HAL
open science

Synthèse et caractérisations de nouveaux polyesters biodégradables dérivés du poly (acide 3,3-diméthylmalique) comme revêtement prometteur de stents cardiovasculaires.

Rima Belibel

To cite this version:

Rima Belibel. Synthèse et caractérisations de nouveaux polyesters biodégradables dérivés du poly (acide 3,3-diméthylmalique) comme revêtement prometteur de stents cardiovasculaires.. Autre. Université Sorbonne Paris Cité, 2015. Français. NNT : 2015USPCD065 . tel-01687097

HAL Id: tel-01687097

https://theses.hal.science/tel-01687097v1

Submitted on 18 Jan 2018

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

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

Université Paris 13 – Institut Galilée

Laboratoire de Recherche Vasculaire Translationnelle – INSERM U1148

Thèse de doctorat

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université Paris 13

Discipline : Sciences de l'ingénieur

Spécialité : Génie biologique et médical

Synthèse et caractérisations de nouveaux polyesters biodégradables dérivés du poly(acide 3,3-diméthylmalique) comme revêtement prometteur de stents cardiovasculaires

Présentée par

Rima BELIBEL

Soutenue le 7 décembre 2015 devant la commission d'examen :

Rapporteurs :	**M E. Schacht**	**Professeur, Université de Gent**
	Mme E. Renard	**Professeur, Université Paris-Est Créteil**
Examinateur :	**M P. Thebault**	**Maître de Conférences, Université de Rouen**
Président de jury :	**Mme L. Mora**	**Professeur, Université Paris 13**
Directeur de thèse :	**Mme C. Barbaud**	**Professeur, Université Paris 13**
Co-encadrant :	**Mme H. Hlawaty**	**Maître de Conférences, Université Paris 13**

A la mémoire de mon père

A mon père qui a disparu très tôt
Qui a toujours voulu que je fasse une thèse
et qui n'a pas eu l'occasion de me voir présenter ce travail

Papa, je te dédicace cette thèse pour avoir suscité ma vocation et permis d'achever mes études. Je suis toujours ta fille qui t'aime beaucoup. J'espère que tu es fier de moi de là où tu me regardes et que le salut soit sur toi à tout jamais.

REMERCIEMENTS

Ce projet de thèse a été effectué à l'institut Galilée université Paris 13, dans le Laboratoire de Recherche Vasculaire Translationnelle (LVTS), dirigé par le docteur Didier Letourneur, directeur de recherche CNRS. Je tiens ainsi, tout d'abord, à le remercier pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et ses locaux.

Je tiens à remercier très sincèrement l'ensemble des membres du jury qui ont fait l'honneur d'accepter de juger mon travail à savoir : madame Estelle RENARD, Professeure, à l'université Paris-Est Créteil, monsieur Etienne SCHACHT, Professeur à l'université de Gent, monsieur Pascal THEBAULT, maître de Conférences à l'université de Rouen et madame Laurence MORA, Professeure à l'université de Paris-Nord.

J'adresse mes remerciements à ma directrice de thèse, le Pr Christel BARBAUD. C'est bien grâce à toi que j'ai pu découvrir un sujet de thèse enrichissant à la hauteur de mes attentes où j'ai pu ainsi m'épanouir dans mes recherches. Merci pour ta confiance, ta patience et tes conseils instructifs depuis mon master. J'ai été extrêmement sensible à tes qualités humaines tout au long de ce travail. J'ai eu énormément de chance de travailler avec toi.

J'exprime aussi ma grande gratitude à mon encadrante, le Dr Hanna HLAWATY, qui a pu m'initier aux bonnes pratiques biologiques ce qui m'a permis d'élargir mes compétences en tant que chimiste. Merci pour ton dynamisme, ta disponibilité et ton écoute toujours avec le sourire. Merci d'être toujours là à me rassurer. *Tu es un exemple à suivre*.

Je tiens ensuite à remercier le Pr Laurence MORA, pour sa collaboration, son professionnalisme, son efficacité et son aide précieuse lors des études d'angles de contact et dans la réalisation de deux de mes articles. J'ai beaucoup apprécié nos échanges. Merci Laurence pour tes compétences, ta disponibilité et ta gentillesse.

Ce laboratoire, c'est aussi bien sûr les membres de mon équipe que j'ai appris à connaître et à côtoyer durant ces quatre années passées. Je remercie, ainsi, monsieur Frédéric CHAUBET, madame Virginie GUEGEN, madame Amélie BARRERE. Je remercie sincèrement Mme Isabelle BATAILLE, pour sa jovialité et son aide dans les études SEC. Je suis très reconnaissante envers Murielle MAIRE, pour son aide et sa disponibilité. Désolée Murielle de t'avoir embêtée tout au long de ces années à me passer des commandes et à emprunter ton matériel. Merci pour ta patience. J'exprime, aussi, ma profonde gratitude envers M. Thierry AVRAMOGLOU pour ses conseils et ses explications enrichissantes ainsi que sur ses qualités scientifiques et humaines qui m'ont été très bénéfiques. Je te remercie Thierry pour tout ce que tu as fait pour moi. Merci aussi à Graciela PAVON-DJAVID, qui a eu la gentillesse de me former à la culture cellulaire.

Je remercie notre secrétaire bien aimée, Pascaline ADONAI, pour son travail, sa gaieté et sa bonne humeur. J'adresse aussi mes remerciements aux autres doctorants Pierre, Marisol, Eléonore, Cécilia, Lucas, Hanane, Hela, Jihane et à Romain avec lesquels j'ai pu partager mon bureau et ainsi que de très bons moments. Un grand merci aux stagiaires avec lesquels

j'ai pu travailler de près comme de loin. Merci à vous : Ramlat, Axelle, Ania, les deux Sabrina, Chérifa, Romain (*Romaino*) pour l'ambiance et l'atmosphère agréable qui régnaient en paillasse et en pause-café. Je tiens à remercier exceptionnellement Delfine pour sa gentillesse. Un grand merci à Marisol (*el-Zina*) qui a pu, par son agréable présence et ses qualités humaines, m'égayer chaque jour. C'est un grand plaisir de partager mon bureau avec toi *el-ZINA.*

Je remercie aussi les doctorants Nicolas, Amena et Hadjer et Oualid ingénieur d'étude sur le site de Bobigny, avec qui j'ai partagé de bons moments, pour leur participation et leur aide pratique à la culture cellulaire.

Je tiens à remercier aussi les chercheurs travaillants dans le site de Bobigny SMBH, Maelle, Julia et Evelyne avec qui j'ai fait mes enseignements pendant les trois ans de thèse. Je tiens également à remercier l'ensemble de mes professeurs du Master de l'université de Paris 12 UPEC et particulièrement madame Sylvie CONDON et madame Julia BENSEMHOUN pour leurs disponibilités.

Je voudrais également remercier monsieur Sylvain OUDEYER et monsieur Jean-François BRIERE de l'IRCOF de l'université de Rouen (IRCOF) de m'avoir donnée l'opportunité d'effectuer mon stage de master 2 au sein d'une équipe dynamique, chaleureuse et de grandes compétences. Merci puisque vous m'avez appris les bonnes pratiques en synthèse organique.

Je remercie également Cédric LORTHIOIR, chargé de recherche CNRS à l'institut de Chimie et des Matériaux de Paris-Est basé à Thiais, pour son aide dans les manips de rhéologie et pour sa grande générosité.

Un grand merci aux nombreuses personnes que j'ai pues rencontrer durant toutes ces années. Merci à Imed pour sa collaboration dans certaines analyses de mes produits, et Soum, doctorant, pour sa générosité et sa bonté.

Je remercie du fond du cœur tous les proches qui m'ont entourée malgré mon manque de disponibilité. Merci à Maya, Magda, Fatima et Souad avec qui j'ai passé la plupart de mon temps libre. Merci les filles de votre générosité et votre présence. Merci pour tous les moments agréables qu'on a pu passer ensemble, j'ai beaucoup appris avec vous les filles. Merci à magda "*La plus belle des plus belles*" pour ta présence et pour ton aide. Merci de m'avoir supportée et pour le café que tu m'as préparé toute la période de la rédaction de ma thèse. Je te remercie du fond du cœur.

Je tiens également à remercier les deux Ikram pour leur gentillesse. Merci pour votre amitié les filles. Je te remercie Fadwa, t'es une personne adorable et souriante, tu as beaucoup de qualités, reste comme tu es, ne change jamais "*Fadouch*".

Une amie à qui je dois UN GRAND MERCI, une amie que je considère beaucoup, que j'aime beaucoup … *SABRINA*, merci pour ta présence, ton écoute, ta gentillesse et ton

aide…Merci pour ton grand cœur et tes qualités humaines, t'es une amie exceptionnelle. MERCI Sab d'être ma MEILLEURE AMIE (*Bentiiiii* ;-).

MERCI à mes amies d'enfance. Loin des yeux, près du cœur. Vous êtes toujours présentes dans ma vie, notre groupe me manque beaucoup, j'aurais aimé que vous soyez présentes à ma soutenance de thèse. Merci Imen, Farida, Meriouma, Soumaya, Amira, Mahira, Wahiba ….Un grand merci à notre adorée « *SIDATI Habiba* » que nous aimons beaucoup. Un grand merci à Amel « *Milou »* et Fatiha, merci les filles pour votre amitié.

Un grand merci à mes amis d'ANNABA, Merci Assoum pour ton grand cœur, je n'oublierai jamais ce que tu as fait pour moi. Un grand merci à ta famille que je respecte beaucoup. Merci à Walid et à toute la promo.

Je voudrais remercier une personne qui a toujours été là pour moi dans les bons et mauvais moments, merci Fathi pour ton grand cœur, pour ta générosité et pour tout ce que tu as fait pour moi. Je t'aime beaucoupppppppp.

Un grand merci à mes autres amis Imed, Amine et Ismail pour leur présence et leur générosité.

Enfin, je voudrais rappeler mon amour et ma gratitude pour toute ma famille qui a été malheureusement loin de moi géographiquement mais proche de moi dans mon cœur. Une grande dédicace à ma mère que j'aime beaucoup, merci maman d'être toujours là pour nous RIEN NE VAUT TA PRESENCE, ma jolie et adorable sœur Sarah, à mon mignon petit frère « Mami » que j'adore et à mon frère Mohamed avec qui ça n'a pas toujours été facile mais j'estime que ceci définit la famille. Merci à mes oncles et mes tantes, à mes cousines et cousins. Merci à toute ma famille. Sarsoura, ma petite sœur, je tiens à te dire MERCI d'être dans ma vie, MERCI d'être ma sœur, t'es la plus proche de mon cœur. Je t'aime plus que tout le monde ma sœur toi et *Mamitou*. *Minou*, merci ma cousine pour ton amour et ta gentillesse. Tu sais que je t'aime et que tu peux compter sur moi*, je serai toujours là pour toi, PROMIS.*

SONAYA, ma deuxième sœur, je ne trouve pas quoi dire sur toi … tu sais pourquoi ? Puisque je ne trouve pas les mots pour te dire combien je t'aime. Je ne sais pas si tu le savais … t'étais … tu es … et tu resteras … ma meilleure amie que j'aime beaucoup. Merci Sonia pour tout ce que tu as fait pour moi, merci de m'avoir supportée, merci pour tous ces jours où tu as toujours été à mes côtés. C'est bon j'ai fini ma thèse, je te promets de répondre toujours à tes appels. Sonaya *MERCI D'ETRE MON AMIE*. Je te souhaite tout le bonheur, que Dieu te protège toi et ta petite famille.

Je tiens à dire à vous tous, que cette thèse a été une excellente expérience et je vous souhaite le meilleur pour les années à venir, tant professionnellement que personnellement.

ABREVIATIONS ET ANGLICISMES

AFM	Microscopie à force atomique
AH	Acide hyaluronique
Ap	Pourcentage d'acidité
AVC	Accident vasculaire cérébral
bFGF	*Basic Fibroblast Growth Factor*
CEs	Cellules endothéliales
CH	Chitosane
CMLs	Cellules musculaires lisses
D	Distribution de la masse molaire
DCA	Angle de contacte dynamique
DIAD	Diisopropylazodicarboxylate
DLC	*Diamond like carbone*
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dRI	Indice de réfraction différentiel
DSC	Calorimétrie différentielle à balayage
ECs	Etudes cliniques
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
GAG	Glycosaminoglycane
H	Hystérèse
HDL	Lipoprotéines à haute densité
HFP	Poly(fluorure d'éthylène)
HUVEC	*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*
IDM	Infarctus du myocarde

IL	Interleukine
IRM	Imagerie par résonance magnétique
LDA	Diisopropylamidure de lithium
LDH	Lactate déshydrogénase
LDL	Lipoprotéines à basse densité
LS	Diffusion de la lumière
LTs	Lymphocytes T
MEC	Matrice extracellulaire
MLABn	Malolactone de benzyle
Mn/Mw	Masse molaire en nombre / en poids
mp	Point de fusion
NMR	Résonance magnétique nucléaire
OGM	Organismes génétiquement modifiés
OMS	Organisation mondiale de la santé
PAMMLA	Poly(acide [R,S] – 3-alkyl-3-méthylmalique)
PCL	poly(ε-caprolactone)
PDGF	*Platelet Derived Growth Factor*
PDMMLA	Poly(acide [R,S] - 3,3 diméthylmalique)
PEA	Polyesteramide
PET	Polyéthylènetéréphtalate
PFVD	Poly(fluorure de vinylidène)
PGA	Poly(acide glycolique)
PHA	Poly(hydroxyalcanoate)
PHA	Poly(hydroxylalcanoate)
PHB	Poly(hydroxybutyrate)
PHV	Poly(hydroxyvalérate)
PLA	Poly(acide lactique)

PMLA	Poly(acide malique)
POC	Polymérisation par ouverture de cycle
PPM	Partie pour million
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
PU	Polyuréthane
Ra	Rugosité de surface
Rf	Rapport frontal
SEC	Chromatographie d'exclusion stérique
SEMs	Stents à élution médicamenteuses
SN	Substitution nucléophile
Tc	Température de cristallisation
Td	Température de décomposition thermique
TFA	Acide trifluroacétique
TFAA	Anhydride trifluroacétique
Tg	Température de transition vitreuse
TGA	Analyse thermogravimétrique
TGF	*Transforming Growth Factor*
THF	Tétrahydrofurane
TLC	Chromatographie sur couche mince
TPP	Triphénylphosphine
θa / θr	Angle de contact à l'avancée / au retrait

