

Université de Montréal

Modification d'acides biliaires à l'aide de polymères pour en moduler les propriétés d'agrégation.

par

Guillaume Giguère

Département de chimie
Faculté des arts et des sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention de grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en chimie

Octobre 2009

© Guillaume Giguère, 2009

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Cette thèse par articles intitulée:

Modification d'acides biliaires à l'aide de polymères pour en moduler les propriétés d'agrégation.

Présentée par:
Guillaume Giguère

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Robert Prud'homme, Président-rapporteur

Julian Zhu, Directeur de recherche

Michel Lafleur, Membre du jury

Anna Ritcey, Examinatrice externe

Louis-André Hamel, Représentant du doyen de la FES

Résumé

Les polymères amphiphiles sont largement utilisés pour les applications biomédicales et pharmaceutiques. Afin d'améliorer les chances de biocompatibilité des nouveaux polymères que nous voulons développer, nous avons utilisé des composés naturels, les acides biliaires, comme produits de départ dans la synthèse de ces polymères.

De nouveaux polymères anioniques amphiphiles dérivés de l'acide cholique ont été préparés par polymérisation radicalaire par transfert d'atomes. Par un contrôle rigoureux des conditions de polymérisation, des bras de poly(acide acrylique) de différentes longueurs ont été greffés sur le squelette de l'acide cholique. L'architecture moléculaire des polymères a été étudiée par spectroscopie ^1H RMN et par spectrométrie de masse. Ces polymères en étoile formés par l'acide biliaire modifié sont capables de s'agréger dans l'eau même si les groupements hydroxyles ont été remplacés par des segments plus volumineux. Il a été observé que les liaisons ester entre le polymère et le cœur d'acide cholique sont sensibles à l'hydrolyse en solution aqueuse.

Pour remédier au problème de stabilité en solution aqueuse et pour avoir, en même temps, des bras hydrophiles non ioniques et biocompatibles, de l'oxyde d'éthylène a été polymérisé sur l'acide cholique par polymérisation anionique. Les liaisons éther formées entre le polymère et les groupements hydroxyles de l'acide biliaire sont plus stables que les liaisons ester sur le polymère de poly(acide acrylique). Les conditions de réaction de la polymérisation anionique ont été optimisées et ont donné des polymères aux architectures et aux masses molaires contrôlées. Les nouveaux polymères forment des agrégats sphériques tel qu'observé par microscopie électronique à transmission avec des échantillons préparés par la méthode de fracture à froid. Leur morphologie est différente de celle des agrégats cylindriques formés par les acides biliaires.

Avec la méthode optimisée pour la polymérisation anionique, l'éther d'allyle et glycidyle a été polymérisé sur un dérivé d'acide cholique, suivi par

une thiolation des liaisons doubles pour introduire l'amine ou l'acide sur la chaîne polymère. Cette addition radicalaire est efficace à plus de 90%. Les polymères qui en résultent sont solubles dans l'eau et s'agrègent à une certaine concentration critique. Il est particulièrement intéressant d'observer la thermosensibilité des polymères ayant des groupements amine, laquelle peut être modulée en acétylant partiellement les amines, donnant des points nuages entre 15 et 48°C.

Mots clés: Acides biliaires, polymères en étoile, polymérisation vivante, polymères amphiphiles, agrégation, thermosensibilité.

Abstract

Amphiphilic polymers are very useful in biomedical and pharmaceutical applications. To improve the biocompatibility of such polymers, we chose to use natural compounds such as bile acids as the starting material in the synthesis of the polymers.

New anionic polymers have been prepared by atom transfer radical polymerization. Poly(acrylic acid) arms of various lengths have been grafted onto a bile acid core. The molecular architecture has been confirmed by ^1H NMR spectroscopy and by mass spectrometry. The star polymers obtained from modified bile acid can aggregate in water, even though the hydroxyl groups were replaced by bulkier chains. The ester linkages between the polymers and the bile acid core are prone to hydrolysis in aqueous solutions.

In order to improve the stability of the polymers in aqueous solutions and to introduce neutral and biocompatible hydrophilic arms, ethylene oxide has been polymerized onto a cholic acid core by anionic polymerization. The ether linkages formed between the hydroxyl groups of the bile acid and the poly(ethylene glycol) are more stable than the ester linkages formed with the poly(acrylic acid) polymers. The reaction conditions for the anionic polymerization have been optimized and provided well-defined polymers with narrow molecular weight distributions. The new polymers formed spherical aggregates as shown by transmission electron microscopy with samples prepared by the freeze-fracture technique. Their morphology is different from those of the cylindrical aggregates formed by bile salts.

With the optimized method for anionic polymerization, allyl glycidyl ether was grafted onto a derivative of cholic acid, followed by thiolation, a radical addition, of the allyl groups to introduce amine or carboxylic acid groups to the polymer chains. This radical addition had an efficiency of more than 90%. The resulting polymers were water-soluble and were found to aggregate

above a certain critical concentration. It is particularly interesting to observe thermosensitivity of the star polymers bearing amine groups. The thermosensitivity of such polymers can be further tuned by partial acetylation of the amine groups, yielding polymers with cloud points in the temperature range from 15 to 48°C.

Keywords: Bile acids, star polymers, living polymerization, amphiphilic polymers, aggregation, thermosensitivity.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Table des matières	v
Liste des schémas	ix
Liste des figures.....	x
Liste des tableaux	xiii
Liste des symboles et abréviations	xiv
Remerciements	xvi
Chapitre 1: Introduction générale	1
1.1 Polymérisations anioniques.....	2
1.1.1 Réactions sans terminaison ou transfert	4
1.1.2 Polymérisation anionique par ouverture de cycle.....	5
1.2 Principes de la polymérisation radicalaire par transfert d'atomes (ATRP)	7
1.2.1 Les amorceurs.....	9
1.3 Polymères en étoile et polymérisations vivantes	11
1.3.1 Propriétés et caractéristiques des polymères en étoile.....	11
1.3.2 Synthèse de polymères en étoile par polymérisation anionique	14
1.4 Les acides biliaires	17
1.4.1 Structure et comportement.....	17
1.4.2 Formation de micelles.....	20
1.4.3 Rôle des acides biliaires.....	23
1.5 Utilisation d'acides biliaires modifiés.....	26
1.5.1 Activité antibiotique des acides biliaires modifiés	26
1.5.2 Acides aminés sur les acides biliaires.....	29
1.5.3 Polymères stéroïdiens	30

1.6	Micelles	33
1.6.1	Importance pharmacologique de la micellisation	33
1.6.2	Surfactants polymères.....	33
1.7	Systèmes polymériques en étoile dérivés du PEG	34
1.7.1	Hydrogels.....	34
1.7.2	Systèmes micellaires.....	35
1.7.3	Revêtement de surfaces	39
1.8	Objet de la thèse	40
1.9	Présentation des travaux.....	41
1.10	Références	42

Chapitre 2: Synthèse et propriétés d'agrégation de polymères en étoile

	dérivés de l'acide cholique par ATRP	55
2.1	Introduction	55
2.2	Experimental Section	56
2.2.1	Materials	56
2.2.2	Synthesis of ATRP Initiators	56
2.2.3	Preparation of CA(<i>t</i> BA _n) _x and CA(AA _n) _x	58
2.2.4	Characterization of the Polymers.....	59
2.3	Results and Discussion.....	60
2.3.1	Structure of Star-Shaped Polymers.....	60
2.3.2	Aggregation Properties of the CA(AA _x) ₄ Star-Shaped Polymers.....	64
2.4	Conclusions	65
2.5	References	66
2.6	Supporting Information	67

Chapitre 3: Polymères en étoile asymétriques et amphiphiles de

	poly(éthylène glycol) dérivés de l'acide cholique	71
3.1	Introduction	71
3.2	Experimental Section	73
3.2.1	Materials	73

3.2.2	Preparation of (2'-hydroxyethylene)-3 α ,7 α ,12 α -Trihydroxy-5 β -Cholanoamide (3).	74
3.2.3	Anionic Polymerization of Ethylene Oxide	75
3.2.4	Characterization Techniques	76
3.3	Results and Discussion	78
3.3.1	Preparation of the CA-PEG ₄ Polymers and Optimization of the Polymerization Conditions.	78
3.3.2	Characterization of the Polymers	79
3.3.3	Molecular Weights of the CA-PEG ₄ Polymers.	80
3.3.4	Thermal Analysis of the CA-PEG ₄ Polymers	82
3.3.5	Aggregation of the CA-PEG ₄ Polymers.	84
3.3.6	Light Scattering and Microscopic Studies of the CA-PEG ₄ Polymers.	85
3.4	Conclusions	89
3.5	References	90
3.6	Supporting Information	93

Chapitre 4: Polymères fonctionnels en étoile dérivés de l'acide cholique et propriétés thermosensibles

	et propriétés thermosensibles	95
4.1	Introduction	95
4.2	Experimental Section	97
4.2.1	Preparation of CA(AGE _n) ₄	97
4.2.2	Preparation of CA(AGE _n -COOH) ₄	98
4.2.3	Preparation of CA(AGE _n -NH ₂) ₄	99
4.2.4	Partial Acetylation of CA(AGE _n -NH ₂) ₄	100
4.2.5	Back Titration Experiments	100
4.2.6	Characterization Methods	101
4.3	Results and Discussion	102
4.3.1	Preparation of CA(AGE _n) ₄ , CA(AGE _n -COOH) ₄ and CA(AGE _n -NH ₂) ₄	102
4.3.2	Aggregation Studies	103

4.3.3 Thermosensitivity.....	104
4.4 Conclusions	108
4.5 References	109
4.6 Supporting Information.....	112
4.6.1 Experimental Section.....	112
4.6.2 CMC and Thermodynamic Consideration.....	116
4.7 References	118
Chapitre 5 : Discussion générale et conclusions	119
5.1 Conception des polymères	119
5.2 Synthèse des polymères	120
5.1.1 Préparation des amorceurs.....	120
5.1.2 Mise en œuvre des polymérisations et architectures	121
5.3 Propriétés des polymères.....	124
5.4 Travaux futurs	126
5.5 Références	127
Annexes	129
A.1 Propriétés des surfactants en solution	129
A.2 Références	131

Liste des schémas

Scheme 2.1. Preparation of the ATRP initiators from cholic acid..... 58

Scheme 3.1. Synthetic path for the preparation of CA-PEG₄ star polymers. 74

Scheme 4.1. Preparation of the positively and negatively charged and acetylated polymers from cholic acid..... 99

Liste des figures

Figure 1.1. Polymérisation anionique du styrène dans le THF par le naphthalénide de sodium.	4
Figure 1.2. Propagation dans la polymérisation anionique de l'EO.....	5
Figure 1.3. Complexation du centre actif d'un alkoxyde avec une chaîne en croissance de PEO.	6
Figure 1.4. Transfert de chaîne pour le PO dans la polymérisation anionique.	7
Figure 1.5. Mécanisme réactionnel de l'ATRP	8
Figure 1.6. Constantes des demi-réactions en ATRP.....	10
Figure 1.7. Architectures moléculaires de polymères de haute fonctionnalité.....	12
Figure 1.8. Préparation de polymères en étoile à partir du DVB.	15
Figure 1.9. Synthèse de PEG en étoile sur des poly(glycérol)s modifiés.....	16
Figure 1.10. Formation des acides biliaires.....	18
Figure 1.11. Structure tridimensionnelle de l'acide cholique.....	19
Figure 1.12. Étapes de micellisation des acides biliaires.	22
Figure 1.13. Transport entérohépatique.....	25
Figure 1.14. Acides biliaires mimant l'effet de la squalamine et de la polymyxine B ₂	27
Figure 1.15. Ester et amide d'acide cholique pour contrôler la stabilité des dérivés.....	30
Figure 1.16. Schématisation du principe de libération de médicaments par Jones <i>et al.</i>	36
Figure 1.17. Préparation de micelles polymères unimoléculaires.....	38
Figure 1.18. Préparation de polymères en étoile avec un cœur dendritique.....	38

Figure 2.1. MALDI-TOF MS for CA(<i>t</i> BA ₇) ₄ and CA(<i>t</i> BA ₁₀) ₄ showing the controlled reaction and well defined structure.	61
Figure 2.2. Polydispersity index obtained by size-exclusion chromatography and monomer conversion obtained by ¹ H NMR spectroscopy for polymerization reactions initiated by 3a (○) and 3b (■).....	63
Figure 2.3. Viscosity measurements at 21°C for CA(AA ₇) ₄ (triangles) and CA(AA ₁₀) ₄ (circles) as a function of the molal concentration of the polymers showing their aggregation around 40-50 millimolale at 7.5 (solid lines) and 15% (dotted lines) of ionization of the poly(acrylic acid) arms.	65
Figure S2.1. ¹ H NMR spectrum of CA(<i>t</i> BA ₇) ₄ showing the protons on chain ends at 4.2 ppm overlapping with the ethylene glycol protons.....	68
Figure S2.2. The molar masses of the polymers derived from initiators 3a (○) and 3b (■) as a function of ATRP reaction time as measured by SEC with PMMA standards.	69
Figure S2.3. LC-MSD-TOF spectra of (A) AA ₇ , cleaved from CA(AA ₇) ₄ , and (B) AA ₁₀ , cleaved from CA(AA ₁₀) ₄	70
Figure 3.1. SEC traces of CA-PEG ₄ star polymers (eluent: THF, RI detector, 1 mL/min). Sample details are given in Table 3.1.....	81
Figure 3.2. MALDI-TOF MS spectra of CA-PEG ₄ star polymers I, II and III obtained using a N ₂ laser at 337 nm wavelength with a 20 kV extraction voltage.	83
Figure 3.3. (A) DSC traces of CA-PEG ₄ star polymers obtained with a heating rate of 10°C/min; (B) Variation of melting temperatures of linear PEG and CA-PEG ₄ star polymers as a function of their molecular weights.....	84
Figure 3.4. Variation of the surface tension of selected CA-PEG ₄ stars measured in water at 22°C as a function of their molal concentrations.	86

Figure 3.5. TEM images of the aggregates formed by sodium cholate at 0.040 molal, CA-PEG ₄ I at 0.025 molal and CA-PEG ₄ III at 0.020 molal. ...	87
Figure 3.6. The R_h distributions for CA-PEG ₄ Samples I and III, and sodium cholate obtained by dynamic light scattering experiments.	89
Figure S3.1. Typical NMR spectra of CA-PEG ₄ and its trifluoroacetic derivative in CDCl ₃	93
Figure S3.2. Viscosity experiments of selected CA-PEG ₄ samples in distilled water at 25°C.	94
Figure 4.1. Influence of the degree of protonation on the CPs of (A) CA(AGE ₅ -NH ₂) ₄ and (B) CA(AGE ₅ -NHCOCH ₃) ₄ acetylated at 40 mol%.	106
Figure 4.2. Influence of the degree of acetylation on the sharpness of the CP transition and its intensity for the CA(AGE ₅ -NHCOCH ₃) ₄ series.	107
Figure S4.1. ¹ H NMR spectra of CA(AGE ₅) ₄ in CDCl ₃ , CA(AGE ₅) ₄ in DMSO <i>d</i> - ₆ after reaction with trifluoroacetic anhydride, CA(AGE ₅ -NH ₂) ₄ in CDCl ₃ and CA(AGE ₅ -COOH) ₄ in acetone <i>d</i> - ₆ at room temperature.	113
Figure S4.2. Example of a back titration for CA(AGE ₅ -NH ₂) ₄ with NaOH. .	114
Figure S4.3. ¹ H NMR spectra of acetylated samples of CA(AGE ₅ -NH ₂) ₄ in CDCl ₃	115
Figure S4.4. Surface tension of samples CA(AGE ₅ -COOH) ₄ , CA(AGE ₁₀ -COOH) ₄ , CA(AGE ₁₅ -COOH) ₄ , CA(AGE ₅ -NH ₂) ₄ , CA(AGE ₁₀ -NH ₂) ₄ and CA(AGE ₁₅ -NH ₂) ₄	116
Figure S4.5. Gibbs energy of micellization involved per monomer unit.	118

Liste des tableaux

Table 2.1. Molecular Characteristics of the Star-Shaped Polymers.	63
Table 3.1. Properties of the CA-PEG ₄ star polymers grafted with PEG chains of different lengths.	76
Table 4.1. Characterization of the Polymers Before Derivatization.....	99
Table 4.2. Modification of the Star Polymers and Their Degree of Substitution and Properties.....	101
Table S4.1. The targeted degrees of acetylation and the experimentally determined values for CA(AGE ₅ -NH ₂) ₄ , showing the quantitative reaction process.	115

Liste des symboles et abréviations

^1H RMN	Résonance magnétique nucléaire du proton
AA	Acrylic acid
AcOEt	Ethyl acetate
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGE	Allyl glycidyl ether
ATRP	Atom transfer radical polymerization ou polymérisation radicalaire par transfert d'atomes
CA	Cholic acid
CAC	Critical aggregation concentration
CA-OH	5 β -Cholane-3 α ,7 α ,12 α ,24-tetrol
CMC	Concentration micellaire critique
CP	Cloud point
DLS	Dynamic light scattering
DMSO	Dimethylsulfoxyde
DP _n	Degré de polymérisation
DSC	Differential scanning calorimeter
DVB	Divinylbenzène
EG	Éthylène glycol
EO	Oxyde d'éthylène ou ethylene oxide
IR	Infrared ou infrarouge
LC-MSD-TOF	Liquid chromatography mass selective detector time-of-flight
MALDI-TOF MS	Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry
M _n	Masse molaire en masse
NMR	Nuclear magnetic resonance
PAMAM	Polyamidoamine

PCL	Poly(ϵ -caprolactone)
PDI	Polydispersity index
PEG	Poly(éthylène glycol) ou poly(ethylene glycol)
PEO	Poly(oxyde d'éthylène) ou poly(ethylene oxide)
PLA	Poly(acide lactique)
PLLA	Poly(L-acide lactique)
PLLG	Poly(L-lactide- <i>co</i> -glycolide)
PMB	Polymyxin B
PMDETA	N,N,N',N'',N''-pentamethyldiethylenetriamine
PO	Oxyde de propylène ou Propylene oxide
R _h	Hydrodynamic radius
RMN	Résonance magnétique nucléaire
R-X	Chaîne dormante
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
SEC	Size exclusion chromatography
ST	Surface tension
<i>t</i> BA	<i>tert</i> -Butyl acrylate
TEM	Transmission electron microscopy
TFA	Trifluoroacetic acid
THF	Tétrahydrofurane ou tetrahydrofuran
T _m	Melting temperature

Remerciements

Je tiens à remercier le professeur Julian Zhu pour m'avoir accueilli dans son groupe de recherche durant toutes ces années. Il m'a toujours laissé une grande liberté pour explorer les avenues de recherche qui m'intéressaient davantage et a toujours su démontrer de l'intérêt vis-à-vis de ma progression. Je lui suis reconnaissant pour son appui, son encouragement, ses efforts pour moderniser le laboratoire au fil des années, pour sa patience et son enthousiasme.

Merci aussi aux collègues présents et passés du laboratoire. Merci particulièrement à Wilms Baille, Marc Gauthier et spécialement à Héloïse Thérien-Aubin. Ils m'ont toujours donné des conseils judicieux qu'ils auraient mis en pratique si ma situation avait été la leur. Ils n'ont jamais hésité à discuter avec moi pour me suggérer des pistes de solution, malgré leurs horaires chargés. Je m'en voudrais aussi de passer sous silence ceux du 2^{ème} étage au PJAB, ils m'ont ouvert les portes de leurs laboratoires pour me laisser utiliser leurs instruments.

L'appui de mes parents et amis a aussi été d'une aide précieuse; sans eux, je n'aurais certainement pas complété tout ce que j'ai entrepris. Ce travail que je présente est aussi en partie à vous.

Voici maintenant le résultat de mon travail, la suite des choses pour moi-même et mes remerciements pour Celui qui a permis tout ceci:

Ecclésiaste 1:11 *On ne se souvient pas de ce qui est ancien; et ce qui arrivera dans la suite ne laissera pas de souvenir chez ceux qui vivront plus tard.[...2:11...] j'ai considéré tous les ouvrages que mes mains avaient faits, et la peine que j'avais prise à les exécuter; et voici, tout est vanité et poursuite du*

*vent, et il n'y a aucun avantage à tirer de ce qu'on fait sous le soleil [...2:22...]
Que revient-il, en effet, à l'homme de tout son travail et de la préoccupation de
son coeur, objet de ses fatigues sous le soleil? [...9:7-10...] Va, mange avec
joie ton pain, et bois gaiement ton vin; car dès longtemps Dieu prend plaisir à
ce que tu fais. Qu'en tout temps tes vêtements soient blancs, et que l'huile ne
manque point sur ta tête. Jouis de la vie avec la femme que tu aimes, pendant
tous les jours de ta vie de vanité, que Dieu t'a donnés sous le soleil, pendant tous
les jours de ta vanité; car c'est ta part dans la vie, au milieu de ton travail que tu
fais sous le soleil. Tout ce que ta main trouve à faire avec ta force, fais-le; car il
n'y a ni oeuvre, ni pensée, ni science, ni sagesse, dans le séjour des morts, où tu
vas.*

Chapitre 1: Introduction générale

Depuis près de 50 ans déjà, le domaine biomédical est en étroite relation avec la chimie des polymères, faisant en sorte que plusieurs polyméristes travaillent maintenant à l'ingénierie moléculaire médicale. À mesure que le bagage de connaissances s'accroît en reconnaissance moléculaire, en auto-assemblage, en génie moléculaire et en chimie supramoléculaire, de plus en plus de portes s'ouvrent aux macromolécules. Parmi les objectifs les plus ambitieux à long terme, il y a les cellules synthétiques.¹ Cependant, ce genre d'exploit nécessite la collaboration de différents scientifiques et une intégration des connaissances liées aux divers champs de compétences. Il est permis de croire que si les polymères se sont développés si rapidement et avec tant de succès pour l'utilisation de simples objets domestiques, leur futur ne peut être qu'encore plus prometteur alors qu'il est maintenant proposé de les utiliser pour des applications vitales dans les sciences de la vie.

Parmi les applications médicales réussies des polymères « communs », on retrouve le polyéthylène qui est utilisé en orthopédie pour la reconstruction des hanches ou des genoux.² Le poly(éthylène téréphtalate) s'est pour sa part révélé un matériau approprié dans le domaine de la chirurgie cardiovasculaire autologue (pontage et reconstruction des vaisseaux sanguins).³ Le poly(méthacrylate de méthyle) est utilisé comme ciment pour les os afin de fixer et d'ancrer les joints artificiels,⁴ et aussi comme substitut des os dans la reconstruction crânienne.⁵ Les silicones sont quant à eux utilisés comme lentilles intraoculaires, comme implants mammaires et pour le relargage de contraceptifs sur de longues périodes.^{6, 7} Les besoins médicaux diversifiés et spécifiques, de même que la mise au point de nouvelles molécules, élargiront davantage les possibilités d'applications.

L'intérêt pour les polymères biodégradables provenant de l'ingénierie tissulaire et du relargage des médicaments nécessite des polymères avec des propriétés comme la biocompatibilité, la bioadhésion, un l'équilibre hydrophile-hydrophobe, une porosité spécifique, etc. Certaines de ces propriétés sont

intrinsèques à la structure macromoléculaire, alors que d'autres sont obtenues par des matériaux composites ou encore par procédés spécifiques de la matière.

Pour combler les besoins en polymères biocompatibles et spécifiques dans leur usage, de nouveaux matériaux peuvent être développés via l'utilisation de produits naturels. Dans cette thèse, le point de départ est de réussir à incorporer des molécules naturelles dans les polymères et d'en contrôler précisément l'architecture (Chapitres 2, 3 et 4). Ensuite, nous voulons rendre ces matériaux sensibles à des stimuli comme le pH et la température, provenant de leur environnement (Chapitre 4). Nous tenterons de développer de nouvelles méthodes de préparation simples et polyvalentes pour la mise au point de ces macromolécules.

1.1 Polymérisations anioniques

Dès le début des années 1910, les observations faites sur la formation de matériaux visqueux à partir de diènes en présence d'alcanes métalliques l'intérêt pour les polymérisations anioniques ont suscité un intérêt pour les polymérisations anioniques. Ce n'est cependant qu'en 1929 que Karl Ziegler a avancé la possibilité d'une addition par le sodium ou le lithium métallique avec des diènes et a proposé un mécanisme pour les polymérisations anioniques.⁸ Ziegler *et al.* ont d'abord proposé que deux atomes de sodium s'ajoutent à la double liaison pour donner deux liaisons carbone-sodium, et ont avancé un mécanisme pour la formation du matériau visqueux via une propagation par insertion du monomère entre la liaison carbone-sodium.⁹⁻¹¹ La nature de la liaison carbone-sodium n'était cependant pas bien comprise: on croyait qu'il s'agissait d'une liaison covalente. Schlenk *et al.* ont ensuite proposé un intermédiaire radicalaire pour la formation des produits visqueux avec le sodium.^{12, 13} C'est en partie grâce aux études de Schlenk *et al.* en 1914 sur l'interaction d'alcanes métalliques avec des structures aromatiques que la base de la chimie des radicaux anions s'est bâtie.¹⁴

Schlenk *et al.* et Scott *et al.* ont montré que les composés aromatiques forment un complexe 1:1 coloré avec du sodium métallique dans un solvant comme l'éther.^{13, 15} Le complexe coloré a été plus tard identifié comme un radical anion aromatique associé au sodium comme contre-ion.^{16, 17} En 1936, Scott et collaborateurs ont utilisé

un complexe de molécules aromatiques avec du sodium pour amorcer la polymérisation d'oléfines.^{15, 18} Plusieurs articles sont ensuite parus dans les années 1940 sur la polymérisation de monomères vinyliques.¹⁹⁻²¹ C'est Michael Szwarc qui fut le premier à démontrer la polymérisation anionique du styrène en utilisant du naphthalénide de sodium dans le tétrahydrofurane (THF; voir Figure 1.1). Il a proposé un amorçage via un transfert d'électrons du radical anion aux monomères de styrène. La nouvelle espèce, le radical anion styryl, se forme sous l'addition d'un électron du naphthalénide de sodium. La solution devient rouge au cours de la polymérisation par l'anion benzyl, même après avoir ajouté tous les monomères, évidence que les extrémités de chaînes demeurent actives. Il y a aussi reprise de la polymérisation suite à l'ajout d'une nouvelle quantité de monomère. Szwarc *et al.* ont ensuite démontré le transfert d'électrons et l'absence de terminaisons: les termes « polymérisations vivantes » et « polymères vivants » venaient de naître.²² Le terme vivant se réfère à la capacité des bouts de chaînes à maintenir leur réactivité pour un temps suffisant afin de poursuivre ultérieurement la polymérisation sans réaction de terminaison ou de transfert.

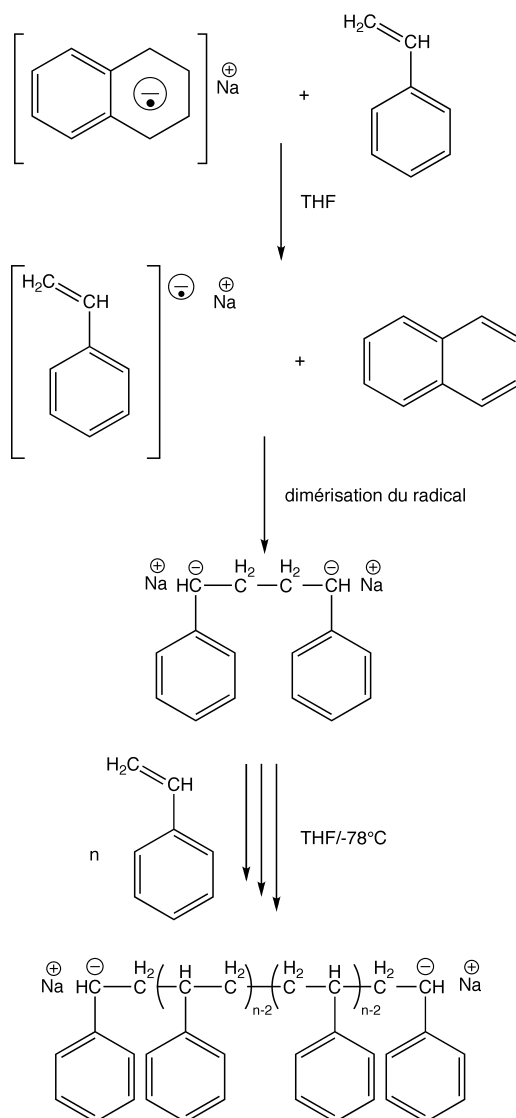


Figure 1.1. Polymérisation anionique du styrène dans le THF par le naphthalénide de sodium.

1.1.1 Réactions sans terminaison ou transfert

La découverte de ces réactions sans transfert ni terminaison amène les deux conséquences suivantes. La première, c'est que la masse molaire qui résulte d'un tel système peut être calculée selon la quantité de monomères.²³ Le degré de polymérisation est donc proportionnel au rapport molaire [monomère ayant réagi] / [amorceur]. Deuxièmement, toutes les chaînes à un temps donné ont la même vitesse de propagation, d'où leur même longueur après un laps de temps donné. Selon ces

critères, la polymérisation est contrôlée en termes de masse molaire et de distribution de longueurs de chaînes.

1.1.2 Polymérisation anionique par ouverture de cycle

La polymérisation de l'oxyde d'éthylène (EO) compte parmi les réactions les plus étudiées dans le domaine des polymérisations anioniques par ouverture de cycle. Au milieu des années 1940, Flory avait déjà noté que l'EO pouvait être polymérisé sans réactions secondaires comme les transferts de chaînes ou les terminaisons.^{24, 25} La croissance de la chaîne pour les polymérisations anioniques par ouverture de cycle se fait par un mécanisme S_N2 , ce qui implique une substitution nucléophile bimoléculaire sur l'atome de carbone (voir Figure 1.2).

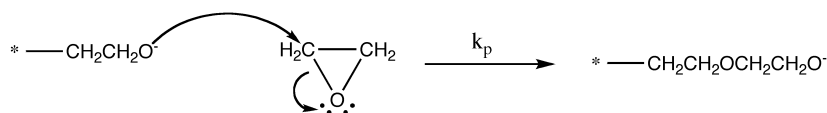


Figure 1.2. Propagation dans la polymérisation anionique de l'EO.

L'analyse de ce mécanisme par Flory l'a conduit à proposer que la masse molaire était contrôlée par le rapport du nombre de mole de monomère consommés sur celui de l'amorceur, et que la distribution de la masse molaire suit une distribution de Poisson.²⁴ Quoique la polymérisation de l'EO semble simple, la synthèse contrôlée du PEO en regard de sa masse molaire et des bouts de chaîne requiert une attention spéciale.^{26, 27}

Les espèces ioniques actives peuvent participer à la polymérisation sous plusieurs formes différentes: ions, paires d'ions et agrégats ioniques, l'ensemble étant en équilibre plus ou moins rapide. Chacune de ces structures peut participer à la propagation avec sa propre constante de vitesse de propagation.²⁸ La constante de dissociation entre un alkoxyde et son cation est généralement lente, à l'exception des situations où les cations sont de grande dimension et généralement complexés avec des cryptants ou des éthers couronne. Les anions carboxylates sont plus faciles à dissocier en raison de leur charge négative plus diffuse et plus encore s'ils sont

associés à de gros cations dans un solvant très polaire avec un bon pouvoir de solvation. Les ions carboxylates étant de moins bons nucléophiles que les alkoxydes, ils sont conséquemment des amorceurs moins efficaces.²⁹

Pour la polymérisation de l'EO, plusieurs conditions réactionnelles donnent des résultats satisfaisants dans le THF. Une forte association de centres actifs est cependant observée puisque la polymérisation est de premier ordre par rapport aux espèces actives à faibles concentrations (sous 10^{-4} M pour K^+ et Cs^+ comme contre-ion) et devient d'ordre fractionnel à concentrations supérieures.^{30, 31} Avec le potassium comme contre-ion dans le THF, la polymérisation est auto-accélérée parce que les chaînes de polyéther peuvent solvater le contre-ion. Ceci augmente la constante de vitesse de propagation en déplaçant l'équilibre du contact des espèces vers leur dissociation et/ou en augmentant le degré de dissociation des paires d'ions en ions avec la conversion des monomères (voir Figure 1.3).

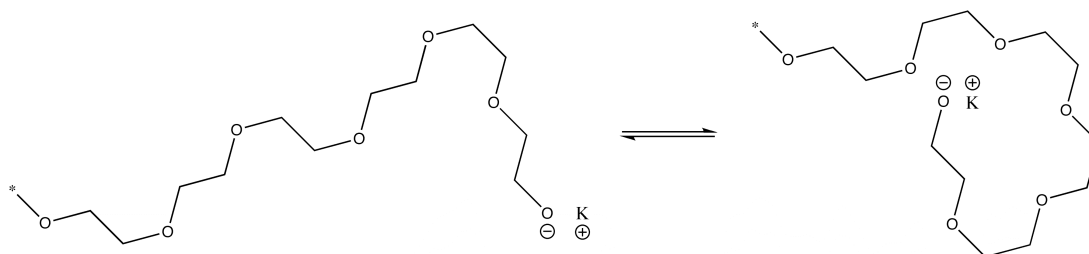


Figure 1.3. Complexation du centre actif d'un alkoxyde avec une chaîne en croissance de PEO.

La polymérisation d'oxyde de propylène (PO) avec l'EO est utilisée industriellement pour la préparation de co-oligomères blocs servant de surfactants. Cependant, les hautes masses molaires ne peuvent être préparées de cette façon en raison d'un transfert de chaîne important typique des oxiranes substitués (voir Figure 1.4).³² La réaction de transfert peut être contrebalancée en complexant le contre-ion avec un éther couronne ou en utilisant des cations de rayon supérieur comme le Rb^+ ou le Cs^+ .³³

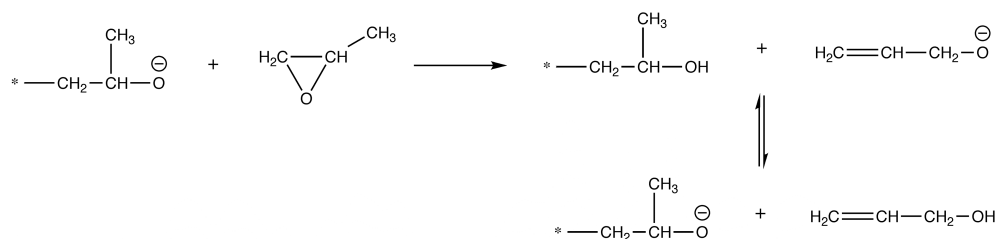


Figure 1.4. Transfert de chaîne pour le PO dans la polymérisation anionique.

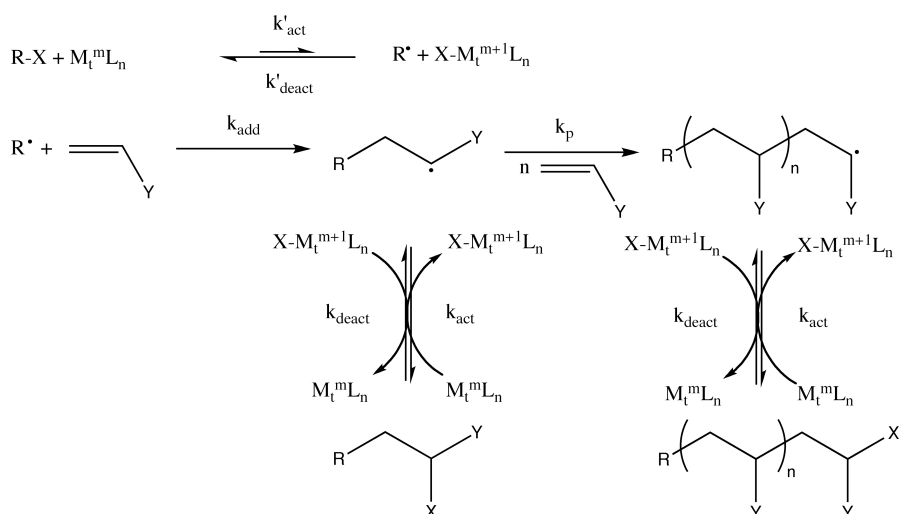
1.2 Principes de la polymérisation radicalaire par transfert d'atomes (ATRP)

Les polymérisations du type ionique tolèrent mal tout ce qui peut avoir un caractère acide ou basique, que se soit le monomère lui-même, le solvant ou toutes autres espèces, au risque de générer des terminaisons et/ou des transferts de chaînes dans le milieu et de perdre ainsi le contrôle de la réaction. De plus, plusieurs monomères sont difficiles à polymériser à cause des risques de « back-biting », d'attaques nucléophile ou électrophile, en plus des réarrangements intramoléculaires qui peuvent se faire. La mise en œuvre des polymérisations ioniques est aussi ardue. La purification des réactifs et des solvants nécessite beaucoup d'efforts, d'appareils spécialisés et de bonnes habiletés de manipulation. Ces conditions de pureté doivent aussi se maintenir tout au long de la polymérisation. Tout ceci coûte non seulement cher en temps et en efforts, mais aussi en dollars.

La plus grande tolérance des espèces radicalaires versus les espèces ioniques vis-à-vis les impuretés a poussé les chercheurs à développer des techniques radicalaires contrôlées/vivantes. Parmi elles, l'ATRP est certainement l'une des plus utilisées en raison de sa convivialité et de sa polyvalence.

Le principe de la polymérisation par ATRP est très apparenté à une autre technique radicalaire de polymérisation, soit l'ATRA (atom transfer radical addition),³⁴ et tire son nom de cette étroite parenté.³⁵ En fait, l'ATRP peut être vue comme un cas particulier de l'ATRA, où il est nécessaire que la réactivation de l'halogénure d'alkyle formé par le monomère soit réactivé pour qu'il y ait poursuite de la polymérisation (voir Figure 1.5). Les caractéristiques vivantes de cette polymérisation sont mises en évidence par la conversion linéaire de premier ordre de la cinétique, l'augmentation linéaire de la masse molaire des chaînes en croissance

avec la conversion et finalement, par la prédiction du degré de polymérisation (DP_n) par le ratio de la quantité de monomère ayant réagi ($[M]$) sur la quantité initiale d'amorceur ($[RX_0]$, soit $DP_n = [M]/[RX]_0$).



$$\text{Constante d'équilibre: } K_{ATRP} = \frac{k_{act}}{k_{deact}}$$

Figure 1.5. Mécanisme réactionnel de l'ATRP.

Le mécanisme de polymérisation de l'ATRP est basé sur un transfert d'électrons des couches intérieures, ce qui inclut un transfert homolytique réversible d'un (pseudo)halogène entre une espèce dormante, un amorceur ou le bout de la chaîne dormante ($R-X$). Un complexe formé d'un métal de transition (M_t^m) et d'un ligand (L_n) dans un état d'oxydation bas (M_t^m/L_n) interagit avec le (pseudo)halogène pour former le radical capable de polymériser (R'). La chaîne en croissance retourne à son état d'espèce dormante lorsqu'elle échange à nouveau le (pseudo)halogène avec le complexe métallique dans un état oxydé supérieur ($X-M_t^{m+1}/L_n$). Les radicaux formés à une vitesse d'activation k_{act} se propagent à une vitesse k_p , se désactivent réversiblement à une vitesse k_{deact} et participent à des réactions de terminaison (k_t). Au fur et à mesure que la réaction progresse, les réactions de terminaison diminuent en raison de l'effet de radicaux persistants (PRE),³⁶ de la longueur de la chaîne,³⁷ et de l'équilibre fortement poussé vers les espèces dormantes ($k_{act} \ll k_{deact}$).³⁸

L'état d'oxydation élevé du complexe, l'équivalent du radical persistant en ATRP, peut être introduit au tout début de la réaction avant même l'amorçage pour augmenter sa concentration et diminuer le nombre de terminaisons de chaînes en croissance nécessaires pour générer le PRE.³⁹ Il peut aussi être formé in situ par la réaction avec l'oxygène dissout. L'amélioration du PRE en début de réaction est plus particulièrement indiquée lorsqu'il s'agit de faire un polymère avec un amorceur multifonctionnel afin d'obtenir des architectures les plus uniformes possibles.

