb, A.J.; Langer, R.; *Macromolecules* **24**, 2278, 1991

- [100] Brem, H.; Piantadosi, S.; Burger, P.C.; Walker, M.; Selker, R.; Vick, N.A.; Black, K.; Sisti, M.; Brem, S.; Mohr, G. et al; *Placebo Controlled Trial Of Safety And Efficacy Of Intraoperative Controlled Delivery By Biodegradable Polymers Of Chemotherapy For Recurrent Gliomas, The Polymer-brain Tumor Treatment Group*, *Lancet*, 345(8956), 1008, 1995
- [101] Albertsson, A.C.; Liu, Y.; *J. Macromol. Sci., Pure Appl. Chem.* **34** (8), 1457, 1997)
- [102] Domb, A.J.; Amselem, S.; *Polymeric Site Specific Pharmacotherapy*, John Wiley & Sons, Chichester, 242, 1994
- [103] Stephens, D.; Li, L.; Robinson, D.; Chen, S.; Chang, H.C.; Liu, R.M.; Tian, Y.; Ginsburg, E.J.; Gao, X.; Stultz, T.; *J. Control. Release* **63**, 305, 2000
- [104] Laurencin, C.T.; Gerhart, T.; Witschger, P.; Satcher, R.; Domb, A.; Rosenberg, A.E.; Hanff, P.; Edsberg, L.; Hayes, W.; Langer, R.; *J. Orthop. Res.* **11** (2), 256, 1993
- [105] Nelson, C.L.; Hickmon, S.G.; Skinner, R.A.; .; *J. Orthop. Res.* **15**, 249, 1997
- [106] Teomim, D.; Nyska, A.; Domb, A.J.; *J. Biomed. Mater. Res.* **45** (3), 258, 1999
- [107] Howard III, M.A.; Gross, A.; Grady, M.S.; Langer, R.S.; Mathiowitz, E.; Winn, H.R.; Mayberg, M.R.; *J. Neurosurg.* **71**(1), 105, 1989
- [108] Park, E.S.; Maniar, M.; Shah, J.C.; *J. Control. Release* **52** (1-2), 179, 1998
- [109] Gouin, S.; *Synthèse et caractérisation de nouveaux polymères biodégradables dérivés des acides biliaires, thèse*, Université de Montréal, 1998
- [110] <http://www.chups.jussieu.fr/polys/biochimie/DGbioch/POLY.Chp.8.19.html>
- [111] Small, D.M.; in « *The Bile ACIDS. Chemistry, Metabolism and Physiology.* » *Vol.4. (D. Kritchesky and P.P. Nair, eds)*, Plenum Press, New York, 1971
- [112] Cowie, J.M.G.; *Eur. Polymer. J.* **11**, 297, 1975
- [113] Xu, H.B.; Zhou, Z.B.; Huang, K.X.; Lei, T.; Zhang, T.; Liu, Z.L.; *Polymer Bull.* **46**, 435, 2001
- [114] Domb, A.J.; Maniar, M.; *J. Polym. Sci. Part A : Polym. Chem.* **31**, 1275, 1993
- [115] Krasko, M.Y. ; Domb, A.J. ; *Biomacromolecules* **6**, 1877, 2005
- [116] Guo, W.X.; Huang, K.X.; Tang, R.; Chi, Q.; *Polymer* **45**, 5743, 2004
- [117] Domb, A.J.; Gallardo, C.F.; Langer, R.; *Macromolecules* **22**, 3200, 1989
- [118] Gouin, S.; Zhu, X.X.; Lehnert, S.; *Macromolecules* **33**, 5379, 2000