SOMMAIRE

RESUME i
ABSTRACT ii
REMERCIEMENTS iii
ABREVIATIONS ET ANGLICISMES Vi
INTRODUCTION GENERALE 1
Chapitre I : *étude bibliographique* 5
1ère partie : *PROBLEMATIQUE* 5
I- Le cœur 6
II- Les réseaux vasculaires 6
III-Les principales pathologies cardiovasculaires 7
III-1- Définition 7
III-2- Epidémiologie 7
IV-Structure et composition cellulaire de la paroi vasculaire saine 8
IV-1- Structure de l'artère saine 8
IV-2- Composition cellulaire et métabolisme de la paroi artérielle 9
V- L'athérosclérose 13
V-1- Définition de l'athérosclérose 13
V-2- Conséquences de l'athérosclérose 13
V-3- Genèse de la plaque d'athérome 14
V-4- La sténose 18
V-5- Evolution finale de la plaque d'athérome 19
VI-Traitements et complications de l'athérosclérose 20
VI-1- Méthodes de traitement 20
VI-1-1- Chirurgie classique 21
VI-1-2- Chirurgie endovasculaire 21
VI-2- Endoprothèses coronaires 24
VI-2-1- Stents nus 24
VI-2-2. Resténose intra-stent et traitements 27
2ème partie : *SOLUTION* 29
I- Stents recouverts 29
II- Types de revêtements 30
II-1- Stents à revêtements passifs 30
II-2- Stents actifs 32

3ème partie : *POLYESTERS BIODEGRADABLES* 35
I- Généralités 34
II- Les polyesters biodégradables 35
II-1- Les polyesters naturels 37
II-1-1- Poly(β-hydroxyalcanoates) (PHAs) 37
II-1-2- Poly(β-acide malique) (PMLA) 39
II-2- Les polyesters synthétiques usuels : synthèse chimique, propriétés et biodégradation 40
II-2-1- Synthèse chimique 41
II-2-2- Différentes propriétés physicochimiques 45
II-2-3- Biodégradation 49
II-3- Principales applications biomédicales des polyesters 53
II-4- La réponse cellulaire à la chimie et aux propriétés physicochimiques de la surface des polymères 55
II-4-1- Interface matériau-cellule : adhésion et comportement cellulaires 55
II-4-2- Les facteurs influençant l'adhésion cellulaire 57
4ème partie : *OBJECTIFS DU PROJET* 58
I- Poly(β-acide [*R*,*S*]-3,3-diméthylmalique) (PDMMLA) 60
II- Méthodologie du projet 62
➢ Références bibliographiques 63
Chapitre II : *PDMMLAs amorphes* 82
1ère partie : *MATERIELS ET METHODES* 82
I- Synthèse, purification et caractérisation des polymères amorphes 82
I-1- Synthèse des monomères β-lactones α,α,β-trisubstituées racémiques 82
I-2- Polymérisation anionique des β-lactones synthétisées 87
II- Les PDMMLAs amorphes étudiés 89
III-Caractérisation physicochimique des films polymères 90
III-1- Préparation des films polymères 90
III-2- Etude de la rugosité de la surface par AFM 90
III-2-1- Principe 90
III-2-2- Caractérisation de la surface 91
III-3- Etude de la mouillabilité de la surface 93
III-3-1- Mesure de l'angle de contact en statique 93
III-3-2- Détermination de l'énergie de surface et de ses composantes 96
III-3-3- Mesure de l'angle de contact en mode dynamique 97
IV-Etude de la rhéologie 99

V- Etudes biologiques 100
VI-Etude de dégradation hydrolytique in vitro 101
2ème partie : *RESULTATS ET DISCUSSIONS* 103
➢ Introduction 103
➢ Références bibliographiques 106
ARTICLE 1 : Effect of chemical Heterogeneity of biodegradable polymers on surface energy: a static contact angle analysis of polyester model films 108
Résumé 108
Abstract 109
I. Introduction 111
II. Material and methods 112
III. Results and discussion 115
III.1. PDMMLA polymers synthesis 115
III.2. Polymer characterization 117
III.2.1. Characterization of polymers chemical structure 117
III.2.2. Atomic Force Microscopy 120
III.2.3. Rough wettability 122
III.3. Cassie corrections of contact angles and surface energies 124
IV. Conclusion 128
References 129
➢ Conclusion de l'article 1 133
ARTICLE 2 : DCA cycling homogenizes heterogeneous surfaces 134
Résumé 134
Abstract 136
1. Introduction 138
2. Experimental Section 141
3. Results and Discussion 143
4. Conclusions 156
References 157
➢ Conclusion de l'article 2 161
ARTICLE 3 : Physicochemical and biological evaluation of statistical functional copolyesters of poly([*R,S*]-3,3 dimethylmalic acid) derivatives for cardiovascular metallic stent coating application 162
Résumé 162
Abstract 164

I. Introduction 165
II. Material and methods 168
III. Results and discussion 173
III.1. Physicochemical properties 173
III.1.1. Atomic Force Microscopy (AFM).....173
III.1.2. Thermal properties.....180
III.1.3. Rheological properties.....182
III.2. Biocompatibility.....183
III.2.1. Cell attachment conditions 183
III.2.2. Spreading test of HUVEC cells on polymer films 184
III.2.3. HUVEC cells morphology on polymer films 185
III.2.4. In vitro HUVECs adhesion.....187
III.2.5. In vitro monocytes adhesion.....187
III.2.6. In vitro proliferation of HUVECs cells on polymer films.....188
IV. Conclusion 188
References.....189
➢ Conclusion de l'article 3 191
ARTICLE 4 : Poly((R,S)-3,3-dimethylmalic acid) derivatives as a promising cardiovascular metallic stent coating: Biodegradation and biocompatibility of the hydrolysis products in human endothelial cells 193
Résumé.....193
Abstract 196
I. Introduction 197
II. Material and methods 199
III. Results and discussion 203
III.1. Change of the molecular weight.....203
III.1.1. Degradation of homopolymers: Effect of load and nature of functional side chain and biological enzymes 203
III.1.2. Degradation of copolymers: Effect of hydrophilic/hydrophobic ratio and enzymes 209
III.1.3. Degradation of high molecular weight (hM_w) copolymers: Effect of hydrophilic/hydrophobic ratio, enzymes, pH and temperature 211
III.2 Cytotoxicity of polyesters and degradation products 216
IV. Conclusion 218
References 222
➢ Conclusion de l'article 4.....219

Chapitre III : *PDMMLAs semi-cristallins* 224
➢ Introduction 225
1ère partie : *MONOMERES OPTIQUEMENT ACTIFS* 229
ARTICLE 5 : Synthesis of New Optically Active α,α',β-Trisubstituted-β-Lactones as Monomers for Stereoregular Biopolyesters 229
Résumé 229
Abstract 230
I. Introduction 232
II. Experimental 234
III. Results and discussion 242
IV. Conclusion 252
References 253
➢ Conclusion de l'article 5 254
2ème partie : *POLYESTERS ISOTACTIQUES* 229
ARTICLE 6 : Synthesis and characterizations of new isotactic homopolyesters, statistical and block copolyesters derived of poly((*S*)-3,3-dimethylmalic acid) via the lactone route 255
Résumé 255
Abstract 256
I. Introduction 257
II. Experimental 259
III. Results and discussion 264
IV. Conclusion 279
References 280
➢ Conclusion de l'article 6 282
3ème partie : *AUTRES RESULTATS (DITACTICITE)* 284
I- Synthèse des deux homopolymères PAMMLABz et PAMMLABz' 284
II- Caractérisations chimique et physicochimique des PAlMMLAs 284
II-2- Caractérisation de la stéréochimie par RMN ^{13}C 285
II-3- Caractérisation physicochimique par DSC et TGA 290
III- Partie expérimentale 292
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 293
ANNEXES 302

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Selon l'organisation mondiale de la santé, les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité avec un tiers de décès par an. L'athérosclérose, par son implication dans plusieurs pathologies cardiovasculaires, est la maladie la plus préoccupante dans les pays développés. C'est une maladie silencieuse liée au mode de vie actuel et définie par la formation d'une plaque d'athérome dans les artères. Cette plaque est caractérisée par un épaississement de la paroi artérielle et une perte de ses propriétés structurales. Elle est constituée de lipides oxidés et de cellules inflamatoires situés au niveau sous endothélial qui peuvent réduire la lumière artérielle voire obstruer complètement l'artère.

Notre laboratoire s'intéresse depuis plusieurs années aux pathologies cardiovasculaires et surtout aux traitements de l'athérosclérose. L'implantation d'un stent métallique au niveau du rétrécissement ou de l'occlusion est la méthode la plus utilisée depuis les années 70 afin d'éliminer cette plaque athéromateuse. Ce dispositif a une résistance suffisante pour permettre la revascularisation tout en s'opposant au recul élastique de la paroi artérielle contrairement à une angioplastie par ballonnet. En revanche, la resténose intra-stent est la complication majeure liée à ce traitement. Elle survient dans 20 à 30% des cas après l'intervention par une réobstruction partielle de l'artère traitée qui nécessite dans la majorité des cas la revascularisation de la circulation sanguine. La resténose est caractérisée par l'endommagement endothélial, la prolifération et la migration des cellules musculaire lisses et le phénomène de corrosion de la surface du métal.

A l'heure actuelle, la solution envisagée pour faire face à ces complications est l'utilisation des stents actifs (SEMs), c'est-à-dire, des stent recouverts qui peuvent libérer une substance bioactive. Le revêtement utilisé doit respecter quelques conditions telles que : l'amélioration de la rugosité et de la composition chimique du métal, la réparation artérielle de l'endothélium, l'inhibition de la prolifération et de la migration des cellules musculaires lisses, la libération des substances bioactives d'une façon prolongée, la biodégradation du biomatériau et la bioassimilation des produits de dégradation par l'organisme. Ces systèmes protecteurs de la paroi artérielle ont permis de réduire le risque de la resténose intra-stent mais leur utilisation à long terme reste controversée. Ceci est lié à plusieurs facteurs tels que la cicatrisation tardive de l'endothélium due aux principes actifs libérés et les phénomènes

d'hypersensibilité et du caractère pro-inflammatoire des polymères utilisés. La recherche d'un nouveau revêtement biocompatible est l'objectif de plusieurs équipes de recherche.

La biocompatibilité d'un matériau a été définie comme « *l'ensemble des interactions entre ce matériau et le milieu environnant, et leurs conséquences biologiques locales ou générales, immédiates ou différées, réversibles ou définitives* ».[a] Généralement, les interactions entre le biomatériau et l'organisme se localisent à sa surface. Afin de comprendre les interactions du revêtement avec le milieu biologique, d'éviter les réactions inflammatoires et d'accélérer la cicatrisation de la paroi artérielle, l'étude des propriétés de surface du revêtement de stent est primordiale.

De plus, la réponse biologique est caractérisée par la nature des interactions biomatériau/cellules. L'adhésion, la morphologie, la fonction et la prolifération cellulaires qui interviennent lors de ces interactions dépendent de plusieurs facteurs. Ces facteurs sont la composition chimique et la charge du matériau, sa rugosité et sa morphologie, la mouillabilité et le comportement hydrophile/hydrophobe de la surface et l'énergie de surface du matériau.

Les polyesters biodégradables sont les matériaux actuellement utilisés pour recouvrir les SEMs. Leurs propriétés physicochimiques et biologiques leur confèrent un intérêt particulier. L'originalité des polyesters biodégradables se retrouve dans le domaine de leur synthèse macromoléculaire. La nature des monomères utilisés, l'architecture et la fonctionnalisation des chaînes polymères sont les points forts de leurs utilisations. Dans ce contexte, mon travail de thèse porte dans un premier temps à élaborer un nouveau polyester synthétique dérivé du poly(acide [*R*,*S*]-3,3-diméthylmalique) (PDMMLA amorphe) qui peut être utilisé comme revêtement de stents actifs.

A l'interface de la chimie et de la biologie, un effort particulier a été porté, en vue de l'identification des propriétés de surface du matériau utilisé, sur son étude physicochimique. Par conséquent, la conduite de ce projet a nécessité :

- la synthèse et la caractérisation chimique d'une série de polymères ;
- la caractérisation physicochimique de la surface des polymères ;
- l'étude de la réponse biologique *in vitro* de ces polymères ;

[a] *Definitions in Biomaterials: Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials.* Chester, England, D. F. Williams: p. March 3-5.

- l'étude *in vitro* de la biodégradation des films polymères et de la cytotoxicité des produits de dégradation.

Le but de cette étude est de corréler la composition chimique et les propriétés de surface de ces polymères à certaines propriétés biologiques. Cette étude porte, d'une part, sur les propriétés de surface des polymères de surface homogène chimiquement et d'autre part sur des polymères de surface hétérogène chimiquement. La nature chimique et physique de la surface peut être modulée en choisissant des copolymères amphiphiles et en adaptant les paramètres étudiés.

Dans un second temps et en parallèle de ces études, la mise en place d'une série de stéréopolyesters dérivés du poly(acide (*S*)-3,3-diméthylmalique) (PDMMLA semi-cristallin) a fait l'objet d'une étude détaillée au cours de ce travail de thèse. Tout d'abord, la mise au point de ces stéréopolyesters a nécessité la synthèse et la caractérisation des monomères optiquement actifs. Des β-lactones chirales avec différents groupements fonctionnels comportant un ou deux centres stéréogènes ont été préparées. Ensuite, la synthèse d'une série d'homopolymères et copolymères isotactiques a été réalisée. La RMN ^{13}C est utilisée pour confirmer l'isotacticité de ces polymères et la DSC et les RX pour confirmer leur semi-cristallinité. Une étude comparative des propriétés physicochimiques des PDMMLAs amorphes et semi-cristallins a été effectuée. Ainsi, une première approche sur la synthèse des stéréopolymères possédant une ditacticité a attirée notre attention. Un nouveau homopolymère qui comporte deux centres de chiralité sur l'unité de répédition a été synthétisé et caractérisé avec succès.

La thèse a donc deux objectifs : l'élaboration des PDMMLAs amorphes pour le revêtement de stents et la synthèse et la caractérisation de nouveaux PDMMLAs semi-cristallins. Ce manuscrit s'articule autour de trois chapitres.