L'ATRP est une réaction complexe parce qu'elle peut compter un ou plusieurs (co)monomères, un complexe formé d'un métal de transition dans deux ou plusieurs états d'oxydation,⁴⁰ elle peut compter plusieurs contre-ions et ligands, un amorceur avec un ou plusieurs atomes transférables radicalement et peut, en plus, inclure un solvant avec ou sans additifs. Toutes ces choses peuvent influencer sur la constante d'équilibre de la réaction.^{41,42}

1.2.1 Les amorceurs

Les amorceurs sont généralement un (pseudo)halogénure d'alkyle de faible ou de haute masse molaire, ou même un matériau insoluble si les amorceurs sont greffés à la surface de particules ou de fibres. Le métal de transition utilisé le plus régulièrement est le cuivre,⁴³ mais d'autres métaux tels le titane,⁴⁴ le molybdène,⁴⁵ le rhénium,⁴⁶ le fer⁴⁷ et le nickel⁴⁸ se sont avérés tout aussi efficaces. Le cuivre demeure cependant à ce jour le métal le plus utilisé, avec sa panoplie de complexes catalytiques et le nombre élevé de monomères pouvant être polymérisés. Le complexe métallique devrait être au moins partiellement soluble dans le milieu de polymérisation. La polymérisation peut être effectuée en milieu homogène ou hétérogène mais, en condition homogène, le contrôle est généralement meilleur puisqu'il est plus facile de doser les concentrations d'activateur et de désactivateur. Les températures de polymérisation varient communément de la température ambiante jusqu'à 150°C. Le système peut être sous vide ou sous pression, il peut y avoir des traces d'humidité dans le milieu ou carrément présence d'eau.⁴⁹

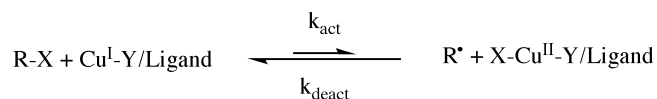
L'oxygène doit être retiré, mais en petite quantité, soit environ moins de 10% du Cu(I), il peut être toléré et plus spécifiquement lorsqu'il y a des espèces

réductrices dans la solution comme le Cu(0). L'ordre d'addition des réactifs peut être modifié, mais l'amorceur est habituellement ajouté en dernier à une solution de catalyseur dans le mélange monomère/solvant.

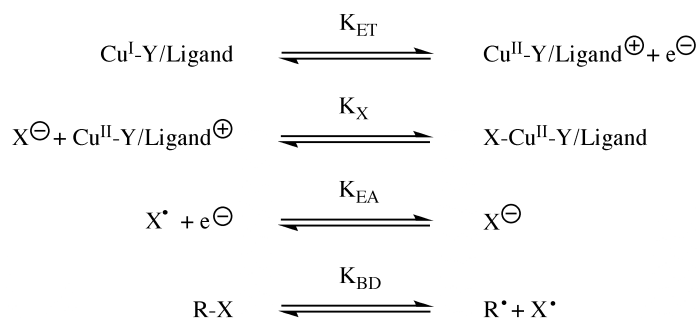
Comprendre et contrôler l'équilibre de la réaction, donc la dynamique du processus de transfert d'atomes selon les paramètres exposés dans le paragraphe précédent, sont les préalables pour une polymérisation réussie.

L'équilibre en ATRP (K_{ATRP}) s'exprime comme la combinaison de plusieurs réactions réversibles (voir Figure 1.6). K_{ATRP} peut s'exprimer comme le produit de la constante d'équilibre pour le transfert d'électrons entre le complexe métallique (K_{ET}), l'affinité électronique de l'halogène (K_{EA}), l'énergie de dissociation de l'halogénure d'alkyle (K_{BD}) et la constante d'équilibre pour le clivage hétérolytique du lien $\text{M}_t^{m+1}-\text{X}$ (K_{X}), qui est un indice de la tendance du complexe à « aimer » l'halogène (l'halogénophilicité). Donc, pour un amorceur donné, l'activité du catalyseur ne dépend pas simplement du potentiel rédox, mais aussi de l'halogénophilicité. Pour des complexes avec des halogénophilicités similaires, le potentiel rédox peut être utilisé comme une mesure de l'activité catalytique en ATRP.^{50, 51}

Transfert d'atome (équilibre général)



Demi-réactions



Constantes d'équilibre

$$K_{\text{ATRP}} = \frac{k_{\text{act}}}{k_{\text{deact}}} = K_{\text{ET}}K_{\text{EA}}K_{\text{BD}}K_{\text{X}} \quad \text{ou} \quad \frac{K_{\text{ATRP}}}{K_{\text{ET}}K_{\text{EA}}K_{\text{X}}} = K_{\text{BD}}$$

Figure 1.6. Constantes de demi-réaction en ATRP.

On peut conclure que, pour un système catalytique donné dans le même solvant (K_{ET} , K_{EA} et K_X considérés constants), K_{ATRP} dépend de l'énergie nécessaire pour effectuer l'homolyse du lien carbone-halogène (K_{BD}). C'est en effet ce qui a été observé récemment lorsque Matyjaszewski et collaborateurs ont calculé l'énergie de dissociation d'une série d'amorceurs ATRP/monomère et qu'ils ont trouvé une étroite relation avec les valeurs de K_{ATRP} mesurées.^{50, 52}

1.3 Polymères en étoile et polymérisations vivantes

1.3.1 Propriétés et caractéristiques des polymères en étoile

Par définition, un polymère en étoile compte au moins trois chaînes avec des groupements terminaux, le tout relié à un seul point de branchement. C'est le cas le plus simple d'une structure branchée et contrôlée (voir Figure 1.7). Puisque chaque molécule compte plus de deux groupements terminaux, les polymères en étoile sont associés aux polymères dendritiques. Les méthodes de préparation sont elles aussi similaires. Ces molécules peuvent être produites par les méthodes dites « arm-first » ou « core-first ». La méthode arm-first nécessite un agent de terminaison multifonctionnel ou encore procède à la réticulation des chaînes préparées de façon contrôlée. Dans la méthode core-first, les chaînes sont introduites en polymérisant directement le monomère sur un amorceur multifonctionnel. Cette dernière méthode est généralement préférée en raison du meilleur contrôle offert.

En raison de leur architecture moléculaire, les dendrimères, des polymères arborescents et en étoile (voir Figure 1.7), sont des candidats plus intéressants pour les applications biomédicales que les polymères linéaires. Ces macromolécules adoptent différentes conformations selon les effets stériques liés à la taille: ils sont plutôt plans et elliptiques aux petites masses, mais deviennent plutôt sphériques si le nombre de motifs augmente. De plus, en bon solvant, le polymère adopte une conformation plus étendue des chaînes, alors qu'en pauvre solvant, le polymère se replie.⁵³ L'amplitude des variations dépend évidemment de la nature du polymère. D'une manière similaire, à faible force ionique dans un solvant, la conformation

étendue est favorisée alors que l'ajout d'électrolytes mène à une contraction résultant en un cœur plus dense.⁵⁴⁻⁵⁶ Le pH peut aussi affecter la conformation des dendrimères ioniques, par exemple en chargeant positivement les amines à faible pH ou les acides carboxyliques à haut pH.^{57, 58}

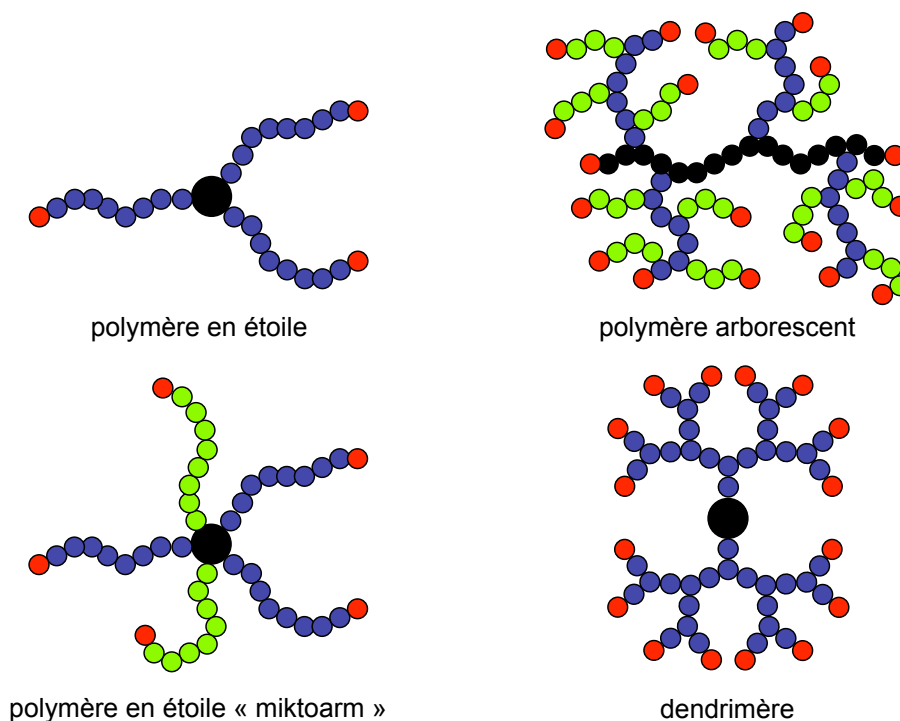


Figure 1.7. Architectures moléculaires de polymères de haute fonctionnalité.

Des environnements différents peuvent exister à l'intérieur même des polymères branchés. Cette propriété est plus marquée chez les molécules de haute masse molaire (structure moins ouverte et moins flexible) en raison de la barrière créée à la périphérie de la molécule qui apporte une distinction entre l'intérieur et l'environnement extérieur, générant un microenvironnement.⁵⁹ Le cœur étant en quelque sorte protégé de l'extérieur et étant entouré des cavités internes, il peut encapsuler des molécules hôtes. Tel que mentionné précédemment, cet espace et ces propriétés peuvent changer suivant les conditions influençant la conformation du polymère.

La viscosité des polymères linéaires augmente linéairement avec la masse molaire et obéit à l'équation de Kuhn-Mark-Houwink-Sakurada. En comparaison, les dendrimères ont une viscosité intrinsèque inférieure qui, de plus, passe par un maximum selon la masse molaire.^{60, 61} Cet effet serait lié à une transition graduelle de forme: une conformation plus ouverte et étendue pour les premières générations et une compacité supérieure pour les générations suivantes. De plus, les enchevêtrements sont moins susceptibles de se produire chez les dendrimères en raison de leur structure compacte. Pour les applications biomédicales, leurs rayons hydrodynamiques inférieurs à ceux de leurs analogues linéaires constituent un avantage puisque cela facilite leur excrétion par les reins.

Les structures branchées forment des molécules avec une grande proportion de groupements exposés à la surface de la pelote statistique à l'image des arbres qui, par leur feuillage, tendent à maximiser leur exposition au soleil. Ces groupements déterminent principalement les propriétés chimiques et physiques de la molécule.⁶⁰ Ils facilitent les interactions multiples et simultanées avec le solvant, les surfaces ou d'autres molécules individuelles. La solubilité, la réactivité de même que l'affinité de liaison sont augmentées par rapport aux polymères linéaires.

Plusieurs ligands comme des sucres, des anticorps et la transferrine ont déjà été greffés en bouts de chaîne des polymères branchés.⁶² Le grand nombre de groupements terminaux permet non seulement d'avoir plusieurs sites potentiels de liaison sur une molécule mais permet aussi de nombreuses interactions multivalentes. Cette multivalence est importante en biologie parce que ces liaisons par les effets statistiques et/ou coopératifs peuvent augmenter l'affinité, l'avidité et la spécificité de la liaison.⁶³

Bien que les groupements terminaux soient d'une grande importance dans l'utilisation des polymères branchés pour le relargage de médicaments et de gènes, les autres fonctionnalités de la molécule ont aussi un rôle à jouer. L'état physico-chimique du cœur, selon l'environnement à la périphérie, et l'architecture spécifique du polymère sont des caractéristiques essentielles. L'intérieur peut généralement fournir un milieu de solubilisation différent de celui retrouvé dans la masse ou à la périphérie de la molécule.

1.3.2 Synthèse de polymères en étoile par polymérisation anionique

Après la découverte de la polymérisation anionique comme technique de synthèse vivante,^{10, 22} les polyméristes ont passé des homopolymères et copolymères linéaires aux homopolymères et copolymères en étoile. Pour arriver à greffer des chaînes linéaires sur un cœur central, trois techniques sont utilisées: la polymérisation avec des amorceurs multifonctionnels, la réticulation avec des agents multiliants et l'utilisation de monomères bifonctionnels dans la polymérisation.

1.3.2.1 Amorceurs multifonctionnels

Pour obtenir des amorceurs multifonctionnels, on utilise des composés organométalliques capables d'amorcer simultanément la polymérisation de plusieurs branches. Pour qu'un amorceur puisse être en mesure de générer un polymère avec des bras équivalents, de faible polymolécularité et de masse molaire contrôlée, il doit avoir des sites de réactivité quasi égaux et la propagation doit être plus lente que l'amorçage. Malheureusement, il y a souvent des problèmes de solubilité de l'amorceur en raison de la forte tendance à l'agrégation. De plus, les effets stériques générés par la proximité d'un nombre important de segments mènent à la création d'un volume d'exclusion. Pour toutes ces raisons, cette méthode de préparation se limite généralement à quelques amorceurs.

L'utilisation du divinylbenzène (DVB) comme amorceur multifonctionnel a été démontrée par Burchard *et al.*^{64, 65} et développée plus tard par Rempp et collaborateurs.^{66, 67} Très dilué dans le benzène, le DVB polymérisé avec le butyllithium forme une suspension de microgels stable. Ces microgels possèdent des sites d'amorçage qui peuvent induire la polymérisation anionique du styrène, de l'isoprène ou du butadiène.

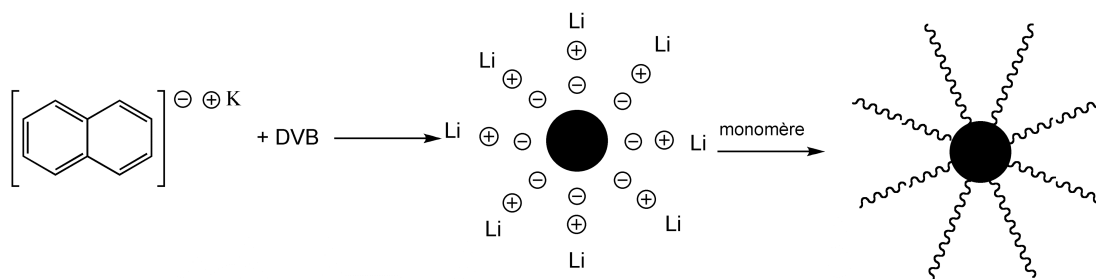


Figure 1.8. Préparation de polymères en étoile à partir du DVB. Un cœur de poly(divinylbenzène) est utilisé pour amorcer la polymérisation de l'EO pour former un polymère en étoile.

Rempp *et al.* ont aussi préparé du poly(oxyde d'éthylène) (PEO) à partir du DVB (voir Figure 1.8).⁶⁸ Le naphthalénide de potassium est utilisé pour générer l'amorceur multifonctionnel avec le DVB. Les polymères résultants ne sont cependant pas très bien définis puisque les résultats de diffusion de la lumière ont donné des fonctionnalités variant entre 5 et 219.

Des POEs en étoile avec 4, 8 et 16 bras ont été préparés à partir de dendrimères de carbosilane.⁶⁹ Les dendrimères sont synthétisés avec du tétravinylsilane en deux étapes: hydrosilylation des groupements vinylsilane avec le dichlorométhylsilane et substitution nucléophile du chlorure de silane avec le bromure de vinylmagnésium. Les groupements terminaux sont convertis en hydroxyles et activés avec du naphthalénide de potassium pour la polymérisation anionique de l'EO. Le polymère résultant possède une faible polymolécularité. Le seul inconvénient de la méthode réside dans la préparation de l'amorceur dendritique.

Des poly(glycérol)s hyperbranchés ou poly(glycérol)s modifiés avec de courtes chaînes de PEO ont aussi été utilisés pour la préparation de polymères en étoile.⁷⁰ Les poly(glycérol)s hyperbranchés ne sont toutefois pas des amorceurs convenables puisqu'ils tendent à s'associer en raison de leurs groupements très polaires. La polymérisation d'oxyde de propylène (PO) avant celle de l'oxyde d'éthylène est nécessaire pour éviter l'association (voir Figure 1.9). Malgré cela, les techniques de caractérisation montrent encore une polymolécularité assez large (1.4 à 2.2).

Des dendrimères polyliithiés de carbosilane ont aussi servi à la préparation de polymères en étoile PEO.⁷¹ La polymolécularité de ce système est étroite, mais aucune information sur le nombre de bras n'est disponible.

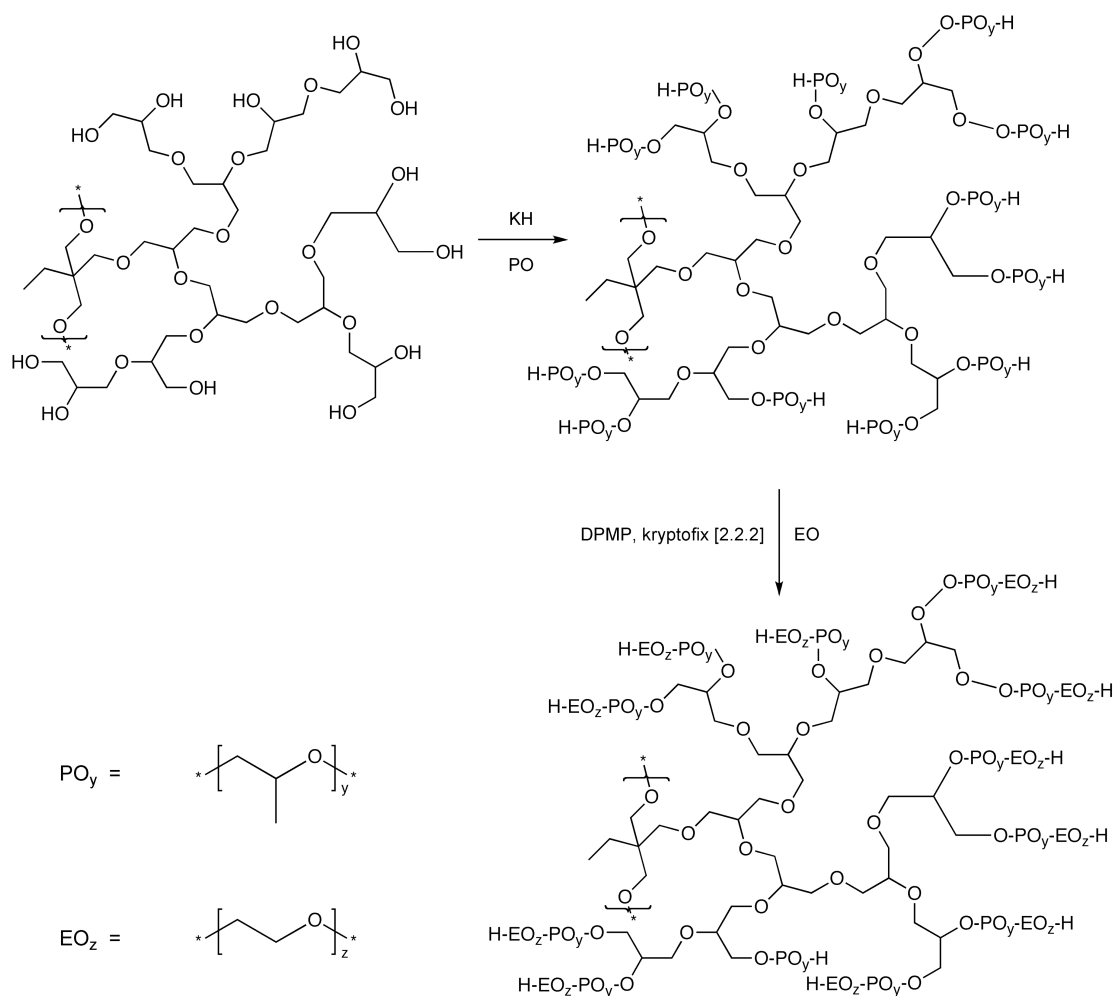


Figure 1.9. Synthèse de PEG en étoile sur des poly(glycérol)s modifiés.⁷⁰

1.3.2.2 Agents multiliants

C'est la méthode la plus utile pour la synthèse de polymères en étoile par polymérisation anionique. Plusieurs agents existent, les plus importants étant les chlorosilanes et les dérivés de chlorométhyl ou bromométhyl-benzène.^{67, 72, 73} La réaction entre les polymères vivants et les chlorosilanes procède sans réactions

secondaires. Cependant, l'efficacité de la réaction dépend de l'encombrement stérique de l'agent de liaison et de la chaîne macromoléculaire.

1.4 Les acides biliaires

1.4.1 Structure et comportement

Les acides biliaires sont une famille de composés constitués d'un squelette stéroïdien contenant un groupement carboxylique et jusqu'à trois groupements hydroxyles. Ces alcools sont liés en positions 3, 7 ou 12 (voir Figure 1.10) avec un acide carboxylique parfois conjugué avec un résidu taurine ou glycine. La Figure 1.10 montre les principaux acides biliaires naturels. Les cycles A et B du précurseur peuvent au cours de la synthèse se fusionner de manière *cis* ou *trans*. Les isomères 5- α , de la fusion *cis*, sont nettement plus abondants que les *allo* (les *trans*) qui ne sont rencontrés qu'occasionnellement chez l'homme, mais plus fréquemment chez les classes inférieures d'animaux (poissons, grenouilles, lézard).⁷⁴ Chez les mammifères, c'est l'acide cholique qui est le plus abondant dans la bile.⁷⁴ Pour l'homme, c'est près de 40% des 2 à 5 g d'acides biliaires contenus dans le corps qui sont de l'acide cholique dérivé ou non.⁷⁴

La grande abondance des acides biliaires vient de la charge de travail qui leur est imposée pour l'assimilation des aliments ingérés. En effet, les acides biliaires sont des molécules amphiphiles en raison de ce qu'il est convenu d'appeler leur « amphiphilicité faciale ». Cette propriété unique découle de l'orientation spatiale des groupements hydroxyles hydrophiles pointant vers la face α , concave, du squelette stéroïdien et des fonctions hydrophobes méthyles orientées du côté convexe β (voir Figure 1.11). Cette structure analogue à celle des surfactants conventionnels, composés d'une chaîne alkyle hydrophobe et d'une tête ionique hydrophile, leur confère ainsi la propriété de s'auto-assembler en milieu aqueux au-delà d'une certaine concentration. La concentration à laquelle la formation de micelles a lieu se nomme la concentration micellaire critique (CMC).

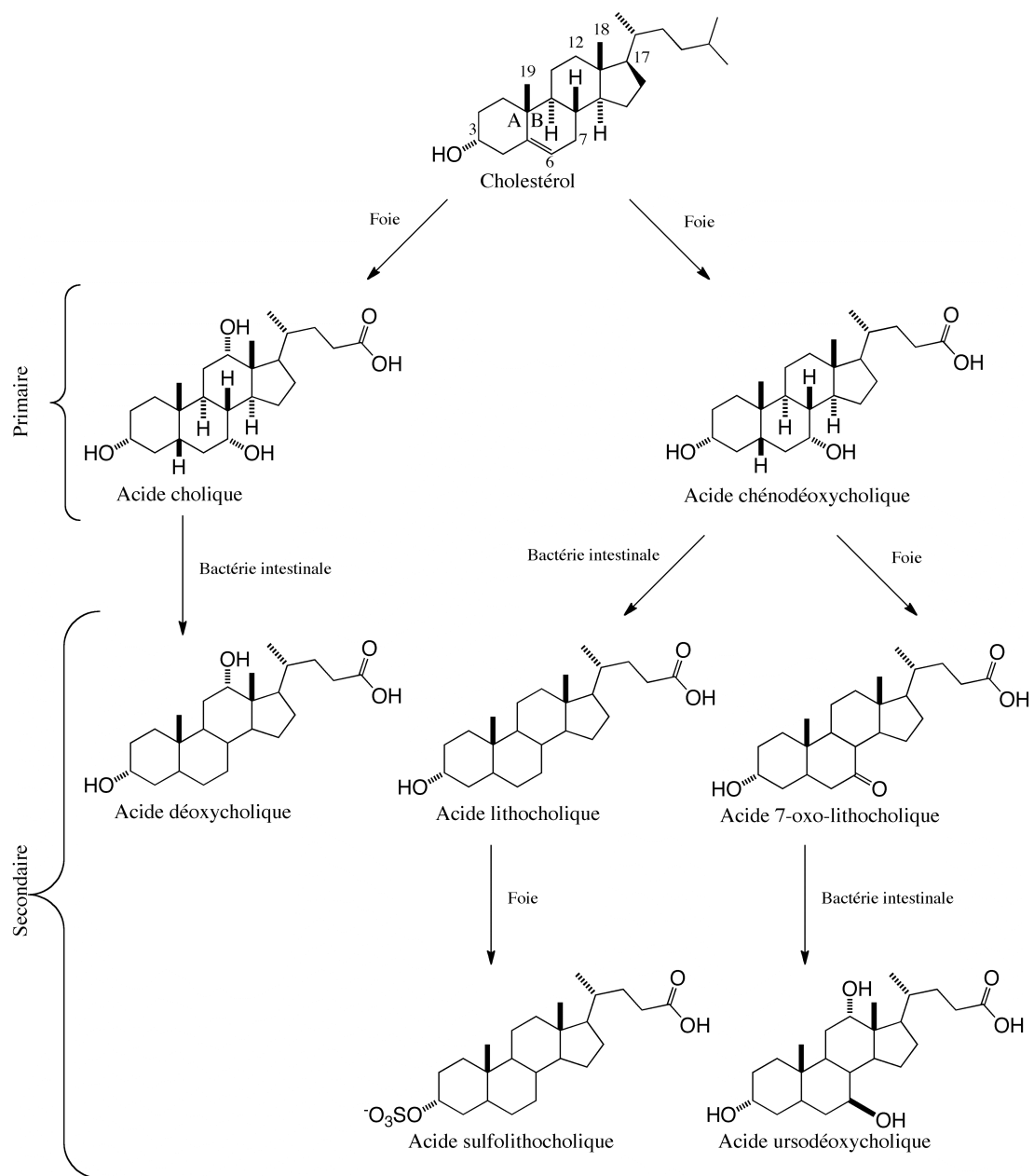


Figure 1.10. Formation des acides biliaries. Les acides biliaries biosynthésés par le foie sont dits primaires alors que les dérivés biosynthésés par des bactéries ou le foie à partir des acides biliaries primaires sont dits secondaires.

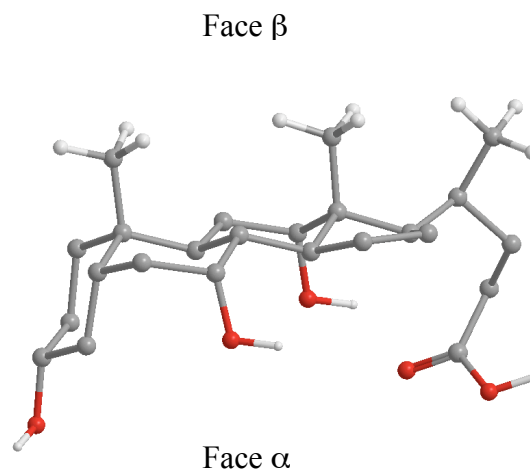


Figure 1.11. Structure tridimensionnelle de l'acide cholique (protons montrés sur les groupements méthyles et hydroxyles). Les groupements méthyles hydrophobes sont orientés d'un côté de la molécule alors que les groupements hydroxyles et carboxyle sont du côté opposé, ce qui génère l'amphiphilicité faciale.

1.4.1.1 Biosynthèse des acides biliaires

Synthétisés par le foie, les acides biliaires primaires sont des dérivés du cholestérol, alors que les acides biliaires secondaires sont produits à partir des acides biliaires primaires sous l'action de microorganismes dans la circulation entérohépatique. Les acides biliaires secondaires peuvent aussi être transformés par des enzymes hépatiques. C'est par les travaux de Bloch *et al.* vers 1940 que l'origine cholestérique des acides biliaires a été démontrée: ils ont retrouvé de l'acide cholique deutérié après avoir injecté du cholestérol deutérié chez un chien.⁷⁵ La transformation du cholestérol en acides biliaires (Figure 1.10) passe par l'épimérisation du groupement 3 β -hydroxyle, la réduction du lien double en C5 et C6, la transformation de la chaîne alkyle liée sur le C17 en acide carboxylique et, finalement, par l'introduction de fonctions hydroxyles en C7 (acide chénodéoxycholique) et, selon le cas, en C3 et C12 (acide cholique). Certaines autres modifications chimiques sur ces deux acides biliaires primaires aboutissent soit à

des acides biliaires secondaires ou encore à des acides biliaires conjugués. La conjugaison se fait principalement avec la taurine et la glycine.⁷⁴

C'est par l'administration d'acides biliaires et par l'observation des effets sur la biosynthèse et la métabolisation du cholestérol que Beher *et al.* ont pu élucider les mécanismes de régulation des acides biliaires qui seraient liés à un double mécanisme de retour.^{76, 77} En effet, ce mécanisme inhibe la conversion du cholestérol en acides biliaires lorsque la concentration de ces derniers est élevée et freine également la biosynthèse du cholestérol lorsqu'il devient en surconcentration.^{78, 79}

1.4.2 Formation de micelles

L'étude des phénomènes entourant la micellisation des acides biliaires permet de mieux comprendre leur sécrétion dans la bile,⁸⁰ leur rôle dans la solubilisation du cholestérol⁸¹ et leurs interactions avec les membranes cellulaires.⁸² Toutefois, ces études ont toujours été laborieuses en raison de la difficulté d'obtenir des échantillons propres et par la complexité du mécanisme en lui-même, comme le démontrera ce qui suit.⁸³⁻⁸⁵ Indices marquants des difficultés rencontrées, les valeurs des CMC varient passablement selon la littérature citée. Plusieurs auteurs ont même mis en doute l'existence d'une CMC et la structure même des micelles fait encore à ce jour l'objet d'investigations.⁸⁶ Lorsque des études de micellisation rapportent le nombre d'agrégation, les résultats divergent énormément, possiblement en raison des différentes techniques utilisées, allant de 1 à 2200 indiquant soit aucune micellisation ou alors d'énormes structures.^{74, 87-90} Pour les CMC, bien qu'aucun consensus n'existe, il semble que les acides biliaires avec trois fonctions hydroxyles s'agrègent à des valeurs supérieures à ceux n'ayant que deux alcools.⁹¹ Contrairement aux surfactants conventionnels composés d'une chaîne alkyle hydrophobe et d'une tête polaire, les acides biliaires sont formés d'un squelette hydrophobe rigide. C'est cette différence qui serait responsable du comportement atypique d'agrégation des acides biliaires.⁹²⁻⁹⁵

Les acides biliaires s'agrègent graduellement.⁹⁶ Ce processus graduel (voir Figure 1.12) passerait par la formation de dimères, qui mèneraient ensuite à la formation de micelles. Gyimesi et Barbcza ont évalué la constante d'équilibre de la

première étape de micellisation par conductimétrie pour un système de cholante de sodium.⁹⁷ La micelle primaire qui résulte de l'association des dimères des sels d'acides biliaires est restreinte stériquement, la forçant à adopter une structure rigide déterminée par les ponts hydrogène spécifiques qui se forment sur le côté hydrophile et les interactions non spécifiques sur la face convexe hydrophobe. Carey et Small ont proposé que, dans la micelle primaire, les plans hydrophobes pointent vers l'intérieur tandis que les plans hydrophiles sont orientés vers l'extérieur, en l'occurrence l'eau.⁷⁴ Cette proposition a été acceptée par certains chercheurs,^{98, 99} alors que d'autres ont préféré développer un nouveau modèle prétextant la faiblesse de l'argumentation concernant la force des interactions hydrophobes conduisant à la stabilité des micelles.^{97, 100, 101} Des études effectuées par ¹H RMN démontrent toutefois la justesse de l'hypothèse de Carey et Small.^{102, 103} C'est en observant l'élargissement des signaux des protons avant et après la concentration micellaire qu'ils ont déduit une association dos-à-dos. En effet, les protons sur les groupements méthyles sont ceux qui présentent le plus grand élargissement alors que les autres signaux sont plutôt stables; cette observation démontre que l'environnement chimique des méthyles a le plus changé, d'où l'hypothèse de l'association dos-à-dos.

Chez les acides biliaires, il existe non seulement des micelles primaires, mais aussi des micelles dites secondaires.⁷⁴ Ces micelles secondaires ne sont autre chose que la fusion de micelles primaires entre elles. Cette capacité à fusionner serait réservée aux sels d'acides biliaires ayant deux groupements hydroxyle: leur surface pour l'interaction hydrophobe est augmentée lors de la formation de la micelle primaire et les liens formés subséquentement sont probablement d'origine hydrophile. La structure de ces micelles secondaires est elle aussi difficile à déterminer, mais des études par viscosimétrie et diffusion de la lumière pointent dans la direction de structures entre la sphère et le cylindre.^{104, 105}

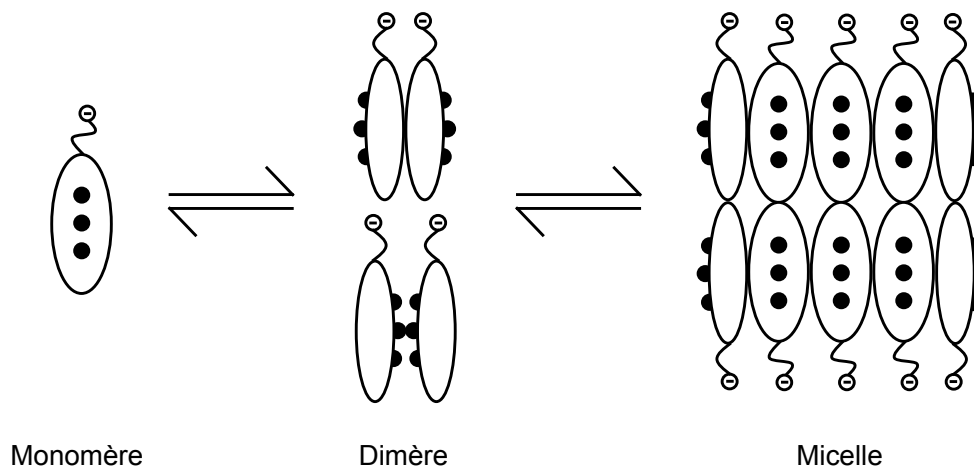


Figure 1.12. Étapes de micellisation des acides biliaires. Les monomères s’associent en dimères pour former des micelles primaires. Ces micelles primaires s’associent ensuite entre elles pour former des agrégats de grande taille que l’on appelle micelles secondaires.

Au cours des années, plusieurs techniques ont été développées pour mesurer la CMC des détergents, qu’on pense à la conductivité électrique,¹⁰⁶ à la tension de surface,¹⁰⁷ à la diffusion de lumière,¹⁰⁸ à la spectroscopie RMN,¹⁰⁹ à l’absorption,⁹³ à la mesure des points de fusion et d’ébullition,^{110, 111} et à la fluorescence.¹¹² Certaines techniques sont dites invasives parce qu’elles utilisent une sonde pour la mesure, alors que d’autres sont non-invasives puisqu’elles ne reposent que sur les variations de propriétés physico-chimiques des solutions. Un large éventail de ces méthodes a été utilisé et adapté pour l’étude des acides biliaires afin de déterminer les CMC et/ou les nombres d’agrégation.¹¹³

Dans le cadre de ce projet, qui inclut le développement et l’étude des nouveaux composés dérivés des acides biliaires, nous avons opté pour des techniques non-invasives afin de minimiser les sources d’erreurs sur les mesures. Plusieurs facteurs pour étudier adéquatement l’agrégation peuvent d’ailleurs jouer en notre défaveur: la polymolécularité des nouveaux polymères et les difficultés d’étude intrinsèques liées aux acides biliaires. Le choix de la tension de surface et de la conductivité a été fait en raison de leurs bonnes sensibilités et reproductibilités.