Le chapitre I est consacré à l'étude bibliographique en quatre parties. La 1ère partie discute la problématique du sujet de thèse (resténose intra-stent). La solution actuellement envisagée pour le traitement de la resténose fait l'objet de la 2ème partie. La 3ème partie fait un aperçu sur les polyesters biodégradables usuels et utilisés comme revêtement de stents actifs. Enfin, la 4ème partie décrit les objectifs et la méthodologie de mon projet de thèse.

Le chapitre II qui comporte deux parties analyse le 1^{ier} objectif de cette thèse. La 1ère partie (matériels et méthodes) présente les principales techniques utilisées dans cette étude. La 2ème partie détaille les résultats obtenus autour de l'objectif I. Ces résultats sont présentés sous forme d'articles (1 à 4) qui sont soit publiés ou en préparation avec des résumés et des discussions.

Le chapitre III qui comporte trois parties présente le 2ème objectif de ce travail. Elles sont présentées sous forme d'articles (5 et 6) avec des résumés qui exposent respectivement la synthèse et la caractérisation d'une nouvelle série de monomères optiquement actifs et les stéréopolyesters correspondants.

Chapitre I : étude bibliographique

Ce chapitre expose une étude bibliographique détaillée en quatre parties (60 pages) :

- **1ère partie** : la resténose intra-stent et ses complications (problématique) ;

- **2ème partie** : le traitement actuellement utilisé pour faire face aux complications de la resténose intra-stent (stents recouverts) ;

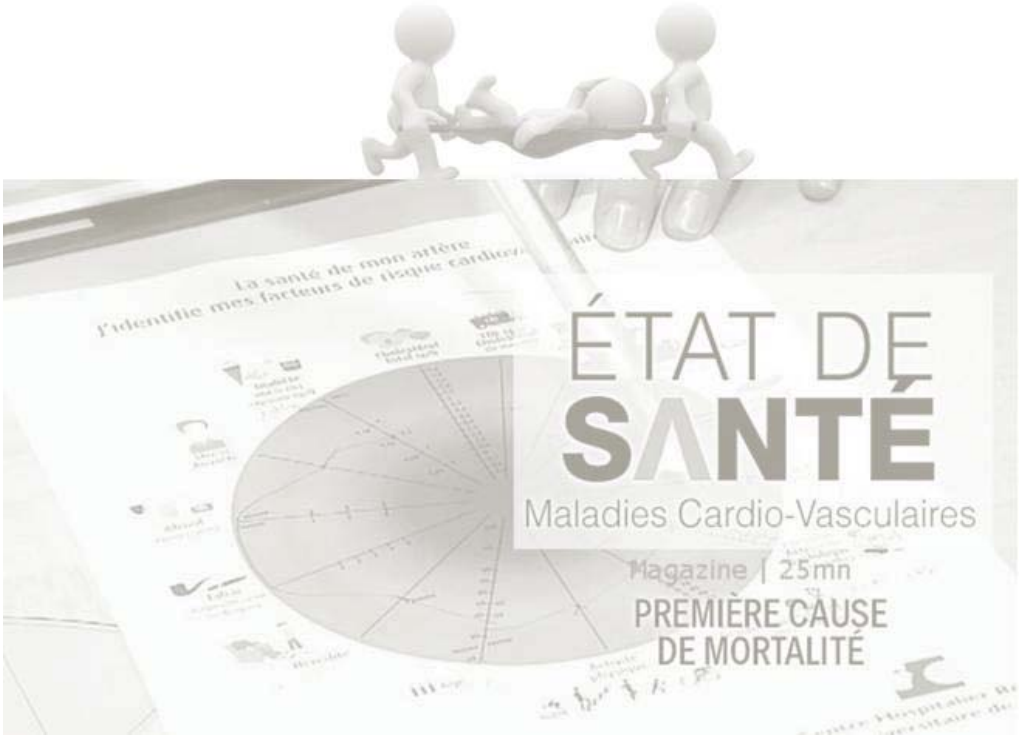
- **3ème partie** : les stents actifs et le revêtement prometteur à base de polyesters biodégradables.
  Afin de comprendre l'intérêt d'utiliser un revêtement de stent à base de polyesters biodégradables et pouvoir effectuer une comparaison avec les résultats obtenus des différentes études sur notre polymère, une analyse bibliographique sur les principales caractéristiques des polyesters biodégradables les plus utilisés est détaillée dans cette partie.
- **4ème partie** : conclusion sur les données des études de la littérature et description du présent projet de thèse (objectifs).

Chapitre I : étude bibliographique

1ère partie :

Système cardiovasculaire et ses pathologies

« PROBLEMATIQUE »



Constitué du cœur et des vaisseaux sanguins, le système cardiovasculaire a pour but principal d'assurer à tous les tissus de l'organisme un apport continu d'oxygène et de nutriments, puis de se charger de l'élimination du dioxyde de carbone et de tous les déchets. L'appareil circulatoire s'appuie sur un véritable réseau aussi étendu que précis. On peut distinguer deux sous-systèmes : le système vasculaire systémique et le système vasculaire pulmonaire (figure I-1). Leur fonctionnement est automatique et autorégulé.

Les accidents cardiovasculaires, comme l'accident vasculaire cérébral (AVC) et l'infarctus du myocarde (IDM) font partie des troubles de santé les plus meurtriers [1]. Lors de ces accidents, le muscle cardiaque n'est plus suffisamment alimenté en sang à cause d'une obstruction des vaisseaux coronaires. Dans presque tous les cas, les accidents cardiovasculaires sont les conséquences de l'athérosclérose, pathologie des artères de gros et moyens calibres.

Pour bien comprendre la problématique du sujet, ce chapitre suit donc cette organisation et nous présenterons successivement le cœur et les réseaux vasculaires. L'attention sera portée sur les principales pathologies cardiovasculaires, les traitements et les complications de l'athérosclérose.

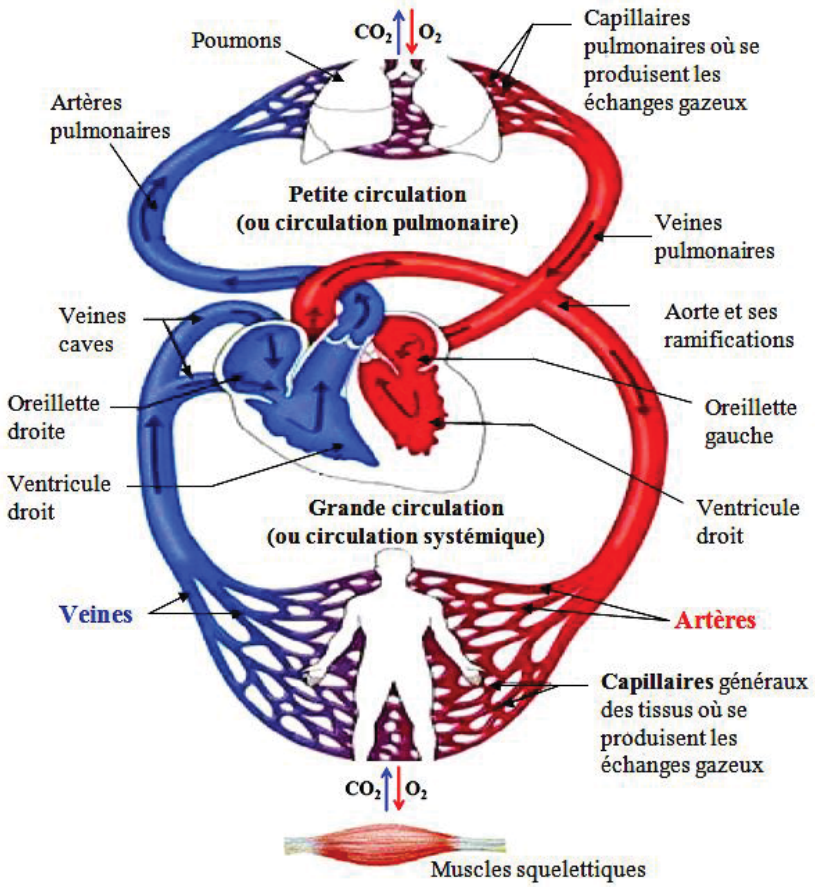


Figure I-1. Le système circulatoire sanguin et le cœur [2].

I- Le cœur

Le sang a besoin de circuler dans les vaisseaux systémiques à forte pression pour qu'il arrive jusqu'aux plus petits vaisseaux dans les membres inférieurs et supérieurs ainsi qu'à tous les tissus des organes. Le système cardiovasculaire est donc pourvu d'une pompe très puissante : le cœur ; un organe creux et musculaire qui assure la circulation sanguine par des contractions rythmiques. Il est constitué par un muscle qui délimite quatre cavités : oreillette droite, oreillette gauche, ventricule droit et ventricule gauche qui reçoivent et propulsent respectivement le sang (figure I-1).

II- Les réseaux vasculaires

Les deux sous-systèmes vasculaires sont composés de trois types de vaisseaux sanguins : les artères, les veines et les capillaires. On estime qu'ils s'étendent sur une longueur totale d'environ 100 000 km aux calibres parfaitement adaptés à leurs fonctions :

- **Les artères :** ce sont les vaisseaux sanguins qui acheminent le sang sortant du cœur dans la circulation. Elles partent du cœur pour se ramifier de plus en plus pour devenir des artérioles débouchant sur des capillaires. Ces artères ont un grand diamètre et une faible résistance à l'écoulement hydraulique. Depuis la grosse aorte (2,5 cm de diamètre) jusqu'aux petites artérioles (diamètre inférieur à 0,3 mm), elles conduisent le sang chargé d'oxygène du cœur vers les organes.

- **Les veines et les veinules :** elles permettent au sang issu des capillaires de retourner au cœur. Les veines ont des parois moins épaisses que les artères.

- **Les capillaires :** fins "comme des cheveux", d'environ 5 à 8 µm de diamètre, assurent, à l'intérieur de chaque organe la circulation du sang. Ils sont aussi le lien entre les systèmes artériels et veineux.

Les propriétés des artères sont modifiées par le vieillissement et la multiplication de facteurs de risque qui peuvent conduire à différentes pathologies [3, 4].

III- Les principales pathologies cardiovasculaires

III-1- Définition

Les maladies cardiovasculaires constituent un ensemble de troubles affectant le cœur et les vaisseaux sanguins. Elles rassemblent des pathologies touchant les vaisseaux sanguins qui alimentent le muscle cardiaque (cardiopathies coronariennes), le cerveau (maladies cérébro-vasculaires) et les bras et les jambes (artériopathies périphériques) ou affectant le muscle et les valves cardiaques, résultant d'un rhumatisme articulaire aigu (cardiopathies rhumatismales). Elles comprennent également les malformations cardiaques congénitales, les thromboses veineuses profondes et les embolies pulmonaires [3].

III-2- Epidémiologie

Les maladies cardiovasculaires sont aujourd'hui un véritable problème de santé publique puisqu'elles constituent une des principales causes de décès au monde, représentant 17,3 millions de décès par an, soit 30% de la mortalité mondiale totale, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Parmi ces décès, on estime que 7,3 millions sont dus à une cardiopathie ischémique et 6,2 millions à des accidents vasculaires cérébraux. Plus de 80% des décès interviennent dans des pays à revenu moyen ou faible et touchent presque également hommes et femmes. En France, elles représentaient 30% des décès totaux en 2010. D'ici 2030, on estime à près de 23,6 millions le nombre de décès dus aux maladies cardiovasculaires. D'après les projections, ces maladies devraient rester les premières causes de décès, le taux de progression le plus important devrait toucher la région de la méditerranée orientale. L'Asie du Sud-est devrait compter le plus grand nombre de décès. L'augmentation des facteurs de risque (tabagisme, manque d'activité physique, hypertension, obésité, diabète, taux élevé de cholestérol, etc.) ou encore des facteurs génétiques soutient cette tendance.

Aujourd'hui, l'athérosclérose est la principale étiologie de ces pathologies. Elle représente l'une des causes majeures de mortalité et d'invalidité humaines dans les pays de haut niveau de vie et qui est variable d'un pays à un autre, représentant de ce fait un enjeu important de santé publique. La prise en charge globale des patients atteints s'est améliorée. Cependant les récidives telles que la resténose intra-stent restent imprévisibles et nombreuses, soulignant l'échec de la prévention médicale et l'insuffisance des connaissances des mécanismes sous-jacents. C'est pourquoi nous accordons à cette pathologie une attention particulière [1].

IV- Structure et composition cellulaire de la paroi vasculaire saine

IV-1- Structure de l'artère saine

La paroi artérielle est constituée de vaisseaux sanguins de calibres et de structures variables, possédant de nombreuses propriétés mécaniques et métaboliques leur permettant de s'adapter à différentes conditions. Ces vaisseaux sanguins répondent à un modèle commun d'organisation, composé de trois tuniques superposées, dénommées de la lumière vers la périphérie de l'artère : l'intima, la média et l'adventice (figure I-2).