1.4.3 Rôle des acides biliaires

C'est sous une forme conjuguée, c'est-à-dire que le groupement carboxyle a réagi avec l'amine de la taurine ou de la glycine, que les acides biliaires se présentent le plus couramment dans leurs fonctions essentielles.⁹¹ Lorsque les acides biliaires sont sous forme de sels, ils ont trois fonctions principales dont la première est la solubilisation et l'émulsification des composants de la bile (*e.g.* la lécithine et le cholestérol)¹¹⁴⁻¹²¹ et une action spécifique sur certaines lipases digestives (*e.g.* l'hydrolyse par le pancréas des triglycérides en acides gras et 2- monoglycérides).¹²² Le mécanisme d'action des acides biliaires dans l'hydrolyse des triglycérides est encore mal connu. Toutefois, les hypothèses suivantes sont envisagées: 1- les acides biliaires émulsifient les triglycérides à l'aide de la lécithine biliaire, 2- la conformation de l'enzyme est modifiée par les acides biliaires qui favorisent le positionnement de la lipase à l'interface huile-eau, 3- les produits lipolytiques sont déplacés de l'interface huile-eau vers une autre interface, 4- l'exposition des triglycérides est augmentée par le déplacement des produits lipolytiques logés à l'interface, 5- les estérifications subséquentes des acides gras sont diminuées pour permettre une lipolisation complète et irréversible en favorisant leur ionisation dans les micelles mixtes. La nécessité des acides biliaires pour le bon fonctionnement de l'activité enzymatique de l'hydrolase carboxylate du pancréas ainsi que des lipases du lait a été démontrée chez l'homme.¹²²⁻¹²⁵ Finalement, il faut souligner que les acides biliaires protègent un certain nombre d'enzymes lipolytiques de la digestion protéolytique et de la dénaturation de surface.^{122, 124}

Comme deuxième fonction, les acides biliaires régularisent le transport d'électrolytes et de l'eau dans les intestins.¹²⁶ Cette fonction est connue depuis plus de 100 ans alors que Tappeiner a découvert, en étudiant les sites de réabsorption d'acides biliaires dans l'intestin canin, que la présence d'acides biliaires dans le lumen provoquait une sécrétion d'eau.⁷⁴ Aussi, Davenport *et al.* ont montré que la muqueuse gastrique perd son imperméabilité à l'acide chlorhydrique après une exposition à l'acide taurocholique ou à la bile.^{127, 128} Quant à l'absorption intestinale de l'eau et des électrolytes, l'acide chénodéoxycholique inhibe cette activité: l'effet

rapporté est fonction de la concentration.^{126, 129} Lorsque la réabsorption des acides biliaires dans l'intestin est inhibée, des symptômes de diarrhée apparaissent chez le patient en raison d'une réabsorption d'eau moins efficace.⁷⁴ Les acides biliaires sont donc une force osmotique majeure dans le passage transmembranaire de l'eau du foie à la bile.^{130, 131} L'amplitude de la circulation des acides biliaires est indirectement proportionnelle à leur aptitude à s'agréger.¹³²

Comme troisième et dernière fonction, les acides biliaires régularisent le taux sanguin de cholestérol. Le cholestérol est utilisé dans les membranes phospholipidiques cellulaires de haute densité pour augmenter leur fluidité, ce qui est essentiel au bon fonctionnement de la cellule. Or, le cholestérol, qui est introduit dans les membranes phospholipidiques de basse densité (molécules insaturées), a plutôt tendance à rigidifier la membrane en comblant les interstices occasionnés par les insaturations, ce qui est mauvais pour la santé. Il importe donc de contrôler le taux de cholestérol pour bénéficier pleinement de son rôle vital dans les membranes à concentration adéquate, évitant sa toxicité à haute concentration. Cette régulation du cholestérol s'effectue normalement soit par la biosynthèse d'acides biliaires dans le foie et l'intestin grêle, ou encore par l'action de saponification des acides biliaires (avec la lécithine) qui forme des micelles mixtes et l'expulse des cellules hépatiques.¹³³⁻¹³⁵

1.4.3.1 Transport entérohépatique

Les acides biliaires transitent continuellement du foie à l'intestin et de l'intestin au foie. Ce concept, appelé le transport entérohépatique, a été développé au 17^{ème} siècle par Giovanni Alfonso Borelli en utilisant les travaux de van Reverhorst qui a démontré que les acides biliaires déversés dans l'intestin d'un chien dépassent largement la quantité rejetée par l'intestin.¹³⁶ Ce n'est que vers la fin du 19^{ème} siècle que ce concept fut réellement validé alors que Moritz Schiff ont démontré que la bile de bœuf injectée à un porc est subséquemment retrouvée dans la bile sécrétée par le porc.¹³⁶ La sécrétion de bile dans l'intestin, son absorption intestinale, son transit dans les veines portales et son retour au foie représentent l'ensemble du processus entérohépatique (voir Figure 1.13). La force motrice de ce processus tire son origine

de la biosynthèse continue d'acides biliaires du foie, des contractions péristaltiques de l'intestin grêle, de la contraction intermittente de la vésicule biliaire, du péristaltisme du petit intestin et, finalement, de la circulation sanguine dans les veines portales.¹³⁷ Il faut noter qu'il existe plusieurs circuits entérohépatiques tout au long de l'intestin en relation avec la diversité d'acides biliaires conjugués ou non, en raison de leurs propriétés physico-chimiques différentes.¹³⁸⁻¹⁴⁷

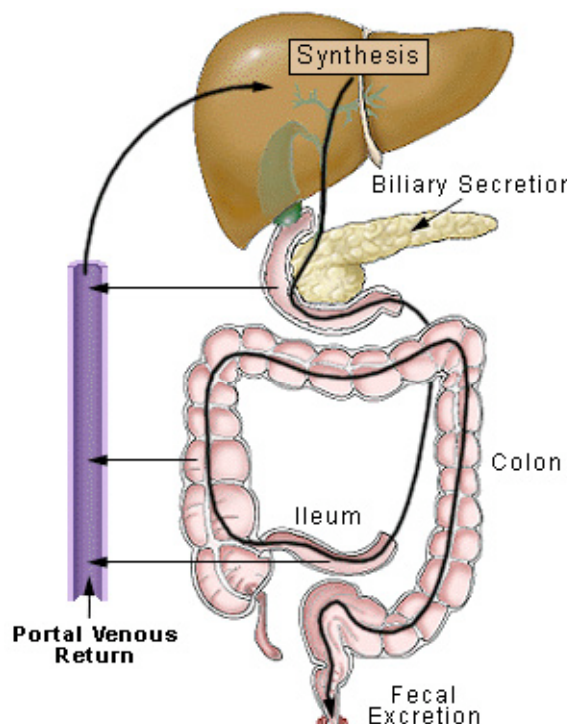


Figure 1.13. Transport entérohépatique.¹⁴⁸ Les acides biliaires primaires et secondaires synthétisés dans le foie et l'intestin sont entreposés dans la vésicule biliaire. Sur demande, ils sont déversés dans le duodénum. Bien qu'une fraction soit éliminée dans les selles, ils sont majoritairement réabsorbés dans la dernière partie de l'intestin grêle pour transiter vers le foie via la veine portale où le cycle peut recommencer.

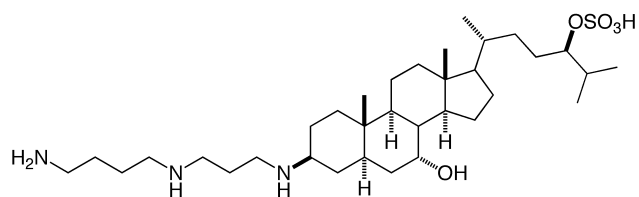
Les acides biliaires hépatiques sont entreposés et concentrés dans la vésicule biliaire pour être ensuite déversés selon un stimulus hormonal, la cholécystokinine, dans le petit intestin. Cette hormone est libérée systématiquement dans le duodénum

par les acides gras et un peu moins par les acides aminés. Ce sont des récepteurs de faible affinité et de haute capacité qui procèdent à la majorité de la réabsorption dans le dernier tiers de l'intestin grêle. Les mécanismes de réabsorption ont été étudiés attentivement et il en ressort que deux principaux mécanismes existent.^{149, 150} Le premier est le transport actif transmembranaire des monomères des sels d'acides biliaires dans l'iléum et le second est la diffusion passive transmembranaire des monomères et micelles.¹⁵¹⁻¹⁵⁴ C'est tout près de 90% des acides biliaires qui sont réabsorbés par transport actif, ce qui en fait le plus efficace des deux mécanismes, l'autre 10% étant accompli par transport passif. Les sites de transport actif d'absorption seraient dotés d'une reconnaissance moléculaire spécifique aux noyaux stéroïdaux, d'une charge positive pour interagir par force coulombienne avec l'anion carboxylate et, finalement, d'une charge négative près de la charge positive afin de repousser les acides biliaires modifiés doublement chargés sur la chaîne latérale.¹⁵⁵⁻¹⁵⁷ Dans les cellules iléocytes, les monomères anioniques d'acides biliaires seraient ancrés à une ou plusieurs protéines, dont la plus importante serait une protéine cytosolique.¹⁵⁸ En réabsorption passive, ce sont les sites anatomiques de la voie gastro-intestinale qui sont mis à contribution.

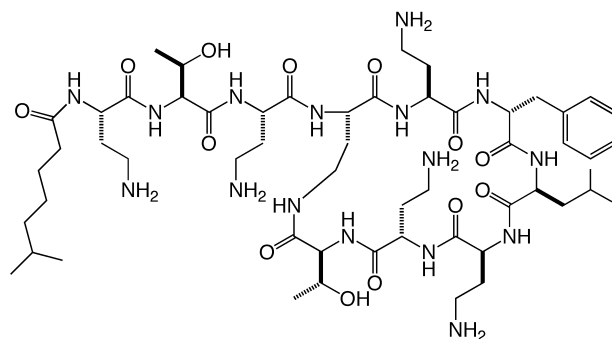
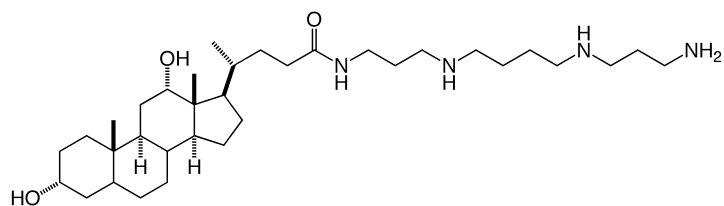
1.5 Utilisation d'acides biliaires modifiés

1.5.1 Activité antibiotique des acides biliaires modifiés

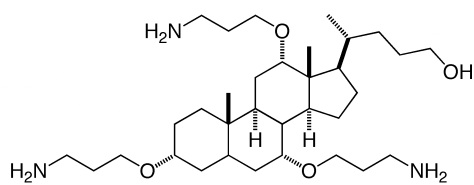
L'utilisation d'antibiotiques dans le traitement de diverses maladies est devenue courante. Malheureusement, plusieurs bactéries développent une résistance à ces antibiotiques synthétiques produits par l'homme. Dans la nature, de tels composés antimicrobiens existent depuis toujours en remplissant encore aujourd'hui leur fonction. Parmi ces molécules biologiques, on retrouve la squalamine et la polymyxine B₂ (PMB, voir Figure 1.14). La squalamine possède un grand spectre d'actions contre les bactéries;¹⁵⁹ cependant, sa synthèse représente un défi considérable.¹⁶⁰⁻¹⁶³



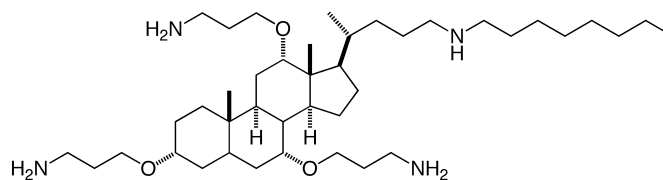
squalamine

polymyxin B₂

1.14a



1.14b



1.14c

Figure 1.14. Acides biliaries mimant l'effet de la squalamine et de la polymyxine B₂. La squalamine et la polymyxine B₂ sont des molécules avec une orientation faciale de leurs groupements. L'utilisation d'acides biliaries modifiés, **1.14a**, **1.14b** et **1.14c**, plus faciles à synthétiser, comme substitués à ces composés, avec sensiblement les mêmes propriétés, est une solution de choix.

Pour cette raison, des dérivés analogues ont été développés,^{164, 165} en particulier certains dérivés d'acides biliaires avec des propriétés comparables à la squalamine (exemple **1.14a**).¹⁶⁶ Il faut souligner que le groupement sulfate n'apparaît généralement pas sur les dérivés; c'est que l'activité mesurée des dérivés est supérieure lorsqu'il n'y est pas. Lors de l'étude du composé **1.14a**, les auteurs ont aussi découvert qu'il avait de plus la capacité de perméabiliser la membrane externe de bactéries à Gram-négatif. Cet éventail intéressant de propriétés est obtenu en seulement deux étapes de synthèse à partir de l'acide déoxycholique, plutôt que les dix-sept étapes initialement accomplies par Moriarty *et al.* pour la synthèse de la squalamine.^{163, 166}

Bien que le PMB soit un peptide, l'utilisation d'acides biliaires s'est encore montrée une solution de rechange des plus intéressantes. C'est en modélisant la structure de la polyxamine B que Li *et al.* ont réalisé que les amines pointaient toutes vers une face de la molécule,¹⁶⁷ résultats appuyés plus tard par Bruch *et al.* et Bhattacharjya *et al.*^{168, 169} L'idée de modifier les acides biliaires avec des fonctions amines, molécule amphiphile faciale, s'est tout naturellement présentée. Les dérivés de l'acide cholique préparés (**1.14b** et **1.14c**) ont démontré des propriétés antibactériennes équivalentes et même supérieures à PMB.^{170, 171} Cette activité était aussi maintenue dans le cas de bactéries « super-résistantes ». L'attachement des amines sur les alcools a permis de forcer leur orientation vers une seule face de la molécule, conduisant aux propriétés recherchées.

Durant l'étude de ces stéroïdes cationiques, l'importance du groupement attaché en position 24 a été démontrée. Les dérivés auxquels une chaîne alkyle a été greffée en C24 (voir **1.14c**) ont une activité contre les bactéries à Gram-négatif et positif, alors que ceux qui sont à chaîne courte (voir **1.14b**) n'ont qu'une activité modérée contre les bactéries à Gram-négatif, mais conservent une forte activité pour les Gram-positifs.¹⁷² Pour expliquer une telle différence, il est proposé que pour induire la mort d'une cellule Gram-négatif, il faut que l'agent bactérien soit capable de traverser la membrane externe pour atteindre la membrane interne de la bactérie et qu'il soit muni d'une chaîne latérale. C'est ce qui est observé chez les dérivés

d'acides biliaires ou de PMB préparés avec ou sans chaîne latérale; tous peuvent perméabiliser les membranes, mais uniquement ceux avec la chaîne latérale sont actifs contre les Gram-négatifs.¹⁷³ Les Gram-positifs n'ont pas de membrane extérieure.

Le PMB n'étant que peu efficace vis-à-vis des Gram-positifs, les mécanismes d'action du PMB et des dérivés d'acide cholique, bien que préparés comme mimiques, ne seraient pas identiques.¹⁷⁰ Les dérivés d'acide cholique auraient un mode d'action apparenté aux peptides cationiques, alors que le PMB agirait d'une autre manière.¹⁶⁸

1.5.2 Acides aminés sur les acides biliaires

Pour augmenter la sélectivité des différents composés actifs avec des membranes, le principe de la complémentarité des charges peut être utilisé: la membrane des bactéries chargée négativement s'associe à des cations et vice versa. L'utilisation d'acides aminés sur un squelette stéroïdien viendrait potentiellement établir une association coulombienne combinée à une chaîne latérale fournissant des interactions plus spécifiques avec un site particulier, ce qui augmenterait l'affinité et la sélectivité.

L'introduction des acides aminés peut facilement se faire en utilisant des liaisons esters sur les alcools (voir Figure 1.15).¹⁷⁴ Cependant, en raison de l'encombrement stérique généré par les différents groupements à proximité les uns des autres sur le squelette stéroïdien, seuls les triesters des acides biliaires n'étant pas α sont stables. Néanmoins, des dérivés tels que **1.15a** peuvent désagréger la membrane de bactéries. Étant donné que les produits d'hydrolyse sont soit endogènes ou relativement non toxiques, ces composés pourraient être utiles comme agents de préservation des aliments; ils devraient toutefois être décomposés avant d'atteindre la flore intestinale et ne causer aucun dommage.

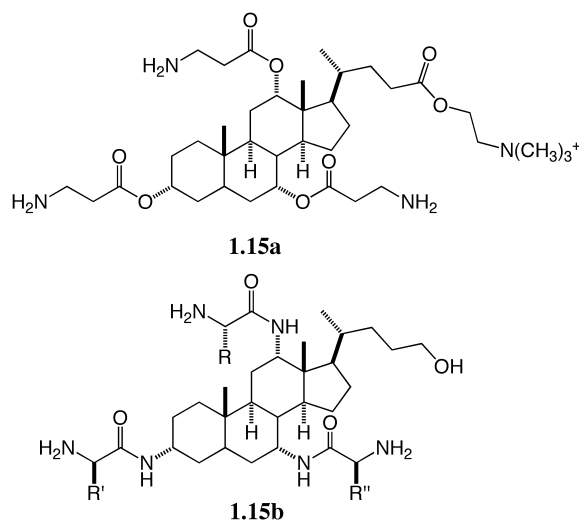


Figure 1.15. Ester et amide d'acide cholique pour contrôler la stabilité des dérivés. Ces dérivés peuvent avoir une activité antimicrobienne et se désagréger en sous-produits endogènes inoffensifs.

Parce que les esters ne sont pas suffisamment stables, l'utilisation de liaisons moins sensibles à l'hydrolyse est nécessaire. Un amide permettrait d'attacher les acides aminés sur l'acide biliaire tout en augmentant la stabilité (voir **1.15b**). La préparation d'analogues triamine de l'acide cholique a déjà été réalisée par Davis et collaborateurs ainsi que Savage *et al.*¹⁷⁵⁻¹⁷⁷ Ces dérivés, avec des acides aminés, présentent des propriétés antimicrobiennes analogues à ceux des esters.¹⁷⁸

1.5.3 Polymères stéroïdiens

C'est probablement Head et Lauter qui ont été les premiers à utiliser le terme « *steroidal polymers* » que nous traduisons ici par *polymères stéroïdiens*.^{179, 180} Cette appellation ne fut que rarement utilisée au cours du temps à quelques exceptions près.¹⁸¹ La raison en est probablement liée au nombre limité de chercheurs dans le domaine et à leur préférence à inclure le nom de la molécule stéroïdienne dans le nom de leur polymère pour plus de clarté. Ici, cette appellation prend tout son sens puisque le sujet est traité dans son sens large.

Dans la littérature, des polymères préparés à partir de monomères dérivés de squelettes stéroïdiens ou encore d'autres polymères auxquels des dérivés ont été greffés sur la chaîne principale sont présentés.¹⁸²⁻¹⁹¹ La majorité du temps, un groupement polymérisable, un méthacryloyl par exemple, est attaché directement ou avec un groupement espaceur sur l'alcool en position C3 via une estérification. La réactivité de l'alcool en C3 étant supérieure à celles en C7 et C12, aucune protection n'est nécessaire.

Selon les conditions de synthèse choisies, la configuration du C3 peut être α ou β .^{183, 190, 191} Les propriétés des homopolymères résultants dépendent du groupement espaceur et de la configuration en C3. Lorsque la configuration 3β est présente, les monomères de méthacryloyl ont un degré de conversion et des masses molaires supérieures, avec des polymolécularités plus étroites et une meilleure solubilité que l'homopolymère 3α .^{189, 191} Cette réactivité du monomère 3β est attribuée à la stéréochimie: la position linéaire du méthacryloyl avec le squelette stéroïdien versus l'angle plus fermé du groupement 3α gênerait la polymérisation.^{191, 192} Cet encombrement stérique autour des alcools chez les acides biliaires cause donc plusieurs difficultés de synthèse et limite quelquefois les produits, en l'occurrence les polymères, qui peuvent être formés à partir des dérivés des acides biliaires.

À notre connaissance, les polymères peigne préparés par ATRP (atom transfer radical polymerization) à partir de tri(éthylène glycol) méthacrylate par Zhu *et al.*, sont le premier exemple de polymères dérivés des acides biliaires avec une masse molaire contrôlée et de faible polymolécularité.¹⁸²

Simultanément, Wan *et al.* ont rapporté la préparation d'un polymère en étoile d'acide cholique de poly(2,2-diméthyltriméthylène carbonate) par polymérisation cationique par ouverture de cycle.¹⁹³ Bien que ce polymère ait trois bras, les auteurs n'ont pas vérifié leur uniformité, mais des indices de polymolécularité assez élevés portent à croire que la structure ne serait pas uniforme. Ces auteurs déplorent l'encombrement qui favorise l'hydrolyse rapide des bras, caractéristique de certains polymères en étoile,^{194, 195} en plus du phénomène récurrent d'hydrolyse chez les acides biliaires lorsque substitués en C3, C7 et C12 par des esters.¹⁹⁶

Il est parfois plus facile d'introduire l'acide biliaire sur le polymère une fois qu'il est préparé.¹⁹⁷⁻²⁰⁵ Le plus souvent, les acides biliaires sont introduits sur des polymères hydrophiles afin de les rendre partiellement lipophiles et de générer ainsi une amphiphilicité pour promouvoir l'agrégation. Les acides biliaires sont en bouts de chaîne²⁰⁰⁻²⁰⁴ ou comme chaîne pendante^{197-199, 205}.

L'utilisation d'acides biliaires comme groupements pendants s'est surtout faite avec les polysaccharides (dextrane et chitosane),^{197, 205} les protéines¹⁹⁸ et le poly(aminométhylstyrène).^{203, 204} Le degré de substitution dépend de l'application envisagée, mais se situe généralement autour de 5 à 15% molaire afin de préserver la solubilité dans l'eau du polymère. Avec le dextrane, le chitosane et l'héparine modifiés avec de l'acide cholique ou déoxycholique, le nouveau polymère est alors capable d'agrégation.^{197, 206, 207} Ces polysaccharides modifiés en solution dans l'eau forment des agrégats entre 20 et 200 nm de diamètre, chaque composé ayant ses propriétés uniques.

Les acides biliaires en bouts de chaîne ont été préparés sur des PEGs et PEGs modifiés.^{202, 208, 209} Les composés formés ont été utilisés dans le traitement des maladies de la vésicule biliaire. Des amino PEGs modifiés avec l'acide déoxycholique et avec un sucre ou un méthoxy à l'autre bout de la chaîne ont aussi été utilisés pour préparer des polymères amphiphiles.^{202, 208} Les CMCs des nouveaux composés sont nettement en dessous de celles des acides biliaires eux-mêmes. Les agrégats formés font de 120 à 180 nm tel que déterminé par diffusion de la lumière. Attacher trois acides biliaires en bouts de chaîne d'un PEG en étoile diminue encore plus la CMC et la taille des agrégats par rapport aux PEGs linéaires substitués.²¹⁰ Lorsque l'acide cholique est greffé au polymère thermosensible poly(*N*-isopropylacrylamide), la température de solubilisation demeure quasi intacte, mais le nouveau composé peut former des micelles.²⁰¹

Ces polymères de stéroïdes trouvent des applications dans le milieu médical en raison de leur biocompatibilité et de leur faible toxicité. Ils sont principalement utilisés dans le domaine de la vectorisation de médicaments (voir section 1.6.2).

1.6 Micelles

1.6.1 Importance pharmacologique de la micellisation

La micellisation est un phénomène général qui augmente la biodisponibilité des composés pharmaceutiques liposolubles lorsque administrés oralement. En effet, les micelles mixtes formées d'acides biliaires et d'acides gras, suite à la digestion des gras dans la diète, solubilisent aussi ces médicaments. Les micelles sont aussi utilisées comme adjuvants et vecteurs de médicaments en pharmacie, et pour le relargage contrôlé. L'emploi de micelles pour l'administration de principes actifs est très souvent bénéfique soit en augmentant la biodisponibilité ou encore en diminuant les effets secondaires. La solubilisation des composés difficilement solubles en milieu aqueux est augmentée, la capacité à traverser les membranes biologiques et la biodistribution sont aussi améliorées. En utilisant des surfactants spéciaux, il est possible d'introduire de nouvelles propriétés pour augmenter le temps de circulation dans le sang.

Malheureusement, les micelles mixtes composées de surfactants de faibles masses molaires sont généralement instables thermodynamiquement en milieu aqueux et sont donc sujettes à la dissociation si diluées. In vivo, les micelles se dissocient immédiatement après leur administration, suivie d'une précipitation du médicament. Il faut donc trouver de nouvelles molécules plus stables face à la dilution; ce sont les polymères amphiphiles.²¹¹

1.6.2 Surfactants polymères

L'utilisation de systèmes polymères sert à minimiser la dégradation, les pertes, les effets secondaires, à augmenter la biodisponibilité et à mieux cibler les zones d'intérêt des principes actifs lorsqu'ils sont administrés aux patients. Lorsque des polymères sont utilisés pour vectoriser les médicaments, ils peuvent être rendus dégradables, plus ciblés (en leur liant par exemple des anticorps) et capables de répondre à des stimuli tels la température et le pH.

Les micelles polymères offrent beaucoup d'avantages parce qu'elles peuvent solubiliser des principes actifs peu solubles et donc augmenter la biodisponibilité,

elles peuvent demeurer longtemps dans le système sanguin pour permettre une accumulation graduelle du médicament dans la zone cible, elles peuvent aussi être plus spécifiques en leur greffant un ligand particulier sur leur surface externe.²¹² La micelle offre aussi une protection afin d'éviter une inactivation du médicament par le milieu biologique environnant.²¹² La structure de la micelle est construite de telle sorte que sa surface extérieure, qui est exposée au milieu aqueux, soit composée d'éléments inertes vis-à-vis le sang et les autres tissus. De ce fait, elle peut demeurer un certain temps en circulation sans être reconnue par les protéines ou les phagocytes: c'est une propriété essentielle.

Il y a trois raisons principales pour préférer une circulation prolongée, la première étant un besoin de garder certains composés pharmaceutiques dans le sang suffisamment longtemps. Avec une circulation prolongée, la concentration de l'agent pharmaceutique peut être maintenue pour une meilleure biodisponibilité. Deuxièmement, ces nanostructures peuvent s'accumuler dans les sites pathologiques affectés par des vascularisations fuyardes, comme les tumeurs et les inflammations, pour ainsi augmenter la disponibilité du médicament dans cette zone.^{213, 214} Troisièmement, le ciblage peut être amélioré puisque plus d'agent passe vers la cible, ce qui augmente le nombre d'interactions entre les deux entités.²¹⁵

1.7 Systèmes polymériques en étoile dérivés du PEG

Les polymères en étoile constitués de PEG sont encore peu utilisés et les développements à ce sujet progressent d'année en année. Jusqu'à présent, ce type de structure a trouvé principalement des applications dans le domaine des systèmes micellaires, des hydrogels ainsi que dans le revêtement de surfaces.

1.7.1 Hydrogels

Un hydrogel est un mélange d'eau et de polymère enchevêtré et réticulé physiquement ou chimiquement. Le polymère insoluble dans l'eau peut se gonfler pour permettre à une quantité importante d'eau de se retrouver à l'intérieur des cavités. Le pourcentage d'eau dans l'hydrogel peut atteindre plus de 99%. Étant

constitués principalement d'eau, ces produits sont flexibles, tout comme les tissus vivants, et sont aussi naturellement compatibles puisqu'ils sont constitués en grande partie d'eau.

Dans l'industrie pharmaceutique, les hydrogels sont chargés d'un principe actif pour le libérer en temps voulu. L'utilisation de ces hydrogels vise entre autres à diminuer les effets secondaires, à maintenir une concentration optimale de médicaments dans le plasma sanguin durant une plus longue période de temps ou encore à la protection du principe actif contre une dégradation ou une élimination trop rapide.²¹²

Les hydrogels à base de poly(acide lactique)-poly(éthylène glycol) (PLA-PEG), poly(ϵ -caprolactone)-poly(éthylène glycol) (PCL-PEG) ou poly(L-lactide-*co*-glycolide)-poly(éthylène glycol) (PLLG-PEG) en étoile tels qu'utilisés par plusieurs auteurs sont intéressants pour la préparation d'hydrogels.²¹⁶⁻²²⁰ Parce que le PEG a un volume hydrodynamique très grand, les hautes masses molaires risquent de ne pas d'être éliminées par les reins. En ayant recours à une forme en étoile, le rayon hydrodynamique plus petit de ces architectures par rapport aux équivalents linéaires permet d'utiliser des PEGs de plus haute masse molaire afin de contrôler plus précisément les propriétés mécaniques et l'hydratation du produit. De plus, parce qu'ils ont une cristallinité réduite en raison de la structure en étoile, ils sont plus souples et gonflent plus rapidement.^{216, 218} Le gonflement plus rapide accélère la dégradation du gel, mais la structure en étoile permet de ralentir cette désintégration comparativement au polymère linéaire, en raison de la disposition différentes des unités.²¹⁶ Cette période de dégradation plus lente est renversée après environ 3 semaines, ce qui peut être un avantage si le principe actif est épuisé et qu'il ne reste plus qu'à se débarrasser de la matrice polymère.

1.7.2 *Systèmes micellaires*

Pour augmenter la solubilité de composés peu solubles en milieu aqueux, les polymères en étoile formant des micelles polymères unimoléculaires sont une solution de choix. Ces micelles sont thermodynamiquement plus stables que les

micelles conventionnelles en ce qu'elles ne sont pas affectées par la dilution. Les composés hydrophobes ne sont pas solubilisés à l'intérieur d'un agrégat de molécules, mais bel et bien par une seule molécule de polymère amphiphile. Du point de vue biomédical, cela représente un avantage certain alors que la prise de médicaments entraîne un effet important de dilution.

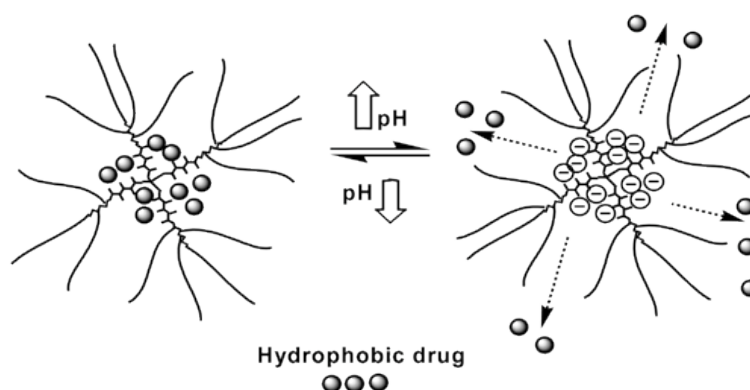


Figure 1.16. Schématisation du principe de libération de médicaments par Jones *et al.*²²¹ L'ionisation des groupements carboxyliques dans le cœur de la micelle augmente la polarité, ce qui facilite la libération du médicament hydrophobe qui s'y trouve.

Jones *et al.* ont préparé des micelles polymères unimoléculaires par ATRP en utilisant la méthode dite « core-first » (voir *Propriétés et caractéristiques des polymères en étoile*).²²¹ Ce polymère, non biodégradable mais de cœur ionisable, a été développé comme vecteur potentiel de médicaments par voie orale où le médicament serait libéré de préférence dans l'intestin plutôt que l'estomac (voir Figure 1.16). L'introduction de groupements ioniques dans le cœur de la micelle permet une libération plus rapide et spécifique du principe actif. En l'absence de fonctionnalités sensibles à l'environnement, le composé hydrophobe s'échappe de l'intérieur de l'agrégat par simple diffusion. Cette libération peut être grandement accélérée en présence de groupements soigneusement choisis pour activer le mécanisme en temps opportun. Le polymère à base d'acide méthacrylique et de PEG, liés sur le pentaérythritole (Figure 1.17), est complètement ionisé à un pH d'environ 9, ce qui maintient le cœur hydrophobe dans l'estomac (pH de 1-2) mais le

rend hydrophile dans l'iléon (pH 7). Des études *in vitro* par dialyse ont démontré que la progestérone, le principe actif, était libérée du sac à dialyse nettement plus rapidement en l'absence du polymère. Ils ont aussi démontré que le pH dans lequel le sac était plongé agissait sur la vitesse à laquelle le composé s'échappait.

Bien qu'il s'agisse de micelles unimoléculaires, Jones *et al.* ont tout de même observé qu'elles s'associaient pour former des agrégats à concentrations relativement élevées.

Les micelles unimoléculaires constituées de polymères en étoile ne peuvent accommoder parfois que quelques molécules hydrophobes dans leur intérieur. Pour cette raison, Fréchet *et al.* ainsi que Kojima *et al.* ont utilisé un cœur dendritique, qui peut généralement accueillir un plus grand nombre de molécules hôtes, pour y attacher du PEG.^{222, 223} La capacité de solubilisation du dendrimère est directement reliée à sa taille. Parce qu'il est difficile de préparer des dendrimères de génération supérieure et que leur taille n'augmente plus que très lentement après un certain seuil, cela limite la capacité d'encapsulation. Wang *et al.* ont utilisé un cœur dendritique hydrophobe auquel ils ont attaché des copolymères bloc amphiphiles pour augmenter le nombre et la taille des molécules pouvant y être solubilisées.²²⁴ En utilisant un dendrimère de polyamidoamine (PAMAM) et en y attachant successivement de la poly(ϵ -caprolactone) lipophile et, ensuite, du PEG, ils ont préparé un nouvel agent de vectorisation. La PCL est polymérisée par ouverture de cycle et le PEG est introduit par estérification des bouts de chaîne (voir Figure 1.18).

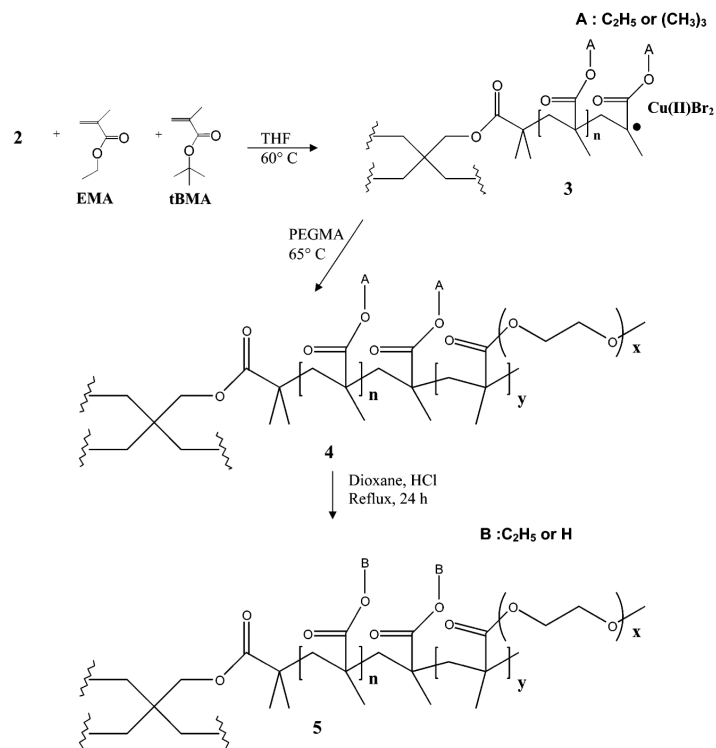


Figure 1.17. Préparation de micelles polymères unimoléculaires.²²¹ L'amorceur (**2**) est polymérisé avec les monomères d'intérêt pour former le polymère en étoile. Dans la seconde étape, l'ajout du PEGMA rend le polymère amphiphile alors que l'hydrolyse de l'ester de *tert*-butyle donne la sensibilité au pH.

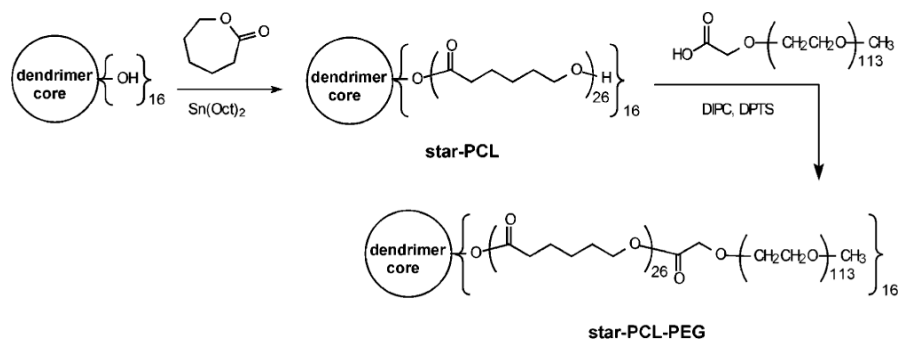


Figure 1.18. Préparation de polymères en étoile avec un cœur dendritique.²²⁴ La capacité d'accommodation des composés hydrophobes par le cœur dendritique est augmentée par la polymérisation du PCL, alors que l'ajout du PEG en périphérie rend le polymère hydrosoluble.

Les nouvelles micelles unimoléculaires se sont avérées former des agrégats telles les micelles conventionnelles, mais toutefois avec un nombre d'unimères inférieur.²²⁴ Avant d'atteindre la concentration « critique », des colorants hydrophobes pouvaient être solubilisés en milieu aqueux, mais cette solubilisation était meilleure au-delà la concentration critique. La raison de cette association serait liée au PEG. Lorsque la densité de PEG à la périphérie de la molécule est faible, les interactions intermoléculaires seraient facilitées alors, qu'à densité élevée, il y aurait formation d'une couche hydrophile plus dense qui réduirait la formation de micelles intermoléculaires.

Tel qu'espéré, la capacité de stockage des micelles est relativement bonne, avec jusqu'à trente-trois molécules d'indométacines par micelle.²²³ Un avantage important du polymère vient de son absence de toxicité dans les conditions utilisées par les expérimentateurs. L'utilisation de PEG comme segment hydrophile aide certainement à cela. De plus, lorsque le polymère est mélangé au principe actif, ce dernier conserve son activité à un niveau comparable à celui du médicament seul.

Quelques articles ont paru dans la littérature sur les micelles constituées de polymères en étoile à partir de la PCL et du PEG.²²⁵⁻²²⁷ Avec un cœur dendritique et trente-deux bras de PLA ou de PCL liés à du PEG, des unimicelles sont formées avec une bonne capacité d'accommodation de molécules hydrophobes, l'étoposide, pour le traitement du cancer.²²⁵ Avec un cœur en cyclodextrine et sept bras de PCL-PEG, il y aurait formation d'agrégats d'environ 40 nm tel que vu par TEM.²²⁶ Quaglia *et al.* ont obtenu des micelles de 45 nm de diamètre pour un polymère en étoile de quatre bras PCL/PEG très stable cinétiquement et n'ayant pas tendance à s'agréger entre elles. La toxicité de ces produits envers les globules rouges et les cellules HeLa était négligeable.²²⁷

1.7.3 Revêtement de surfaces

Depuis déjà plusieurs années, il est connu que l'adhésion des biomatériaux aux surfaces peut créer de sérieux problèmes entre autres dans les dispositifs médicaux, les implants et les cathéters. Plus récemment le domaine des biotechnologies, avec les biocapteurs et biocatalyseurs, a fait appel à des surfaces

résistantes à l'adhésion des cellules et/ou protéines pour améliorer les performances *in vivo* de leur technologie. Pour les biotechnologies, la surface doit résister à l'adsorption non spécifique des protéines et préserver à la fois la conformation active des protéines qui peuvent être volontairement attachées à la surface. Pour restreindre cette adsorption, on revêt généralement les surfaces de monocouches auto-assemblées,^{228, 229} d'hydrogels²³⁰ ou de protéines.^{231, 232} Le revêtement de surfaces par le PEG a démontré une bonne capacité contre l'adsorption des protéines.²³³⁻²³⁶ Les polymères en étoile dérivés du PEG ont aussi un futur prometteur dans ce domaine.²³⁶⁻²³⁹

Les polymères en étoile, avec leur grande densité de groupements fonctionnels, peuvent être liés à la surface et réticulés par voie intermoléculaire afin d'augmenter la densité de surface et l'épaisseur de la couche par rapport aux polymères linéaires. En effet, des études d'adsorption de protéines globulaires ont mis en évidence la relation entre l'hydrophobicité d'une surface et sa tendance à adsorber les protéines irréversiblement. Les protéines globulaires qui ont un cœur hydrophobe et une couche extérieure hydrophile ont tendance, lorsqu'elles entrent en contact avec la surface hydrophobe, à modifier leur conformation pour favoriser les interactions hydrophobes. Pour éviter cette dénaturation, il faut rendre la surface inerte vis-à-vis l'adsorption des protéines pour que, thermodynamiquement, l'attraction avec la surface soit moins importante que les répulsions avec la couche de polymère, ou à tout le moins, d'un point de vue cinétique, pour que le phénomène soit négligeable sur l'intervalle de temps utile.

1.8 Objet de la thèse

L'objectif principal de cet ouvrage consiste à développer de nouveaux matériaux polymériques biocompatibles et spécifiques dans leur application. La stratégie retenue consiste à incorporer des molécules naturelles, les acides biliaires, dans des polymères tout en contrôlant l'architecture et la nature des groupements chimiques sur les chaînes. Nous devons donc premièrement développer ces nouveaux composés, deuxièmement les caractériser et, finalement, voir à de possibles applications.

Les acides biliaires sont des molécules de choix en raison de leur présence relativement importante dans le corps humain, démontrant leur faible toxicité. De ce fait, il est possible de croire que, si de nouveaux composés basés sur ces entités sont développés et injectés à l'humain, les risques de toxicité seraient moins grands que pour d'autres molécules. À partir de cette hypothèse, il devient intéressant d'utiliser les acides biliaires comme molécules de base dans le développement de composés biocompatibles.

Les acides biliaires, avec leur origine cholestérique, et le cholestérol étant un agent important dans la structure des membranes cellulaires, les possibilités d'applications de ses dérivés sont intéressantes (antibactérien, transvection). Le groupement carboxylique des acides biliaires limite leur solubilité à des pH supérieurs à environ 5,5. En modifiant la nature du groupement hydrophile, il est possible d'étendre sur un éventail de pH plus large les capacités d'agrégation en raison d'une solubilité étendue. Pour réaliser ce projet, il nous faut simplement attacher des polymères cationiques, anioniques ou neutres: cette diversité offrira davantage d'opportunités d'applications. Ces nouveaux surfactants pourraient être utilisés dans des conditions où les acides biliaires sont inopérants et aussi trouver de toutes nouvelles utilités.

En produisant des polymères en étoile, nous allons augmenter le nombre de groupements fonctionnels disponibles sur la molécule, permettant d'y attacher des groupements d'intérêt pour les applications futures. Il nous sera donc important de mettre au point des conditions réactionnelles pour générer ces structures. De plus, la méthode développée devrait être polyvalente afin de minimiser les efforts de synthèse et de pouvoir garder l'ensemble du procédé simple.

1.9 Présentation des travaux

La thèse compte cinq chapitres incluant celui-ci dédié à l'introduction et à la revue de la littérature.