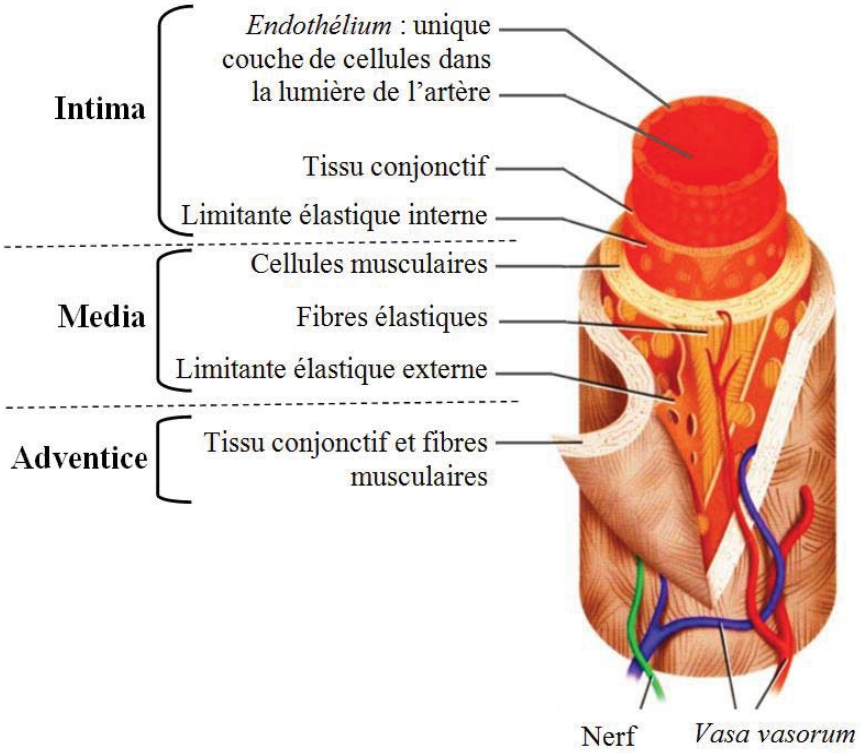


Figure I-2. La structure d'une artère de moyen calibre [5].

a-L'intima

L'intima correspond à la première couche et le lieu de formation de la plaque d'athérome. Cette tunique interne mince et lisse revêtant l'intérieur du vaisseau sanguin est constituée d'une couche unique et continue de cellules endothéliales (CEs) et d'une fine couche de tissu conjonctif. Ces CEs sont en contact direct avec le sang circulant. Quelque soit le diamètre de la paroi, il y a toujours une seule couche de CEs. La couche sous-endothéliale ou membrane basale sur laquelle reposent les CEs, d'épaisseur variable et de nature conjonctive, est composée de fibres de collagène et de quelques fibres élastiques. Enfin, la limitante élastique interne permet de séparer l'intima de la média.

b-La média

La media est la tunique moyenne, plus épaisse, de nature à la fois musculaire et élastique. Elle est limitée de part et d'autre par les membranes limitantes élastiques interne et externe et composée principalement de cellules musculaires lisses (CMLs) entourées de fibres élastiques et de fibres de collagène. Cette couche est très variable selon les différents territoires vasculaires. On distingue les artères élastiques, gros vaisseaux proximaux, opposées aux artères musculaires, les petites artères périphériques particulièrement douées de vasomotricité. La média est séparée de l'adventice par la limitante élastique externe.

c- L'Adventice

L'adventice qui est la couche externe de l'artère est composé de fibres de collagène, de fibres élastiques et de fibroblastes. Elle ancre le vaisseau dans les tissus voisins qui vont permettre l'apport des nutriments et de l'oxygène aux grosses artères : les *vasa vasorum.* Son organisation est à peu près la même quel que soit le type de vaisseaux.

La complexité de ces trois tuniques dépend du vaisseau sanguin. Leurs propriétés mécaniques dépendent de leur quantité d'élastine qui varie avec le diamètre du vaisseau. Chaque type de vaisseau est donc conçu de telle façon à pouvoir supporter la pression du flux sanguin en se déformant en conséquence [6].

IV-2- Composition cellulaire et métabolisme de la paroi artérielle

La paroi artérielle a non seulement la fonction de « conduit » qui relie le cœur aux différents organes, mais elle possède des fonctions de synthèse, des propriétés mécaniques et des récepteurs**.** Les principaux types cellulaires composant les artères sont les CEs, les CMLs, et les fibroblastes (figure I-3).

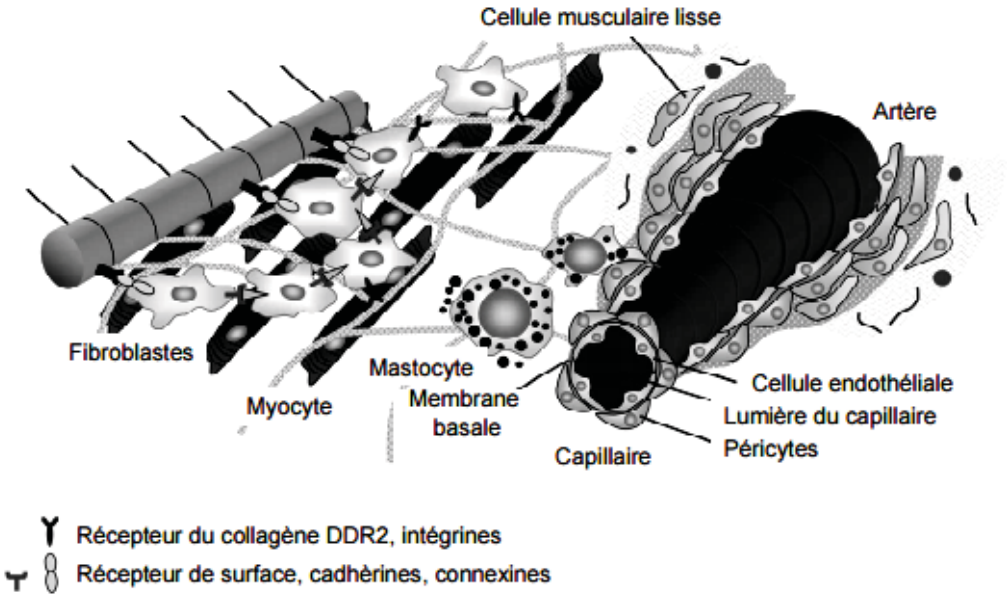


Figure I-3. Composition cellulaire de la paroi artérielle [7].

a- Les cellules endothéliales de l'intima

Situées à l'interface entre les compartiments sanguins et tissulaires [8], les CEs sont le premier site anatomique qui permet de restreindre les échanges entre le sang et la paroi vasculaire. Ces cellules forment un endothélium continu reposant sur une membrane basale [9]. L'endothélium joue un rôle actif majeur dans les vaisseaux, lui conférant ses propriétés anticoagulantes, antiplaquettaires et fibrinolytiques. Il régule le tonus vasomoteur [10] et le trafic des leucocytes [11]. Il a aussi des fonctions de transport actif et passif dans la paroi artérielle, des constituants sanguins parmi lesquels les lipoprotéines.

Les CEs sont liées à la matrice sous-endothéliale par les intégrines [b] (figure I-3). Ces dernières sont activées face aux forces de cisaillement unidirectionnelles qui permettent la libération relativement élevée de monoxyde d'azote (NO) et maintiennent une faible production d'endothéline (ET-1) [c]. Cette action assure ainsi une inhibition de la prolifération des CMLs, une meilleure vasodilatation et donc une inhibition de l'agrégation plaquettaire due au taux élevé de NO. En effet, la charge négative présente sur la surface des CEs est responsable de l'inhibition électrostatique de l'adhésion des leucocytes et des plaquettes sur l'endothélium [12].

Ces fonctions sont régulées par de nombreux facteurs humoraux modulant leur capacité de synthèse et leur conférant ainsi un phénotype différent selon qu'elles sont au repos,

[b] **Les intégrines** sont des récepteurs d'adhésion cellulaire (protéines transmembranaires).
[c] **Endothéline ET-1** est un puissant facteur vasoconstricteur.

stimulées, activées ou lésées conduisant à la formation de lésions d'athérosclérose en cas de perturbations [13, 14].

b- Les cellules musculaires lisses

Elles constituent le type cellulaire prédominant de la média des artères sous la forme de deux phénotypes: a) contractile, qui assure la vasomotricité et le tonus artériel, et b) synthétique caractérisé par leurs capacités de prolifération et de synthèse des éléments de la matrice extracellulaire (MEC) (fibres élastiques, collagène et protéoglycanes). Elles sont également impliquées dans le catabolisme des lipoprotéines [15].

Sous l'influence d'une agression de la paroi artérielle, l'endomagement des cellules endothéliales et en réponse à des variations extérieures, les CMLs peuvent subir des changements irréversibles et profonds de leur phénotype.[20-22] La structure et la fonction cellulaire sont donc modifiées en observant une forte capacité de prolifération, de migration, et de synthèse de la MEC en exprimant peu les marqueurs contractiles. Cette réponse est impliquée dans différents processus pathologiques tels que l'athérosclérose et l'hypertension artérielle [16].

Dans la plaque d'athérome ces CMLs sont localisées dans l'intima artérielle et jouent un rôle important dans la croissance et la stabilité de cette plaque en participant à l'élaboration de la chape fibreuse et du cœur lipidique [17, 19].

c- Les fibroblastes

Les fibroblastes sont des cellules fusiformes ou étoilées du tissu conjonctif. Les fibroblastes cardiaques constituent le type cellulaire majoritaire dans le cœur. Elles sont souvent surnomées « *cellules de soutien* ». Elles participent également aux propriétés structurales et mécaniques du cœur. Elles contribuent au renouvellement de la MEC, principalement du collagène et au remodelage cardiaque. Ces caractéristiques des fibroblastes font que plusieurs études dans la littérature visent à les cibler spécifiquement pour développer de nouveaux traitements afin de réduire les conséquences néfastes des pathologies cardiaques [20].

***d- Les lipoprotéines :* Porteurs des lipides**

Les lipides sont des molécules hydrophobes, insolubles dans les milieux biologiques aqueux. Pour être transportés au niveau plasmatique, ils sont donc véhiculés au sein des

lipoprotéines [21]. Les lipoprotéines sont des particules synthétisées dans le foie et les intestins. Elles transportent les lipides (cholestérol non estérifié, esters de cholestérol, triglycérides et phopholipides) dans le sang et à travers le corps aux différents tissus pour les utiliser dans les métabolismes cellulaires [22]. Il existe deux sortes de lipoprotéines responsables du transport du cholestérol (figure I-4) :

- Les lipoprotéines à basse densité (LDL) : structure composée d'un noyau lipidique, d'une protéine extérieure et de défenses antioxydantes [23].
- Les lipoprotéines à haute densité (HDL) : particules plus petites et plus denses avec une structure globalement identique [24].

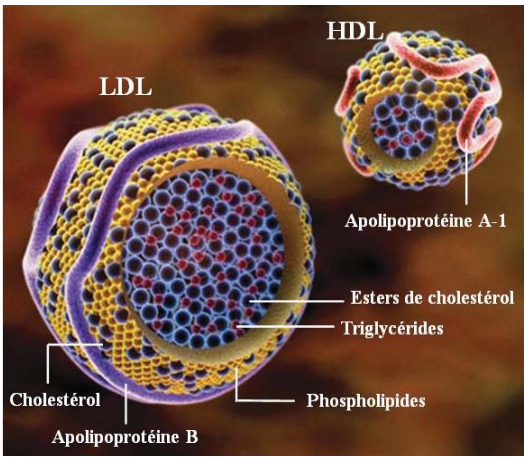


Figure I-4. Molécules de LDL et HDL [25].

Au niveau de l'intima, les LDLs et HDLs peuvent pénétrer dans la paroi artérielle et subir une oxydation du noyau lipidique. Cette oxydation est produite à cause des radicaux libres (tels que les radicaux de peroxyde libérés par les cellules et les réactions chimiques continues dans le corps) et de l'épuisement de la défense anti-oxydante des lipoprotéines. La protéine extérieure des deux lipoprotéines LDL et HDL se modifie avec l'avancement de l'oxydation [26, 27]. Les cellules de la paroi vasculaire interprètent ce changement comme un signe de danger et font appel au système immunitaire. La différence dans la protéine extérieure des deux lipoprotéines (figure I-4) fait que seules les molécules de LDL oxydées (LDL-ox) sont reconnues par les récepteurs des macrophages [26, 28], ce qui aide à expliquer certains effets pro-athérosclérotiques associés aux concentrations élevées du plasma en LDL [29]. Les médecins ont donné appellation à LDL comme "mauvais cholestérol" et à HDL comme "bon cholestérol"[25].

V- L'athérosclérose

V-1- Définition de l'athérosclérose

L'origine du mot athérosclérose dérive du grec : « *athéré* » qui signifie "bouillie ou caillot" et « *sclérose* » qui signifie "dur et correspond à toute forme de dégénérescence fibreuse d'un tissu ou d'un organe". Ce terme a été créé en 1904 par l'Allemand Marchand (atherosklerose). L'OMS en donne une définition descriptive : *"l'athérosclérose est une association en proportion variable de remaniements de l'intima des artères, consistant en une accumulation locale de lipides, de complexes glucidiques et de produits d'origine sanguine, de tissus fibreux et de dépôts calcaires, le tout accompagné de modifications de la média"* [30, 31].

Il s'agit donc d'une atteinte chronique de la paroi vasculaire des artères de moyen et de gros calibre, due à l'accumulation locale de lipides, de tissu fibreux et de dépôts calcaires, dans l'espace sous endothélial induisant ainsi la formation d'une plaque d'athérome (figure I-5) [32].

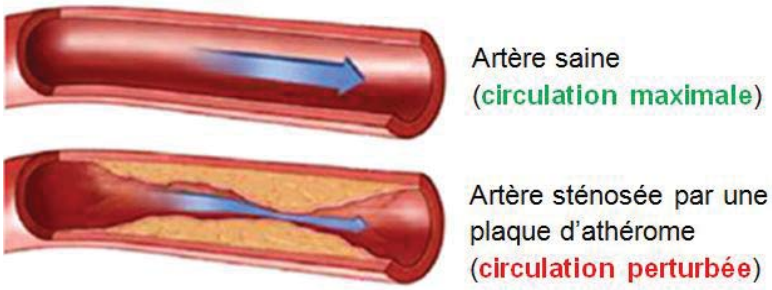


Figure I-5. Plaque d'athérome [33].

Cette pathologie ne présente que peu de symptômes qui ne se révèlent que plusieurs années après l'apparition des premières lésions anatomiques et entraîne la diminution progressive de la lumière vasculaire pouvant aboutir à son obstruction totale.

V-2- Conséquences de l'athérosclérose

Selon l'endroit où la plaque d'athérome se développe, l'athérosclérose peut avoir des conséquences importantes. Elle présente un danger qui pourrait aller jusqu'à mettre en péril la vie de la personne atteinte. En effet, la plaque d'athérosclérose peut boucher totalement la lumière de l'artère. Ceci bloque la circulation sanguine et donc le transport des nutriments vers certains organes. Elle provoque des pathologies chroniques comme la paralysie, les troubles sensitifs, les troubles du langage et l'apparition d'une insuffisance cardiaque. Elle est

également à l'origine des maladies aiguës plus bruyantes et potentiellement mortelles comme l'IDM si elle a lieu dans l'artère coronaire et l'AVC si elle a lieu dans la carotide.

V-3- Genèse de la plaque d'athérome

La plaque d'athérome se caractérise par un remodelage vasculaire dû à un processus inflammatoire qui contribue à l'évolution de la plaque. Seules les artères de moyen et gros calibre (0,5 à 3 cm de diamètre) sont sensibles au développement de la plaque d'athérome [34, 35]. Les acteurs qui conduisent au changement de l'artère saine en artère athéroscléreuse sont les cellules de la paroi vasculaire et les éléments circulants [3, 36].