Le deuxième chapitre traite de la préparation de polymères d'acide acrylique dérivés d'acide cholique par ATRP. On y retrouve la méthode de préparation de l'amorceur dérivé de l'acide biliaire, les conditions de synthèse et les propriétés

d'agrégation. (G. Giguère et X. X. Zhu *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2007**, *45*, 4173)

Dans le troisième chapitre, la synthèse de polymères en étoile par voie anionique à partir de dérivés biliaires est présentée. Le monomère choisi est de type non ionique. Les propriétés d'association sont mises en évidence en fonction de la longueur de la chaîne et une comparaison avec l'acide cholique est effectuée. (J. Luo, G. Giguère et X. X. Zhu *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 900)

Au quatrième chapitre, la méthode de préparation anionique est encore utilisée avec quelques modifications de celle du chapitre troisième. La méthode développée permet de synthétiser facilement le polymère et d'ajouter subséquemment la charge désirée. Il est démontré que les nouveaux composés peuvent s'agréger. (G. Giguère et X. X. Zhu *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 201-206)

Le cinquième et dernier chapitre consiste en une discussion générale des travaux de la thèse ainsi qu'en une conclusion avec une proposition de travaux futurs à la lumière de ces résultats.

1.10 Références

1. Mark, H. F., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1981**, *20*, 303-304.
2. Mathiesen, E. B.; Lindgren, U.; Reinholt, F. P.; Sudmann, E., *Acta Orthop. Scand.*, **1986**, *57*, 193-196.
3. Mii, S.; Mori, A.; Sakata, H.; Kawazoe, N., *J. Am. Coll. Surg.*, **1998**, *186*, 581-588.
4. Breusch, S. J.; Kuhn, K. D., *Orthopade*, **2003**, *32*, 41-50.
5. Moreira-Gonzalez, A.; Jackson, I. T.; Miyawaki, T.; Barakat, K.; DiNick, V., *J. Craniofac. Surg.*, **2003**, *14*, 144-153.
6. Gu, S. J.; Sivin, I.; Du, M. K.; Zhang, L.; Ying, L. R.; Meng, F.; Wu, S. L.; Wang, P. Z.; Gao, Y. L.; He, X.; Qi, L. F.; Chen, C. R.; Tiu, Y. P.; Wang, D., *Contraception*, **1995**, *52*, 99-103.
7. Chehade, M.; Elder, M. J., *Aust. N. Z. J. Ophthalmol.*, **1997**, *25*, 255-263.

8. Ziegler, K.; Colonius, H.; Schafer, O., *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1929**, 473, 36-56.
9. Ziegler, K., *Angew. Chem.*, **1936**, 49, 499-502.
10. Ziegler, K.; Jakob, L.; Wollthan, H.; Wenz, A., *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1934**, 511, 64-88.
11. Ziegler, K.; Schaper, O., *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1930**, 479, 150-179.
12. Schlenk, W.; Bergmann, E.; Benedikt, B.; Blum, O.; Bresiewicz, C.; Rodloff, I.; Appenrodt, J.; Ehninger, K.; Ender, H.; Israel, R.; Knorr, A.; Kohler, T.; Michael, A.; Muller, E.; Rubens, E.; Schmidt-Nickels, W.; Stoffers, W.; Wiegandt, A.; Willstadt, H., *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1928**, 463, 1-97.
13. Schlenk, W.; Bergmann, E.; Blum-Bergmann, O., *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1930**, 479, 78-89.
14. Schlenk, W.; Appenrodt, J.; Michael, A.; Thal, A., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1914**, 47, 473-490.
15. Scott, N. D.; Walker, J. F.; Hansley, V. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **1936**, 58, 2442-2444.
16. Lipkin, D.; Paul, D. E.; Townsend, J.; Weissman, S. I., *Science*, **1953**, 117, 535-536.
17. Paul, D. E.; Lipkin, D.; Weissman, S. I., *J. Am. Chem. Soc.*, **1956**, 78, 116-120.
18. Scott, N. D., 1939, (E. I. du Pont de Nemours & Co.). 2181770
19. Robertson, R. E.; Marion, L., *Can. J. Research*, **1948**, 26B, 657-667.
20. Beaman, R. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **1948**, 70, 3115-3118.
21. Blomquist, A. T.; Tapp, W. J.; Johnson, J. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **1945**, 67, 1519-1524.
22. Szwarc, M., *Nature (London, United Kingdom)*, **1956**, 178, 1168-1169.
23. Waack, R.; Rembaum, A.; Coombes, J. D.; Szwarc, M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, 79, 2026-2027.
24. Flory, P. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1940**, 62, 1561-1565.
25. Flory, P. J., *Principles of Polymer Chemistry*. Cornell University Press: Ithaca, 1953; p 672.

26. Wojtech, B., *Makromol. Chem.*, **1963**, *66*, 180-195.
27. Kazanskii, K. S.; Lapienis, G.; Kuznetsova, V. I.; Pakhomova, L. K.; Evreinov, V. V.; Penczek, S., *Polym. Sci. Ser. A*, **2000**, *42*, 585-595.
28. Szwarc, M., Carbanions living polymers and electron transfer processes. Interscience Publishers: Toronto, 1968; p 695.
29. Penczek, S.; Cypryk, M.; Duda, A.; Kubisa, P.; Slomkowski, S., *Prog. Polym. Sci.*, **2007**, *32*, 247-282.
30. Solovyanov, A. A.; Kazanskii, K. S., *Vysokomolekulyarnye Soedineniya, Seriya A*, **1972**, *14*, 1063-1071.
31. Kazanskii, K. S.; Solovyanov, A. A.; Entelis, S. G., *Eur. Polym. J.*, **1971**, *7*, 1421-1433.
32. Yu, G. E.; Heatley, F.; Booth, C.; Blease, T. G., *J. Polym. Sci. Pol. Chem.*, **1994**, *32*, 1131-1135.
33. Quirk, R. P.; Lizarraga, G. M., *Macromol. Chem. Phys.*, **2000**, *201*, 1395-1404.
34. Minisci, F., *Acc. Chem. Res.*, **1975**, *8*, 165-171.
35. Wang, J. S.; Matyjaszewski, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 5614-5615.
36. Fischer, H., *Chem. Rev.*, **2001**, *101*, 3581-3610.
37. Vana, P.; Davis, T. R.; Barner-Kowollik, C., *Macromol. Rapid Commun.*, **2002**, *23*, 952-956.
38. Tang, W.; Tsarevsky, N. V.; Matyjaszewski, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 1598-1604.
39. Matyjaszewski, K.; Nanda, A. K.; Tang, W., *Macromolecules*, **2005**, *38*, 2015-2018.
40. Matyjaszewski, K.; Coca, S.; Gaynor, S. G.; Wei, M. L.; Woodworth, B. E., *Macromolecules*, **1998**, *31*, 5967-5969.
41. Braunecker, W. A.; Matyjaszewski, K., *Prog. Polym. Sci.*, **2007**, *32*, 93-146.
42. Tsarevsky, N. V.; Braunecker, W. A.; Matyjaszewski, K., *J. Organomet. Chem.*, **2007**, *692*, 3212-3222.
43. Matyjaszewski, K.; Xia, J., *Chem. Rev.*, **2001**, *101*, 2921-2990.

44. Kabachii, Y. A.; Kochev, S. Y.; Bronstein, L. M.; Blagodatskikh, I. B.; Valetsky, P. M., *Polym. Bull.*, **2003**, *50*, 271-278.
45. Maria, S.; Stoffelbach, F.; Mata, J.; Daran, J. C.; Richard, P.; Poli, R., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 5946-5956.
46. Kotani, Y.; Kamigaito, M.; Sawamoto, M., *Macromolecules*, **2000**, *33*, 6746-6751.
47. Matyjaszewski, K.; Wei, M. L.; Xia, J. H.; McDermott, N. E., *Macromolecules*, **1997**, *30*, 8161-8164.
48. Uegaki, H.; Kotani, Y.; Kamigaito, M.; Sawamoto, M., *Macromolecules*, **1997**, *30*, 2249-2253.
49. Qiu, J.; Charleux, B.; Matyjaszewski, K., *Prog. Polym. Sci.*, **2001**, *26*, 2083-2134.
50. Gillies, M. B.; Matyjaszewski, K.; Norrby, P. O.; Pintauer, T.; Poli, R.; Richard, P., *Macromolecules*, **2003**, *36*, 8551-8559.
51. Matyjaszewski, K.; Gobelt, B.; Paik, H. J.; Horwitz, C. P., *Macromolecules*, **2001**, *34*, 430-440.
52. Tang, W.; Matyjaszewski, K., *Macromolecules*, **2007**, *40*, 1858-1863.
53. Chai, M. H.; Niu, Y. H.; Youngs, W. J.; Rinaldi, P. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 4670-4678.
54. Topp, A.; Bauer, B. J.; Prosa, T. J.; Scherrenberg, R.; Amis, E. J., *Macromolecules*, **1999**, *32*, 8923-8931.
55. Topp, A.; Bauer, B. J.; Klimash, J. W.; Spindler, R.; Tomalia, D. A.; Amis, E. J., *Macromolecules*, **1999**, *32*, 7226-7231.
56. Topp, A.; Bauer, B. J.; Tomalia, D. A.; Amis, E. J., *Macromolecules*, **1999**, *32*, 7232-7237.
57. Rietveld, I. B.; Bouwman, W. G.; Baars, M.; Heenan, R. K., *Macromolecules*, **2001**, *34*, 8380-8383.
58. Jones, J. W.; Bryant, W. S.; Bosman, A. W.; Janssen, R. A. J.; Meijer, E. W.; Gibson, H. W., *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 2385-2389.
59. Esfand, R.; Tomalia, D. A., *Drug Discov. Today*, **2001**, *6*, 427-436.
60. Fréchet, J. M. J., *Science*, **1994**, *263*, 1710-1715.

61. Mourey, T. H.; Turner, S. R.; Rubinstein, M.; Fréchet, J. M. J.; Hawker, C. J.; Wooley, K. L., *Macromolecules*, **1992**, *25*, 2401-2406.
62. Gillies, E. R.; Fréchet, J. M. J., *Drug Discov. Today*, **2005**, *10*, 35-43.
63. Mammen, M.; Choi, S. K.; Whitesides, G. M., *Angew. Chem.-Int. Edit.*, **1998**, *37*, 2755-2794.
64. Eschwey, H.; Hallensleben, M.; Burchard, W., *Makromol. Chem.*, **1973**, *173*, 235-239.
65. Eschwey, H.; Burchard, W., *Polymer*, **1975**, *16*, 180-184.
66. Tsitsilianis, C.; Lutz, P.; Graff, S.; Lamps, J. P.; Rempp, P., *Macromolecules*, **1991**, *24*, 5897-5902.
67. Mayer, R., *Polymer*, **1974**, *15*, 137-145.
68. Gnanou, Y.; Lutz, P.; Rempp, P., *Makromol. Chem.-Macromol. Chem. Phys.*, **1988**, *189*, 2885-2892.
69. Comanita, B.; Noren, B.; Roovers, J., *Macromolecules*, **1999**, *32*, 1069-1072.
70. Knischka, R.; Lutz, P. J.; Sunder, A.; Mulhaupt, R.; Frey, H., *Macromolecules*, **2000**, *33*, 315-320.
71. Vasilenko, N. G.; Rebrov, E. A.; Muzafarov, A. M.; Esswein, B.; Striegel, B.; Moller, M., *Macromol. Chem. Phys.*, **1998**, *199*, 889-895.
72. Morton, M.; Helminiak, T. E.; Gadkary, S. D.; Bueche, F., *J. Polym. Sci.*, **1962**, *57*, 471-482.
73. Orofino, T. A.; Wenger, F., *J. Phys. Chem.*, **1963**, *67*, 566-575.
74. Nair, P. P.; Kritchevsky, D., *The bile acids: chemistry, physiology, and metabolism.*, Ed. série Nair, P. P.; Kritchevsky, D., Vol. 1 et 2. 1971, Plenum Press: New York.
75. Bloch, K.; Berg, B. N.; Rittenberg, D., *J. Biol. Chem.*, **1943**, *149*, 511-517.
76. Beher, W. T.; Baker, G. D.; Anthony, W. L., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **1962**, *109*, 863-868.
77. Beher, W. T.; Baker, G. D.; Anthony, W. L.; Beher, M. E., *Henry Ford Hosp. Med. Bull.*, **1961**, *9*, 201-213.
78. Bergstrom, S.; Danielsson, H., *Acta Physiol. Scand.*, **1958**, *43*, 1-7.
79. Myant, N. B.; Eder, H. A., *J. Lipid Res.*, **1961**, *2*, 363-368.

80. O'Maille, E. R. L., *J. Physiol.*, **1980**, 302, 107-120.
81. Kwan, K. H.; Higuchi, W. I.; Hofmann, A. F., *J. Pharm. Sci.*, **1978**, 67, 1711-1714.
82. Helenius, A.; Simons, K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1975**, 415, 29-79.
83. Kratochvil, J. P., *Hepatology*, **1984**, 4, 85S-97S.
84. Kratochvil, J. P.; Hsu, W. P.; Kwok, D. I., *Langmuir*, **1986**, 2, 256-258.
85. Kratochvil, J. P.; Hsu, W. P.; Jacobs, M. A.; Aminabhavi, T. M.; Mukunoki, Y., *Colloid Polym. Sci.*, **1983**, 261, 781-785.
86. Rinco, O.; Nolet, M. C.; Ovans, R.; Bohne, C., *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2003**, 2, 1140-1151.
87. Laurent, T. C.; Persson, H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1965**, 106, 616-624.
88. de Moerloose, P.; Ruysen, R., *J. Pharm. Belg.*, **1959**, 14, 95-105.
89. Furusawa, T., *Fukuoka Igaku Zasshi*, **1962**, 53, 124-165.
90. Kratochvil, J. P.; DelliColli, H. T., *Can. J. Biochem.*, **1968**, 46, 945-952.
91. Hofmann, A. F.; Small, D. M., *Annu. Rev. Med.*, **1967**, 18, 333-376.
92. Small, D. M., *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **1968**, 45, 108-119.
93. Carey, M. C.; Small, D. M., *J. Colloid Interface Sci.*, **1969**, 31, 382-396.
94. Carey, M. C.; Small, D. M., *Am. J. Med.*, **1970**, 49, 590-608.
95. Small, D. M.; Admirand, W., *Nature*, **1969**, 221, 265-267.
96. Mukerjee, P., *J. Pharm. Sci.*, **1974**, 63, 972-981.
97. Gyimesi, J.; Barbcza, L., *J. Incl. Phenom.*, **1993**, 15, 153-158.
98. Vadnere, M.; Natarajan, R.; Lindenbaum, S., *J. Phys. Chem.*, **1980**, 84, 1900-1903.
99. Zana, R.; Guveli, D., *J. Phys. Chem.*, **1985**, 89, 1687-1690.
100. Campredon, M.; Quiroa, V.; Thevand, A.; Allouche, A.; Pouzard, G., *Magn. Reson. Chem.*, **1986**, 24, 624-629.
101. Oakenfull, D. G.; Fisher, L. R., *J. Phys. Chem.*, **1978**, 82, 2443-2445.
102. Small, D. M.; Penkett, S. A.; Chapman, D., *Biochim. Biophys. Acta*, **1969**, 176, 178-189.
103. Martis, L.; Hall, N. A.; Thakkar, A. L., *J. Pharm. Sci.*, **1972**, 61, 1757-1761.

104. Mazer, N. A.; Carey, M. C.; Kwasnick, R. F.; Benedek, G. B., *Biochemistry*, **1979**, *18*, 3064-3075.
105. Fontell, K., *Kolloid Z. Z. Polym.*, **1971**, *246*, 614-625.
106. Oakenfull, D. G.; Fisher, L. R., *J. Phys. Chem.*, **1977**, *81*, 1838-1841.
107. Mysels, K. J., *Hepatology*, **1984**, *4*, 80S-84S.
108. Roe, J. M.; Barry, B. W., *J. Colloid Interface Sci.*, **1983**, *94*, 580-583.
109. Stevens, R. D.; Ribeiro, A. A.; Lack, L.; Killenberg, P. G., *J. Lipid Res.*, **1992**, *33*, 21-29.
110. Coello, A.; Mejjide, F.; Rodriguez Nunez, E.; Vazquez Tato, J., *J. Phys. Chem.*, **1993**, *97*, 10186-10191.
111. Coello, A.; Mejjide, F.; Nunez, E. R.; Tato, J. V., *J. Pharm. Sci.*, **1996**, *85*, 9-15.
112. Kalyanasundaram, K.; Thomas, J. K., *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, *99*, 2039-2044.
113. Carey, M. C., *Bile Acids in Gastroenterology*. MTP Press: Boston, 1983.
114. Small, D. M.; Bourges, M.; Dervichian, D. G., *Nature*, **1966**, *211*, 816-818.
115. Bourges, M.; Small, D. M.; Dervichian, D. G., *Biochim. Biophys. Acta*, **1967**, *137*, 157-167.
116. Small, D. M.; Bourges, M. C.; Dervichian, D. G., *Biochim. Biophys. Acta*, **1966**, *125*, 563-580.
117. Bourges, M.; Small, D. M.; Dervichian, D. G., *Biochim. Biophys. Acta*, **1967**, *144*, 189-201.
118. Small, D. M., *J. Lipid Res.*, **1967**, *8*, 551-557.
119. Admirand, W. H.; Small, D. M., *J. Clin. Invest.*, **1968**, *47*, 1043-1052.
120. Small, D. M., *N. Engl. J. Med.*, **1968**, *279*, 588-593.
121. Small, D. M., *Adv. Intern. Med.*, **1970**, *16*, 243-264.
122. Hamosh, M., *Adv. Pediatr.*, **1982**, *29*, 33-67.
123. Hofmann, A. F., *Biochim. Biophys. Acta*, **1963**, *70*, 306-316.
124. Hofmann, A. F., *Biochem. J.*, **1963**, *89*, 57-68.
125. Hernell, O., *Eur. J. Clin. Invest.*, **1975**, *5*, 267-272.

126. Mekjian, H. S.; Phillips, S. F.; Hofmann, A. F., *J. Clin. Invest.*, **1971**, *50*, 1569-1577.
127. Davenport, H. W., *Gastroenterology*, **1968**, *54*, 175-181.
128. Davenport, H. W.; Warner, H. A.; Code, C. F., *Gastroenterology*, **1968**, *54*, Suppl:709-711.
129. Forth, W.; Rummel, W.; Glasner, H., *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. Exp. Pathol.*, **1966**, *254*, 364-380.
130. Erlinger, S.; Dhumeaux, D., *Gastroenterology*, **1974**, *66*, 281-304.
131. Scharschmidt, B. F.; Van Dyke, R. W., *Gastroenterology*, **1983**, *85*, 1199-1214.
132. Wingate, D. L.; Phillips, S. F.; Hofmann, A. F., *J. Clin. Invest.*, **1973**, *52*, 1230-1236.
133. Shefer, S.; Hauser, S.; Bekersky, I.; Mosbach, E. H., *J. Lipid Res.*, **1969**, *10*, 646-655.
134. Dietschy, J. M., *Gastroenterology*, **1969**, *57*, 461-464.
135. Carey, M. C.; Small, D. M., *Arch. Intern. Med.*, **1972**, *130*, 506-527.
136. Reuben, A., *Hepatology*, **2005**, *42*, 500-505.
137. Hofmann, A. F., *Clin. Gastroenterol.*, **1977**, *6*, 3-24.
138. Hofmann, A. F., *Hepatology*, **1984**, *4*, 4S-14S.
139. Matoba, N.; Une, M.; Hoshita, T., *J. Lipid Res.*, **1986**, *27*, 1154-1162.
140. Gurantz, D.; Hofmann, A. F., *Am. J. Physiol.*, **1984**, *247*, G736-748.
141. Tavoloni, N., *Biochim. Biophys. Acta*, **1986**, *879*, 186-201.
142. Angelin, B.; Bjorkhem, I., *Gut*, **1977**, *18*, 606-609.
143. Angelin, B.; Einarsson, K.; Hellstrom, K., *Gut*, **1976**, *17*, 420-425.
144. Krag, E.; Phillips, S. F., *J. Clin. Invest.*, **1974**, *53*, 1686-1694.
145. Mekhjian, H. S.; Phillips, S. F.; Hofmann, A. F., *Dig. Dis. Sci.*, **1979**, *24*, 545-550.
146. O'Maille, E. R. L., *Ir. J. Med. Sci.*, **1977**, *146*, 190-198.
147. Aldini, R.; Roda, A.; Labate, A. M. M.; Cappelleri, G.; Roda, E.; Barbara, L., *J. Lipid Res.*, **1982**, *23*, 1167-1173.

148. <http://www.lib.mcg.edu/edu/eshuphysio/program/section6/6ch5/6ch5img/page17.jpg>, consulté le 10 avril 2008.
149. Roda, A.; Hofmann, A. F.; Mysels, K. J., *J. Biol. Chem.*, **1983**, 258, 6362-6370.
150. Wilson, F. A., *Am. J. Physiol.*, **1981**, 241, G83-92.
151. Gallagher, K.; Mauskopf, J.; Walker, J. T.; Lack, L., *J. Lipid Res.*, **1976**, 17, 572-577.
152. Lucke, H.; Stange, G.; Kinne, R.; Murer, H., *Biochem. J.*, **1978**, 174, 951-958.
153. Wilson, F. A.; Treanor, L. L., *Biochim. Biophys. Acta*, **1979**, 554, 430-440.
154. Dietschy, J. M., *J. Lipid Res.*, **1968**, 9, 297-309.
155. Bundy, R.; Mauskopf, J.; Walker, J. T.; Lack, L., *J. Lipid Res.*, **1977**, 18, 389-395.
156. Firpi, A.; Walker, J. T.; Lack, L., *J. Lipid Res.*, **1975**, 16, 379-385.
157. Lack, L., *Environ. Health Perspect.*, **1979**, 33, 79-90.
158. Weinberg, S. L.; Burckhardt, G.; Wilson, F. A., *J. Clin. Invest.*, **1986**, 78, 44-50.
159. Moore, K. S.; Wehrli, S.; Roder, H.; Rogers, M.; Forrest, J. N.; McCrimmon, D.; Zasloff, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1993**, 90, 1354-1358.
160. Zhou, X. D.; Cai, F.; Zhou, W. S., *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42, 2537-2539.
161. Kinney, W. A.; Zhang, X. H.; Williams, J. I.; Johnston, S.; Michalak, R. S.; Deshpande, M.; Dostal, L.; Rosazza, J. P. N., *Org. Lett.*, **2000**, 2, 2921-2922.
162. Zhang, X. H.; Rao, M. N.; Jones, S. R.; Shao, B.; Feibush, P.; McGuigan, M.; Tzodikov, N.; Feibush, B.; Sharkansky, I.; Snyder, B.; Mallis, L. M.; Sarkahian, A.; Wilder, S.; Turse, J. E.; Kinney, W. A.; Kjaersgaard, H. J.; Michalak, R. S., *J. Org. Chem.*, **1998**, 63, 8599-8603.
163. Moriarty, R. M.; Tuladhar, S. M.; Guo, L.; Wehrli, S., *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35, 8103-8106.
164. Kim, H. S.; Choi, B. S.; Kwon, K. C.; Lee, S. O.; Kwak, H. J.; Lee, C. H., *Bioorg. Med. Chem.*, **2000**, 8, 2059-2065.
165. Sadownik, A.; Deng, G.; Janout, V.; Regen, S. L.; Bernard, E. M.; Kikuchi, K.; Armstrong, D., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 6138-6139.

166. Kikuchi, K.; Bernard, E. M.; Sadownik, A.; Regen, S. L.; Armstrong, D., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1997**, *41*, 1433-1438.
167. Li, C. H.; Peters, A. S.; Meredith, E. L.; Allman, G. W.; Savage, P. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 2961-2962.
168. Bruch, M. D.; Cajal, Y.; Koh, J. T.; Jain, M. K., *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 11993-12004.
169. Bhattacharjya, S.; David, S. A.; Mathan, V. I.; Balaram, P., *Biopolymers*, **1997**, *41*, 251-265.
170. Schmidt, E. J.; Boswell, J. S.; Walsh, J. P.; Schellenberg, M. M.; Winter, T. W.; Li, C. H.; Allman, G. W.; Savage, P. B., *J. Antimicrob. Chemother.*, **2001**, *47*, 671-674.
171. Li, C. H.; Lewis, M. R.; Gilbert, A. B.; Noel, M. D.; Scoville, D. H.; Allman, G. W.; Savage, P. B., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1999**, *43*, 1347-1349.
172. Li, C. H.; Budge, L. P.; Driscoll, C. D.; Willardson, B. M.; Allman, G. W.; Savage, P. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 931-940.
173. Hancock, R. E. W., *Annu. Rev. Microbiol.*, **1984**, *38*, 237-264.
174. Guan, Q. Y.; Li, C. H.; Schmidt, E. J.; Boswell, J. S.; Walsh, J. P.; Allman, G. W.; Savage, P. B., *Org. Lett.*, **2000**, *2*, 2837-2840.
175. Li, C. H.; Rehman, A. u.; Dalley, N. K.; Savage, P. B., *Tetrahedron Lett.*, **1999**, *40*, 1861-1864.
176. Davis, A. P.; Perez-Payan, M. N., *Synlett*, **1999**, 991-993.
177. Broderick, S.; Davis, A. P.; Williams, R. P., *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 6083-6086.
178. Rehman, A. u.; Li, C. H.; Budge, L. P.; Street, S. E.; Savage, P. B., *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, (10), 1865-1868.
179. Head, W. F., Jr.; Lauter, W. M., *J. Am. Pharm. Assoc.*, **1958**, *47*, 563-566.
180. Head, W. F., Jr.; Lauter, W. M., *J. Am. Pharm. Assoc.*, **1958**, *47*, 567-570.
181. Price, M. J.; Thèse de doctorat, 2004, University of Utah: Salt Lake City, p. 161.
182. Hao, J.; Li, H.; Zhu, X. X., *Biomacromolecules*, **2006**, *7*, 995-998.
183. Ahlheim, M.; Hallensleben, M. L., *Makromol. Chem.*, **1992**, *193*, 779-797.

184. Ahlheim, M.; Hallensleben, M. L.; Wurm, H., *Polym. Bull.*, **1986**, *15*, 497-501.
185. Benrebouh, A.; Avoce, D.; Zhu, X. X., *Polymer*, **2001**, *42*, 4031-4038.
186. Benrebouh, A.; Zhang, Y. H.; Zhu, X. X., *Macromol. Rapid Commun.*, **2000**, *21*, 685-690.
187. Zhu, X. X.; Moskova, M.; Denike, J. K., *Polymer*, **1996**, *37*, 493-498.
188. Zhang, Y. H.; Akram, M.; Liu, H. Y.; Zhu, X. X., *Macromol. Chem. Phys.*, **1998**, *199*, 1399-1404.
189. Denike, J. K.; Zhu, X. X., *Macromol. Rapid Commun.*, **1994**, *15*, 459-465.
190. Aoi, T.; Sato, K.; Kodama, K.; Kawabe, Y.; Nakao, H.; Yagihara, M., *J. Photopolym. Sci. Tec.*, **1999**, *12*, 477-486.
191. Zhang, Y. H.; Zhu, X. X., *Macromol. Chem. Phys.*, **1996**, *197*, 3473-3482.
192. Akram, M.; Denike, J. K.; Bélanger-Gariépy, F.; Zhu, X. X., *Acta Crystallogr. Sect. C-Cryst. Struct. Commun.*, **1996**, *52*, 2905-2907.
193. Wan, T.; Liu, Y.; Yu, J. Q.; Chen, S.; Li, F.; Zhang, X. Z.; Cheng, S. X.; Zhuo, R. X., *J. Polym. Sci. Pol. Chem.*, **2006**, *44*, 6688-6696.
194. Cai, Q.; Zhao, Y. L.; Bei, J. Z.; Xi, F.; Wang, S. G., *Biomacromolecules*, **2003**, *4*, 828-834.
195. Zhao, Y. L.; Shuai, X. T.; Chen, C. F.; Xi, F., *Chem. Mat.*, **2003**, *15*, 2836-2843.
196. Savage, P. B., *Eur. J. Org. Chem.*, **2002**, 759-768.
197. Lee, K. Y.; Jo, W. H.; Kwon, I. C.; Kim, Y. H.; Jeong, S. Y., *Macromolecules*, **1998**, *31*, 378-383.
198. Orienti, I.; Gianasi, E.; Aiedeh, K.; Zecchi, V., *J. Pharm. Belg.*, **1996**, *51*, 125-130.
199. Pattinson, N.; Collins, D.; Campbell, B., *J. Chromatogr.*, **1980**, *187*, 409-412.
200. Kim, I. S.; Jeong, Y. I.; Lee, Y. H.; Kim, S. H., *Arch. Pharm. Res.*, **2000**, *23*, 367-373.
201. Kim, I. S.; Jeong, Y. I.; Kim, S. H., *Arch. Pharm. Res.*, **2000**, *23*, 87-89.
202. Kim, I. S.; Kim, S. H.; Cho, C. S., *Macromol. Rapid Commun.*, **2000**, *21*, 1272-1275.

203. Cheng, Y. A.; Suenaga, T.; Still, W. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 1813-1814.
204. Boyce, R.; Li, G.; Nestler, H. P.; Suenaga, T.; Still, W. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 7955-7956.
205. Nichifor, M.; Carpov, A., *Eur. Polym. J.*, **1999**, *35*, 2125-2129.
206. Diancourt, F.; Braud, C.; Vert, M., *J. Bioact. Compat. Polym.*, **1996**, *11*, 203-218.
207. Nichifor, M.; Lopes, A.; Carpov, A.; Melo, E., *Macromolecules*, **1999**, *32*, 7078-7085.
208. Kim, C.; Lee, S. C.; Kang, S. W.; Kwon, I. C.; Kim, Y. H.; Jeong, S. Y., *Langmuir*, **2000**, *16*, 4792-4797.
209. Ghedini, N.; Ferruti, P.; Andrisano, V.; Cesaroni, M. R.; Scapini, G., *Synth. Commun.*, **1983**, *13*, 701 - 706.
210. Huh, K. M.; Lee, K. Y.; Kwon, I. C.; Kim, Y. H.; Kim, C.; Jeong, S. Y., *Langmuir*, **2000**, *16*, 10566-10568.
211. Yokoyama, M., *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.*, **1992**, *9*, 213-248.
212. Park, K.; Mersny, R. J., *Controlled Drug Delivery: Designing Technologies for the Future*. Oxford University Press: New York, 2000; Vol. 752, p 459.
213. Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T.; Matsumura, Y.; Hori, K., *J. Control. Release*, **2000**, *65*, 271-284.
214. Gabizon, A. A., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **1995**, *16*, 285-294.
215. Torchilin, V. P.; Trubetskoy, V. S., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **1995**, *16*, 141-155.
216. Li, Y. X.; Kissel, T., *Polymer*, **1998**, *39*, 4421-4427.
217. Park, S. Y.; Han, D. K.; Kim, S. C., *Macromolecules*, **2001**, *34*, 8821-8824.
218. Choi, Y. R.; Bae, Y. H.; Kim, S. W., *Macromolecules*, **1998**, *31*, 8766-8774.
219. Park, C. W.; Lee, S. J.; Kim, D.; Lee, D. S.; Kim, S. C., *J. Polym. Sci. Pol. Chem.*, **2008**, *46*, 1954-1963.
220. Lu, C. F.; Liu, L.; Guo, S. R.; Zhang, Y. Q.; Li, Z. H.; Gu, J. R., *Eur. Polym. J.*, **2007**, *43*, 1857-1865.
221. Jones, M.-C.; Ranger, M.; Leroux, J.-C., *Bioconjugate Chem.*, **2003**, *14*, 774-781.

222. Kojima, C.; Kono, K.; Maruyama, K.; Takagishi, T., *Bioconjugate Chem.*, **2000**, *11*, 910-917.
223. Liu, M. J.; Kono, K.; Fréchet, J. M. J., *J. Control. Release*, **2000**, *65*, 121-131.
224. Wang, F.; Bronich, T. K.; Kabanov, A. V.; Rauh, R. D.; Roovers, J., *Bioconjugate Chem.*, **2005**, *16*, 397-405.
225. Wang, F.; Bronich, T. K.; Kabanov, A. V.; Rauh, R. D.; Roovers, J., *Bioconjugate Chem.*, **2008**, *19*, 1423-1429.
226. Gou, P. F.; Zhu, W. P.; Xu, N.; Shen, Z. Q., *J. Polym. Sci. Pol. Chem.*, **2008**, *46*, 6455-6465.
227. Quaglia, F.; Ostacolo, L.; Nese, G.; Canciello, M.; De Rosa, G.; Ungaro, F.; Palumbo, R.; La Rotonda, M. I.; Maglio, G., *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **2008**, *87A*, 563-574.
228. Mrksich, M., *Chem. Soc. Rev.*, **2000**, *29*, 267-273.
229. Ostuni, E.; Chapman, R. G.; Holmlin, R. E.; Takayama, S.; Whitesides, G. M., *Langmuir*, **2001**, *17*, 5605-5620.
230. Lee, K. Y.; Mooney, D. J., *Chem. Rev.*, **2001**, *101*, 1869-1879.
231. Kim, H. D.; Nienhaus, G. U.; Ha, T.; Orr, J. W.; Williamson, J. R.; Chu, S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2002**, *99*, 4284-4289.
232. Heyes, C. D.; Kobitski, A. Y.; Amirgoulova, E. V.; Nienhaus, G. U., *J. Phys. Chem. B*, **2004**, *108*, 13387-13394.
233. Zalipsky, S.; Harris, J. M., *ACS Symp. Ser.*, **1997**, *680*, 1-13.
234. Szleifer, I.; Carignano, M. A., *Macromol. Rapid Commun.*, **2000**, *21*, 423-448.
235. Yang, Z. H.; Galloway, J. A.; Yu, H. U., *Langmuir*, **1999**, *15*, 8405-8411.
236. Sofia, S. J.; Premnath, V.; Merrill, E. W., *Macromolecules*, **1998**, *31*, 5059-5070.
237. Groll, J.; Ameringer, T.; Spatz, J. P.; Moeller, M., *Langmuir*, **2005**, *21*, 1991-1999.
238. Groll, J.; Amirgoulova, E. V.; Ameringer, T.; Heyes, C. D.; Rocker, C.; Nienhaus, G. U.; Moller, M., *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 4234-4239.
239. Huang, H. Q.; Fulchiero, E. C.; Penn, L. S., *Macromolecules*, **2005**, *38*, 1028-1030.

Chapitre 2: Synthèse et propriétés d'agrégation de polymères en étoile dérivés de l'acide cholique par ATRP*

Star-shaped polymers with a cholic acid core and poly(*t*-butyl acrylate) or poly(acrylic acid) arms have been synthesized by atom transfer radical polymerization. Cholic acid was first modified into an efficient tetra-functional ATRP initiator followed by the addition of the poly(*t*-butyl acrylate) arms. The activation of all four initiation sites was evidenced by comparative kinetic measurements, ¹H NMR spectroscopy and mass spectrometry. The star-shaped polymers with hydrophilic poly(acrylic acid) arms showed aggregation in aqueous solutions at concentrations of ca. 40-50 millimolale.

2.1 Introduction

Star-shaped polymers possess unique physico-chemical properties and have found uses as drug delivery vectors and transfecting agents.^[1, 2] These systems are generally advantageous because of their low intrinsic viscosity, compact structure and high density of functional groups.^[2, 3] Such polymers with well-defined structures are difficult to prepare by conventional methodologies.^[4] In this study, the feasibility of preparing well-defined tetra-functional star-shaped polymers with a cholic acid (CA) core is examined. A series of linear polymers made of bile acids have already been prepared as thermosensitive, elastomeric and amphiphilic polymers.^[5-7] To the best of our knowledge, there has been only one report on star-shaped polycarbonates derived from bile acids, in the formation of microspheres for drug-delivery applications.^[8] Bile acids are facial amphiphiles, which are known to self-assemble in aqueous solutions by association of their hydrophobic β faces. CA is the most

* Giguère, G. et Zhu X.X. *Synthesis and Aggregation Properties of Anionic Star-Shaped Polymers With a Cholic Acid Cores and Polyacrylate Arms*, J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem. (2007), 45, 4173-4178. © John Wiley & Sons, Inc.

abundant bile acid in most mammals^[9] and bile acid derivatives have tunable aggregation properties in aqueous solutions through the modification of their alcohol and/or carboxylic acid groups.^[10-13]

We have modified the carboxylic acid group on position 24 and the three hydroxyl groups on positions 3, 7 and 12 and on CA with functional groups susceptible to initiate atom transfer radical polymerization (ATRP). This tetra-functional cholic acid derivative was used to initiate the polymerization of *tert*-butyl acrylate. Hydrolysis of the *tert*-butyl groups on the arms afforded an anionic star-shaped polymer. The kinetics of polymerization, structure and aggregation properties of the resulting polymers have been studied.

2.2 Experimental Section

2.2.1 Materials

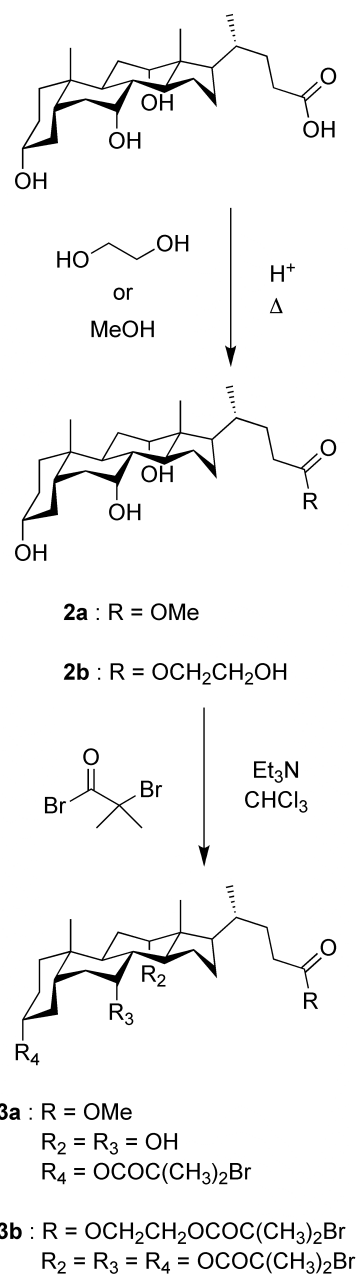
tert-Butyl acrylate (*t*BA) (98%), cholic acid (98%), N,N,N',N'',N''-pentamethyldiethylenetriamine (PMDETA) (99%), copper (I) bromide (98%) and copper (II) bromide (99%), potassium acetate (99+%) were obtained from Aldrich, ethylene glycol (99%) from EMD Chemicals and SDHB (mixture of 2,5-dihydroxybenzoic acid and 5-methoxysalicylic acid) from Bruker. Before use, *t*BA was washed sequentially with 1 M sodium carbonate, water and brine, then dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and distilled under reduced pressure. Copper (I) bromide was stirred with glacial acetic acid for 24 h, then washed consecutively with glacial acetic acid, ethanol, and diethyl ether, and dried at 80°C for 30 minutes. All other chemicals were used as received.

2.2.2 Synthesis of ATRP Initiators

The precursors methyl cholate (**2a**) and 2'-hydroxyethyl 3 α ,7 α ,12 α -trihydroxy-5 β -cholan-24-ate (**2b**) were synthesized from CA (**1**) as described elsewhere.^[14] Compounds **3a** and **3b** (Scheme 2.1) were prepared by dissolving 4 g (**2a**: 9.47 mmol or **2b**: 8.8 mmol) of the respective precursors in 100 mL of dry

chloroform containing 3 or 6 eq of dry triethylamine, respectively, in a flame dried flask. The reaction mixture was stirred under nitrogen at 0°C and 3 or 6 eq of 2-isobutyl bromide (for preparing **3a** or **3b**, respectively) in dry chloroform (~ 3/10, v/v) were added over a period of 40 min. The reaction was allowed to proceed at room temperature for 24 h. An additional 1.5 eq of dry triethylamine and 2-isobutyl bromide were added for compound **3b**. The reaction was left for another 24 h, and quenched with 6 mL of methanol. After evaporating the solvents under reduced pressure, the resulting solid precipitate was washed with 4 × 100 mL of ethyl acetate (AcOEt). The organic phase was washed sequentially with 1 M HCl/brine (1/1, v/v), brine, 1 M NaHCO₃/brine (1/1, v/v) and brine, dried with magnesium sulfate, filtered, and evaporated under reduced pressure. A complete extraction by successive washing helped in the preliminary purification of the product (brine helped in the phase separation). Compounds **3a** and **3b** were purified by silica gel chromatography (hexanes/ethyl acetate volume ratios for **3a** and **3b** were 2/1 and 4.5/1, respectively; R_f (**3a**): 0.87; R_f (**3b**): 0.28) to yield 3.23 g (60% yield) and 6.06 g (66% yield) of compounds **3a** and **3b**, respectively.

¹H NMR (**3a**, 400 MHz, CDCl₃): δ = 0.71 (s, H¹⁸), 0.92 (s, H²¹), 1.00 (d, H¹⁹), 3.67 (s, H²⁵), 3.87 (d, H⁷), 4.01 (d, H¹²), 4.62 (m, H³); ¹³C NMR (**3a**, 400 MHz, CDCl₃): δ = 12.9, 17.7, 22.8, 23.6, 26.7, 27.0, 27.9, 28.7, 31.1, 31.3, 35.0, 35.1, 35.7, 39.7, 41.6, 42.4, 46.9, 47.6, 52.0, 56.8, 68.8, 73.5, 76.6, 171.6, 175.3. Elemental analysis: C₂₉H₄₇BrO₆ (**3a**, 571.58 g/mol), C 60.94, H 8.29; Found C 61.20, H 8.26. MS: *m/z* [M+H]⁺: peaks at 571 and 573 corresponding to the isotopic distribution of the bromine atom were observed. ¹H NMR (**3b**, 400 MHz, CDCl₃): δ = 0.77 (s, H¹⁸), 0.84 (d, H¹⁹), 0.95 (s, H²¹), 4.30-4.37 (m, H²⁵ and H²⁶), 4.64 (sept, H³), 5.01 (d, H⁷), 5.17 (s, H¹²); ¹³C NMR (**3b**, 400 MHz, CDCl₃): δ = 11.9, 17.4, 21.9, 22.9, 24.4, 25.7, 27.1, 28.5, 30.5, 34.1, 38.1, 40.2, 42.8, 45.1, 47.3, 56.1, 61.4, 63.4, 72.7, 74.9, 170.3, 170.4, 170.5. Elemental analysis: C₄₂H₆₄Br₄O₁₀ (**3b**, 1044.12 g/mol), C 48.11, H 6.15; Found C 48.21, H 6.18. MS: *m/z* [M+NH₄]⁺: 1062 to 1070 five peaks corresponding to the isotopic distributions of the bromine atoms were observed.



Scheme 2.1. Preparation of the ATRP initiators from cholic acid.

2.2.3 Preparation of $CA(tBA_n)_x$ and $CA(AA_n)_x$

In a typical polymerization procedure for $CA(tBA_n)_4$, two flasks were used to add to each of them 77.28 g (0.6 mol) of *t*BA and 77.28 g of acetone. 0.577 g (4.0 mmol) of CuBr and 0.090 g (0.4 mmol) of CuBr₂ were added to the first flask and 4.2 g (4.0 mmol) of **3b** to the second for the preparation of $CA(tBA_n)_4$. The flasks were

purged with argon for 30 min in a dry ice/acetone bath, and 0.767 g (4.4 mmol) of PMDETA was then added to the flask containing the copper salts. Purge was maintained for an additional 10 min and the flasks were immersed in an oil bath (60°C) and stirred for an additional 15 min. The solution containing the initiator was transferred to the other flask by means of a double-ended needle. A sample was then immediately withdrawn and quenched in liquid nitrogen for kinetic measurements. The withdrawal of samples was repeated several times over the course of polymerization. $CA(tBA_n)_1$ was prepared from **3a** using the same procedure as above but with 1.38 g of *t*BA, 1.38 g of acetone, 0.0103 g of CuBr, 0.0016 g of CuBr₂ and 0.164 g of **3a**.

Hydrolysis of the *tert*-butyl acrylate repeat units to acrylic acid repeat units (AA) on the arms of the star-shaped polymers was achieved in the presence of 5 eq of trifluoroacetic acid (versus *tert*-butyl group) in dichloromethane (1/9, v/v) for 24 h. This led to the formation of a white precipitate. The solvent was removed under reduced pressure and the polymer was precipitated three times (from THF) in dichloromethane and then dried *in vacuo*.

2.2.4 Characterization of the Polymers

For size exclusion chromatography (SEC), volatiles from the aliquots retrieved during the polymerization reaction were evaporated under reduced pressure and the residue filtered through silica gel with tetrahydrofuran (THF) as the eluent (to remove the catalyst) and then dried *in vacuo*. SEC was done in THF on a Waters System 1525 with HR-3, HR-4 and HR-6 columns, a Waters 2414 refractive index detector at a flow rate of 1 mL/min. The calibration curve was made with poly(methyl methacrylate) standards.

For matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), a Bruker Autoflex instrument equipped with a N₂ laser operating at 337 nm was used. The matrix (SDHB), polymer and potassium acetate were dissolved in THF at a concentration of 10 mg/mL. The three solutions were mixed respectively in a 4:1:1 ratio, an aliquot of the new solution was deposited

on the sample target plate and allowed to dry at room temperature. The instrument was calibrated using a peptide calibration kit covering the mass range of interest.

^1H NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 400 operating at 400 MHz for protons in CDCl_3 . For kinetic studies, the monomer consumption during polymerization was followed by the disappearance of the vinylic protons in reference to the *tert*-butyl protons (used as an internal reference).

Viscosity was measured on a Cambridge Applied System viscosimeter (ViscoLab 4100) operated at 21°C . The samples were prepared with standardized sodium hydroxide solutions in milli-Q water to obtain the desired final concentration. The viscosity of the solution was measured six times and averaged. The solution was then diluted to the next concentration with milli-Q water and the measurements were repeated.

To characterize the arms of the star-shaped polymers, the arms were cleaved from the core with sodium hydroxide (1/5, w/w for monomer units) in THF under reflux for 5 h. The mixture was then acidified with concentrated hydrochloric acid. The solvent was evaporated and accurate mass measurements were performed on a liquid chromatography mass selective detector time-of-flight (LC-MSD-TOF) instrument from Agilent Technologies in positive electrospray mode.

2.3 Results and Discussion

2.3.1 Structure of Star-Shaped Polymers

Because of the sensitivity of ATRP catalysts to carboxylic acid groups, this functionality on position 24 of CA was modified to an ester.^[15] Ethylene glycol was used for the esterification and to simultaneously generate an additional (fourth) hydroxyl group on the CA molecule. All the hydroxyl groups were then transformed into ATRP initiating groups with 2-isobutyryl bromide selected for its resemblance to *t*BA (the repeat unit of the arms) and its high reactivity in ATRP.^[15] Given the proximity of all three hydroxyl groups on the α face (positions 3, 7 and 12) of the rigid and bulky steroid backbone, we need to ensure that all initiation sites on **3b** would be activated in the early stage of polymerization.

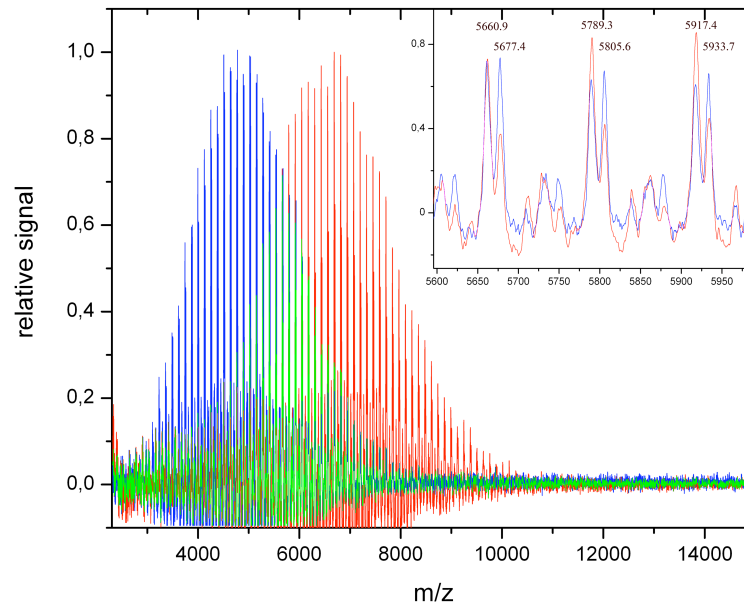


Figure 2.1. MALDI-TOF MS for CA(*t*BA₇)₄ (left, blue) and CA(*t*BA₁₀)₄ (right, red) showing the controlled reaction and well defined structure. The mass numbers shown in the inset correspond to the sum of masses of the initiator, the cation (Na⁺ or Li⁺) and multiples of *t*BA. For example, a fraction of 37 units of *t*BA (together with the initiator **3b**) with Li⁺ or Na⁺ ions corresponds to a mass of 5787 or 5803, respectively. The small difference between the theoretical and experimental masses may be caused by a loss in resolution of the isotopes (e.g., there should be an average of 2.8 ¹³C atoms per 37 units of *t*BA).

¹H NMR spectroscopy showed that all four initiating groups on **3b** had indeed reacted (2.7 Supporting Information) by the presence and accurate integration of the four terminal main-chain protons adjacent to the terminal bromine atom. To verify that the arms are of equal length, two complimentary experiments were done: the analysis of the arms and comparative kinetic measurements. In the first case, the arms of the star-shaped polymers were hydrolytically cleaved from the core at their ester linkage and then analyzed by mass spectrometry. The spectra of the arms show distributions of molecular weight centered around 729 Da for CA(AA₁₀)₄ and 541 Da

for CA(AA₇)₄ with a 72 Da separation between the peaks corresponding to the molar mass of the AA repeat unit (see 2.6 Supporting Information). The comparison of these estimated average molecular weights agrees reasonably well with the molecular weights by ¹H NMR for the corresponding star polymers (Table 2.1, bottom), and are in good agreement with the results of the MALDI-TOF MS experiments of the star-shaped polymers (Figure 2.1 and Table 2.1). The results (Table 2.1) are also consistent with those predicted by the ratio of initiator to monomer in the reaction vessel. The ¹H NMR results seem to be less accurate because of the intensity disproportion of the integrated peaks to calculate the ratios. In the second case, a “control” polymerization reaction initiated with **3a** (mono-functional initiator without steric hindrance concerns) was performed for kinetic comparison with reactions initiated with **3b**. To accomplish this, the quantity of **3a** in the polymerization vessel was adjusted so that the number of initiating groups present within the vessel was the same as for the reaction initiated by **3b** (i.e. 4 times more **3a** than **3b**). The evolution of conversion with time for both reactions is shown in Figure 2.2 and indicates that both reactions were under good control (linearity of the kinetic plot; low polydispersity). It is clear that the kinetics of both reactions were similar, confirming that all four initiating groups have a similar reactivity. Based on these results, the length of the arms can be deduced from the molecular weights of the polymer by MALDI-TOF MS (Figure 2.1), SEC and NMR spectroscopy. These values are reported in Table 2.1 and are consistent amongst themselves: the length varies between 5.8 to 7.2 of AA units for CA(AA₇)₄ and between 9.5 to 13.0 for CA(AA₁₀)₄. The composition of the polymers can be observed directly from their mass spectra. Figure 2.1 shows that the major detected species are the polymers with either lithium or sodium ions. The small difference between the theoretical and experimental masses may be caused simply by a loss in resolution of the isotopes of bromine and carbon atoms (there should be an average of 3 ¹³C atoms per 40 units of *t*BA). These results clearly indicate that the length and structure of star-shaped polymers prepared from the cholic acid core by ATRP were well controlled.

Table 2.1. Molecular Characteristics of the Star-Shaped Polymers.

Method	M_n (g/mol)	
	CA(<i>t</i> BA ₇) ₄	CA(<i>t</i> BA ₁₀) ₄ ^c
MALDI-TOF MS (PDI)	4760 (1.04)	6230 (1.04)
GPC (PDI)	4350 (1.07)	6190 (1.06)
From conversion (NMR) ^a	4170	7760
¹ H NMR of polymer ^b	4380	5920
	CA(AA ₇) ₄	CA(AA ₁₀) ₄
¹ H NMR of polymer ^b	2720	3730

^a Calculated from the molecular weights of CA and *t*BA and the extent of conversion.

^b Calculated from the integration of the *tert*-butyl group 1.45 ppm region (*Pt*BA) or of the 3.5–3.8 ppm region (PAA, polymer backbone) relative to that of the methyl group on C-21 on CA (internal reference).

^c PDI in parenthesis.

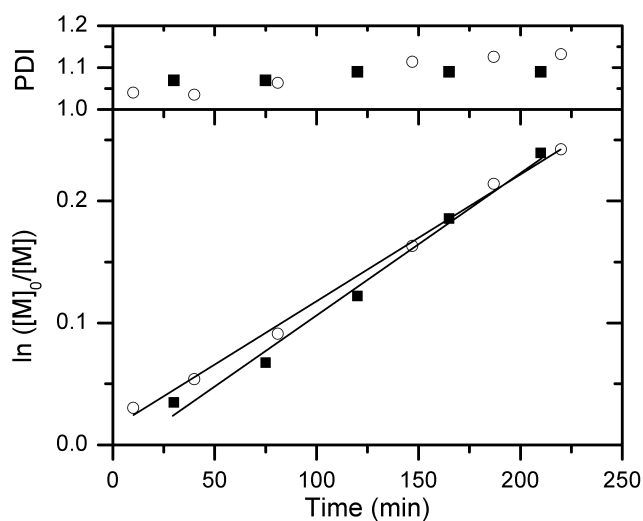


Figure 2.2. Polydispersity index (PDI) obtained by size-exclusion chromatography and monomer conversion obtained by ¹H NMR spectroscopy for polymerization reactions initiated by 3a (○) and 3b (■).

2.3.2 Aggregation Properties of the $CA(AA_x)_4$ Star-Shaped Polymers

Amphiphilic star-shaped polymers with aggregation properties may be of use in the transport of hydrophobic compounds similar to the “molecular umbrella” derived from bile acids.^[16, 17] To evaluate the effect of arm length on the aggregation properties, star-shaped $CA(AA_7)_4$ and $CA(AA_{10})_4$ were synthesized, since the length of the arms may influence the hydrophilic/hydrophobic balance of the resulting material and consequently their aggregation properties. Rheological study was carried out because of its rapidity, sensitivity and common use for characterizing aggregation in solutions.^[18-21] In order to compare the aggregation properties of the two polymers, the degree of ionization of the arms was adjusted to 7.5 and 15% for both polymers by the addition of NaOH. Figure 2.3 shows the evolution of viscosity as a function of the polymer concentration. Molal concentration was used for the convenience of sample preparation. A sharp increase of viscosity is observed in the range of 40-50 millimolal for both polymers, indicating the occurrence of aggregation. The star polymers should retain the facial amphiphilicity of CA so that aggregation of the polymers can occur through the association of the hydrophobic β faces of CA. The increase of viscosity following the aggregation of $CA(AA_{10})_4$ is more pronounced than for $CA(AA_7)_4$ but the aggregation concentration appears to be similar for both. This may be due to the difference in the hydrodynamic radii of the aggregates formed in solution: $CA(AA_{10})_4$ forms larger aggregates and increases the viscosity faster than the smaller aggregates of $CA(AA_7)_4$. Coulombic repulsion between the polymers in solution did not appear to significantly influence the aggregation, as evidenced by the similar viscosities obtained for a given polymer when studied at 7.5 and 15% ionization of the AA residues (Figure 2.3)

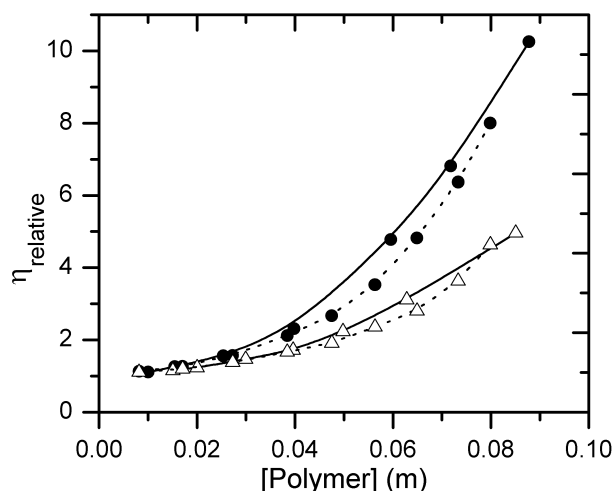


Figure 2.3. Viscosity measurements at 21°C for CA(AA₇)₄ (triangles) and CA(AA₁₀)₄ (circles) as a function of the molal concentration of the polymers showing their aggregation around 40-50 millimolar at 7.5 (solid lines) and 15% (dotted lines) of ionization of the poly(acrylic acid) arms.

Testing at higher degrees of ionization would be difficult due to the partial and gradual hydrolysis of the arms and the larger amounts of polymers to dissolve. Indeed, when the completely deprotected CA(AA_x)₄ star polymers were dissolved in water, the hydrolysis occurred rather rapidly at 45°C at the ester linkage between the arm and the core. This was confirmed by NMR spectroscopy by the changes in chemical shifts of the protons on positions 3, 7 and 12 (from 4.64, 5.01 and 5.17 ppm of the star polymer to 3.47, 3.84 and 3.98 ppm, respectively, corresponding to the initial chemical shifts of these protons on CA) and of the protons of the ethylene glycol diester group which was converted into the hydroxyl form.

2.4 Conclusions

Star-shaped polymers with a bile acid core have been prepared with well-defined molecular weights. All four sites on the cholic acid core can be initiated and

the length of the arms could be controlled by ATRP. The aggregation of the resulting anionic polymers depended on the length of the arms. In this molecular weight range, the length of the polymer chains has shown to have a greater effect on the aggregation of the polymers than the degree of ionization of the chains. The amphiphilic properties of these materials and their aggregation may be useful for potential pharmaceutical applications. The hydrolytic stability of the ester linkage between the core and the arms should be further addressed for the use of such polymers. The degradability of the polymers in their deprotonated acid form may become a problem in certain applications, but the synthetic strategy should be useful in the design and preparation of more stable analogues of the polymers.

2.5 References

1. Ooya, T.; Lee, J.; Park, K., *J. Control. Release*, **2003**, *93*, 121-127.
2. Roovers, J.; Comanita, B., *Dendrimers and Dendrimer-Polymer Hybrids In Branched Polymers I*, Roovers, J., Ed.; Springer-Verlag Berlin: Berlin, 1999; Vol. 142, p 179-228.
3. Grest, G.S.; Fetters, L.J.; Huang, J.S.; Richter, D., *Star Polymers: Experiment, Theory, and Simulation In Polymeric Systems (Advances in Chemical Physics)*, I, P. and Stuart, A.R., Eds.; John Wiley & Sons Inc: New York, 1996; Vol. 94, p 67-163.
4. Hadjichristidis, N.; Pitsikalis, M.; Pispas, S.; Iatrou, H., *Chem. Rev.*, **2001**, *101*, 3747-3792.
5. Zhu, X.X.; Nichifor, M., *Acc. Chem. Res.*, **2002**, *35*, 539-546.
6. Gautrot, J.E.; Zhu, X.X., *Angew. Chem.-Int. Edit.*, **2006**, *45*, 6872-6874.
7. Liu, H.Y.; Avoce, D.; Song, Z.J.; Zhu, X.X., *Macromol. Rapid Commun.*, **2001**, *22*, 675-680.
8. Wan, T.; Liu, Y.; Yu, J.Q.; Chen, S.; Li, F.; Zhang, X.Z.; Cheng, S.X.; Zhuo, R.X., *J. Polym. Sci. Pol. Chem.*, **2006**, *44*, 6688-6696.

9. Beher, W.T., *Bile Acids : Chemistry and Physiology of Bile Acids and their Influence on Atherosclerosis*, S. Karger: New York, 1976; Vol. 6, p 48-59.
10. Kim, C.; Lee, S.C.; Kang, S.W.; Kwon, I.C.; Kim, Y.-H.; Jeong, S.Y., *Langmuir*, **2000**, *16*, 4792-4797.
11. Willemen, H.M.; de Smet, L.; Koudijs, A.; Stuart, M.C.A.; Heikamp-de Jong, I.; Marcelis, A.T.M.; Sudholter, E.J.R., *Angew. Chem.-Int. Edit.*, **2002**, *41*, 4275-4277.
12. Zhong, Z.Q.; Yan, J.; Zhao, Y., *Langmuir*, **2005**, *21*, 6235-6239.
13. Taotafa, U.; McMullin, D.B.; Lee, S.C.; Hansen, L.D.; Savage, P.B., *Org. Lett.*, **2000**, *2*, 4117-4120.
14. Hu, X.Z.; Zhang, Z.; Zhang, X.; Li, Z.Y.; Zhu, X.X., *Steroids*, **2005**, *70*, 531-537.
15. Matyjaszewski, K.; Xia, J., *Chem. Rev.*, **2001**, *101*, 2921-2990.
16. Janout, V.; Zhang, L.-h.; Staina, I.V.; Di Giorgio, C.; Regen, S.L., *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 5401-5406.
17. Janout, V.; Jing, B.; Regen, S.L., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 15862-15870.
18. Kralchevsky, P.A.; Danov, K.D.; Denkov, N.D., *Handbook of Surface and Colloid Chemistry*. CRC Press: New York, 1997; p 333-494.
19. D'Arrigo, G.; Briganti, G.; Maccarini, M., *J. Phys. Chem. B*, **2006**, *110*, 4612-4620.
20. Shukla, A.; Fuchs, R.; Rehage, H., *Langmuir*, **2006**, *22*, 3000-3006.
21. Sata, N.; Chuzyo, K., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1953**, *26*, 177-183.

2.6 Supporting Information

The synthesis of star-shaped polymer from cholic acid is evidenced by the ^1H NMR spectrum in Figure S2.1 where the protons on positions 3, 7, 12 and end chain protons show up. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.7 (s, 3, H^{18} , E), 4.0-4.3 (b, 8, H^{25} , H^{26} and end chains protons, D), 4.5 (b, 1, H^3 , C), 4.9 (b, 1, H^7 , B) and 5.1 (b, 1, H^{12} , A).

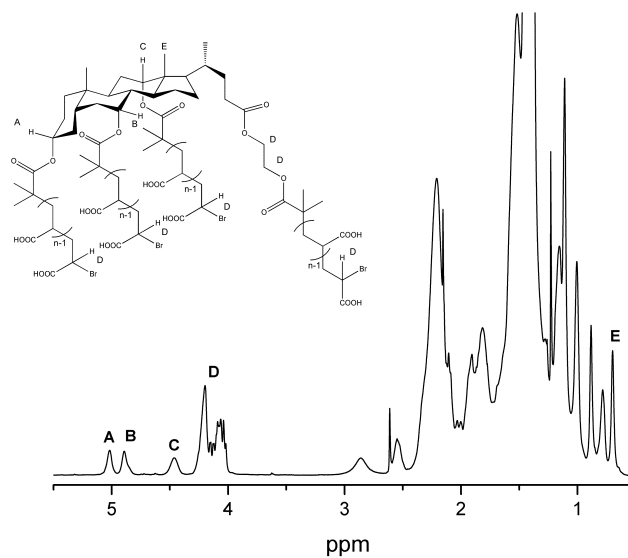


Figure S2.1. ^1H NMR spectrum of $\text{CA}(t\text{BA}_7)_4$ showing the protons on chain ends at 4.2 ppm overlapping with the ethylene glycol protons.

Figure S2.2 shows a linear increase in molecular weight with time during the ATRP of the monomer, indicating a well controlled polymerization. The controlled polymerization shows a first order monomer consumption.

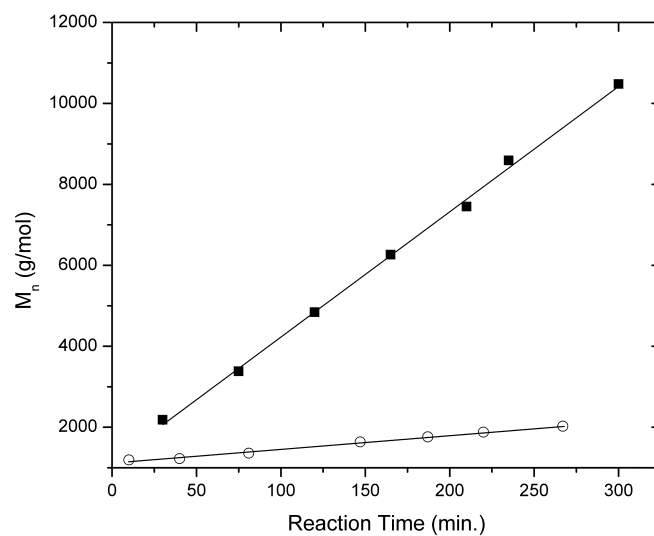


Figure S2.2. The molar masses of the polymers derived from initiators 3a (○) and 3b (■) as a function of ATRP reaction time as measured by SEC with PMMA standards.

The molecular weights of the polymers were determined by SEC, MALDI-TOF and ^1H NMR spectroscopy to confirm the kinetic results. The number of arms was confirmed by comparison of the molar masses of the polymers (obtained by the MALDI-TOF) with those of the arms obtained from the electrospray mass spectra of the cleaved arms (Figure S2.3).

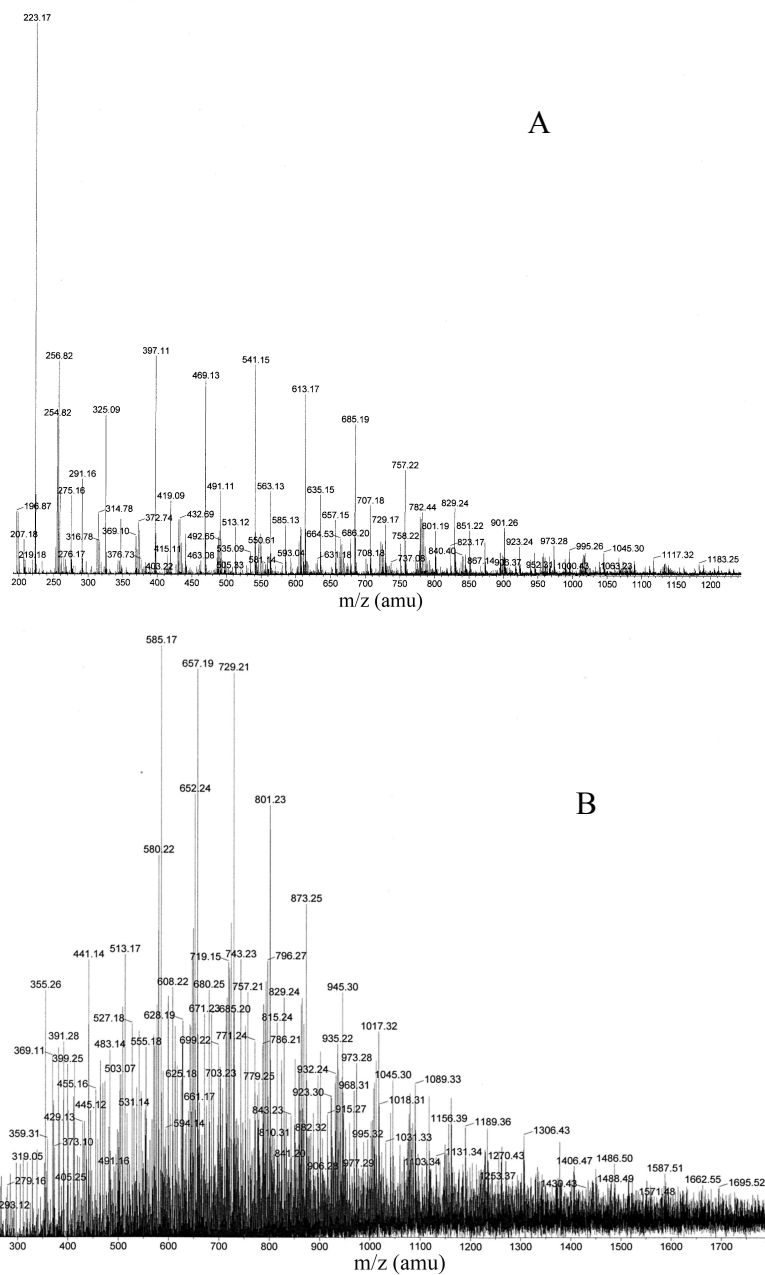


Figure S2.3. LC-MSD-TOF spectra of (A) AA₇, cleaved from CA(AA₇)₄, and (B) AA₁₀, cleaved from CA(AA₁₀)₄.

Chapitre 3: Polymères en étoile asymétriques et amphiphiles de poly(éthylène glycol) dérivés de l'acide cholique*

Poly(ethylene glycol) (PEG) arms are grafted from a cholic acid core via anionic polymerization, yielding star-shaped polymers with a unique asymmetric structure with facial amphiphilicity. Well-defined cholic acid-PEG₄ stars (polydispersity index ca. 1.05) with tunable molar masses (ca. 1000 – 13000) were obtained and characterized by the use of size exclusion chromatography, MALDI-TOF mass spectrometry, NMR spectroscopy and thermal analysis. The asymmetric star polymers were found to aggregate differently from cholic acid salt. The critical aggregation concentrations of the star polymers were determined by surface tension measurements, and spherical aggregates of the polymers with different PEG chain lengths were observed by transmission electron microscopy using the freeze-fracture etching technique. The elongated aggregates formed by the sodium salt of cholic acid were also observed. The hydrodynamic diameters of the aggregates were measured using dynamic light scattering. The formation of aggregates makes them interesting systems as potential drug carriers.

3.1 Introduction

Compact structure and high segment density render star polymers with distinct physical properties in bulk, as in melt and in solution compared to their linear analogs.¹ The encapsulation behavior of the star polymers with amphiphilic core-shell structure has been successfully exploited for drug-delivery applications and in catalysis.²⁻⁴ Star polymers with more than 3 arms, even up to hundreds of arms, have

*Luo, J.; Giguère, G. et Zhu X.X. *Asymmetric Poly(ethylene glycol) Star Polymers with a Cholic Acid Core and Their Aggregation Properties*, *Biomacromolecules* (2009), 10, 900-906.

been prepared due to synthetic and theoretical interests in such materials.^{5, 6} Among them poly(ethylene glycol) (PEG)-based star polymers since PEGs and PEG-based micelles are regarded as bioacceptable materials and found biomedical and pharmaceutical applications in the delivery of therapeutic and diagnostic reagents.^{2, 7, 8} PEGylation is commonly used in prodrugs to solublize and stabilize small molecular drugs and increase the circulation time in the blood pool.^{9, 10} The conjugation of ligands onto star-shaped PEGs may generate stronger binding affinity, due to the multiple dents on a globular vehicle.¹¹ PEG-based micelles are stealth from the uptake of the reticuloendothelial system and can enhance the accumulation of the loaded pharmaceuticals to the pathological sites, such as tumor, by the enhanced permeability and retention (EPR) effect.¹² In addition, it has been reported that asymmetric star polymers exhibited interesting and unique physical properties in various applications, such as adhesives, viscosity index improvers and compatibilizers.^{13, 14}

The asymmetric star polymers reported to date include asymmetry of polymeric arms differing in molecular weight, chemical composition, and functional groups.¹⁵ The structural asymmetry of bile acids makes them interesting building block in the preparation of oligomeric and polymeric materials. Star-shaped oligomers of bile acids have been made for use as molecular tweezers and umbrellas.¹⁶⁻²² Star-shaped polymers with cholic acid as a core and poly(acrylic acid) or polylactide as arms has been prepared to explore their applications.²³⁻²⁵

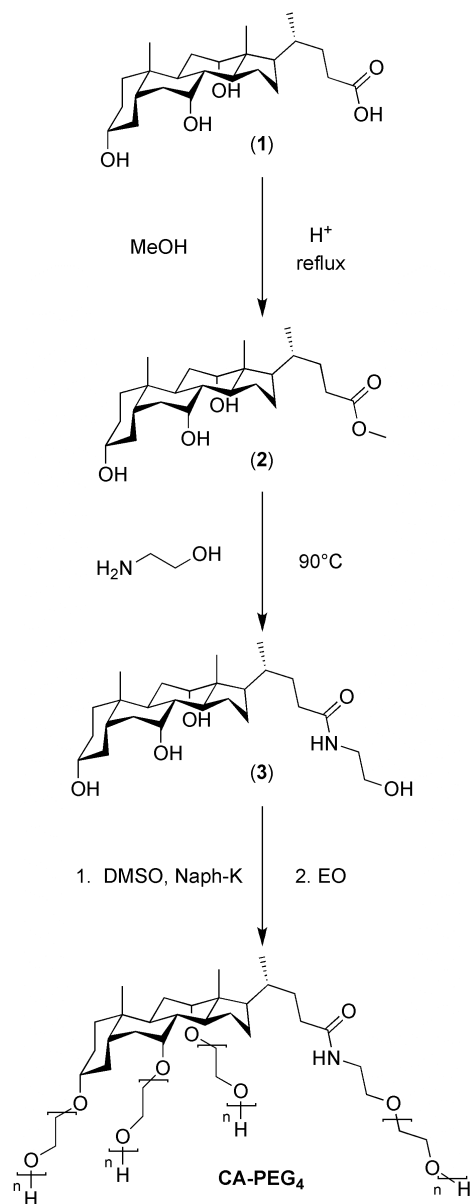
We report here the synthesis and the properties of a different type of asymmetric amphiphilic star polymer with four PEG chains orienting toward one side of the cholic acid core. The structural asymmetry of cholic acid itself renders the polymer with interesting amphiphilic properties. Cholic acid (CA) is one of the major primary bile acids, which are facially amphiphilic biomolecules synthesized biologically in the liver of mammals as emulsifiers in the digestion of fats.²⁶ It possesses a rigid steroid skeleton structure and four hydrophilic groups located on one side of its rigid skeleton: three hydroxyl groups (all in α -positions) and a carboxylic acid group (compound **1** in Scheme 3.1). The facial amphiphilicity of the cholic acid core imparts a spatial asymmetric distribution of the PEG chains, which are located on one

side of the cholane skeleton. Therefore, the star polymers obtained should have a unique structural asymmetry so that they retain the hydrophobicity of cholic acid skeleton on one face, while PEG chains modify its hydrophilicity on the other. Different from most of PEG star polymers, CA-PEG₄ can self-assemble into micelles, and these phenomena were evidenced by utilizing surface tension measurements, dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM). The structure of the micelles formed by such polymers was also found to be different from that of the micelles formed by the parent bile acid.

3.2 Experimental Section

3.2.1 Materials

Cholic acid (98%) and ethanolamine (98%) were purchased from Aldrich and used without further purification. Dimethylsulfoxide (DMSO, from Aldrich) was dried by refluxing with calcium hydride for 48 h before distillation. Tetrahydrofuran (THF) was dried with sodium in the presence of benzophenone and was distilled after the solution turned dark blue. Potassium naphthalene was prepared directly in dry THF from naphthalene (>99%, Aldrich) and potassium (98% in mineral oil, Aldrich) with a concentration of 0.45 mol/L (titrated with a standard hydrochloric acid solution). Potassium naphthalene in THF is a dark green solution, easy to prepare and to transfer in a Schlenk flask, and to monitor the consumption of the strong base in the deprotonation of alcohols. Ethylene oxide (EO) was distilled from a trap with a 1.6 mol/L *n*-butyl lithium solution in hexane (from Aldrich) to another trap after passing through a calcium hydride drying column. All glassware used in the anionic polymerization was flame-dried under vacuum before use.



Scheme 3.1. Synthetic path for the preparation of CA-PEG₄ star polymers.

3.2.2 Preparation of (2'-hydroxyethylene)-3 α ,7 α ,12 α -Trihydroxy-5 β -Cholanoamide (3).

Cholic acid methyl ester **2** (8.0 g), prepared from cholic acid according to a previously published procedure,²⁷ was dissolved in 50 mL of dry ethanalamine and heated at 90°C for 4 h. The reaction solution was then cooled to room temperature and 50 mL of ice water was poured into the solution. The product was precipitated

and filtered at room temperature, then dissolved in hot methanol followed by the addition of ethyl acetate (4 times excess) to precipitate again. After filtration and drying in a vacuum oven, 8.0 g of product (**3**) was obtained with a yield of 93 %. Elemental analysis: C₂₆H₄₅NO₅, calculated: C 69.14%, H 10.04%, N 3.10%; found: C 69.15%, H 10.49%, N 3.14%. FTIR (cm⁻¹): 1655 (sharp), 3288 (sharp). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ = 0.58 (3H, s, 18-CH₃), 0.81 (3H, s, 19-CH₃), 0.92 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, 21-CH₃), 1.0-2.2 (m, protons on the steroidal skeleton backbone), 3.08 (2H, q, *J* = 6.1 Hz, 25-NCH₂), 3.18 (1H, m, 3-CH), 3.35 (2H, q, *J* = 5.7 Hz, 26-CH₂O), 3.60 (1H, m, 7-CH), 3.77 (1H, m, 12-CH), 4.01 (1H, d, *J* = 3.3 Hz, 12-COH), 4.10 (1H, d, *J* = 3.5 Hz, 7-COH), 4.32 (1H, d, *J* = 4.3 Hz, 3-COH), 4.62 (1H, t, *J* = 5.4 Hz, 26-COH), 7.75 (1H, t, *J* = 5.7 Hz, 24-CONH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ = 13.21, 17.99, 23.49, 23.67, 27.08, 28.16, 29.43, 31.26, 32.58, 33.36, 35.25, 35.26, 36.07, 36.18, 42.23, 42.26, 42.38, 46.59, 46.99, 60.84, 67.11, 71.30, 71.88, 173.65. LCMS: t_R 10.36 min, m/z 452 [M+H]⁺.

3.2.3 Anionic Polymerization of Ethylene Oxide

In a typical procedure, all the glassware and needles were flame-dried under vacuum and purged with argon 3 times. 0.45 g of **3** (1 mmol) was placed into a 100 mL flask, charged with 40 mL of dry DMSO. Potassium naphthalene solution in THF (0.43 mol/L) was introduced (9.2 mL, 1 eq., or 2.3 mL, 0.25 eq.) dropwise into the vigorously stirred flask via a canula by high pressure argon. Then, dry ethylene oxide chilled in dry ice/acetone was introduced into the flask and polymerized at 40°C for 48 h. The reaction mixture was neutralized and quenched with concentrated HCl. The DMSO solution was extracted with hexane (50 mL × 3) to remove naphthalene, and DMSO was removed by distillation under vacuum. A small amount of THF was added to the residue to dissolve the polymer and to precipitate the salt. After filtering off the salt, the polymer was concentrated to dryness by rotary evaporation and high vacuum. The samples prepared are listed in Table 3.1.

Table 3.1. Properties of the CA-PEG₄ Star Polymers Grafted with PEG Chains of Different Lengths.