V-3-1- Le vieillissement artériel et les cellules vasculaires

Physiologiquement, avec l'âge, une déformation des artères apparait ; les fonctions des CEs et des CMLs se modifient [37], ce qui conduit à la perturbation du système vasculaire :

- la perméabilité de l'intima au flux de composants circulants sanguins (lipoprotéines) augmente avec le dysfonctionnement endothéliale.
- l'accumulation progressive du collagène et de la fibrose dans la paroi artérielle avec la modification des CMLs de leur phénotype contractile pour un phénotype synthétique.

Ce dysfonctionnement aboutit à l'épaississement de l'intima, à la rigidité artérielle et à la perte des propriétés viscoélastiques des artères ce qui favorise l'apparition des lésions athéroscléreuses [38].

L'évolution des lésions athéroscléreuses augmente fortement avec les facteurs de risques tels que l'âge, les dyslipidémies familiales héréditaires [39] et les anomalies des facteurs hémostatiques, mais aussi avec les facteurs de risques environnementaux (la sédentarité, l'obésité, le tabagisme) [3, 40].

V-3-2- Anatomie pathologique de l'athérome

Il s'agit d'une plaque nodulaire développée au niveau de l'intima de façon chronique. Elle débute dès l'enfance et progresse de façon silencieuse, de taille et de forme variables, et évolue en six stades de la strie lipidique à la lésion compliquée .[12, 41, 42]. La fissuration ou la rupture de cette plaque met son contenu en contact avec la circulation sanguine. Les processus de coagulation s'installent et les plaquettes adhèrent en favorisant la constitution de la thrombose [43]. Ceci peut augmenter le risque de caillots susceptibles d'obstruer

complètement les vaisseaux et entraîner la gravité de la maladie (IDM, AVC, ischémie aigüe). Voici les stades d'evolution d'une plaque :

***a- Lésion initiale* :** Elle correspond à un dysfonctionement des cellules endothéliales et l'accumulation de lipides dans les macrophages de l'intima dans des zones à risque d'athérosclérose. A ce stade, il existe également un début de prolifération des CMLs.

***b- Strie lipidique* :** Elle représente le premier stade de l'athérome qui est caractérisé par l'accumulation de nombreuses CMLs et des cellules spumeuses (CML ou macrophages riche en LDLox). Cette strie ne se manifeste pas cliniquement mais elle peut évoluer vers la plaque d'athérome (figure I-6, b).

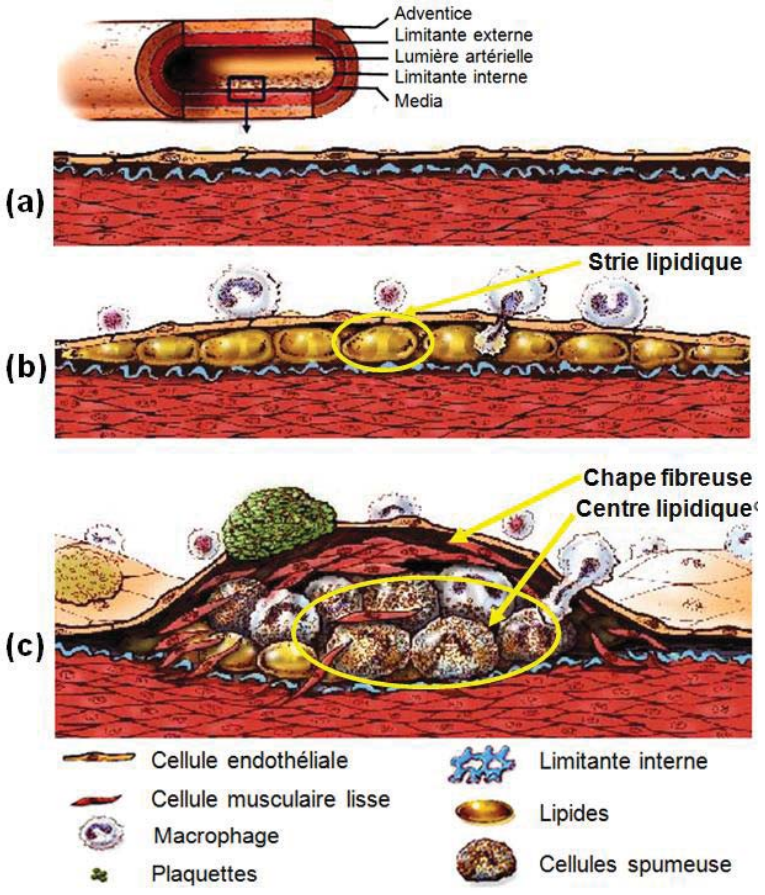


Figure I-6. Représentation de (a) la paroi vasculaire saine, (b) la strie lipidique et (c) la plaque d'athérome mature [44].

***c- Lésion intermédiaire* :** A ce stade, la mort cellulaire n'est pas visible. Ces lésions développeront ultérieurement des noyaux lipidiques caractéristiques des lésions évoluées (plaque fibreuse ou athérome).

***d- Cœur lipidique* :** Le noyau central représente une plaque ferme surélevée en dôme et occupe une région bien définie de la lumière vasculaire. Le cœur lipidique semble se développer pour devenir une plaque fibreuse ou pour donner une lésion compliquée thrombotique lipides extracellulaires [41].

a- *Plaque fibro-lipidique* : correspond à la définition d'athérosclérose de l'OMS citée précédemment [30, 31].. Elle représente une plaque fibreuse calcifiée avec sa chape fibreuse qui sépare son centre lipidique du reste de l'intima (figure I-8, c). Le cœur lipidique contient des lipides, des macrophages, des lymphocytes T, des CMLs et la chape fibreuse est formée de CMLs, et de fibres de collagène. Les cellules spumeuses sont localisées dans la couche profonde de la chape fibreuse et dans le cœur lipidique. La plaque fibro-lipidique peut entraîner des manifestations ischémiques chroniques si le diamètre de la lumière artérielle est réduit de plus de 50% [45].

b- *Plaque compliquée* : la mortalité et la morbidité de l'athérosclérose sont largement dues au phénomène inflammatoire local suivant la formation de l'athérome simple et qui entraîne sa transformation en plaque compliquée. La complication de cette plaque (rupture, érosion, hémorragie) dépend de plusieurs facteurs intrinsèques et extrinsèques [41, 46, 47].

V-3-3- Processus impliqués dans le développement de la plaque

Les cellules de la paroi vasculaire (CEs, CMLs, lymphocytes et macrophages) et les éléments circulants sanguins (lipoprotéines) constituent les acteurs responsables de l'initiation de l'athérosclérose et de sa progression en lésions plus avancées. La dysfonction endothéliale est la première étape déclencheuse de la formation d'une plaque simple qui peut se compliquer sous l'influence de plusieurs facteurs :

- pénétration des lipoprotéines dans l'intima artériel ;
- recrutement des monocytes et leur différenciation en macrophages puis en cellules spumeuses ;
- réaction inflammatoire ;
- formation de la chape fibreuse.

a- La dysfonction endothéliale : déclencheur de l'athérosclérose

L'endothélium se compose des CEs qui jouent le rôle d'une barrière à perméabilité sélective entre le sang et la paroi vasculaire. Ces cellules sont exposées à des agressions

continues ou répétées d'origine mécanique (hypertension), métabolique (hypercholestérolémie chronique ou hyperhomocystéinémie) et/ou immunologique (après une transplantation). Ceci entraîne un dysfonctionnement de l'endothélium qui est caractérisé par une altération des fonctions de vasorégulation et de vasoperméabilité. Cela peut induire une agrégation plaquettaire, une adhésion leucocytaire et une production de cytokines pro-inflammatoires [48] permettant la formation d'un état inflammatoire initiant l'athérosclérose.

b- Formation de la strie lipidique : cellules spumeuses

Le premier évènement qui suit ce dysfonctionnement induit une perméabilité accrue aux LDLs au sein de la paroi artérielle [3, 49]. Lors de ce passage trans-endothélial, les LDLs circulants peuvent être modifiés pour produire des LDLs-ox ayant une cytotoxicité vis-à-vis des cellules de la paroi [50, 51]. L'insertion progressive de ces LDL-ox dans l'espace sous-endothélial induit l'expression de molécules d'adhésion [52] et de récepteurs de chimiokines [53] à la surface de l'endothélium générant une activation du système immunitaire (monocytes et lymphocytes) [54]. Ces cellules adhèrent à la barrière endothéliale puis pénètrent dans l'intima.

Une fois dans l'intima, les monocytes se multiplient et se différencient rapidement en macrophages. Ces macrophages vont se gorger de LDL-ox présents dans l'intima via les récepteurs *« scavenger »* et devenir des cellules spumeuses. Cette différenciation complexe est le stade précoce de la structuration de « la strie lipidique » (figure I-7).

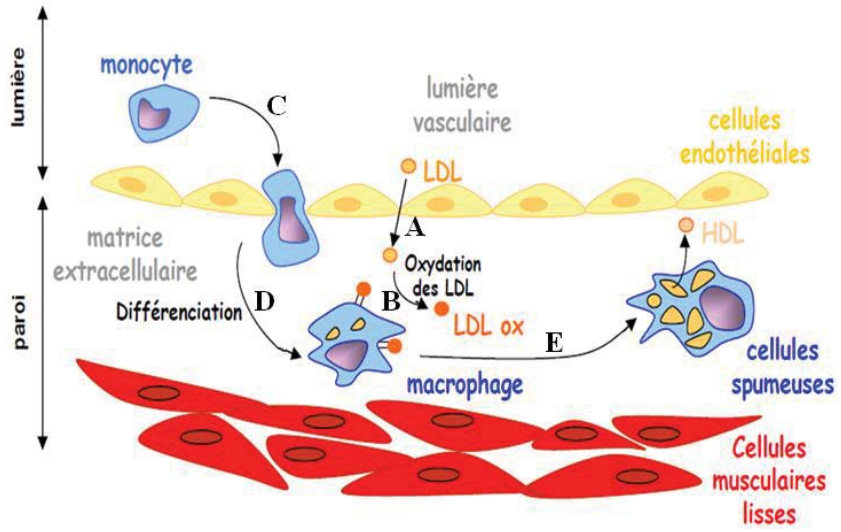


Figure I-7. Mécanisme de l'athérosclérose : formation de la strie lipidique [55].

A : *transcytose et fixation sous-intimale ;* ***B :*** *oxydation des LDL ;* ***C :*** *adhésion des monocytes et diapédèse ;* ***D :*** *transformation des monocytes en macrophages ;* ***E :*** *accumulation des LDL oxydées dans le macrophage qui se transforme en cellules spumeuses.*

c- Evolution de la strie lipidique vers des lésions plus avancées

A ce stade, les CMLs migrent de la média vers l'intima, prolifèrent et perdent ainsi leur phénotype contractile pour un phénotype sécrétoire. Elles sécrètent des protéines de la MEC et du collagène qui contribuent alors à l'élaboration de « la chape fibreuse ». Cette dernière entoure les cellules spumeuses présentes dans la strie lipidique pour former la plaque fibrino-lipidique « plaque d'athérome » (figure I-8) [3, 56].

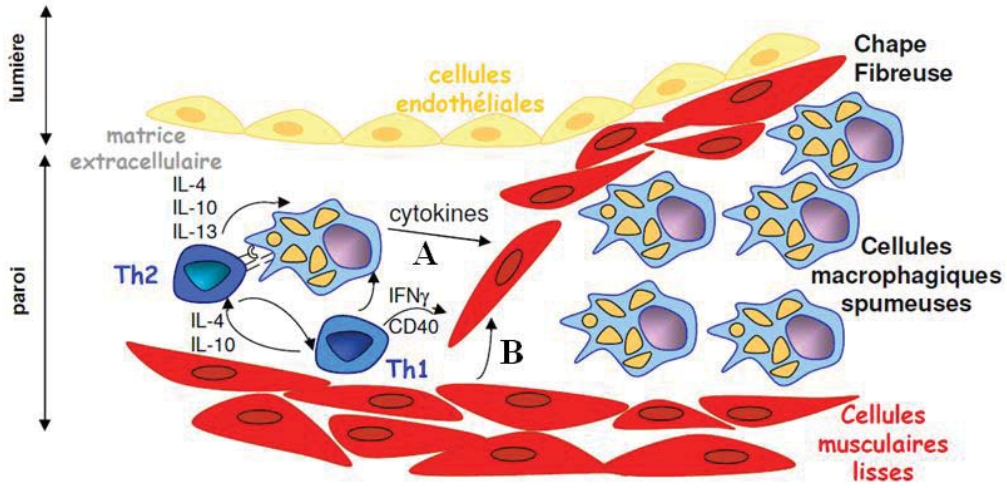


Figure I-8. Mécanisme de l'athérosclérose : progression de la lésion athéromateuse [55].
A : *réactions inflammatoires ;* ***B :*** *recrutement des CMLs, migration et dédifférenciation.*

Cette plaque évolue et se développe entraînant « une sténose ». A cet effet, la paroi artérielle se modifie et met en place le phénomène de « remodelage compensateur » en se dilatant. En parallèle à ce phénomène, plusieurs cytokines inflammatoires (IL-1, interferon IFN-γ …) sont recrutées dans le processus de l'apoptose (mort cellulaire programmée) de différents types cellulaires (CMLs, CEs, macrophages, cellules spumeuses et lymphocytes). L'apoptose entraîne un agrandissement du noyau lipidique. Les cytokines pro-inflammatoires altèrent les propriétés anti-thrombotiques de l'endothélium en favorisant un phénomène de thrombose [47].

V-4- La sténose

L'augmentation du volume de la plaque entraîne progressivement une réduction du calibre de la lumière artérielle ce qui obstrue partiellement la circulation sanguine et engendre ce qu'on appelle « la sténose ». Jusqu'à un stade déjà avancé, le développement de la plaque dans la paroi du vaisseau peut être compensé par une augmentation du diamètre de l'artère permettant de retarder la survenue des sténoses : le phénomène de remodelage compensateur

[45]. Progressivement, les efforts de compensation sont extrêmement importants à mettre en place et la sténose devient significative et serrée [57].

La sténose est liée à l'existence de deux types de plaques [58-61] :

- ***Plaque d'athérome stable*** : cette plaque est composée d'un petit centre lipidique (5% de la composition de la plaque) recouvert d'une chape fibreuse épaisse formée de CMLs et de collagène qui minimise le risque de rupture et stabilise la plaque [45].