Sample	EO units (× 4 arms)	M_n (PDI)				CAC (millimolal)
		Theo.	SEC	MALDI-TOF	NMR	
I	5	1330	1110 (1.04)	1360 (1.03)	1440	9
II	10	2210	1510 (1.04)	1810 (1.03)	2700	12
III	15	3090	2190 (1.04)	2430 (1.03)	3500	15
IV	30	5730	3500 (1.03)	3640 (1.03)	5200	16
V	50	9250	5870 (1.05)	5980 (1.03)	8830	19
VI	75	13650	7320 (1.03)	6860 (1.02)	10280	19
CA		408.6				9

Note: EO units: theoretical values based on the amount in de feed; M_n : number-average molecular weight obtained by SEC relative to linear PEG standards, by MALDI-TOF MS with dithranol as a matrix and peptide standards, or by ¹H NMR peak integration of methyl proton signals on the cholic acid core and the methylene proton signals on the PEG chains, presented in comparison to the theoretical value calculated based on the amount of EO used (see 3.6 Supporting Information); CAC: the critical aggregation concentration obtained by surface tension measurement with an accuracy of ± 1 millimolal.

3.2.4 Characterization Techniques

The infrared (IR) spectra of the polymers were recorded on a Bomem MB-100 Fourier transform IR spectrometer at room temperature with potassium bromide pellets made from the ground polymer. ¹H NMR spectra of polymers and cholic acid derivatives were recorded on a Bruker AMX400 spectrometer operating at 400 MHz for protons. The molar masses of the CA-PEG₄ samples were determined by size exclusion chromatography (SEC) in THF at 25°C with a flow rate of 1 mL/min in reference to linear PEG standards. The thermal transitions of the polymers were

analyzed on a TA DSC2910 differential scanning calorimeter (DSC). The samples were heated from room temperature to 100°C, then cooled to -80°C before finally being heated to 100°C, all at a heating or cooling rate of 10°C/min.

MALDI-TOF mass spectrometry (MS) was performed on a Bruker Autoflex MALDI-TOF mass spectrometer, which used a 20 kV extraction voltage and a N₂ laser of 337 nm wavelength. Dithranol (1,8-dihydroxy-9[10H]-anthralenone) (Sigma) was used as a matrix with added LiCl for the analysis. About 10 mg of dithranol was dissolved in 2.5 mL of methanol to prepare a saturated solution of which 20 µL was mixed with 2 µL of a polymer solution (2.5 mg in 0.5 mL of methanol). Finally, 2 µL of a 10 mg/mL solution of LiCl in methanol was added. The samples (0.5 to 1 µL) were applied to the target plate by the dried-droplet method. A peptide calibration standard with a molecular weight range of 1-4 kDa and a protein calibration standard with a molecular weight range of 3-25 kDa were used to calibrate the molar masses of the star polymers.

The purity of precursor compound **3** was analyzed on a reverse phase HPLC-MS equipped with a Betasil C₁₈ column (150 × 4.6 mm) with UV detection at a wavelength of 214 nm. A gradient of eluents was used: A = 5% v/v trifluoroacetic acid (TFA) in H₂O and B = 5% v/v TFA in CH₃CN, gradient of B from 20% to 80% over 20 min, flow rate at 0.5 mL/min., injection volume: 10 µL, MS conditions: scan 100-800, cone voltage 30 kV, temperature 400°C, mode (polarity) positive.

Surface tension measurements were performed on a First Ten Ångströms instrument (FTÅ200) with milli-Q water. The graph of the pendant drop method was used to calculate the critical aggregation concentration (CAC) of the polymers. The instrument was calibrated using the needle width as reference.

The average size of the aggregates was measured by dynamic light scattering (DLS) on a Brookhaven Instrument (BI-200SM) equipped with a 532 nm laser. To calculate the size distribution of the different samples in solution (0.025 molale for Sample I, 0.020 for Sample III and 0.040 molale for CA), inverse Laplace transform was performed with MatLab using the regularization function. The average hydrodynamic radius (R_h) was calculated according to the apparent Γ of the Williams-Watts function, assuming a spherical form for the aggregates.

For transmission electron microscopy (TEM), different sample concentrations were prepared in milli-Q water for freeze-fracture. A small amount of these solutions were dropped onto a gold sample carrier, and then frozen in liquid propane. The frozen samples were then mounted on the sample holder of a BAL-TEC freeze etching instrument (model BAF060). Samples were then fractured and let sublimate for less than 30 seconds before the newly created surface was coated from an angle of 45° (shadowed) with 2 nm of platinum-doped carbon. A 10 nm layer of carbon was then applied perpendicularly. The samples were placed in distilled water to make the platinum-carbon replica float on the water surface. They were then deposited on carbon-coated copper grids. The replicas were examined on a JEOL JEM-2000FX TEM operating at an acceleration voltage of 80 kV.

3.3 Results and Discussion

3.3.1 Preparation of the CA-PEG₄ Polymers and Optimization of the Polymerization Conditions.

Since it is difficult to achieve a high conversion by directly reacting the carboxylic acid group with 2-aminoethanol, cholic acid methyl ester was aminolyzed with ethanolamine (Scheme 3.1). The FTIR spectrum of **3** shows very sharp peaks at 1655 cm⁻¹ (C=O), 3288 cm⁻¹ (NH) and 1570 cm⁻¹ (NH) typical of an amide and no peaks attributable to an ester (1736 cm⁻¹ for **2**). This indicates the complete conversion of the methyl ester to the corresponding amide. ¹H NMR and ¹³C NMR spectra also confirm the structure of the amide **3**.

The solubility of the core **3** is very poor in THF, a common solvent for anionic polymerization of EO.²⁸ After deprotonation with potassium naphthalene, the solubility of the alkoxide becomes even lower due to the tendency of the alkoxide to aggregate; the solution turned milky and opaque, providing polydispersed polymers as they precipitated out in THF. Therefore, DMSO was used as the solvent to increase the solubility of precursor **3** in the salt form. It was noted that DMSO can stabilize the cations to form loose ion pairs in the polymerization of EO and therefore increase the polymerization rate.⁸ The use of DMSO as a solvent provided a

homogenous initiation at the beginning of the polymerization with 100% deprotonation of precursor by naphthalene potassium. It was observed that the phase separation occurred a few hours later as reported in other star PEG syntheses,²⁹⁻³¹ when the monomer was introduced less than 40 eq. in order to generate short PEG chains, and polymers with wide PDI were obtained. A homogenous reaction solution was obtained after polymerization at 40°C overnight when 80 eq. of EO was charged with 100% deprotonation of precursor **3** and a narrow dispersed polymer was isolated (PDI: 1.07), even though the mixture still became milky at the beginning stage of polymerization. The crown ether structures formed with the longer PEG chains may solvate and stabilize the cations and prevent the alkoxide salts from aggregating.³²

Although narrow disperse polymers can be obtained using a full deprotonation of the hydroxyl groups with large quantities of monomer added (usually more than 80 eq.), phase separation is still encountered in the preparation of star polymers with short PEG chains. Star PEG polymers can be prepared with a partial deprotonation of alcohol groups.²⁹⁻³¹ Under these conditions, it is expected that all the initiating sites (hydroxyl groups) contribute to the polymerization of EO to form four PEG chains due to the rapid proton exchange between the dormant hydroxyl groups and the active alkoxides compared to the rate of polymerization.^{33, 34} The proton NMR study of the star-shaped polymers showed that four PEG chains were attached onto one cholane core. To avoid the milky transition of the solutions, 25% deprotonation (Scheme 3.1) was employed in the preparation of Samples I to VI. The polymerization solutions remained transparent throughout the entire duration of the polymerization providing a homogeneous mixture during the propagation step. As shown in Table 3.1, a series of star polymers were prepared with narrow polydispersities, and the average molecular weights were studied with SEC, MALDI-TOF MS and ¹H NMR.

3.3.2 Characterization of the Polymers

FTIR spectra show a decrease in the carbonyl band at 1641 cm⁻¹ and an increase in the C-O-C band of PEG at 1120 cm⁻¹ with increasing length of PEG chains grafted on the cholic acid core **3** from Sample I to V (data not shown), indicating a qualitative chain growth. To verify that all four hydroxyl groups on the

cholane core are grafted with a PEG chain when 25% deprotonation of the hydroxyl groups were used, the CA-PEG₄ star polymers were treated with the trifluoroacetic anhydride, followed by NMR analysis of the integral of the proton signal intensity of the CH₂ adjacent to the trifluoroacetyl group. In the NMR spectra of the CA-PEG₄ sample with a PEG-chain length of 30 units before and after the acetylation (Figure S3.1, 3.6 Supporting Information), it is clear that the protons of CH₂ on the α -position adjacent to trifluoroacetate were shifted from 3.8 to 4.5 ppm, and the protons of the CH₂ on the β -position of trifluoroacetate were also shifted to a lower field. In the proton NMR spectra, the ratios of the integral of methylene protons at 4.5 ppm and 3.8 ppm to that of the three methyl groups on cholic acid core were all observed to be 8 : 9, indicative of four PEG chains on each cholic acid molecule.

3.3.3 *Molecular Weights of the CA-PEG₄ Polymers.*

The theoretical values of molecular weight of the star polymers can be calculated based on the amounts of initiator and monomer (EO) added. However, we cannot exclude the possibility of incomplete conversion and the loss of the EO monomer during the drying and transfer process due to its low boiling point. This may explain the lower experimental values of molecular weights measured by SEC and MALDI-TOF than the theoretical values (Table 3.1). The SEC curves (Figure 3.1) show the ease of control of molecular weight by the anionic polymerization process with narrow molecular weight distributions. While the use of linear PEGs as the calibration standards in SEC is suitable and likely provides the most reliable values of molecular weight, it is necessary to point out that the molecular weights of star-shaped PEGs may be slightly underestimated in SEC analysis since the star-shaped polymers have a smaller hydrodynamic radius than the corresponding linear polymers with the same molecular weights.¹

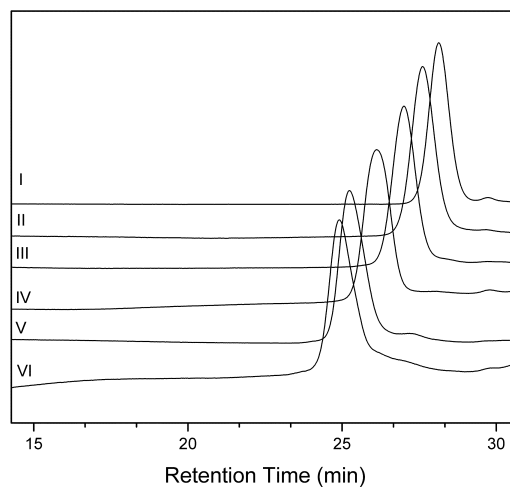


Figure 3.1 SEC traces of CA-PEG₄ star polymers (eluent: THF, RI detector, 1 mL/min). Sample details are given in Table 3.1.

Both MALDI-TOF MS and NMR can be used for more accurate measurements of polymers of lower molar masses. The molar masses calculated from the ¹H NMR signals, using the ratio of the proton signals of PEG chains and the methyl group (position 18) on cholic acid, are closer to the theoretical molecular weights of the CA-PEG₄ stars than the SEC results. However, NMR data for polymers of higher molecular weight may be less accurate due to difficulties in the integration of less intense ¹H signals of the chain end groups.

MALDI-TOF MS is particularly suitable in the analysis of such polymers of low polydispersity. For the CA-PEG₄ stars with lower molar masses (Samples I to IV), high resolution MS spectra were obtained (Figure 3.2) showing symmetric distributions of the molecular masses. The M_n values obtained here are closer to the theoretical values for these samples in comparison with the values obtained by SEC. For star polymers with higher molecular weight (Samples V and VI), SEC data would be more reliable, as the MALDI-TOF analysis has lower signal to noise ratio and yields lower molecular weight than the SEC experiments (Table 3.1). Some studies indicated that the high-mass components are generally under-represented in respect to the lower-mass components and discriminated by the higher laser power needed in

the experiments.³⁵⁻³⁸ Even so, both SEC and MALDI-TOF MS methods provide similar values for the very low polydispersity of the star-shaped polymers (<1.05), which serves as a proof of success for a controlled anionic polymerization process.

3.3.4 *Thermal Analysis of the CA-PEG₄ Polymers.*

Melting point suppression is a well-known effect of the PEG chains in star polymers, because of the defective PEG crystal lattice caused by the core and by the lower molecular weight of the PEG chains.^{39, 40} The melting points of crystalline polymers may also depend on the thermal history of the sample. To erase the initial thermal history of the samples, the DSC thermograms of the CA-PEG₄ samples were recorded during the second heating at 10°C/min (Figure 3.3). The CA-PEG₄ star polymer with very short PEG chains (i.e., Sample I with 4 EO units on each chain) have an obvious glass transition without crystallization and melting. The PEG chains here may be too short to form any crystalline domain. The star polymer with a M_n of 1510 (Sample II, average 6 EO units) shows a weak glass transition, a sharp exothermal crystallization peak and a broad melting point. For polymers III to VI, the increase in molar mass of the samples also raises the melting points. The melting points of the polymers seem to depend on the size of the crystalline domains, which may be larger with increasing length of the PEG chains. Figure 3.3 shows that the melting points of the PEG stars are always lower than those of the linear PEGs of the same molar mass.⁴¹⁻⁴³

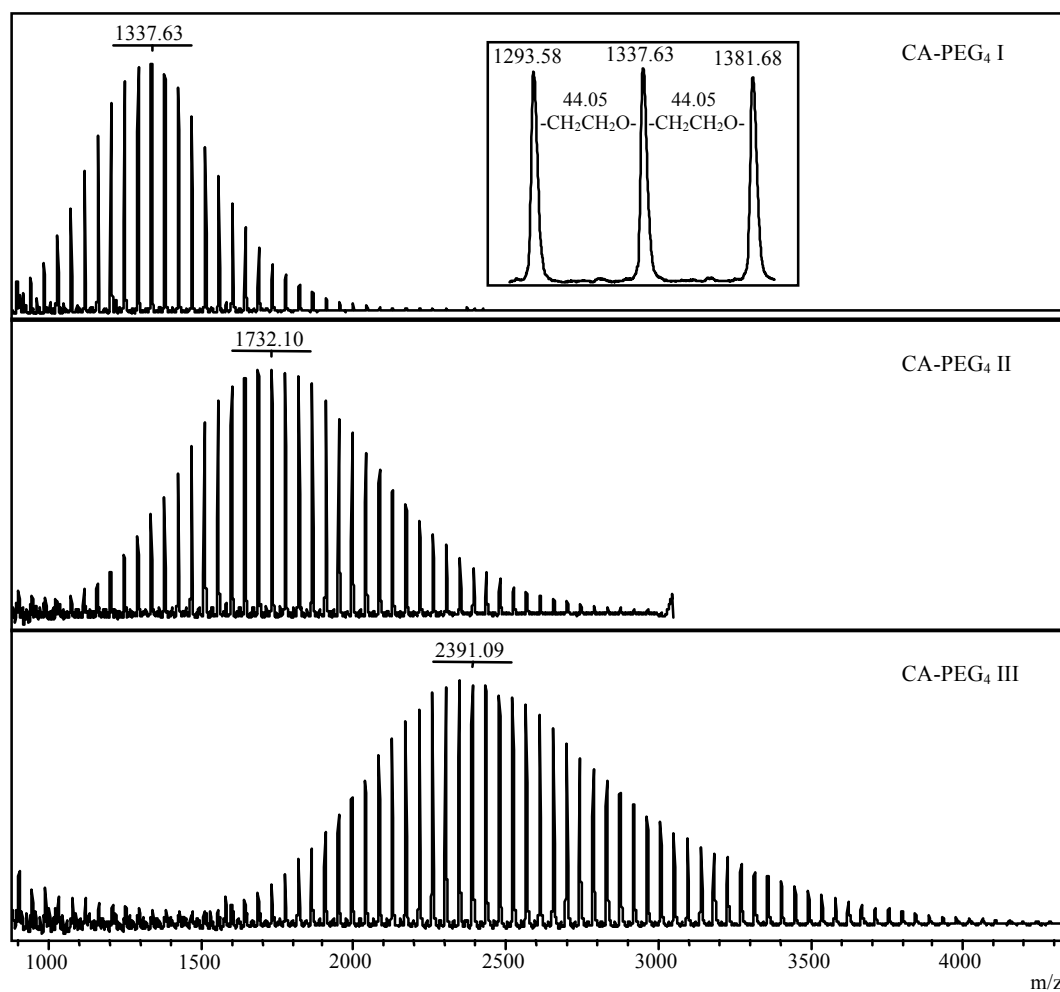


Figure 3.2. MALDI-TOF MS spectra of CA-PEG₄ star polymers I, II and III obtained using a N₂ laser at 337 nm wavelength with a 20 kV extraction voltage. Dithranol was used as the matrix in the presence of LiCl.

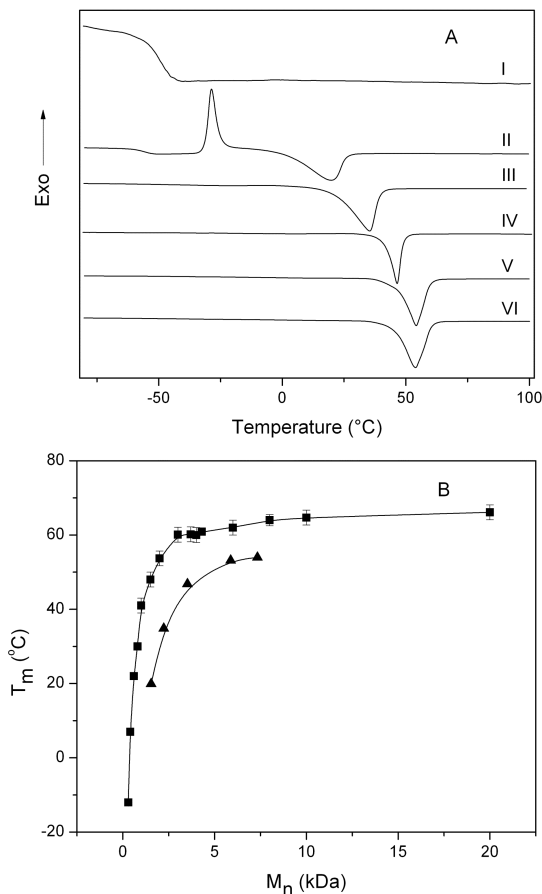


Figure 3.3. (A) DSC traces of CA-PEG₄ star polymers obtained with a heating rate of 10°C/min (second heating curves); (B) Variation of melting temperatures (T_m) of linear PEG (■) and CA-PEG₄ star polymers (▲) as a function of their molecular weights. The T_m values of PEG stars are those obtained from DSC analysis and the data of linear PEGs are from literature.⁴¹⁻⁴³

3.3.5 Aggregation of the CA-PEG₄ Polymers.

Because of the asymmetric structure and the amphiphilicity of the CA-PEG₄ star polymers, they can easily aggregate in water. The aggregation of these polymers was then studied by the use of surface tension technique. Molal concentration (mole of solute per kilogram of solvent) was used because of its convenience in the calculation of concentrations for samples of varying volumes but of known weight. At low concentrations, the molal and molar concentrations (mole of solute per liter of

solution) are similar in value.

The surface tension of the solution should decrease with increasing concentration of surfactant molecules and becomes stable above a certain concentration of the surfactants; the break point being defined as the CAC of the surfactant. It is known that the surface tension above the CAC becomes stable.⁴⁴ The value of the lowest surface tension measured is mainly affected by the hydrophobic heads rather than the hydrophilic tails, since this segment will be positioned at the air/water interface. Figure 3.4 gives representative surface tension profiles of the star-shaped polymers, all with a break point, indicating the formation of aggregates. All the CA-PEG₄ star polymers prepared in this study have a CAC (Table 3.1), including the one with the longest PEG chains (Sample VI), indicating that these polymers all maintain a reasonable balance of amphiphilicity to allow hydrophobic interactions of the convex faces of cholic acid core in the formation of stable aggregates above their CACs. The CACs of CA-PEG₄ are equal or higher than the CAC of sodium cholate (9 millimolal), and increased from 9 to 19 millimolal with increasing PEG chain lengths due to the higher hydrophilicity of the longer PEG chains. The results from surface tension measurements were confirmed by viscosity experiments for selected samples (see 3.6 Supporting Information) with a good agreement of both techniques.

3.3.6 *Light Scattering and Microscopic Studies of the CA-PEG₄ Polymers.*

TEM images of the star polymers shown in Figure 3.5 provide unequivocal evidence for the formation of micellar aggregates. Spherical aggregates with sizes around 100-130 nm are shown in the images obtained above the CACs of the CA-PEG₄ star polymers, which are definitely different from the cylindrical aggregates formed by sodium cholate. This is the first time that the cylindrical micellar aggregates formed by a pure bile salt in water are visualized and a clear difference is observed for its PEGylated derivatives. Previously, micelles formed by mixtures of bile salts, phospholipids and cholesterol observed under transmission electron microscope by Howell *et al.* also revealed cigar-shaped structures.⁴⁵ The influence of the various components on the micellar structure is difficult to predict, but evidence

by light scattering experiments showed that pure bile salts formed cylindrical shapes of the micelles, which may be attributed to the elongated structure to bile acids.⁴⁶

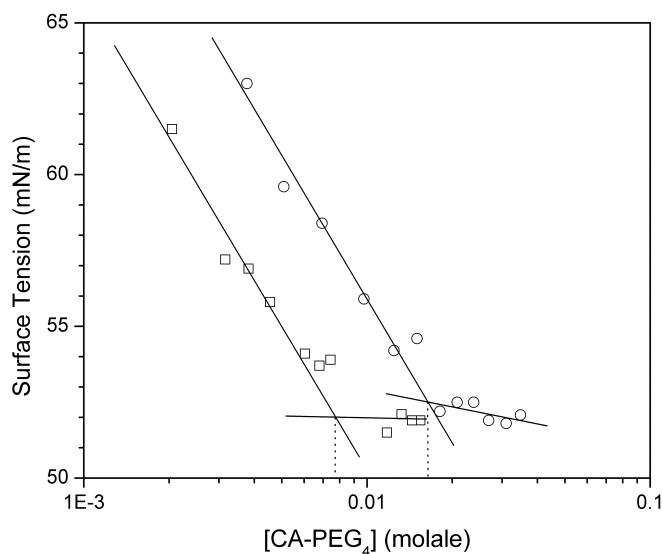


Figure 3.4. Variation of the surface tension (ST) of selected CA-PEG₄ stars measured in water at 22°C as a function of their molal concentrations. Sample I, squares; Sample IV, circles.

Hydrogen bonding is believed to play an important role in forming large secondary aggregates from the primary aggregates of bile salts and the relative position of hydrogen bonds on the cholic acid skeleton (for complementary between molecules) may influence the CAC.⁴⁶⁻⁴⁹ In the CA-PEG₄ star polymers, the hydroxyl groups on the concave faces of cholic acid are extended by the PEG chains. The mechanism of aggregation may be quite different and possibly complicated as is known for bile acids.^{26, 46, 50, 51} The dependence of the size of the aggregates on the concentration and on the PEG chain lengths need to be studied in more detail.

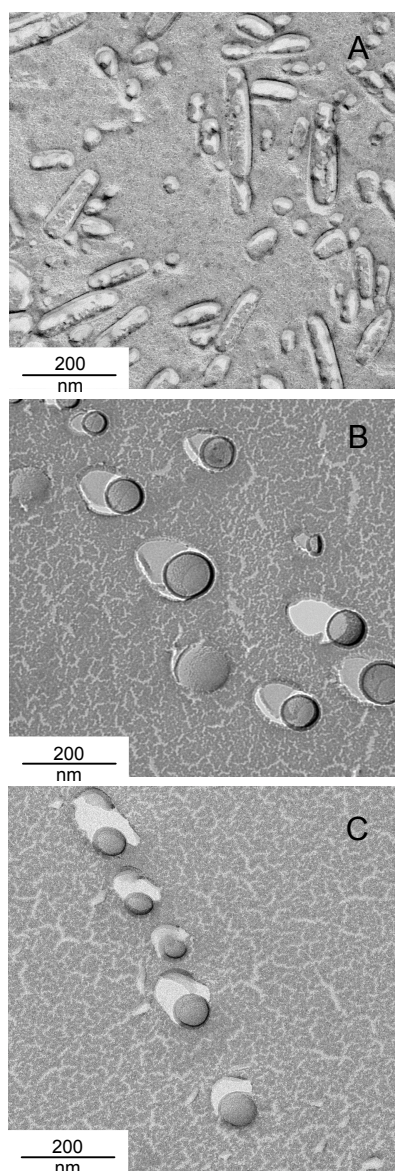


Figure 3.5. TEM images of the aggregates formed by sodium cholate at 0.040 molal (A), CA-PEG₄ I at 0.025 molal (B) and CA-PEG₄ III at 0.020 molal (C).

Geometric packing considerations are usually used to calculate the micellar shape adopted by a linear surfactant.⁵² Considering the ratio between the optimal surface area of the polar head group (a_0), the critical chain length (l_c) and the volume occupied by the hydrophobic chain (v), if the critical packing parameter v/a_0l_c is in the range of $1/3$ to $1/2$, cylindrical micelles should be formed. When $v/a_0l_c < 1/3$, then spherical supramolecular structures are formed. In the present case with CA-PEG₄,

the volume and the surface of the hydrophobic part, the steroidal skeleton, are believed to be fairly constant while the PEGs were attached, resulting in the increase of the optimal surface parameter. With this assumption, we expect a lower value of the packing parameters, leading to a transition from rod-shaped aggregates of cholic acid to spherical aggregates of CA-PEG₄.

TEM provided images of a limited number of frozen micelles (not large enough to provide a statistical distribution of the size). DLS experiments can be used to study the size and distribution of the micelles in solution. Selected samples were studied as shown in Figure 3.6. The average diameter of the aggregates measured by DLS is 180 nm for Sample I, and 200 nm for Sample III. The β values, an indication of the dispersity of the sizes, are 0.6 for both Samples I and III. In DLS studies, R_h is calculated according to the Stoke-Einstein equation assuming a spherical shape, which is not the case for the aggregates of sodium cholate, leading to a smaller hydrodynamic diameter than the average rod length. The R_h distribution in Figure 3.6 may be explained by the stepwise aggregation of the samples that unavoidably gives different species in solution. For Samples I and III, the average hydrodynamic diameters (180 nm and 200 nm, respectively) are larger than those shown on the TEM images. The discrepancy may be due to the larger hydrated state of the micelles in solution. The large R_h values of the micelles clearly indicates that these are the size of multi-molecular aggregates, not of individual star polymers. The size distribution of these two samples seems to be slightly narrower than that of sodium cholate (Figure 3.6). Note that spherical shape of the micelles was assumed in the calculation of the light scattering data, even in the case of rod-like micelles of sodium cholate. The size and distribution of these aggregates under different conditions (concentration, temperature, and ionic strength) need to be further studied to obtain a better insight of such systems.

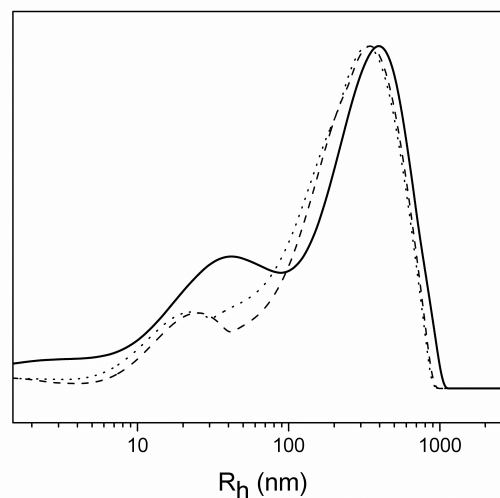


Figure 3.6. The R_h distributions for CA-PEG₄ samples I (0.025 molal, dashes) and III (0.020 molal, dots), and sodium cholate (0.040 molal, solid line) obtained by dynamic light scattering experiments.

3.4 Conclusions

The grafting of PEG chains of different lengths on the cholic acid core has been successfully achieved by anionic polymerization of ethylene oxide, providing star polymers with very low polydispersity. It is easy to apply the same grafting method to other bile acids or compounds with multiple functional groups of this kind. The PEGylated cholic acid derivatives can form spherical micellar aggregates in water, providing interesting reservoir for hydrophobic compounds that may be explored for use as drug delivery vehicles. The OH groups of the PEG chains may be further modified to introduce other functional groups for different applications. Further experiments will be carried out to study the formation of mixed micelles. The biocompatibility and the aggregation behavior make such materials good candidates in potential applications as drug carriers and rheology modifiers.

3.5 References

1. Grest, G. S.; Fetters, L. J.; Huang, J. S.; Richter, D., In *Advances in Chemical Physics*, John Wiley & Sons Inc: New York, 1996; Vol. XCIV, p 67-163.
2. Qiu, L. Y.; Bae, Y. H., *Pharm. Res.* **2006**, *23*, 1-30.
3. Seidlits, S.; Peppas, N. A., In *Nanotechnology in Therapeutics: Current Technology and Applications*, Peppas, N. A.; Hilt, J. Z.; Thomas, J. B., Eds. Taylor & Francis Ltd: Norfolk, 2007; p 317-348.
4. Chi, Y.; Scroggins, S. T.; Fréchet, J. M. J., *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6322-6323.
5. Taton, D.; Gnanou, Y.; Matmour, R.; Angot, S.; Hou, S.; Francis, R.; Lepoittevin, B.; Moinard, D.; Babin, J., *Polym. Int.* **2006**, *55*, 1138-1145.
6. Wiltshire, J. T.; Qiao, G. G., *Aust. J. Chem.* **2007**, *60*, 699-705.
7. Merrill, E. W., In *Poly(Ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*, Harris, J. M., Ed. Springer: New York, 1992; p 199-220.
8. Zalipsky, S.; Harris, J. M., *ACS Symp. Ser.* **1997**, *680*, 1-13.
9. Filpula, D.; Zhao, H., *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 29-49.
10. Greenwald, R. B.; Choe, Y. H.; McGuire, J.; Conover, C. D., *Adv. Drug Delivery Rev.* **2003**, *55*, 217-250.
11. Ross, E. A.; Branham, M. L.; Tebbett, I. R., *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *51*, 29-36.
12. Torchilin, V. P., *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, *54*, 235-252.
13. Hadjichristidis, N., *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **1999**, *37*, 857-871.
14. Hadjichristidis, N.; Pispas, S.; Pitsikalis, M.; Iatrou, H.; Vlahos, C., *Adv. Polym. Sci.* **1999**, *142*, 71-127.
15. Hadjichristidis, N.; Pitsikalis, M.; Pispas, S.; Iatrou, H., *Chem. Rev.*, **2001**, *101*, 3747-3792.
16. Janout, V.; Di Giorgio, C.; Regen, S. L., *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2671-2672.
17. Janout, V.; Lanier, M.; Regen, S. L., *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 640-647.

18. Mukhopadhyay, S.; Maitra, U.; Ira, I.; Krishnamoorthy, G.; Schmidt, J.; Talmon, Y., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15905-15914.
19. Zhao, Y.; Zhong, Z., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9988-9989.
20. Zhao, Y.; Zhong, Z., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17894-17901.
21. Luo, J.; Chen, Y.; Zhu, X. X., *Synlett* **2007**, 2201-2204.
22. Chen, Y.; Luo, J.; Zhu, X. X., *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 3402-3409.
23. Giguère, G.; Zhu, X. X., *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2007**, *45*, 4173-4178.
24. Zou, T.; Cheng, S.-X.; Zhang, X.-Z.; Zhuo, R.-X., *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2007**, *82*, 400-407.
25. Fu, H.-L.; Zou, T.; Cheng, S.-X.; Zhang, X.-Z.; Zhuo, R.-X., *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2007**, *1*, 368-376.
26. Nair, P. P.; Kritchevsky, D., *The Bile Acids: Physiology and Metabolism*. Plenum Pub Corp: New York, 1973; Vol. 1, p 372.
27. Benrebouh, A.; Zhang, Y. H.; Zhu, X. X., *Macromol. Rapid Commun.* **2000**, *21*, 685-690.
28. Cabasso, I.; Zilkha, A., *J. Macromol. Sci., Chem.* **1974**, *A8*, 1313-1324.
29. Knischka, R.; Lutz, P. J.; Sunder, A.; Mulhaupt, R.; Frey, H., *Macromolecules* **2000**, *33*, 315-320.
30. Shen, R.; Senyo, T.; Akiyama, C.; Atago, Y.; Ito, K., *Polymer* **2003**, *44*, 3221-3228.
31. Taton, D.; Saule, M.; Logan, J.; Duran, R.; Hou, S.; Chaikof, E. L.; Gnanou, Y., *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2003**, *41*, 1669-1676.
32. Fruchtel, J. S.; Jung, G., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 17-42.
33. Flory, P. J., *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, *62*, 1561-1565.
34. Boileau, S., In *Comprehensive Polymer Science: The Synthesis, Characterization, Reactions & Applications of Polymers*, Allen, G.; Bevington, J. C., Eds. Pergamon Press: Oxford, 1990; Vol. 3, p 467.
35. Byrd, H. C. M.; McEwen, C. N., *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 4568-4576.
36. Montaudo, G.; Garozzo, D.; Montaudo, M. S.; Puglisi, C.; Samperi, F., *Macromolecules* **1995**, *28*, 7983-7989.

37. Montaudo, G.; Montaudo, M. S.; Puglisi, C.; Samperi, F., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1995**, *9*, 453-460.
38. Shimada, K.; Lusenkova, M. A.; Sato, K.; Saito, T.; Matsuyama, S.; Nakahara, H.; Kinugasa, S., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, *15*, 277-282.
39. Chen, E. Q.; Lee, S. W.; Zhang, A.; Moon, B. S.; Honigfort, P. S.; Mann, I.; Lin, H. M.; Harris, F. W.; Cheng, S. Z. D.; Hsiao, B. S.; Yeh, F., *Polymer* **1999**, *40*, 4543-4551.
40. Chen, E. Q.; Lee, S. W.; Zhang, A. Q.; Moon, B. S.; Mann, I.; Harris, F. W.; Cheng, S. Z. D.; Hsiao, B. S.; Yeh, F. J.; von Merrewell, E.; Grubb, D. T., *Macromolecules* **1999**, *32*, 4784-4793.
41. Beech, D. R.; Booth, C.; Dodgson, D. V.; Sharpe, R. R.; Waring, J. R. S., *Polymer* **1972**, *13*, 73-77.
42. Beech, D. R.; Booth, C.; Pickles, C. J.; Sharpe, R. R.; Waring, J. R. S., *Polymer* **1972**, *13*, 246-248.
43. Hay, J. N.; Sabir, M.; Steven, R. L. T., *Polymer* **1969**, *10*, 187-202.
44. Shinoda, K.; Nakagawa, T.; Tamamushi, B.; Isemura, T., *Colloidal Surfactants: Some Physicochemical Properties.*, Hutchinson, E; van Rysselberghe, P., Eds. Academic Press: New York, 1963; Vol. XII, p. 310.
45. Howell, J. I.; Lucy, J. A.; Pirola, R. C.; Bouchier, I. A. D., *Biochim. Biophys. Acta* **1970**, *210*, 1-6.
46. Danielsson, H.; Sjövall, J., *Sterols and Bile Acids*. Elsevier: New York, 1985; Vol. 12, p. 447.
47. Oakenfull, D. G.; Fisher, L. R., *J. Phys. Chem.* **1977**, *81*, 1838-1841.
48. Venkatesan, P.; Cheng, Y.; Kahne, D., *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6955-6956.
49. Zhong, Z. Q.; Yan, J.; Zhao, Y., *Langmuir* **2005**, *21*, 6235-6239.
50. Rinco, O.; Nolet, M. C.; Ovans, R.; Bohne, C., *Photochem. Photobiol. Sci.* **2003**, *2*, 1140-1151.
51. Yihwa, C.; Quina, F. H.; Bohne, C., *Langmuir* **2004**, *20*, 9983-9991.
52. Israelachvili, J. N., *Intermolecular and Surface Forces: With Applications to*

3.6 Supporting Information

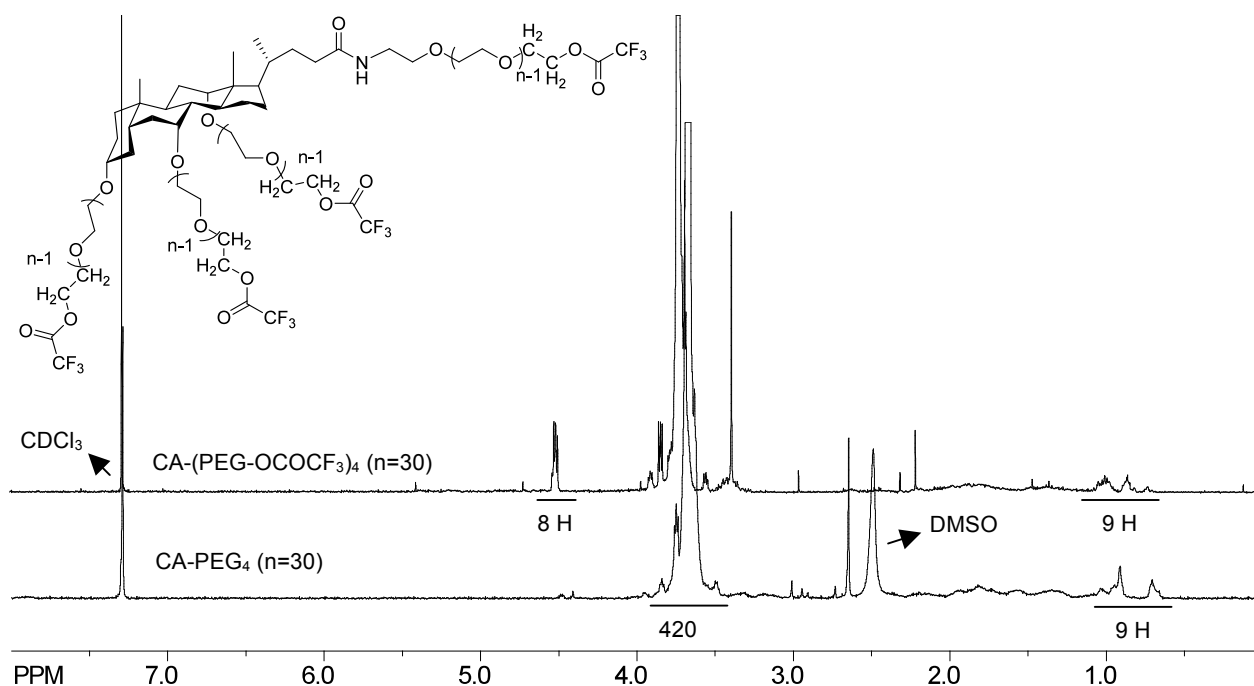


Figure S3.1. Typical NMR spectra of CA-PEG₄ (bottom) and its trifluoroacetic derivative (top) in CDCl₃. CA-PEG₄ was reacted with trifluoroacetic anhydride to determine the number of PEG chains on the cholane core. The chemical shift of the methylene groups at the PEG chain ends changes from 3.8 to 4.5 ppm upon substitution. The integrations of the proton signals are used to calculate the number of ethylene oxide units and the number of PEG chains on the polymer.