- ***Plaque d'athérome instable*** : est composée d'un centre lipidique très volumineux (32% de la composition de la plaque) [45]. à haute teneur en cholestérol qui diminue la résistance physique de la plaque ; cette partie est séparée de la lumière artérielle par une fine couche fibreuse. Il s'agit d'une plaque vulnérable [62-64].

V-5- Evolution finale de la plaque d'athérome

La plaque d'athérome peut se compliquer par le développement des ruptures de la surface de la lésion, par des hémorragies sous-plaque ou intra-plaque et par des dépôts thrombotiques (figure I-9) [41, 42].

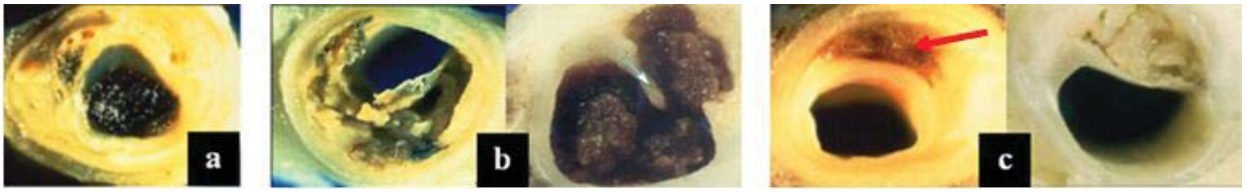


Figure I-9. Plaque d'athérome compliquée [41, 46, 47] .

a) ulcération de la plaque ; b) la rupture de plaque ; c) hémorragie intra-plaque.

- ***Ulcération de la plaque*** **:** la plaque ulcérée est caractérisée par la rupture de l'endothélium au niveau de la plaque mettant son contenu dans la circulation [31] et entraînant l'adhésion plaquettaire (thrombose). La plaque s'ulcère progressivement dans la lumière artérielle et peut être la source d'embolies par libération des substances athéromateuses dans le sang (figure I-9, a) [41, 46, 47].

- ***Rupture ou fissure de la plaque*** **:** l'extrémité rompue de la chape fibreuse expose le matériel thrombogénique en contact avec les plaquettes circulantes. L'adhésivité de ces dernières est stimulée et conduit à une thrombose locale (figure I-9, b) [41].
- ***Hémorragie sous ou intra-plaque*** **:** une hémorragie est possible entre la paroi et la plaque (hémorragie sous-plaque) ou dans le noyau lipidique (hémorragie intra-plaque). Ces

hémorragies sont à l'origine de la rupture du *vasa vasorum* de la paroi artérielle ou de la pénétration du sang venu de la lumière artérielle à travers une ulcération (figure I-9, c) [41, 46].

La cause principale de ces phénomènes est la défection de la chape fibreuse de la plaque menant à sa rupture [65, 66]. La nécrose (mort cellulaire non-programmée) des cellules spumeuses est un facteur essentiel dans la rupture de la plaque. L'ensemble de ces événements mène à l'initiation de la coagulation et à la formation d'un thrombus (figure I-10).

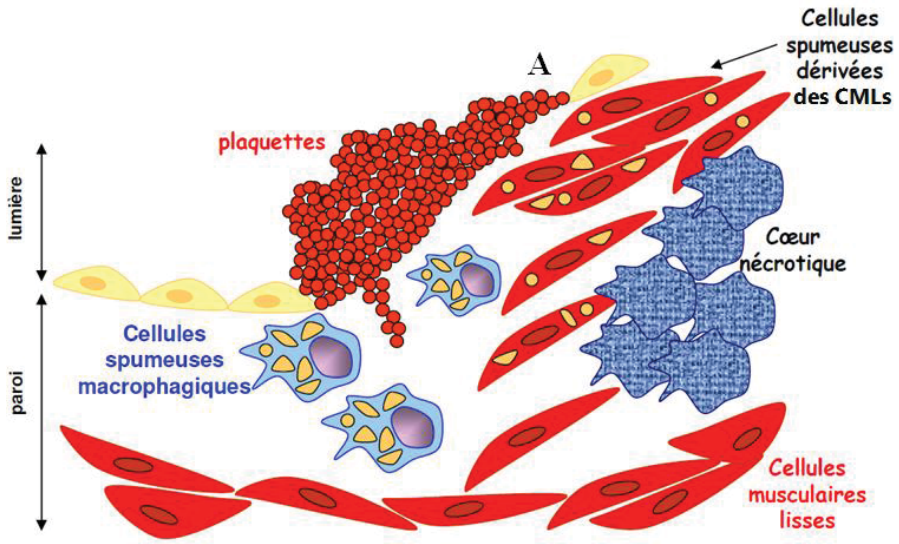


Figure I-10. Mécanisme de l'athérosclérose : rupture de plaque et thrombose [55].
A : *dysfonction endothéliale et adhésion plaquettaire.*

VI- Traitements et complications de l'athérosclérose

VI-1- Méthodes de traitement

Plusieurs techniques sont disponibles pour pallier aux complications d'athérosclérose selon le degré et la localisation de la lésion [67, 68]. Une prise médicamenteuse (statines, aspirine, nitrates et bêta bloquants) accompagnée d'un régime alimentaire équilibré en éliminant les facteurs de risque possibles (alcool, cigarette) peuvent réduire le risque d'avancement de la maladie. Cependant, ce traitement médicamenteux n'est pas toujours efficace et pourra conduire à de nombreux effets secondaires [57]. Il est donc nécessaire de trouver une nouvelle technique agissant localement et de façon efficace qui pourrait stimuler

le retablissement de la paroie arterielle par la favorisation de la ré-endothélialisation (retablissement des CE).

VI-1-1- Chirurgie classique

Dans le cas d'une chirurgie classique, il s'agit de remplacer la partie endommagée de l'artère par un conduit cylindrique qui peut à nouveau permettre la circulation sanguine. Cette prothèse est généralement fabriquée en Téflon (Polytétrafluoroéthylène PTFE) ou en Dacron (Polyéthylènetéréphtalate PET) [69]. Actuellement, cette technique est très utilisée et bien maîtrisée mais elle nécessite une intervention chirurgicale lourde et invasive. La tendance actuelle semble *s'orienter vers* des techniques moins invasives comme la chirurgie endovasculaire.

VI-1-2- Chirurgie endovasculaire

Dans le cas de cette chirurgie, il s'agit d'amener une prothèse sur le site de la lésion artérielle par voie percutanée via un cathéter dont le suivi serait fait par les techniques d'imageries médicales [70]. Différentes techniques sont classées selon le type d'intervention [71]:

a- Athérectomie : cette technique consiste à éliminer la plaque sténosante par meulage en utilisant un cathéter muni d'une tête rotative coupante. Il existe trois types d'athérectomie :

a-1- L'athérectomie rotationnelle est la plus utilisée. Elle consiste à meuler la plaque durcie en petites particules grâce à une fraiseuse en diamant placée au bout du cathéter (figure I-11, c).

a-2- L'athérectomie directionnelle sert à éliminer des plaques moins dures. Un ballonnet et une lame se trouvent au bout du cathéter. Après l'insertion de ce dernier, le ballonnet est gonflé en mettant la lame en contact avec la plaque, qui va être coupée, stockée dans une cellule spéciale et évacuée ensuite par le cathéter (figure I-11, d).

a-3- L'athérectomie transluminale permet de découper la plaque à l'aide d'une lame rotative posée au bout du cathéter doté d'un système de vide qui va aspirer les débris et les éliminer.

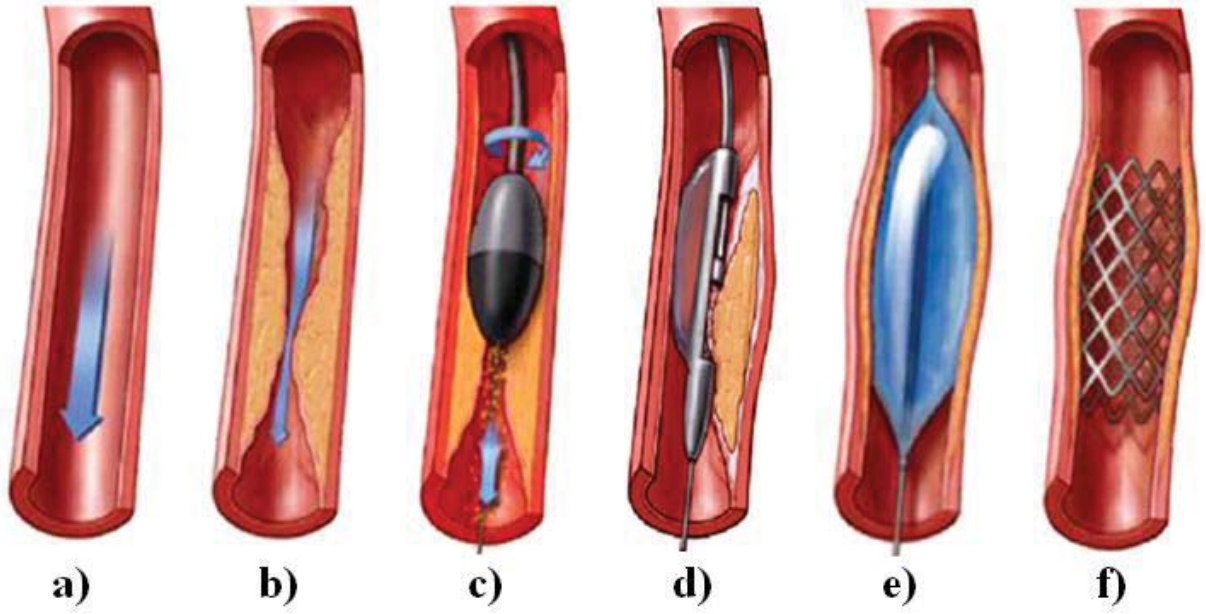


Figure 11. Traitements mécaniques de l'athérosclérose [33].

a) artère saine, b) artère sténosée, c) athérectomie rotationnelle, d) athérectomie directionnelle, e) angioplastie par ballonnet, f) angioplastie avec pose de stent nu.

Une angioplastie par laser qui consiste à utiliser l'énergie thermique du laser peut donner le même résultat que l'athérectomie. Ces techniques permettent de détruire la plaque d'athérome en produisant des débris. Cependant, ces débris peuvent entraîner un risque d'embolie en se déplaçant dans la circulation sanguine et obstruant ainsi les capillaires.

b- Angioplastie par ballonnet : c'est la première technique utilisée et la plus accessible dans le cas d'une sténose artérielle [70]. Elle consiste à rouvrir l'artère rétrécie ou obstruée par gonflement d'un ballonnet placé au bout d'un cathéter et augmenter ainsi le débit sanguin (figure I-11, e). Cette technique est généralement accompagnée d'un traitement médicamenteux ou de l'utilisation d'une prothèse endovasculaire permanente appelée *stent* (figure I-11, f) (définition détaillée dans le paragraphe-VI-2-1 ci-dessous).

Cette technique a fait ses preuves. Néanmoins deux complications majeures ont été observées au cours de 3 à 6 mois suivant l'implantation : (i) dans 5 à 8% des cas, de brutales occlusions des artères traitées ; (ii) dans plus que 30% des cas, une reconstitution de la plaque sténosante [72-75].

b-1- La resténose due à l'angioplastie par ballonnet : la resténose est définie par un nouveau rétrécissement de la lumière artérielle dans les six premiers mois après le traitement de l'artère [76].

Le mécanisme conduisant à la reformation de la nouvelle plaque d'athérome (resténose) a, cette fois-ci, une composition différente de celle provoquant la sténose. *Elle constitue une forme accélérée de l'athérosclérose* [77]. Ce phénomène de resténose imparfaitement connu et défini comme étant une réponse cicatricielle de la paroi artérielle [78]. Il implique une rétraction ou un recul élastique (remodelage constructif) et une hyperplasie intimale.

- Le recul élastique : après le dégonflement du ballonnet, l'artère dilatée implique naturellement ses propriétés mécaniques (élasticité) en se rétrécissant progressivement (vasoconstriction) et diminuant ainsi le calibre de la lumière artérielle de presque 50% sans modification de l'épaisseur de la paroi [79, 80]. Ce phénomène joue un rôle non négligeable dans la resténose (figure I-12) [81].

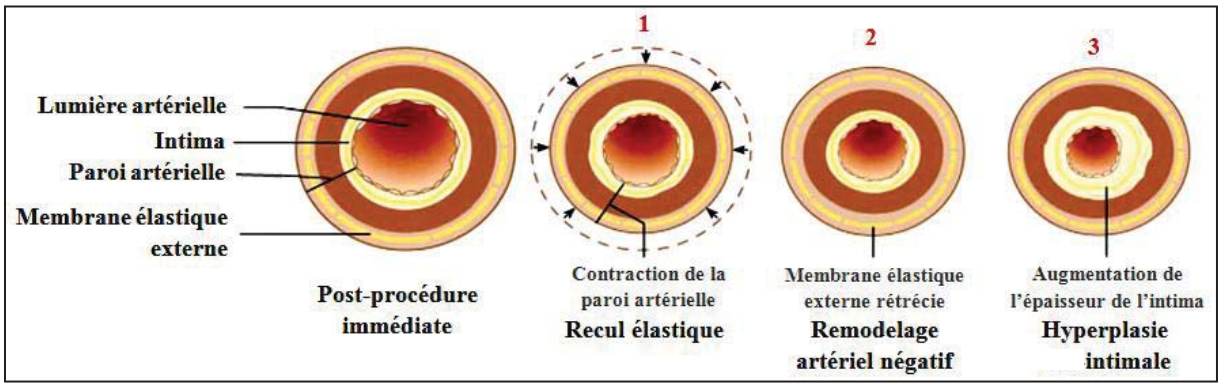


Figure I-12. Physiopathologie de la resténose après angioplastie au ballonnet : remodelage constructif et hyperplasie intimale [14, 81].

(1) Retour élastique de la paroi ; (2) Remodelage constructif des trois tuniques de la paroi artérielle ; (3) hyperplasie intimale par prolifération des CMLs.