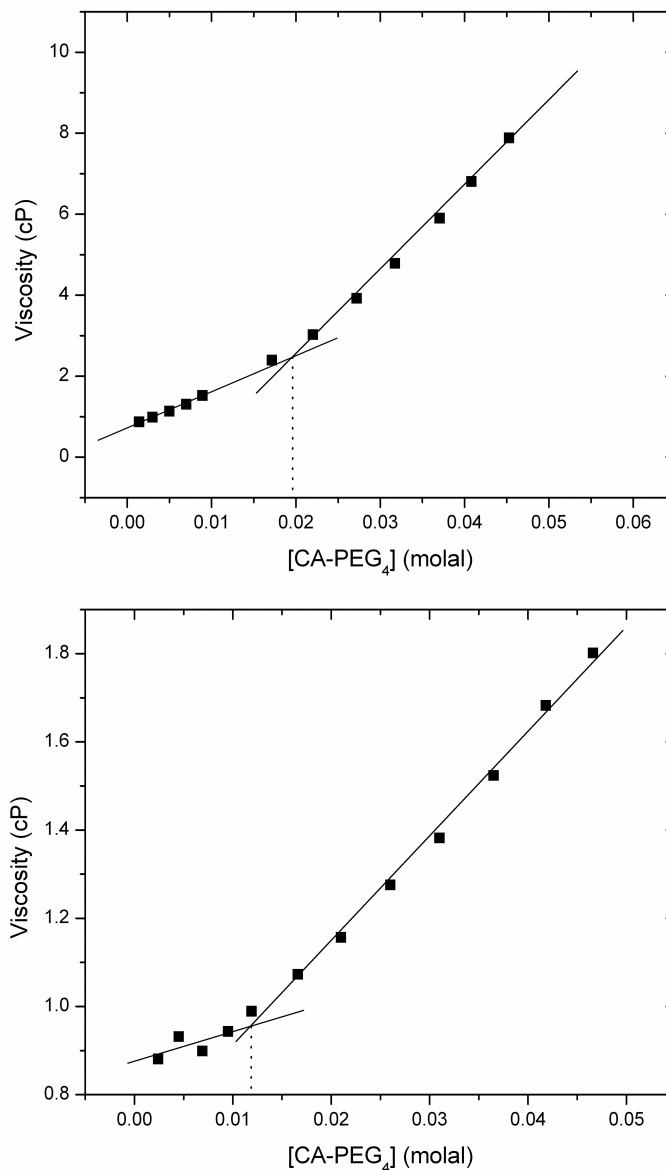


Figure S3.2. Viscosity experiments of selected CA-PEG₄ samples in distilled water at 25°C. Samples II (ca. 10 EG units on each PEG chain, bottom) and V (ca. 50 EG units on each PEG chain, top). Experiments were performed on a Cambridge viscometer model VL-4100. The values of viscosity indicated in the figures are the average of 5 measurements. Molal concentration was used for ease in sample preparation.

Chapitre 4: Polymères fonctionnels en étoile dérivés de l'acide cholique et propriétés thermosensibles *

Star polymers derived from cholic acid with poly(allyl glycidyl ether) arms have been prepared via anionic polymerization, yielding polymers with well-defined molecular weight and low polydispersity. The double bonds of the allyl groups on the polymer are used to introduce either amine or carboxylic acid groups to obtain amphiphilic polymers with cationic and anionic groups, respectively. The polymers can aggregate in water above a certain critical concentration, which was found to vary with the arm length of the star polymers. The star polymers bearing amino groups showed interesting thermosensitivity, which also depends on the pH of the media. A simple acetylation of the amine groups can sharpen the transition and vary the cloud point from 15 to 48°C depending on the degree of acetylation. Such polymers offer useful alternatives to the existing thermosensitive polymers.

4.1 Introduction

Bile acids are natural compounds biosynthesized in the liver and they help in the solubilization of fats in the diet.¹ Bile acids have been used for various purposes including regulation of cholesterol level,² dissolution of gallstones,³ cancer treatment,⁴ and membrane transfection.⁵ Bile acids in their salt form are surfactants in nature with facial amphiphilicity due to a rigid steroidal structure where the hydrophilic groups are located on one side of the skeleton. Changing the polar groups on the α face may modify the characteristics of the aggregation properties.⁶⁻¹²

*G. Giguère et X.X. Zhu. *Functional Star Polymers with a Cholic Acid Core and their Thermosensitive Properties*, *Biomacromolecules*, (2010), 11, 201-206. © American Chemical Society.

Oligomeric and polymeric derivatives of cholesterol and bile acids have been used successfully for the transport of peptides, oligonucleotides and DNA across lipid membranes.^{5, 7, 13-16} Cationic functional groups may be useful to complex with DNA or to interact with cell membranes. Bile acids bearing positive charges also demonstrated antimicrobial activity that is not susceptible to bacterial resistance.^{9, 17-19} Carboxylic acid functional groups on modified bile acids were found to optimize their enterohepatic circulation.²⁰ The presence of steroid units on the polymer was reported to show improved transfection efficiency.¹⁶ Cholic acid is a good starting point to prepare a variety of new polymers, as several polymers derived from bile acids have shown interesting aggregation properties and good biocompatibility.²¹⁻²⁶ We previously used atom transfer radical polymerization (ATRP) to attach polymeric arms onto modified cholic acid.²² The ester linkage between the poly(acrylic acid) arms and the bile acid may be prone to hydrolysis in acidic or basic environment. To obtain stable linkage between cholic acid and the arms, anionic polymerization was used to graft poly(ethylene glycol) arms onto the alcoholate groups of the cholic acid derivative via ether linkages upon ring opening of the oxirane derivatives such as ethylene oxide.²³ Allyl glycidyl ether (AGE) may be grafted similarly and may allow the subsequent addition of thiolated compounds containing carboxylate or amine groups. The reaction of a double bond with a thiol derivative has been used to introduce different functional groups.^{14, 27-31}

Previously we have found that the incorporation of methacrylate and acrylate monomers made of bile acids allow a tuning of the lower critical solution temperature (LCST) of thermosensitive polymers based on N-substituted polyacrylamides.^{32, 33} Thermosensitive polymers have been shown to be useful in tissue engineering (infiltration and proliferation of cells),³⁴ targeted drug delivery (localized delivery by warming up a certain body zone),³⁵ and as extracellular matrices (to maintain cells in a specific position).³⁶ The applications of pH-sensitive polymers include the specific drug targeting, where the incorporation of drugs in a pH-sensitive polymer allow its delivery in the stomach or in the intestine depending on the pH value.³⁷

We have developed an efficient preparation procedure for new types of well-defined star-shaped polymers based on naturally occurring cholic acid via the anionic

polymerization method. Both anionic and cationic star polymers have been made by attaching AGE to the steroidal backbone of a cholic acid core with ether linkages. The new star polymers have been found to aggregate above a certain critical micellar temperature. We have attempted to modify the charge density and the number of functional (amino) groups of the cationic polymers. Rather unexpectedly, interesting thermosensitive properties have been observed with the polymers bearing amino groups. We have then studied the thermosensitivity of the polymers by controlling the degree of acetylation of the polymers. We have also investigated the dependence of their properties on both pH and temperature, showing their potential as versatile biomaterials.

4.2 Experimental Section

4.2.1 Preparation of $CA(AGE_n)_4$

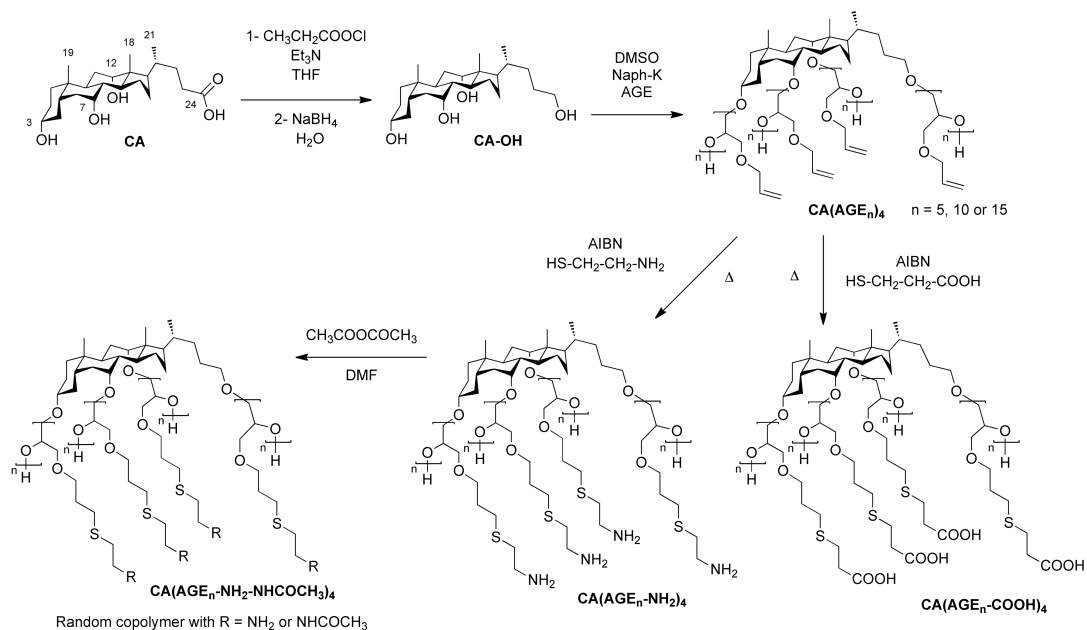
The preparation of the polymers is shown in Scheme 1. First, 5β -cholane- $3\alpha,7\alpha,12\alpha,24$ -tetrol (**CA-OH**) was prepared according to a literature procedure³⁸ with modifications (see Supporting Information). The reaction was quenched with concentrated hydrochloric acid rather than with a 1 N solution and the extraction volumes were reduced to half.

For the anionic polymerization, all glassware was flame-dried under vacuum and purged with argon three times. In a dry flask, 1 g of **CA-OH** (2.5 mmol) was placed in a 250 mL Schlenk flask and purged with argon. The flask was then charged with 67 mL of freshly distilled DMSO with the aid of a double-ended needle using a positive pressure. The total amount of potassium naphthalene solution (6.3 mL, 2.5 mmol) was slowly added in 3 to 5 portions, each portion after the disappearance of the green color of the previous addition, to the stirred solution of DMSO maintained at 30°C. In order to obtain 5 repeat units in length for every initiating site on **CA-OH**, 6.0 mL (5.78 g, 51 mmol) of freshly distilled AGE were transferred to the flask in the same manner as DMSO. The polymerization was let to proceed overnight and finally quenched with concentrated hydrochloric acid and extracted with hexanes (3 x 30 mL). Water (200 mL) was added to the DMSO medium and extractions with

dichloromethane (3×100 mL) were performed, followed by the removal of the solvent on a rotary evaporator. Final traces of solvent were removed under high vacuum. Yield: $> 90\%$; M_n : see Table 1. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm, $n = 5$, spectrum shown in Figure S1 in Supporting Information): 0.69 (18- CH_3), 0.89 (19- CH_3), 0.98 (21- CH_3), 3.55 (5H, protons on the polymer backbone and on the CH_2 groups connecting the lateral chains to the polymer backbone), 3.99 (2H, protons on the carbon adjacent to the double bond), 5.20 (2H, vinylic), 5.88 (1H, vinylic). ^{13}C NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, ppm, for $n = 5$): 13.21, 18.17, 23.49, 27.07, 28.29, 29.43, 31.29, 32.78, 35.27, 36.10, 42.22, 46.59, 47.15, 48.01, 69.99, 70.68, 72.13, 79.11, 116.97, 126.79, 128.59, 133.88, 136.08.

4.2.2 Preparation of $\text{CA}(\text{AGE}_n\text{-COOH})_4$

The addition of 3-mercaptopropionic acid on the $\text{CA}(\text{AGE}_n)_4$ was performed by dissolving 1 g of the polymer in 2.75 mL THF. Then, 5 and 0.15 equivalents, according to the number of double bonds, of 3-mercaptopropionic acid and AIBN were added successively and the solution was refluxed for 5 hours. The most volatile compounds were removed with a rotary evaporator and a vacuum distillation was performed to remove the less volatile ones. The viscous liquid resulted from this distillation was purified by dialysis. Yield: $> 94\%$; efficiency of the subsequent addition of thiolated compounds: above 85% (Table 2). ^1H NMR (400 MHz, acetone- d_6 , spectrum shown in Figure S1 in Supporting Information): 0.74 (18- CH_3), 1.87 (4H, protons on the β carbon to the oxygen atom on the lateral chain and on the carbon adjacent to the carboxyl group), 2.65 and 2.80 (4H, protons on the two carbons adjacent to the sulfur atom), 3.59 (5H, protons on the polymer backbone and on the CH_2 groups connecting the lateral chains to the polymer backbone). ^{13}C NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, ppm, for $n = 5$): 27.31, 28.68, 30.24, 35.47, 52.28, 69.70, 79.04, 173.93.



Scheme 4.1. Preparation of the Positively and Negatively Charged and Acetylated Polymers from Cholic Acid.

Table 4.1. Characterization of the Polymers Before Derivatization.

CA(AGE _n) ₄ n	M _n , theo	M _n , SEC (PDI)	M _n , NMR ^a (from arm length) ^b	Monomer units by ¹ H NMR ^a (arm length) ^b
5	2700	2300 (1.13)	2350 (2600)	17 (4.8)
10	5000	3400 (1.12)	4860 (4050)	39 (8.0)
15	7200	4700 (1.11)	7200 (7250)	60 (15.1)

^a calculated from the ratio of NMR peak intensities 18-CH₃ / -CH= (at 5.8 ppm)

^b calculated from end group titration with trifluoroacetic anhydride

4.2.3 Preparation of CA(AGE_n-NH₂)₄.

CA(AGE_n)₄ was dissolved in methanol (1/20, w/v), 5 equivalents of cysteamine hydrochloride and 0.5 equivalent of AIBN per double bond were added. After refluxing the solution for 36 hours, methanol was evaporated and the residual syrup was dissolved in chloroform. Sodium hydroxide pellets were added to

neutralize the ammonium chloride salt and the organic layer was washed once with water. After solvent evaporation, the resulting viscous liquid was purified by dialysis. Yield: > 95%; efficiency of the subsequent addition of thiolated compounds: above 80%, (Table 2). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , $n = 5$, spectrum shown in Figure S1 in Supporting Information): 0.70 (18- CH_3), 1.86 (protons on the β carbon to the oxygen atom on the lateral chains), 2.08 (protons on the nitrogen atom), 2.63 (4H, protons on the two carbons adjacent to the sulfur atom), 2.90 (2H, protons on the carbon adjacent to the amine group), 3.55 (5H, protons on the polymer backbone and on the CH_2 groups connecting the lateral chains to the polymer backbone). ^{13}C NMR (400 MHz, methanol- d_4 , ppm, for $n = 5$): 23.43, 27.75, 28.24, 29.95, 34.50, 40.70, 69.91, 71.12, 79.19.

4.2.4 Partial Acetylation of $\text{CA}(\text{AGE}_n\text{-NH}_2)_4$.

$\text{CA}(\text{AGE}_5\text{-NH}_2)_4$ was dissolved in dry dimethylformamide (DMF, 1:2 w/v) and freshly distilled acetic anhydride was added dropwise. After 45 minutes, solid sodium hydroxide was added to the solution to neutralize the acidic medium. The solution was dialyzed against water and freeze-dried. Yield: 75%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , $n = 5$ with 5 mol% acetylation): 0.68 (18- CH_3), 1.87 (protons on the β carbon to the oxygen atom on the lateral chains), 2.01 (CH_3 -amide), 2.22 (protons on the nitrogen atom), 2.62 (4H, protons on the two carbons adjacent to the sulfur atom), 2.88 (2H, protons on the carbon adjacent to the amine group), 3.53 (5H, protons on the polymer backbone and on the CH_2 groups connecting the lateral chains to the polymer backbone). ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm, for $n = 5$ with 5 mol% acetylation): 23.61, 28.81, 30.10, 36.54, 39.20, 41.44, 51.17, 70.14, 71.30, 79.17, 171.03.

4.2.5 Back Titration Experiments.

In order to determine the degree of thiolation onto the allylic functions, back titrations were performed. The sample (0.1 g) was first dissolved in 10 mL of 0.1 M standardized solution of HCl or NaOH for the amine and acid series, respectively,

and then 20 mL of milli-Q water were added. The back titration with acid (HCl) for $\text{CA}(\text{AGE}_5\text{-COOH})_4$ or base (NaOH) for $\text{CA}(\text{AGE}_5\text{-NH}_2)_4$ was started and the pH was monitored to calculate the pK_a , the first and the second equivalent points (Table 2).

Table 4.2. Modification of the Star Polymers and their Degree of Substitution and Properties.

$\text{CA}(\text{AGE}_n\text{-X})_4$ n	substitution (mol%)			pK_a	CAC (millimolal) ^e
	¹ H NMR ^a	back titration ^{b, c}	elemental analysis ^d		
X = COOH					
5	93	89 ± 9 85 ± 7	92 ± 1	5.0	17.5 ± 0.1
10	100	94 ± 2 87 ± 5	95.2 ± 0.3	5.4	12.8 ± 0.6
15	98	90 ± 5 92 ± 5	94.8 ± 0.7	5.4	6.2 ± 0.6
X = NH₂					
5	97	80 ± 3 85 ± 2	101.6 ± 0.4	8.6	25.9 ± 0.1
10	98	93 ± 1 86 ± 7	91 ± 1	8.5	17 ± 2
15	97	79 ± 5 85 ± 3	89 ± 1	8.1	9 ± 2

^a Error estimated to be 7% for ¹H NMR

^b Initial average number of double bonds determined by ¹H NMR

^c The first value is calculated from the first equivalent point and the second calculated according to the volume difference between the two equivalent points (see Supporting Information for more details)

^d Based on the sulfur content

^e Measured at 25°C and with 60 mol% NaOH added for the acid series $\text{CA}(\text{AGE}_n\text{-COOH})_4$ or 10 mol% HCl added for the amine series $\text{CA}(\text{AGE}_n\text{-NH}_2)_4$

4.2.6 Characterization Methods.

¹H NMR spectra of bile acid derivatives were recorded on a Bruker AMX400 spectrometer operating at 400.13 MHz for ¹H and at 100.61 MHz for ¹³C.

The molar masses of the polymers were measured by size exclusion chromatography (SEC) on a Waters 1525 system operating at 30°C in THF at a flow

rate of 1 mL/min with HR-3, HR-4 and HR-6 columns, and a Waters 2414 refractive index detector. Calibration was performed with polystyrene standards.

Conductivity experiments were performed with an Orion conductivity cell 018010 in a thermostated bath. The samples were prepared with standardized sodium hydroxide or hydrochloric acid solutions in milli-Q water to obtain the desired final concentration. The conductivity of the solution was measured after equilibration. The solution was then diluted to the next concentration with milli-Q water and the measurements were repeated.

The cloud points (CP) were measured on a BioCary 300 UV-Vis spectrometer at 500 nm with solutions of the polymer in milli-Q water (0.1 wt%). Samples were successively heated and cooled at a rate of 0.1°C/min. The CP was taken as the onset of the heating cycle or as the inflection point for the first derivative.

4.3 Results and Discussion

4.3.1 Preparation of $CA(AGE_n)_4$, $CA(AGE_n-COOH)_4$ and $CA(AGE_n-NH_2)_4$

AGE is a monomer polymerizable by anionic polymerization and was polymerized onto PEG chains by Hruby *et al.* and Koyama and co-workers in bulk.^{27, 28} The solid initiator **CA-OH** needs to be dissolved in a solvent such as THF and DMSO. The polydispersity of the polymers obtained in THF was broader than those obtained in DMSO due to the lower solubility in THF of the anionic species formed during the polymerization. Lower PDI was obtained at lower polymerization temperature in both solvents, but at temperatures lower than 60°C, THF became a poor solvent which resulted in even higher PDI. The low temperature probably allows a more uniform statistical probability of monomer addition onto the short living chains. This may be especially true with DMSO, since it is known that DMSO destabilizes anions,³⁹ and may speed up the propagation in the anionic polymerization. In this context, the greater anion activity requires lower polymerization temperature to ensure a slower propagation.

Table 1 presents the molecular weight and polydispersity obtained by ¹H NMR and SEC for the allylic **CA(AGE_n)₄** polymers. The ¹H NMR results are in

good accordance with the experimental feed ratios. The molecular weights measured by SEC deviate from the expected values, partly due to the lack of more appropriate standards for the molecular weight of the polymers. The low polydispersity was shown by the narrow peaks of the SEC. The results in Table 1 indicate that monodisperse polymers with controllable chain lengths have been obtained.

To ensure that four arms are attached onto the cholic acid core, ^1H NMR spectroscopy was used to confirm the star-shaped architecture of the polymers. The alcohol end groups were reacted with trifluoroacetic anhydride, causing a chemical shift change of the adjacent protons (from 3.55 to 5.38 ppm, Figure S1 in Supporting Information). The ratio of the peak integration of these peaks to that of the double bond protons yields the polymer arm length (Table 1). The results clearly indicate that all four OH groups have been initiated. It is reasonable to assume that the arms should be the same in length.

The carboxylic acid and amine functional groups were introduced later by a radical addition. We used ^1H NMR, acid-base titration and elemental analysis to verify the completion of the addition of the thiol groups onto the double bonds (results in Table 2). Despite the uncertainty of the measurements, both ^1H NMR and elemental analysis provided similar values. The data obtained from titration agree with the results for the amines $\text{CA}(\text{AGE}_n\text{-NH}_2)_4$, but not for the acids $\text{CA}(\text{AGE}_n\text{-COOH})_4$. The lower degree of substitution here reflects the difficulty to perform a complete titration for a weak base or a weak acid. The pK_a values in Table 2 obtained from the back titration experiment may not be quite accurate. It should be noted, however, that the pK_a values in Table 2 do not show dependence on the degree of polymerization. This is in agreement with other reports on the pK_a measured for other polymers with different chain lengths.^{40, 41}

4.3.2 Aggregation Studies.

Cholic acid was found to aggregate around 8 mM when the carboxylic group is ionized (pK_a 4.6 to 5.0).⁴² The attachment of amino and carboxylic functions on cholic acid should change the range of pH where aggregation occurs and also the critical aggregation concentration (CAC) depending on the length of the polymer

arms. AGE has been usually copolymerized with PEG to form amphiphilic block copolymers.^{14, 27-31, 43} In water, polyAGE or modified polyAGE with pendant groups formed the hydrophobic core and the PEG formed the hydrophilic corona. Here, polyAGEs are modified to change the hydrophobic/hydrophilic property of cholic acid derivative while preserving a balance that promotes self-assembly. The aggregation of these cholic acid derivatives may make them useful as efficient delivery vehicles in cancer therapy related to DNA transfection and hydrophobic drugs.

Conductivity is a reliable and sensitive method to determine the critical micellar concentration (CMC). The results in Table 2 show that the CAC shifts to a lower concentration as the polymer chain length increases due to the lipophilic nature of the uncharged polymeric units.

The polymers prepared can exchange protons with their environment. This can be seen in Figure S4 (Supporting Information) which shows the surface tension (ST) of the different polymers versus the concentration of added base or acid. At first, for the acid $\text{CA}(\text{AGE}_n\text{-COOH})_4$ (or amine $\text{CA}(\text{AGE}_n\text{-NH}_2)_4$) series, the ST decreases with the amount of acid (or base) added, indicating that the air-water interface is not saturated due to the relatively low solubility of the polymers. As more acid or base is added, ST passes by a minimum (interface air-water saturated) to increase slightly until the neutralization of every acid or base group on the polymer.

4.3.3 *Thermosensitivity.*

Thermosensitivity in water has been observed for homo- and copolymers of N-alkyl substituted acrylamides.^{32, 44-46} Such polymers are hydrophilic and soluble in water at lower temperatures but phase-separates at a higher temperature since the hydrogen bonds between water and the polymer are disrupted. This temperature is known as the cloud point (CP). The unique sensitivity toward temperature of such polymers renders them potentially useful as sensors, biomaterials and drug delivery devices.

Interestingly and unexpectedly, thermosensitive properties were also observed for the $\text{CA}(\text{AGE}_n\text{-NH}_2)_4$ series, but not for the $\text{CA}(\text{AGE}_n\text{-COOH})_4$ samples. The

experiments on the influence of the degree of protonation on CPs were repeated for **CA(AGE₅-NH₂)₄** (Figure 1). The CPs change quickly with the amount of acid or base added as reported in literature.⁴⁷ To prepare ‘perfectly’ clear solutions of **CA(AGE₅-NH₂)₄**, 5 to 10 mol% HCl are needed. When the temperature is raised, the initially opaque solutions become even more opaque. At these protonation degrees, the CP is probably below the freezing point of water and the determination of the ‘real’ CP is thus difficult. If more than 10 mol% HCl are added, the turbidity of the solution changes very gradually and to a lesser degree (see Figure 1A).

A simple addition of acetic anhydride to the amine set of polymers **CA(AGE_n-NH₂)₄** results in the formation of the amide bonds on some of the amine groups to produce a statistical copolymer (Scheme 1). The reaction of acetic anhydride and amine groups is almost quantitative (Table S1 in Supporting Information), so that the experimental feed ratio should provide the degree of acetylation in the statistical copolymers formed.

The acetylation reaction is a simple reaction allowing an easy tuning of the CP by simply controlling the amount of acetic anhydride added to the polymers. Polymers with different degrees of acetylation (determined by ¹H NMR with details in Figure S3 and Table S1 in Supporting Information) show different CPs. In this study, the polymers tested have CPs ranging from 15 to 48°C (Figure 2). This range of temperature should be of interest for biomedical applications since it encompasses both the room temperature and body temperature. To obtain a polymer with a certain desired CP, a degree of acetylation can be conveniently selected with the help of the relationship shown in Figure 2.

As partially acetylated polymers still have free amine groups, the influence of their protonation on CPs was also examined. Starting with **CA(AGE₅-NHCOCH₃)₄** acetylated at 40 mol%, acid was added to the aqueous solution of the polymer. When the amount of added hydrochloric acid varied from 20 to 200 mol% relative to the number of free amine groups, the CPs changed by about 2°C (Figure 1B). It seems that the degree of protonation has only a weak effect on the observed CPs in this range of protonation, which is different for the non-acetylated polymers.

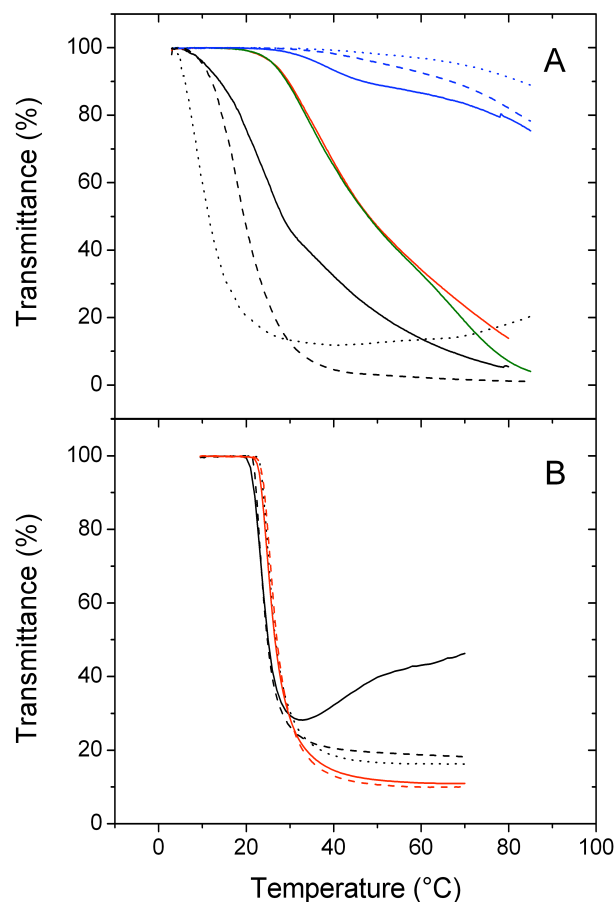


Figure 4.1. Influence of the degree of protonation on the CPs of (A) $\text{CA}(\text{AGE}_5\text{-NH}_2)_4$ (significant effect) and (B) $\text{CA}(\text{AGE}_5\text{-NHCOCH}_3)_4$ acetylated at 40 mol% (practically little or no effect). A: HCl added: black (0%); red (5%); green (10%); blue (15%); blue dash (20%); blue dot (25%); NaOH added: black dashes (5%); black dots (15%). The numbers here indicate the molar percentages of the acid or base added relative to the free amine groups in the polymer. B: HCl added: black (20%); black dashes (42%); black dots (56%); red (80%); red dashes (191%).

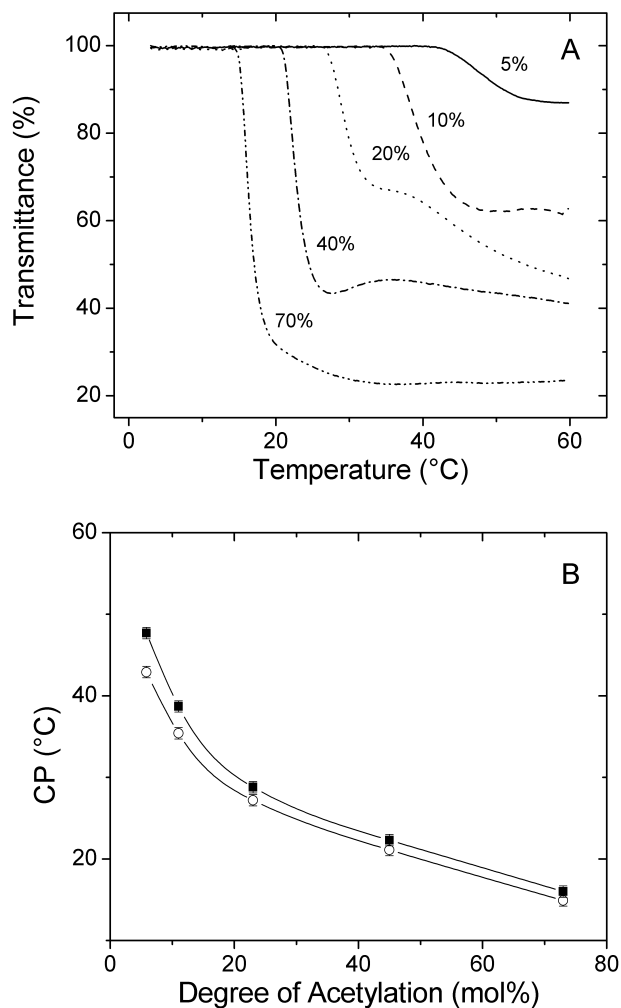


Figure 4.2. Influence of the degree of acetylation on the sharpness of the CP transition and its intensity for the $\text{CA}(\text{AGE}_5\text{-NHCOCH}_3)_4$ series. A: Solid line (5% acetylation); dash (10% acetylation); dot (20% acetylation); dash-dot (40% acetylation) and dash-dot-dot (70% acetylation). The numbers near the curves indicate the percentage of acetylation of the amine groups of the polymer. The solutions were prepared at 0.1 wt% and heated at $0.1^\circ\text{C}/\text{min}$ and scanned at a wavelength of 500 nm. CP values (B) determined as the onset temperature (circles) and as the inflection point from first derivative of the absorbance curve (squares).

As partially acetylated polymers still have free amine groups, the influence of their protonation on CPs was also examined. Starting with $\text{CA}(\text{AGE}_n\text{-NH}_2)_4$ acetylated at 40 mol%, acid was added to the aqueous solution of the polymer. When

the amount of added hydrochloric acid varied from 20 to 200 mol% relative to the number of free amine groups, the CPs changed by about 2°C (Figure 4.1). It seems that the degree of protonation has only a weak effect on the observed CPs in this range of protonation, which is different for the non-acetylated polymers.

The sharpness of the CP transition differ for the $\text{CA}(\text{AGE}_5\text{-NH}_2)_4$ and the $\text{CA}(\text{AGE}_5\text{-NHCOCH}_3)_4$ series (see Figure 1). Polymers with higher amide contents have a sharper CP transition as shown in Figures 1 and 2 with the onset and first derivative temperatures closer to each other at higher acetylation degrees. In the same manner, the most acetylated polymers have a greater final opacity. These two experimental evidences indicate that the amide bonds are more efficient to reveal the thermosensitive character of the polymer than the amine groups. It is interesting to note that such polymers can exhibit sharp transitions at a certain temperature and over a broad range of temperatures. Such characteristics should make these polymers more adaptable in their applications as biomaterials.

4.4 Conclusions

Grafting AGE to cholic acid leads to changes in the properties of the bile acid. Polymer chains of modified polyAGE of varying lengths can be attached to the cholic acid core by anionic polymerization, which results in new polymers with well-defined molar masses of very narrow polydispersity indices. The polymers are shown to have different aggregation properties. The critical aggregation temperature depends on the nature of the functional groups (carboxylic acid versus amine) and the polymer chain length: the CAC is lower for the carboxylic acid than the amine derivatives with the same polymer chain length, and the CAC decrease with the increase of the polymer chain length. The degree of ionization is also important for the solubility of the polymers.

It is important to highlight the sensitivity of the polymers toward both pH and temperature. The hydrophilic and hydrophobic balance of the amine series of the polymers grafted on cholic acid, $\text{CA}(\text{AGE}_n\text{-NH}_2)_4$, renders such polymers with interesting thermosensitivity over a large range of temperatures and this thermosensitivity is also dependent on the degree of protonation of the polymers

(therefore the pH of the media). We have found that the cloud point of the polymers can be varied by the degree of acetylation of the amino groups. The acetylation also makes the transition of the polymers sharper and better defined over a wide range of temperatures covering both room and body temperatures. The biological origin and the pH- and thermosensitivity of these new polymers make them interesting candidates for various biomedical applications including biosensing, tissue engineering and drug delivery.

4.5 References

1. Danielsson, H.; Sjövall, J., *Sterols and Bile Acids*. Elsevier: New York, 1985; Vol. 12, p 447.
2. Enhnen, A.; Kramer, W.; Wess, G., *Drug Discov. Today*, **1998**, *3*, 409-418.
3. Hofmann, A. F., *Ital. J. Gastroenterol.*, **1995**, *27*, 106-113.
4. Criado, J. J.; Manzano, J. L.; Rodriguez-Fernandez, E., *J. Inorg. Biochem.*, **2003**, *96*, 311-320.
5. Janout, V.; Di Giorgio, C.; Regen, S. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 2671-2672.
6. Zhong, Z. Q.; Yan, J.; Zhao, Y., *Langmuir*, **2005**, *21*, 6235-6239.
7. Janout, V.; Zhang, L.-h.; Staina, I. V.; Di Giorgio, C.; Regen, S. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 5401-5406.
8. Taotafa, U.; McMullin, D. B.; Lee, S. C.; Hansen, L. D.; Savage, P. B., *Org. Lett.*, **2000**, *2*, 4117-4120.
9. Willemen, H. M.; de Smet, L. C. P. M.; Koudijs, A.; Stuart, M. C. A.; Heikamp-de Jong, I. G. A. M.; Marcelis, A. T. M.; Sudholter, E. J. R., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 4275-4277.
10. Stein, T. M.; Gellman, S. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 3943-3950.
11. Cheng, Y.; Ho, D. M.; Gottlieb, C. R.; Kahne, D.; Bruck, M. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 7319-7320.
12. Broderick, S.; Davis, A. P.; Williams, R. P., *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 6083-6086.

13. Janout, V.; Jing, B.; Regen, S. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 15862-15870.
14. Koyama, Y.; Ito, T.; Kimura, T.; Murakami, A.; Yamaoka, T., *J. Control. Release*, **2001**, *77*, 357-364.
15. Geall, A. J.; Taylor, R. J.; Earll, M. E.; Eaton, M. A. W.; Blagbrough, I. S., *Bioconjugate Chem.*, **2000**, *11*, 314-326.
16. Han, S. o.; Mahato, R. I.; Kim, S. W., *Bioconjugate Chem.*, **2001**, *12*, 337-345.
17. Savage, P. B., *Eur. J. Org. Chem.*, **2002**, 759-768.
18. Virtanen, E.; Kolehmainen, E., *Eur. J. Org. Chem.*, **2004**, 3385-3399.
19. Fini, A.; Fazio, G.; Roda, A.; Bellini, A. M.; Mencini, E.; Guarneri, M., *J. Pharm. Sci.*, **1992**, *81*, 726-730.
20. Anwer, M. S.; O'Maille, E. R.; Hofmann, A. F.; DiPietro, R. A.; Michelotti, E., *Am. J. Physiol.*, **1985**, *249*, G479-488.
21. Wan, T.; Liu, Y.; Yu, J. Q.; Chen, S.; Li, F.; Zhang, X. Z.; Cheng, S. X.; Zhuo, R. X., *J. Polym. Sci. Pol. Chem.*, **2006**, *44*, 6688-6696.
22. Giguère, G.; Zhu, X. X., *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **2007**, *45*, 4173-4178.
23. Luo, J.; Giguère, G.; Zhu, X. X., *Biomacromolecules*, **2009**, *10*, 900-906.
24. Fu, H. L.; Zou, T.; Cheng, S. X.; Zhang, X. Z.; Zhuo, R. X., *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, **2007**, *1*, 368-376.
25. Chen, W. Q.; Wei, H.; Li, S. L.; Feng, J.; Nie, J.; Zhang, X. Z.; Zhuo, R. X., *Polymer*, **2008**, *49*, 3965-3972.
26. Zou, T.; Li, S. L.; Hu, Z. Y.; Cheng, S. X.; Zhuo, R. X., *J. Biomater. Sci.-Polym. Ed.*, **2007**, *18*, 519-530.
27. Hruby, M.; Konak, C.; Ulbrich, K., *J. Appl. Polym. Sci.*, **2005**, *95*, 201-211.
28. Koyama, Y.; Umehara, M.; Mizuno, A.; Itaba, M.; Yasukouchi, T.; Natsume, K.; Suginaka, A.; Watanabe, K., *Bioconjugate Chem.*, **1996**, *7*, 298-301.
29. Yoshikawa, K.; Yoshikawa, Y.; Koyama, Y.; Kanbe, T., *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 6473-6477.

30. Koyama, Y.; Ito, T.; Matsumoto, H.; Tanioka, A.; Okuda, T.; Yamaura, N.; Aoyagi, H.; Niidome, T., *J. Biomater. Sci.-Polym. Ed.*, **2003**, *14*, 515-531.
31. Hruby, M.; Konak, C.; Ulbrich, K., *J. Control. Release*, **2005**, *103*, 137-148.
32. Benrebouh, A.; Avoce, D.; Zhu, X. X., *Polymer* **2001**, *42*, 4031-4038.
33. Liu, F.; Tao, G. L.; Zhuo, R. X., *Polym. J.* **1993**, *25*, 561-567.

34. Betre, H.; Setton, L. A.; Meyer, D. E.; Chilkoti, A., *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 910-916.
35. Meyer, D. E.; Shin, B. C.; Kong, G. A.; Dewhirst, M. W.; Chilkoti, A., *J. Control. Release* **2001**, *74*, 213-224.
36. Gappa, H.; Baudys, M.; Koh, J. J.; Kim, S. W.; Bae, Y. H., *Tissue Eng.* **2001**, *7*, 35-44.
37. Jones, M.-C.; Ranger, M.; Leroux, J.-C., *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 774-781.
38. Kihira, K.; Mikami, T.; Ikawa, S.; Okamoto, A.; Yoshii, M.; Miki, S.; Mosbach, E. H.; Hoshita, T., *Steroids*, **1992**, *57*, 193-198.
39. Um, I. H.; Lee, E. J.; Jeon, S. E., *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2001**, *22*, 1301-1302.
40. Georgiou, T. K.; Vamvakaki, M.; Patrickios, C. S.; Yamasaki, E. N.; Phylactou, L. A., *Biomacromolecules*, **2004**, *5*, 2221-2229.
41. Plamper, F. A.; Becker, H.; Lanzendorfer, M.; Patel, M.; Wittemann, A.; Ballauf, M.; Muller, A. H. E., *Macromol. Chem. Phys.*, **2005**, *206*, 1813-1825.
42. Reis, S.; Moutinho, C. G.; Matos, C.; de Castro, B.; Gameiro, P.; Lima, J., *Anal. Biochem.*, **2004**, *334*, 117-126.
43. Kurisawa, M.; Yokoyama, M.; Okano, T., *J. Control. Release* **2000**, *69*, (1), 127-137.
44. Hoffman, A. S., *Macromol. Symp.*, **1995**, *98*, 645-664.
45. Liu, H. Y.; Zhu, X. X., *Polymer*, **1999**, *40*, 6985-6990.
46. Nichifor, M.; Zhu, X. X., *Polymer*, **2003**, *44*, 3053-3060.
47. Yin, X.; Hoffman, A. S.; Stayton, P. S., *Biomacromolecules*, **2006**, *7*, 1381-1385.

4.6 Supporting Information

4.6.1 Experimental Section

Materials. Cholic acid ($\geq 98\%$), ethyl chloroformate (97%), sodium borohydride ($\geq 98.5\%$), naphthalene ($\geq 99\%$), potassium chunks (98%, in mineral oil), cysteamine hydrochloride ($\geq 98\%$), 3-mercaptopropionic acid ($\geq 99\%$), 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN, 98%), and trifluoroacetic anhydride ($> 99\%$) were purchased from Aldrich and used without further purification. Standardized solutions of hydrochloric acid and sodium hydroxide were purchased from Aldrich and titrated before use. Acetic anhydride ($> 98\%$, Fluka) was freshly distilled before use.

Preparation of 5 β -cholane-3 α ,7 α ,12 α ,24-tetrol (CA-OH). Cholic acid (10 g, 24.5 mmol) was dissolved in THF (40 mL/g). Dry triethylamine (13 mL, 93.3 mmol) and ethyl chloroformate (8 mL, 83.7 mmol) were then added to the solution. After stirring for 2 h, a solution of aqueous NaBH₄ (10.67 g in 107 mL of water, 282 mmol) was slowly added, the gas produced was evacuated, followed by stirring for 3 h. The mixture was diluted with water (200 mL) and concentrated HCl was added until all the white residue dissolved. (CAUTION! The acidification produces a lot of gas.) The solution was extracted with ethyl acetate (3 x 200 mL), the organic phase dried over anhydrous Na₂SO₄, then filtered and dried under vacuum.

Naphthalene radical anions were obtained by mixing naphthalene with potassium in anhydrous tetrahydrofuran (THF) at an approximate concentration of 0.40 M and further titrated with a standard 0.1 M hydrochloric acid aqueous solution. AGE ($\geq 99\%$) and dimethyl sulfoxide (DMSO, $\geq 99\%$) were obtained from Aldrich and dried over calcium hydride prior to reflux (2 hours) under reduced pressure followed by distillation.

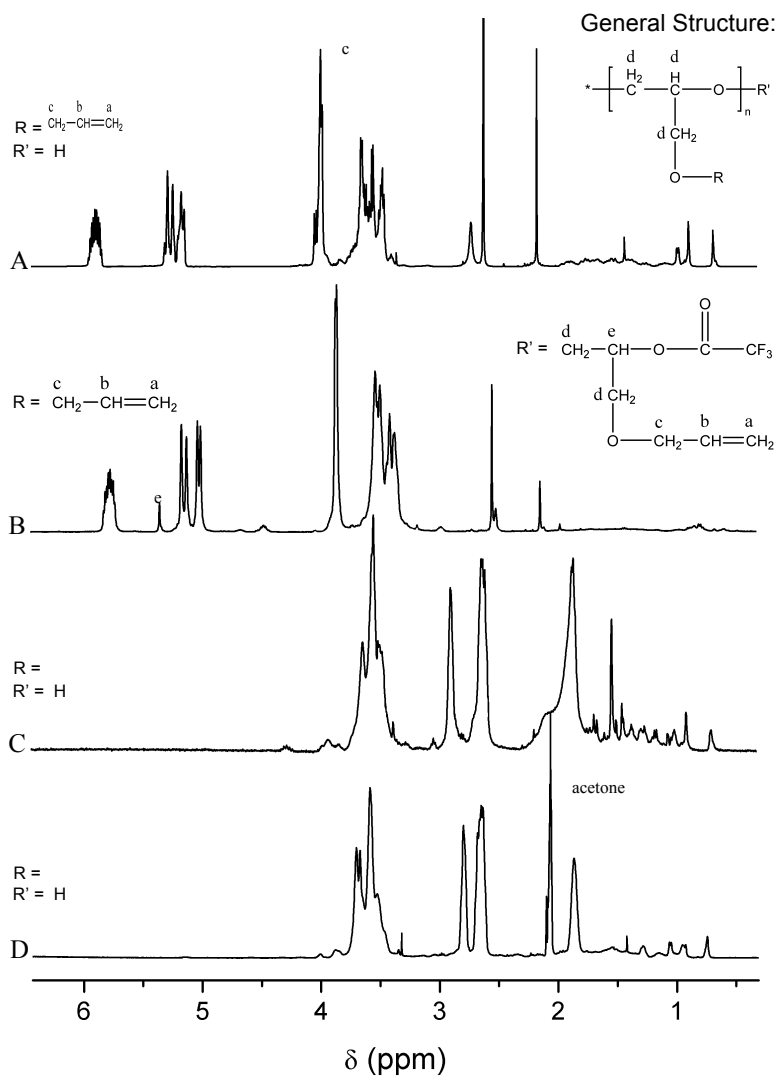


Figure S4.1. ^1H NMR spectra of A) $\text{CA}(\text{AGE}_5)_4$ in CDCl_3 , B) $\text{CA}(\text{AGE}_5)_4$ in $\text{DMSO } d_6$ after reaction with trifluoroacetic anhydride C) $\text{CA}(\text{AGE}_5\text{-NH}_2)_4$ in CDCl_3 and D) $\text{CA}(\text{AGE}_5\text{-COOH})_4$ in $\text{acetone } d_6$ at room temperature. For spectrum B, the n in the general structure is replaced by $n-1$.

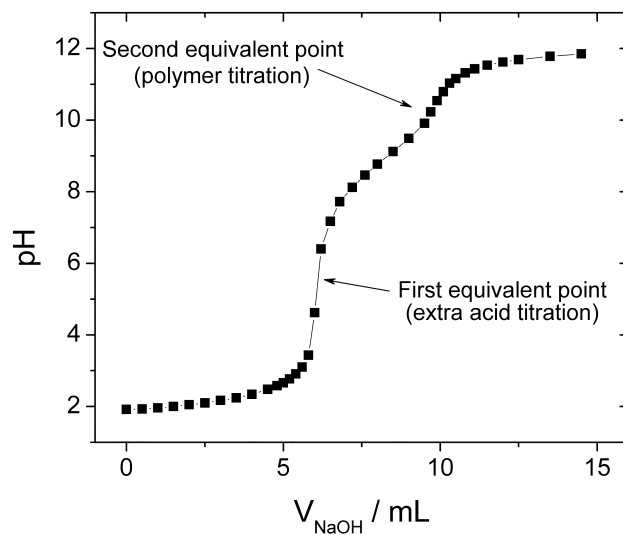


Figure S4.2. Example of a back titration for $\text{CA}(\text{AGE}_5\text{-NH}_2)_4$ with NaOH (0.1 M). The first equivalent point corresponds to the neutralization of the extra acid (HCl) added in the system, and the second equivalent point corresponds to the neutralization of the protonated amine groups on the polymer. Both are used to calculate the substitution on the polymer.

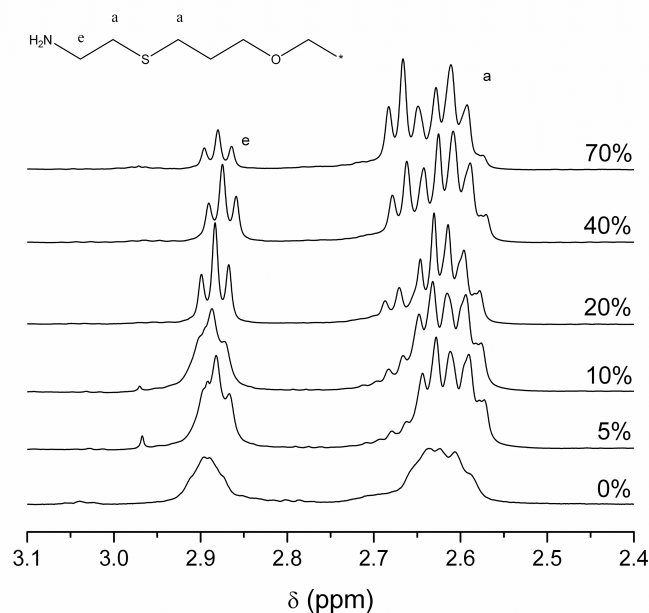


Figure S4.3. ^1H NMR spectra of acetylated samples of $\text{CA}(\text{AGE}_5\text{-NH}_2)_4$ in CDCl_3 . The expected percentages of the NH_2 groups of $\text{CA}(\text{AGE}_5\text{-NH}_2)_4$ reacted with acetic anhydride are indicated next to the spectra. The chemical shift of the methylene groups **a** changes from 2.9 to 3.55 ppm (PEG protons region) upon acetylation. The integrations of the proton signals **a** and **e** are used to calculate the experimental percentage of reacted NH_2 groups on the polymer.

Table S4.1. The targeted degrees of acetylation and the experimentally determined values for $\text{CA}(\text{AGE}_5\text{-NH}_2)_4$, showing the quantitative reaction process.

Expected acetylation ratio (%)	^1H NMR acetylation ratio (%) ^a
5	5.8
10	11
20	24
40	45
70	74

^a calculated with the ratio of the protons **e** / **a** (see Figure S4.3) with $\pm 2\%$

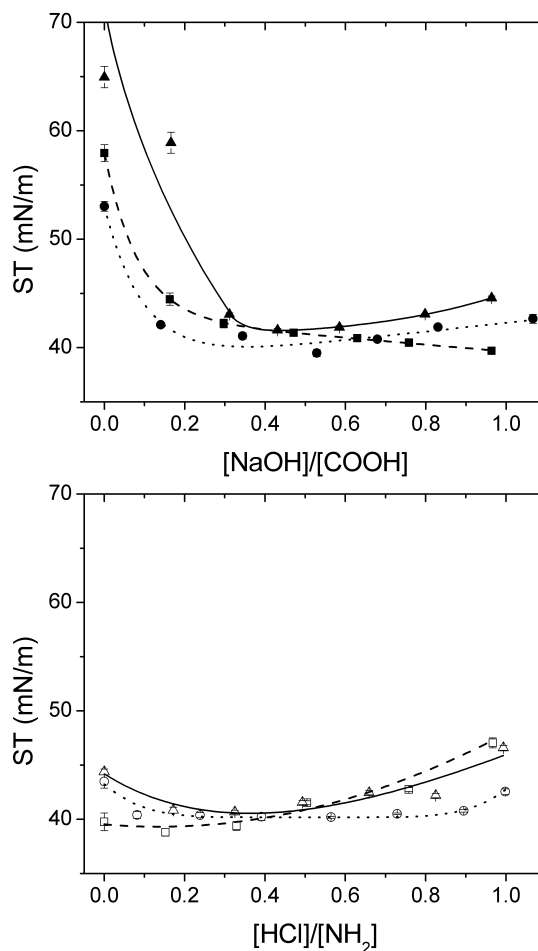


Figure S4.4. Surface tension of samples $\text{CA}(\text{AGE}_5\text{-COOH})_4$ (●), $\text{CA}(\text{AGE}_{10}\text{-COOH})_4$ (■), $\text{CA}(\text{AGE}_{15}\text{-COOH})_4$ (▲), $\text{CA}(\text{AGE}_5\text{-NH}_2)_4$ (○), $\text{CA}(\text{AGE}_{10}\text{-NH}_2)_4$ (□) and $\text{CA}(\text{AGE}_{15}\text{-NH}_2)_4$ (△) when HCl (for the amine $\text{CA}(\text{AGE}_n\text{-NH}_2)_4$ series) or NaOH (for the acid $\text{CA}(\text{AGE}_n\text{-COOH})_4$ series) is added.

4.6.2 CMC and Thermodynamic Consideration.

Changes in the polar and/or non-polar groups usually affect the CMC. It is possible to calculate the CMC of a surfactant according to the hydrophilic and hydrophobic segments in the molecule.¹ The influence of the hydrophobic part is greater than the hydrophilic one as described by the Klevens rule:²

$$\log(\text{CMC}) = A - B \cdot N_c$$

where A depends on the surfactant head group, temperature, and the addition of inert electrolytes, B represents the contribution of each methylene group in the lowering of the CMC by the tail and N_c the number of hydrocarbons in the chain.

In terms of thermodynamics, adding an extra methylene unit to the paraffin chain will decrease the Gibbs energy of micellization by about 1.08 kT .³ In the field of amphiphilic block copolymers, propylene oxide and butylene oxide are among the oxirane monomers often used to form the hydrophobic segment. For amphiphilic block copolymers with hydrophobic oxirane monomer, the ΔG of micellization changes by ca -150 J/mol for every extra propylene oxide unit and ca -960 J/mol for every extra butylene oxide unit.⁴ The smaller changes in ΔG for the oxirane monomers reflect their greater hydrophilic character than that of a methylene unit. In this study, we have roughly determined the change in ΔG as being -60 J/mol (see Figure S5 for details) assuming that $\Delta G \approx RT \cdot \ln(\text{CMC})$.¹ This small change in the Gibbs energy shows the moderate hydrophobicity of the modified AGE polymeric units. The result indicates that long polymer chains made of modified AGE can be attached to an amphiphilic molecule such as bile acid while the aggregation properties of the molecule is preserved while obtaining the advantages of polymers for their specific applications.

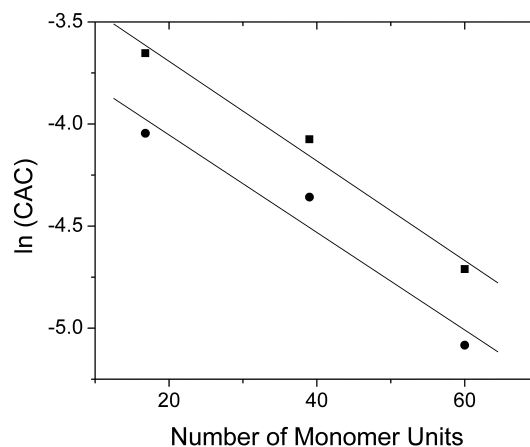


Figure S4.5. Gibbs energy of micellization involved per monomer unit ($\Delta G_m = RT(\partial \ln[\text{CAC}]/\partial(\text{number of monomer units}))$); star polymers bearing COOH groups $\text{CA}(\text{AGE}_n\text{-COOH})_4$ (circles), and amino groups $\text{CA}(\text{AGE}_n\text{-NH}_2)_4$ (squares).

4.7 References

1. Shinoda, K.; Nakagawa, T.; Tamamushi, B.; Isemura, T., *Colloidal Surfactants: Some Physicochemical Properties*. Physical Chemistry, Eds Hutchinsonvan, E.; van Rysselberghe, P., Academic Press: New York, 1963; Vol. XII, p 310.
2. Klevens, H. B., *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1953**, *30*, 74-80.
3. Shinoda, K., *J. Phys. Chem.* **1955**, *59*, 432-435.
4. Altinok, H.; Nixon, S. K.; Gorry, P. A.; Attwood, D.; Booth, C.; Kelarakis, A.; Havredaki, V., *Colloid Surf. B-Biointerfaces* **1999**, *16*, 73-91

Chapitre 5: Discussion générale et conclusions

5.1 Conception des polymères

Parmi les différents acides biliaires qui existent, l'acide cholique est le plus abondant dans la bile. Avec ses multiples fonctions alcools, cette molécule est particulièrement intéressante pour le développement de nouveaux matériaux. En effet, les hydroxyles peuvent être estérifiés ou transformés en d'autres fonctionnalités selon les propriétés recherchées pour le nouveau dérivé (voir Chapitre 1).

Une autre caractéristique intéressante de l'acide cholique est son amphiphilicité faciale. Cette orientation spatiale des groupements hydrophiles et hydrophobes en raison du squelette rigide suggère qu'il est possible de synthétiser des polymères qui auront eux aussi une orientation spatiale particulière, en ce qu'elle sera asymétrique plutôt que symétrique tel qu'on le voit souvent chez les polymères en étoile. Une attention particulière doit être portée à la nature et à la longueur du polymère hydrophile attaché sur le squelette puisque ce dernier est de taille limitée, d'où le risque de le « noyer » dans le polymère et de perdre l'amphiphilicité.

Pour préparer les nouveaux matériaux, il faut utiliser des techniques de polymérisation vivante comme l'ATRP ou la polymérisation anionique. L'ATRP est a priori plus intéressante que la méthode anionique parce qu'elle est plus facile à mettre en œuvre. Par contre, la fragilité de la liaison ester en milieu aqueux donne un point faible aux produits. Pour solutionner cette problématique, il faut faire appel à des liaisons plus stables comme les éthers ou les amides. Cependant, convertir les alcools en amines pour subséquemment introduire le groupe polymérisable par ATRP nécessite beaucoup d'effort de synthèse et la polymérisation anionique devient alors plus attrayante. Si l'on veut lier le groupement polymérisable par ATRP avec une liaison éther, il faut encore ajouter plusieurs étapes de synthèse. De plus, l'aspect biocompatibilité basé sur l'acide cholique est compromis en raison de toutes ces modifications majeures qu'on devrait lui apporter.

Il n'en demeure pas moins que l'ATRP et la méthode de polymérisation anionique peuvent permettre de synthétiser des polymères asymétriques à quatre bras de manière contrôlée.

5.2 Synthèse des polymères

5.1.1 Préparation des amorceurs

Avec l'ATRP la modification de l'acide cholique en un amorceur est facilement réalisable. La protection de l'acide et l'estérification des alcools sur l'acide cholique sont des réactions bien documentées dans la littérature,^{1,2} en plus de la disponibilité commerciale des halogénures d'acide pour l'ATRP. Tel que prévu, la protection de la fonction acide suivie de l'estérification des alcools pour introduire les groupements amorceurs se réalisait avec assez d'aisance (Chapitre 2), mais la solution était brun orange. Dans le contexte de production de polymères avec un potentiel de biocompatibilité élevé, il est préférable de ne laisser aucune impureté dans l'amorceur, d'où le besoin de purifier à nouveau par chromatographie sur gel de silice pour enlever « la couleur » lorsque nécessaire. Ces étapes longues et répétitives de purification sont évidemment un inconvénient majeur pour l'utilisation de l'ATRP même si elle permet d'accéder à des polymères d'architecture peu commune.

Il est aussi important de mentionner que des amorceurs basés sur l'acide chénodéoxycholique et déoxycholique ont été préparés avec des conditions de synthèse et des rendements similaires à ceux de l'acide cholique. Ces deux acides biliaires ayant chacun un alcool en moins que l'acide cholique, mais sur un atome de carbone différent, il aurait été possible de trouver la position la moins réactive si les vitesses de polymérisation avaient été différentes pour les divers amorceurs dans des conditions de polymérisation identiques.

Avec la polymérisation par voie anionique, la fonction acide de l'acide cholique doit être modifiée pour obtenir un polymère à quatre bras. Dans un cas, elle est transformée en un amide et, dans l'autre cas, elle est réduite en un alcool (Chapitres 3 et 4). Ces deux approches ont leurs avantages et leurs inconvénients. Transformer l'acide en amide permet de retrouver l'acide en cas d'hydrolyse, ce qui

peut être utile pour diminuer la toxicité de certains dérivés biliaires.³ D'un autre côté, selon les conditions environnementales qui prévalent, les liaisons amide ou ester pourraient être clivées de façon inopportune. Dans la deuxième approche une seule étape de synthèse est nécessaire au lieu des deux dans l'autre stratégie, mais le nouveau composé, le petromyzonol, est un dérivé d'un produit naturel stable qui est plus toxique chez l'homme que l'acide cholique.

Pour une polymérisation anionique efficace, il ne faut virtuellement aucune trace d'impuretés ou d'humidité dans les amorceurs. Ainsi, même si leur préparation s'avère plus simple que celle pour l'ATRP, cette exigence peut parfois demander des efforts supplémentaires. Par contre, du point de vue toxicité, on ne veut pas plus « d'impuretés inconnues » dans l'amorceur par ATRP. Considérant ceci, il est plus convivial et plus rapide de faire la réduction ou l'amidation de l'acide carboxylique sur l'acide cholique que de faire l'estérification des alcools et la purification.

5.1.2 *Mise en œuvre des polymérisations et architectures*

Un avantage de la technique ATRP est, tel que souligné précédemment, les conditions de synthèse peu astreignantes. Tous les réactifs et les solvants peuvent être utilisés tels quels à l'exception du bromure de cuivre et du monomère qui doivent être purifiés. Ces purifications sont faciles à réaliser. Au moment de la synthèse, un simple dégazage des solutions pour enlever l'oxygène dissout est suffisant et la polymérisation peut démarrer. Les cinétiques de polymérisation sont reproductibles et donnent des polymères aux architectures contrôlées (augmentation de la masse molaire dans le temps et indice de polymolécularité étroit).

Bien qu'il soit possible de pouvoir préparer des macromolécules avec la masse désirée selon les conditions choisies, il faut arrêter la polymérisation au bon moment afin de contrôler la masse molaire du polymère. Contrairement aux techniques ioniques où les espèces actives en croissance peuvent être présentes en solution sans grand risque de désactivation, il n'en va pas de même pour les radicaux. La conséquence est que si l'on veut une chaîne de 100 unités par exemple, il faudra en avoir 120 en solution et arrêter la réaction lorsque 5/6 des monomères auront réagi. Il faut éviter que les radicaux libres se trouvent en excès dans le milieu par rapport à

la concentration de monomères et participent davantage à des réactions secondaires indésirables qui ne mèneraient pas au produit désiré. Pour atteindre l'objectif de cette thèse, il faut greffer de courts polymères à l'acide cholique. L'arrêt de la synthèse après un certain temps peut donc générer des « erreurs de masse molaire » assez importantes et il faut donc faire un suivi serré de la progression de la réaction.

Un milieu très dilué a été utilisé pour réaliser la préparation des polymères, afin d'avoir une cinétique suffisamment lente pour avoir un bon contrôle sur les petites masses molaires. Les résultats montrent clairement que la réaction est vivante en raison de l'indice de polymolécularité étroit et de la masse molaire qui augmente avec le temps. De plus, les études cinétiques de polymérisation entre l'amorceur monosubstitué et le tétrasubstitué montrent un rapport 1 pour 1 dans la vitesse de consommation des monomères lorsque la concentration des fonctions amorçables est la même en solution. L'ensemble de ces observations montre qu'il est possible de faire un polymère à quatre bras de façon contrôlée.

Étant donné que les polymères sont de très petites masses molaires, l'ATRP n'est pas dans une zone où la polymolécularité est la plus étroite en général (voir Annexe A2). Toutefois, avec les conditions de synthèse choisies, l'indice de polymolécularité est relativement faible, ce qui n'est pas courant dans la littérature et apporte donc un protocole efficace pour la préparation de courtes chaînes par ATRP. C'est une contribution intéressante du point de vue synthétique parce qu'elle donne des produits bien contrôlés aux faibles masses avec une excellente efficacité de l'amorçage.

Pour la polymérisation anionique, il est impossible de cliver sélectivement les bras du cœur et de faire des cinétiques comparatives. Par spectroscopie ^1H RMN, nous savons que quatre chaînes de polymères ont été attachées sur le dérivé d'acide cholique et, par DSC, qu'il s'agit d'un polymère en étoile. Parce que l'amorceur s'apparente à celui en ATRP où l'amorçage de toutes les fonctions hydroxyles y est possible et que les bras des polymères sont uniformes, il est raisonnable de croire que parce que tous les alcools amorcent une polymérisation en anionique, ici aussi les bras devraient être uniformes.

Nous avons donc démontré qu'il est possible d'obtenir des polymères à quatre bras sur l'acide cholique par voie anionique et radicalaire. Considérant que dans la littérature on utilise souvent des agents de couplage pour estérifier les alcools lorsqu'on veut par exemple introduire des chlorures d'acide en raison de la faible réactivité/disponibilité de ces derniers,^{1, 2} ce résultat est pour le moins inattendu. De plus, lorsque des acrylates sont ajoutés sur chacun des alcools de l'acide cholique, leur réactivité augmente si un groupement espaceur est utilisé à cause de l'encombrement stérique.² Ici, sans avoir même utilisé cette stratégie pour augmenter les chances d'amorcer la polymérisation sur chaque site amorçable, un polymère en étoile à quatre bras est obtenu, ce qui réduit à la fois les étapes de synthèse et augmente aussi la biocompatibilité en minimisant les segments synthétiques sur le polymère.

La mise au point des conditions de polymérisation anionique a aussi été nécessaire. Le premier problème avec les amorceurs anioniques réside dans leur faible solubilité sous forme d'anions. Le THF, qui est le solvant généralement utilisé pour la polymérisation de l'oxyde d'éthylène, ne peut solubiliser l'amorceur si qualitativement plus de 30% de la base forte est ajoutée par rapport aux alcools: l'agrégation rend la solution laiteuse et opaque. Le DMSO étant un solvant plus polaire que le THF, il a été utilisé dans un mélange 1:1 avec le THF dans l'espoir de minimiser l'agrégation. L'amorceur protégé avec l'amide est assez soluble dans ce mélange. Même avec quatre alkoxydes, la solution demeure transparente. Cependant, la réaction devient laiteuse quelques heures plus tard, indépendamment de la quantité d'oxyde d'éthylène ajoutée. En utilisant seulement du DMSO pour la polymérisation, la solution devient laiteuse encore plus rapidement que dans les deux autres situations. La raison est probablement la déstabilisation des anions par le DMSO et la bonne solvataion des cations qu'il offre,⁴ ce qui augmente la réactivité de l'alkoxyde. Les amorceurs chargés avec des chaînes courtes de PEO, environ 3 à 4 unités, précipitent en s'agréant mais conservent leur réactivité. Avec leur croissance subséquente, les chaînes plus longues de PEO favorisent le retour en solution des polymères en formant possiblement des éthers couronne avec le potassium.^{5, 6}

Il importe de bien contrôler la solvataion de l'amorceur et la quantité de monomères pour éviter une polymérisation hétérogène. La déprotonation partielle de l'amorceur dans le DMSO, en ajoutant moins de naphthaléinide de potassium, s'est avérée la solution la plus efficace que nous avons trouvée.

Pour la polymérisation de l'éther d'allyle et de glycidyle, la mise au point des conditions a été d'autant facilitée par le travail du Chapitre 3. Nous avons donc simplement adapté les conditions précédentes à la nouvelle synthèse dans le DMSO puisque l'utilisation du THF était encore problématique.

Un avantage de l'ATRP versus la polymérisation anionique réside dans l'absence de charges sur la molécule qui pourraient favoriser l'agrégation. En fait, d'avoir estérifié les alcools masque l'amphiphilicité de l'acide cholique qui devient une molécule « ordinaire » et, ainsi, des conditions similaires à celles de la littérature peuvent être utilisées.⁷

5.3 Propriétés des polymères

La préparation de ces polymères dérivés des acides biliaires avait pour but de modifier leurs propriétés d'agrégation, d'en observer de nouvelles (ex: agent gélifiant) et ultimement, ce qui n'a pas été fait, de les étudier pour des applications biomédicales.

Dans tous les cas, les nouveaux polymères sont amphiphiles et forment des agrégats en milieu aqueux. Cette propriété était attendue, mais il n'était pas évident qu'elle serait préservée après l'attachement des bras de polymère. En effet, la grosseur du squelette stéroïdien par rapport à celle du nouveau segment hydrophile peut laisser croire a priori que la section hydrophobe sera facilement « noyée » dans la structure. Or, les choix du poly(acide acrylique), du PEG et du PAGE modifié, qui sont modérément hydrophiles, permettent de conserver cette propriété. Bien entendu, la charge des polymères ioniques peut freiner cette association ou rendre la CAC très élevée.

Pour des chaînes aussi longues qu'environ 35 unités d'EG, l'association existe encore. Une des causes aidant à ce phénomène réside probablement dans la structure asymétrique des polymères. En effet, la structure rigide du cœur stéroïdien oriente les

bras d'un côté du squelette. Il est possible que, lorsque la chaîne atteint une longueur « critique », elle enrobe aussi la face amphiphile. Cependant, en milieu aqueux, il est possible que cette face du squelette soit plus exposée que pour une autre structure où le squelette ne serait pas aussi rigide que celui de l'acide cholique et avec autant d'orientation spatiale. La face hydrophobe étant plus exposée en raison de son orientation privilégiée, l'association entre les molécules serait donc possible. Même si avec des chaînes longues, il y a toujours de l'association, il y a tout de même un effet de la longueur de la chaîne sur la CAC et il est d'autant plus marqué avec les polymères ioniques. Par contre, la variation de la CAC n'est pas très grande.

Le fait que les CACs soient de l'ordre du millimolaire laisse croire que la simple solubilisation de médicaments en solution suivie d'une injection chez un patient peut être illusoire. Parce que le cœur de la micelle n'est pas cinétiquement stable et qu'il est difficile à réticuler, il faudrait plutôt penser à réticuler les bras pour stabiliser les structures. Cette approche aurait probablement ses limites avec les bras d'acide acrylique qui s'hydrolysent assez facilement. Pour les PEGs et ses dérivés, il faudrait s'assurer d'avoir des structures de taille convenable.

Les études par microscopie électronique et par diffusion de la lumière ont démontré que la taille des agrégats était de loin supérieure à ce que l'on trouve généralement pour une micelle conventionnelle. De si grosses structures pourraient venir de plus petites structures agglomérées. Cependant, les images par microscopie n'ont jamais permis de voir de parois qui appartiendraient à de plus petites structures au sein de la grande. Donc, jusqu'à preuve du contraire, les agrégats ne sont le résultat que d'une seule et même entité composée d'un grand nombre de polymères en étoile.

Un autre point intéressant avec les agrégats se trouve dans le changement drastique de la structure adoptée par l'acide cholique seul en solution (des cylindres) et les polymères (des sphères). Avec l'éventail d'échantillons disponibles, seulement des sphères ont été observées. Parce que l'acide cholique est un surfactant rigide et non conventionnel, et que sa propre micellisation est encore mal comprise, il est très difficile de spéculer sur les raisons qui peuvent expliquer un tel changement. C'est certainement un sujet d'études futures.

Pour les PAGES modifiés, ils sont intéressants avec leurs propriétés en réponse à des stimuli, puisqu'ils sont à la fois sensibles au pH et à la température. Alors que le Pluronic* et des PEG-*b*-polyesters (tels le poly(acide lactique) et le poly(ϵ -caprolactone)) sont des polymères thermosensibles,⁸ nos polymères **CA-PEG₄** n'ont pas démontré de thermosensibilité. Parce qu'aucun des polymères préparés jusqu'à présent n'avait démontré cette propriété, il n'était pas attendu que les dérivés allyliques le soient. Toutefois, les PAGES avec des amines sont thermosensibles et cette propriété est d'autant plus rehaussée si les amines sont acétylées. La gamme de températures sur laquelle a été observée la transition est aussi intéressante, puisqu'elle inclut la température normale du corps. Évidemment, même si ces polymères répondent au pH et à la température, il faudrait s'assurer de leur biocompatibilité.

5.4 Travaux futurs

(1) Synthèses des polymères. On pourrait hydrogéner le polymère allylique pour avoir l'alcool en chaîne pendante.⁹ Le polymère serait nettement plus hydrophile, mais il serait certainement plus facile d'en faire un gel chimique ou physique.

(2) Caractérisation des polymères. Une des premières choses à faire est certainement d'étudier la biocompatibilité et de valider la capacité de solubilisation de composés hydrophobes par ces nouveaux polymères, plus particulièrement des PEGs et des PAGES modifiés.

Il serait intéressant aussi de voir s'il serait possible de former des gels avec ces polymères, particulièrement avec les polymères hydrogénés, en utilisant des agents de gélation. Ces gels pourraient potentiellement servir eux aussi de dispositifs pour le relargage contrôlé de médicaments.

Avec les **CA-PEG₄** la poursuite des études sur l'agrégation pour tenter d'expliquer la transition rapide du cylindre à la sphère et la taille des agrégats est une série d'études intéressantes. Il faudrait synthétiser des dérivés avec des bras très

* Le Pluronic est le nom commercial du copolymère bloc PEO-PPO-PEO.

courts (une ou deux unités d'EG) pour tenter de déterminer à partir de quand se fait la transition cylindre-sphère et étudier ces phénomènes par microscopie électronique et diffusion de la lumière. Prendre en compte l'effet de la concentration du polymère, de la force ionique du milieu ou d'agents complexant sur la forme adoptée par les agrégats sont autant d'avenues à explorer pour mieux comprendre les principes qui régissent l'agrégation de ces polymères.

Pour le PAGE, il faudrait aussi faire le même genre d'études que le CA-PEG₄ et ses agrégats. Jusqu'à maintenant, aucune information sur la forme et la taille des agrégats n'a été faite. De plus, le comportement de ces agrégats avec la température pourrait aussi être intéressant à étudier puisqu'il s'agit dans certains cas de polymères thermosensibles et que des propriétés atypiques pourraient bien exister sur la forme et la transition des structures en milieu aqueux.

(3) Études des applications. Il faudra essayer la solubilisation de certains médicaments et voir les taux de solubilisation atteints. De plus, des études sur le profil du relargage sont nécessaires. Il faudra voir l'effet de la température, du pH, de la force ionique et autres facteurs sur ce profil et déterminer avec quel type d'applications il est compatible.

Avec les alcools en bouts de chaîne, des groupements de reconnaissance pourraient être attachés pour donner une plus grande spécificité sur les sites d'action du principe actif contenu dans l'agrégat. Évidemment, il faut sélectionner les médicaments à vectoriser avec ces polymères avant de décider des groupements à mettre en bouts de chaîne.

5.5 Références

1. Hu, X. Z.; Zhang, Z.; Zhang, X.; Li, Z. Y.; Zhu, X. X., *Steroids*, **2005**, *70*, 531-537.
2. Zhu, X. X.; Nichifor, M., *Acc. Chem. Res.*, **2002**, *35*, 539-546.
3. Anwer, M. S.; O'Maille, E. R.; Hofmann, A. F.; DiPietro, R. A.; Michelotti, E., *Am. J. Physiol.*, **1985**, *249*, G479-488.

4. Um, I. H.; Lee, E. J.; Jeon, S. E., *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2001**, 22, 1301-1302.
5. Fruchtel, J. S.; Jung, G., *Angew. Chem.-Int. Edit. Engl.*, **1996**, 35, 17-42.
6. Penczek, S.; Cypriak, M.; Duda, A.; Kubisa, P.; Slomkowski, S., *Prog. Polym. Sci.*, **2007**, 32, 247-282.
7. Matyjaszewski, K.; Xia, J., *Chemical Reviews (Washington, D. C.)*, **2001**, 101, 2921-2990.
8. He, C. L.; Kim, S. W.; Lee, D. S., *J. Control. Release*, **2008**, 127, 189-207 (plus les références citées à l'intérieur).
9. Erberich, M.; Keul, H.; Moller, M., *Macromolecules*, **2007**, 40, 3070-3079.

Annexes

A.1 Propriétés des surfactants en solution

Les molécules dites « agent tensioactif » ont des propriétés uniques: elles ont une concentration assez limitée d'espèces dissoutes sous forme monomérique, diminuent la tension interfaciale même à faible concentration, forment des micelles à partir d'une certaine concentration appelée CMC et solubilisent des composés insolubles dans l'eau par les micelles.

Le plus souvent, les agents tensioactifs sont composés d'une chaîne hydrophobe et d'une tête hydrophile. La tête est généralement ionique, c'est-à-dire que sous forme neutre, elle est formée par l'association d'un anion ou d'un cation avec son contre-ion. L'eau possède une grande constante diélectrique et peut solubiliser des substances très polaires. Un surfactant, lorsque dissout dans l'eau, verra les ions de sa tête ionique séparés par l'effet de solvation de l'eau. La dissociation a lieu en raison du gain d'entropie versus l'énergie nécessaire pour séparer les ions. Si l'on dissout du dodécyl sulfate de sodium (SDS) dans l'eau, alors l'ion sodium va se séparer de la chaîne alkyle par l'effet d'entropie: cette dissociation 1 : 1 augmente considérablement l'entropie du système. Une fois le sodium détaché du SDS, il y a formation simultanée de l'anion dodécyl sulfate. Cette charge portée par la molécule force la dissolution du composé en raison de la forte répulsion électrique.

Pour les surfactants dits non ioniques, il n'y a pas d'ions à dissocier pour être solvatés par l'eau. En contrepartie, si l'on considère l'exemple du PEO, l'atome d'oxygène présent dans la partie hydrophile du surfactant possède une attraction assez marquée pour les molécules d'eau, alors que la portion éthylène vient diminuer cet effet de solvation. De plus, il existe une entropie positive de conformation de solution attribuable au groupement hydrophile long et volumineux. Ces deux effets sont généralement faibles en comparaison de la dissociation des ions pour favoriser la solubilisation. Pour ces raisons, la concentration maximale à laquelle l'espèce

monomérique peut se trouver en solution est généralement beaucoup plus faible que celle des agents ioniques. La CMC des surfactants non ioniques est donc beaucoup plus faible que celle des composés conventionnels. Par exemple, la CMC du SDS est d'environ 8,1 mM alors que celle du dodécyl glucoside est de 0,19 mM.¹

La « répulsion » entre la chaîne alkyle et les molécules d'eau n'implique en fait aucune force répulsive. Les forces cohésives entre les molécules d'eau étant très fortes, alors que les forces eau-alkane ou alkane-alkane sont faibles, la séparation de phase donne au système une énergie inférieure à celle de l'état mélangé.

Si un excès de surfactant est présent en solution, l'attraction électrique qui existe entre les contre-ions en solution et l'excès solide et chargé de surfactant diminue la concentration d'équilibre des contre-ions en solution puisqu'ils seront soumis à un nouvel équilibre avec ceux dans la phase solide. Toutefois, la répulsion électrique entre les tensioactifs chargés à l'état solide augmente leur tendance à la dissolution. Si un sel est ajouté, la concentration des contre-ions est augmentée et il y a aussi une diminution du potentiel électrique pour les surfactants chargés à l'état solide. Cette diminution de potentiel électrique sur l'excès de tensioactif présent augmente la solubilisation des contre-ions et diminue celle des chaînes de carbone. On conclut donc que si un sel est ajouté la concentration de contre-ions en solution augmente, mais celle du surfactant ionique diminue. La conséquence pratique de cet effet est la diminution de la CMC avec l'ajout de sel dans la solution. Cet effet est par contre inopérant, jusqu'à une certaine limite, chez les surfactants non ioniques.

Malgré la dualité et l'asymétrie des propriétés des surfactants, les tendances opposées au sein même de la molécule peuvent être simultanément satisfaites. Cela se traduit en une forte prédisposition pour l'adsorption et en une orientation préférentielle à l'interface des solutions aqueuses, conséquence des forces cohésives intenses entre les molécules d'eau. C'est de là que viennent les propriétés comme la diminution de la tension de surface, l'action émulsifiante, le mouillage et la dispersion des solutions.² Cependant, en solution il n'y a pas d'interface où les molécules amphiphiles peuvent s'adsorber et c'est la raison pour laquelle les chaînes de carbone vont alors s'associer à partir d'une certaine concentration. La diminution de l'énergie de Gibbs qui accompagne cette association est d'autant plus importante

que la chaîne est longue. Alors que la CMC diminue avec la longueur de l'alcane, le raccourcissement de ce segment montre que pour assister à la formation de micelles il faut minimalement autour de 4 atomes de carbone.³ Les raisons seraient une CMC trop élevée (environ 3 M) ce qui pose des problèmes de solubilité ou encore que la force de cohésion des agrégats qui n'est pas suffisamment forte pour contrer les forces d'agitation thermique qui tendent à la dispersion. Les propriétés du solvant sont aussi considérablement modifiées à de telles concentrations, dont le caractère polaire.

A.2 Références

1. Shinoda, K.; Yamaguchi, T.; Hori, R., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1961**, *34*, 237-241.
2. Hartley, G. S., *Aqueous Solutions of Paraffin-Chain Salts: a Study in Micelle Formation*. Hermann: Paris, 1936.
3. Shinoda, K.; Nakagawa, T.; Tamamushi, B.; Isemura, T., *Colloidal Surfactants: Some Physicochemical Properties*. Physical Chemistry, Ed. série Shinoda, K.; Nakagawa, T.; Tamamushi, B.; Isemura, T., Vol. XII. 1963, Academic Press: New York, p 310.