- L'hyperplasie intimale : participe à la diminution de la lumière artérielle par une augmentation de l'épaisseur de la paroi artérielle. Cette augmentation est due à la prolifération incontrôlée des CMLs dans la média qui migrent et prolifèrent par la suite dans l'intima et le recrutement des leucocytes, des monocytes et des plaquettes. pour former ainsi une nouvelle couche (néo-intima). La lumière artérielle est de nouveau réduite. Les réactions biologiques impliquées dans ce processus seront bien expliquées dans le paragraphe VI-2-2 : resténose intra-stent [82].

b-2- Afin de limiter le risque de resténose après une angioplastie par balonnet, plusieurs médicaments ont été testés (les statines, les antiagrégants plaquettaires et les anticoagulants). Toutefois, ces traitements n'ont pas fait leurs preuves [83].

Pour cette raison, la première solution apportée pour affronter ce problème de resténose est de rajouter une prothèse endovasculaire permanente lors de la dilatation de l'artère sténosée appelée « *stent* ». Cette technique permet de donner en plus une résistance mécanique à la paroi artérielle et empêcher ainsi son recul élastique [72, 74, 75, 84-86].

c- Angioplastie par pose de stent : la pose d'un stent peut être réalisée en le plaçant sur un cathéter à ballonnet qui va permettre au stent de se déployer lors du gonflement du ballonnet. Ce dernier est ensuite dégonflé et retiré. Le stent déployé reste en place contre la paroi pour maintenir la lumière artérielle ouverte (figure I-13).

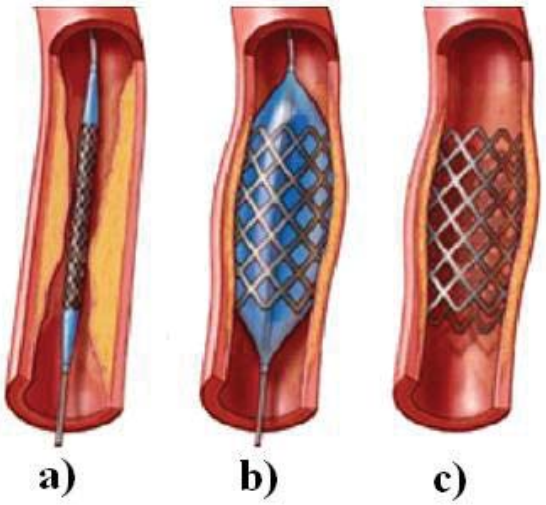


Figure I-13. Procédure de déploiement d'un stent [33].

a) stent et ballonnet non ouverts avancés à travers la lésion rétrécie, b) ballonnet gonflé et stent ouvert permettant l'élargissement de la zone rétrécie, c) maintien du vaisseau élargi par le stent.

VI-2- Endoprothèses coronaires

VI-2-1- Stents nus

Un stent coronaire est un petit ressort métallique maillé de forme variable et d'un diamètre de l'ordre du millimètre une fois déployé. Ce dispositif se déploie dans le site de la lésion afin de renforcer la tenue mécanique de l'artère et d'écraser la plaque sténosante contre la paroi artérielle en rétablissant de nouveau le passage du sang (figure I-13). L'origine du terme « *stent* » est associée au nom du dentiste anglais Charles Stent qui a mis au point un dispositif pour la correction de l'alignement dentaire mais l'étymologie exacte de cette appellation est discutable. Le premier stent est le WallStent introduit par Jacques Puel en 1986 [87] Cette technique est devenue courante dans les années 1990 [88].

Cette endoprothèse permanente est utilisée pour empêcher le recul élastique précoce de l'artère, la principale cause de limitation d'angioplastie par ballonnet. Pour ce fait, le stent déployé dans l'artère doit adopter plusieurs critères qui peuvent être considérés comme une fiche technique type à respecter pour valider son utilisation médicale :

- *Critères techniques* : les dimensions et le design du stent doivent être choisis en fonction de la lésion avec de fines mailles pour limiter le risque thrombotique en présentant une compatibilité avec le cathéter guide et une visibilité par imagerie médicale ;
- *Critères mécaniques* : une fois déployé, le stent doit présenter une résistance à l'écrasement, un faible recul élastique et un faible raccourcissement ;
- *Critères cliniques* : l'efficacité et la tolérance à court terme (6 mois suivant l'intervention) d'un stent sont évaluées par rapport à sa capacité à favoriser la ré-endothélialisation et à limiter le risque thrombotique et la resténose néo-intimale ;
- *Critères économiques* : « le prix d'un stent est *de l'ordre de 600 à 850 € pour les stents nus et de 1 500 à 2 100 € pour les stents recouverts actifs »* [89].

Les matériaux généralement utilisés pour la fabrication des stents sont l'acier inoxydable AISI 316L, l'alliage platine-iridium (Pt-Ir), le tantale (Ta), le titane (Ti), l'alliage nickel-titane (nitinol Ni-Ti), l'alliage cobalt-chrome (Co-Cr), les alliages du magnésium (Mg) ou le fer pur (Fe) [89].

L'acier inoxydable AISI 316L présente des propriétés mécaniques bien adaptées et une bonne résistance à la corrosion. Pour ces raisons, il est le matériau le plus fréquemment utilisé (70% des stents commercialisés). C'est un alliage contenant principalement du fer (60-65 %), du chrome (16-18%), du nickel (10-14%) et d'un faible pourcentage en carbone (<0,03%), en manganèse (2,0%), en silicium (1,0%), en phosphore (0,045%), en souffre (0,03%) et en molybdène (2-3%) [90, 91]. Cependant, il présente un problème de biocompatibilité après exposition en milieu biologique. Cela est du au relarguage nocif d'éléments métalliques (corrosion du métal), les allergies et les réactions inflammatoires dues au molybdène et au nickel [92, 93].

L'alliage Pt-Ir contenant 90% et 10% respectivement présente une excellente radio-opacité, une bonne résistance à la corrosion mais il présente de mauvaises propriétés mécaniques. Le Ta et le Ti présentent une excellente résistance à la corrosion et une meilleure biocompatibilité en raison de sa surface très stable qui empêche l'échange d'électrons entre le

métal et le milieu biologique. Le Ta a été déposé sur l'AISI 316L afin d'améliorer les propriétés de corrosion de l'acier inoxydable et ainsi sa biocompatibilité. Cependant, il présente de mauvaises propriétés mécaniques ce qui limite sa disponibilité commerciale. Le Ti seul a une très faible résistance à la traction ce qui limite son utilisation comme le seul matériau pour la fabrication des stents. Par contre, comme alliages avec d'autres matériaux, il réduit sa limite d'élasticité (ex : alliage Ni-Ti) [94].

L'alliage Ni-Ti contenant 49,5-57,5% de nickel est utilisé principalement pour la fabrication des stents auto-expansibles [d] en raison de son effet de mémoire de forme. A température ambiante, il présente un diamètre inferieur au diamètre prédéfini. En revanche, il s'élargit pour atteindre ce diamètre à la température corporelle (Cordis SMART Stent avec un diamètre de 10 mm après déploiement maximal à 37°C) [94]. Il a également des propriétés mécaniques convenables mais des problèmes de corrosion discutables qui nécessitent des traitements de la surface [94].

Les alliages Co-Cr sont depuis peu utilisés pour la fabrication des stents. Ils présentent une excellente résistance radiale en raison de leur module d'élasticité élevé. Ils ont la capacité de former des stents de très faibles épaisseurs, radio-opaques et compatibles à l'imagerie par résonance magnetique (IRM) [94].

En résumé : les propriétés basiques communes entres ces métaux sont présentés dans le tableau I-1 :

Tableau I-1. Différence relative entre les trois alliages métalliques utilisés comme biomatériaux cardiovasculaires [94].

Propriétés	AISI 316L	Alliages Co-Cr	Alliages Ti
Rigidité	+++	++	+
Résistance	++	+	+++
Résistance à la corrosion	+	++	+++
Compatibilité sanguine	+	++	+++

En effet, l'implantation d'un stent métallique représente actuellement un bénéfice en pathologies cardiovasculaires et limite le risque de resténose [74]. Néanmoins, dans 20 à 30% des cas, la cicatrisation de la paroi artérielle après l'implantation induit une réduction de la lumière artérielle d'une façon plus au moins importante [95, 96]. Cela est accompagné par

[d] Un stent auto-expansible est pré-monté et maintenu sur un cathéter par une gaine externe qui le recouvre. Lorsque la gaine externe est retirée, le stent se déploie, prend son diamètre et sa forme prédéterminés.

une reproduction de la plaque sténosante intra-stent due cette fois-ci à un phénomène d'hyperplasie intimale [71].

VI-2-2. Resténose intra-stent et traitements

Après la mise en place du stent métallique, une circulation du sang est rétablie. Toutefois, cette action entraîne la dénudation de l'endothélium et rétabli un recouvrement de plaquettes et de fibrine [97] Une réaction de cicatrisation de la paroi est nécessaire afin de permettre la réendothélialisation des zones de la paroi artérielle endommagées. En effet, lorsque cette réparation physiologique est excessive, elle peut induire une resténose intra-stent. Elle est due à un phénomène d'hyperplasie intimale (figure I-14) [71].

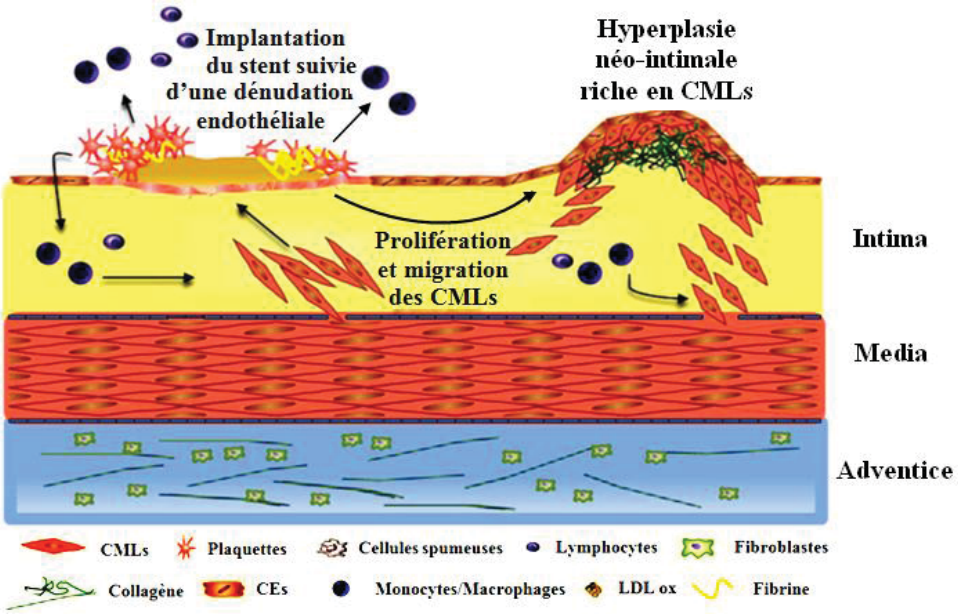


Figure I-14. Resténose intra-stent [98].

Ce processus peut se produire suivant une cascade de réactions biologiques sur deux phases : (i) la phase précoce immédiate qui est une phase d'inflammation et d'activation plaquettaire (figure I-15, A et B). Ces dernières vont être activées par les facteurs exprimés par les CEs lésées et s'agréger à l'endothélium [99] ; (ii) la phase tardive qui entraine la différentiation, la migration et la prolifération des CMLs vers la néo-intima et la sécrétion ainsi de la MEC provoquant une récidive de la plaque sténosante et exprimant ainsi plusieurs molécules pro-inflammatoires (macrophages Inflammatory Protein 1, (IL-1), et (l'IL-6)) (figure I-15, C) [100, 101].

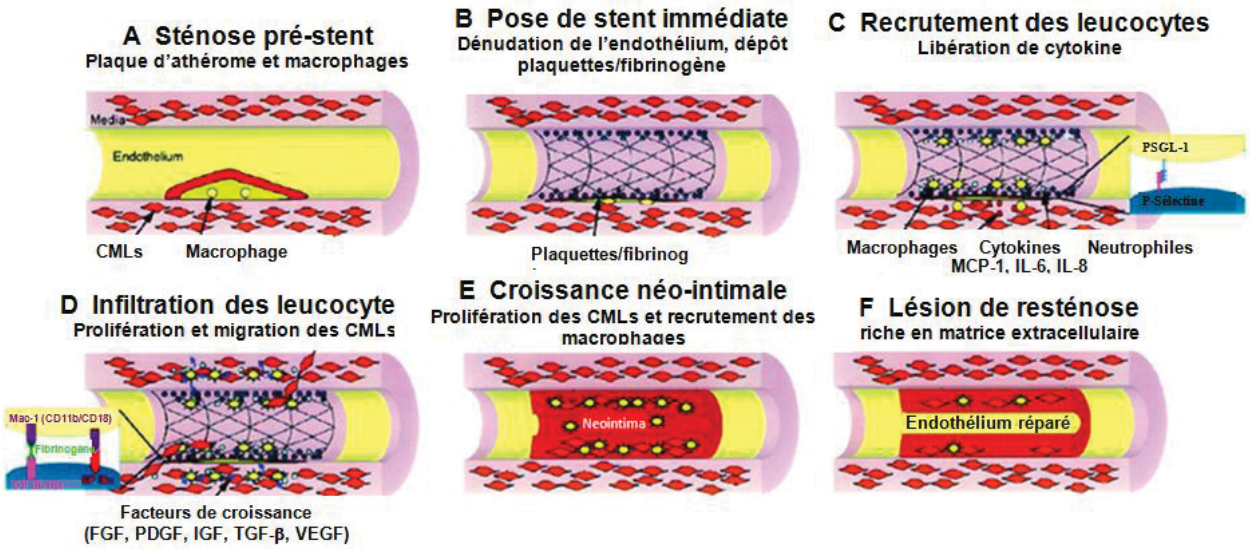


Figure I-15. Mécanisme de la resténose intra-stent *[102]*.

A : *avant intervention, plaque athéromateuse mature ;* ***B, C, D :*** *après la pose du stent, réponse précoce avec recrutement plaquettaire, recrutement et infiltration des leucocytes, libération de cytokines, prolifération des CMLs et recrutement des macrophages;* ***E :*** *quelques semaines après intervention, progression de l'hyperplasie intimale et maintien de la prolifération des CMLs et recrutement des monocytes ;* ***F :*** *plusieurs semaines après la pose du stent, forte hyperplasie intimale et rétrécissement de la lumière artérielle.*

Les plaquettes, les macrophages et les CMLs produisent les facteurs de croissances tels que le Platelet Derived Growth Factor (PDGF), le Transforming Growth Factor-Bêta (TGF-β) et le basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) qui sont responsables de leur migration et de leur prolifération incitant ainsi la synthèse de la MEC (figure I-15, D-F) [103, 104].

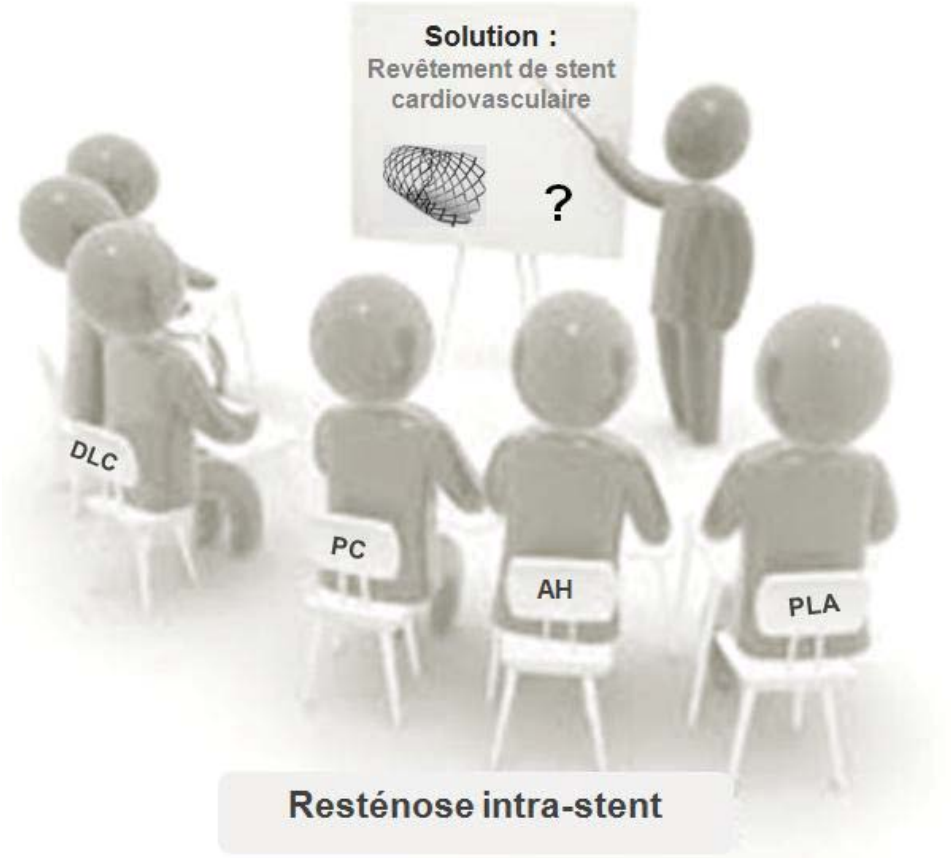
En conclusion, la resténose survenant après la pose du stent nu est à l'origine de plusieurs phénomènes qui se produisent à sa surface. L'utilisation des molécules telles que le tranilaste, les corticostéroïdes et l'acide anthanilique n'a pas permis le blocage de ce phénomène. Par ailleurs, d'autres tentatives thérapeutiques ont eu lieu comme l'athérectomie rotative, l'implantation d'une seconde endoprothèse et le laser. Aucune de ces techniques ne s'est révélée efficace. La solution envisagée pour faire face à ces complications et améliorer les interactions matériau-milieu biologique est de recouvrir le stent métallique par une couche protectrice (stent recouvert).

Chapitre I : étude bibliographique

2ème partie :

Traitement de la resténose intra-stent : stents recouverts

« SOLUTION »



Les stents recouverts développés Les stents recouverts développés à ce jour sont soit des stents sans relargage de médicaments soit des stents à élution médicamenteuse (SEMs) qui libèrent localement des principes actifs. Ils constituent une avancée majeure dans l'évolution des stents et sont utilisés pour faire face aux risques de resténose. Cette deuxième partie du chapitre I évalue ces stents recouverts et les avantages et les inconvénients des différents matériaux utilisés pour leur recouvrement. Les propriétés physicochimiques et biologiques seront également décrites.

I- Stents recouverts

- ***Pourquoi ce revêtement ?***

Compte tenu des causes susmentionnées de la resténose intra-stent, les études scientifiques poursuivent la recherche pour mettre en place un système de revêtement idéal qui respecte le cahier des charges pour un revêtement d'un *stent* cardiovasculaire [105, 106]. En effet, en plus de sa biocompatibilité, ce revêtement doit :

- favoriser la cicatrisation de la paroi artérielle (ré-endothélialisation) et la regénération de l'intima
- empêcher la prolifération et la migration des CMLs et l'adhésion plaquettaire.
- résister aux phénomènes imposés par le déploiement du stent et par le flux sanguin (frottement, déformation, cisaillement).

Par conséquent, ce revêtement sert de barrière protectrice entre le milieu biologique et le métal ce qui peut empêcher la libération des ions métalliques (corrosion du métal) et diminuer donc le taux de resténose. Il permet de modifier la composition chimique, la rugosité et l'épaisseur de la surface du métal. Cette matrice doit donc respecter les critères de choix d'une endoprothèse coronaire et suivre alors le déploiement du stent et sa déformation plastique. Ces caractéristiques fortement primordiales sont résumées dans le tableau I-2 :

Tableau I-2. Caractéristiques physicochimiques et biologiques du revêtement de stent.

Caractéristiques requises pour le revêtement du stent métallique		
Physicochimiques	**Mécaniques**	**Biologiques**
1- Resistance à la stérilisation 2- Absence de contamination 3- Protection contre la corrosion 4- Adhérence au métal 5- Rugosité minimale 6- Homogénéité 7- Stabilité thermique 8- Hydrophobie	1- Élasticité 2- Adhérence à la surface 3- Resistance à l'usure provient du phénomène de cisaillement de la paroi artérielle	1- Non cytotoxique 2- Non cancérigène 3- Non thrombogène 4- Favoriser la reconstruction de l'endothélium 5- Bloquer l'hyperplasie intimale.

De plus, le revêtement idéal doit présenter une bonne résistance au processus de stérilisation ainsi qu'aux attaques chimiques du milieu physiologique [107]. Il doit également avoir une rugosité minimale pour limiter l'adhésion plaquettaire et donc le risque de la réponse inflammatoire [108]. Une élasticité suffisante est nécessaire pour que le matériau suive la déformation plastique du stent et conserve sa bonne adhérence au substrat. Il est nécessaire que le revêtement utilisé résiste à l'usure et aux contraintes de cisaillement de la paroi artérielle (de l'ordre de 0,7 Pa) et à celles imposées par le flux sanguin [109]. Ce recouvrement avec ou sans principe actif doit présenter une bonne biocompatibilité et il ne doit pas être toxique, cancérigène ou thrombogène. Il est très fortement recommandé d'utiliser un matériau qui favorise la ré-endothélialisation et empêche la prolifération des CMLs [91].

II- Types de revêtements

Plusieurs techniques sont utilisées pour effectuer ce recouvrement : par trempage [110, 111], par galvanisation [112], par pulvérisation simple ou suivie par un bombardement ionique [112-114] ou par des procédés plasma[115-119].

Deux types de stents recouverts existent : des stents à revêtements passifs et des stents dits actifs.

II-1- Stents à revêtements passifs

Ces revêtements sont dits passifs car ils ne relarguent pas un principe actif. Il existe trois types de revêtements : inorganiques, polymères ou cellules. Ces revêtements minimisent les interactions entre le métal et les tissus environnants et assurent la fonction de la barrière protectrice du stent de la corrosion ou encore diminuent dans certains cas le taux de resténose. Plusieurs recouvrements ont été étudiés. Les matériaux utilisés pour le recouvrement passif de stents métalliques peuvent être classés en : revêtements inorganiques, matériaux poreux, cellules endothéliales et polymères (tableau I-3).

Les matériaux inorganiques utilisés sont : l'or, l'oxyde d'iridium, nitrure de titane et les carbones (carbure de silicium, carbone amorphe (DLC : Diamond Like Carbon) et carbone pyrolytique). Les matériaux poreux étudiés sont le polyuréthane (PU) et l'oxyde d'aluminium. Les polymères utilisés pour recouvrir les stents métalliques sont des polymères bio-stables (non biodégradables), des polymères biodégradables, des polymères biologiques ou des copolymères (tableau I-3).

Tableau I-3. Evaluation (forces et faiblesses) des revêtements passifs [91, 120-141].

Revêtements			Littérature	
			Forces	**Faiblesses**
Inorganique	Matériaux	Or	Très bonne résistance à la corrosion, biocompatibilité et visibilité. *in vitro* : ↘ prolifération néo-intimale et réponse inflammatoire.	*Etudes cliniques (ECs)* : ↗ prolifération néo-intimale et thrombose / stent nu.
		Oxyde d'iridium	Hautement biocompatible. ↗ l'endothélialisation et ↘ l'inflammation et recrutement des CMLs par la conversion du H_2O_2 en H_2O et O_2.	*ECs* insuffisants.
		Nitrure de titane	Bon candidat pour ↘ agrégation plaquettaire et ↘ prolifération des CMLs.	
	Carbone	Carbure de silicium	Matériau semi-conducteur prometteur pour ↘ resténose. Antithrombogène, ↘ dépôt plaquettaire. Résultats très encourageants, *in vitro*.	Contradictoires in vivo. Manque d'élasticité.
		DLC	*In vitro* : réduction d'activation plaquettaire et de thrombogénicité.	*ECs* : pas différence/stent AI 316L, manque d'élasticité.
		Carbone pyrolytique	Revêtements des stents en AI 316L nécessitent des T°C ↗ pour le dépôt et appliqué en couches épaisses.↗ adhésion de CEs. ↘ risque de thrombose.	Conditions de dépôt pas adaptées. Pas d'amélioration clinique significative. Manque d'élasticité.
Matériaux poreux		PU et oxyde d'aluminium	Films de PU avec micropores et des revêtements nanoporeux d'OAl (↘ la taille des pores → ↗ le temps de relargage du PA).	
			↗ l'endothélialisation	Pas d'effet significatif sur la ↘ néo-intima *in vivo*.
Cellules endothéliales (CEs)			Stratégie limitée par la perte ou l'endommagement d'une partie des CE lors de l'implantation et de déploiement du stent ou à cause des contraintes imposées par le flux sanguin.	
Polymères	Polymères biostables	PET, PU, PFVD/HFP	Bonnes propriétés mécaniques. Résultats clinique prometteurs pour PFVD/HFP mais pas définitifs.	Déclenchement de la réponse inflammatoire (PU). ↗ risque de resténose (PET). *In vivo* : inflammation chronique et réponse néo-intimale proliférative intense pour PET et PU.
	Polymères biodégradables	PLLA, POE, PCL	*ECs* : résultats encourageants. Mécanisme de biodégradation pas complètement compris pour le PLLA.	Déclenchement de la réponse inflammatoie
	Copolymères	PLGA, PHBV, POE-PBT, MAM - MAHE, EVA; LMA-MPC, CPU, CH/POE	Evalués en tant que SEM en raison de leur excellente biocompatibilité et afin d'améliorer les propriétés thrombogène du Ta*, la résistance à la corrosion de Ni-Ti [51] et la biocompatibilité de l'AI.	
			↗ l'endothélialisation mais *ECs* pas suffisants pour les catégoriser comme bons revêtements de stents métalliques	Déclenchement de la réponse inflammatoire
	Polymères biologiques	Phospholipides : PC	Structure à la fois hydrophile et hydrophobe, imite la fonction des lipides de la membrane des cellules humaines. Biocompatible et non allergique, utilisé pour empêcher l'adhésion des cellules induisant la coagulation et donc ↘ la formation du thrombus et la réaction inflammatoire. Confirmation clinique. Résultats encourageants pour être un bon candidat pour les SEM.	
		GAG : Héparine	Utilisé pour son caractère antithrombotique, anti-adhérence des plaquettes et pour son effet antiprolifératif des CMLs mais pas d'amélioration de la resténose ou de la thrombose par rapport au stent en AI.	
		Polysaccharides : AH, CH	AH : étudié pour améliorer la thrombo-résistance des stents. ↘significative de dépôt des plaquettes et de la réaction inflammatoire. CH : résultats encourageants *in vitro* nécessitent des études *in vivo* pour prouver son potentiel clinique.	
		Fibrine	Caractère viscoélastique. Rôle potentiel pour être un bon revêtement *in vivo*. *ECs* humaines nécessaires pour valider ces résultats.	

L'évaluation de ces différents matériaux comme revêtement de stents métalliques est présentée dans le tableau I-3. Bien que l'augmentation de la prolifération néo-intimale soit limitée par rapport à la réponse induite par les stents métalliques nus, la réaction inflammatoire aux corps étrangers est significative dans la majorité des cas.

II-2- Stents actifs

Contrairement aux stents à revêtements passifs qui visent à réduire la réponse inflammatoire par une interaction non spécifique, les stents à revêtements actifs offrent un moyen plus direct pour moduler la réponse du système immunitaire après l'implantation du stent. Quatre parties sont donc nécessaires :

a- Le stent métallique (plateforme) ;

b- Le revêtement polymère ;

c- Le médicament ;

d- Le cathéter pour la mise en place intra-artérielle.

Les stents actifs peuvent comporter différentes molécules bioactives telles que des facteurs de croissance, des agents anti-inflammatoires ou ntiprolifératifs. Cette voie est prometteuse pour réduire la resténose en délivrant le médicament localement de façon progressive au niveau de la lésion.

Actuellement, le traitement le plus utilisé pour prévenir la resténose est l'implantation d'un stent à élution médicamenteuse (SEM). Les médicaments qui ont été étudiés en profondeur pour le traitement de la resténose sont l'héparine, le paclitaxel, le sirolimus et le zotarolimus. L'héparine a été efficace dans la réduction à la fois de la prolifération néo-intimale et de la thrombose tandis que le paclitaxel, le sirolimus et le zotarolimus ont été principalement utilisés pour leurs propriétés antiproliférives en bloquant l'hyperplasie néo-intimale (annexe A).

L'héparine (figure I-16) qui a une activité anticoagulante et anti-inflammatoire est le premier agent thérapeutique utilisé. L'héparine a montré une réduction du recrutement des leucocytes [142, 143]. Cependant, son efficacité est limitée par sa non-spécificité et sa réaction avec d'autres protéines du plasma. Cela nécessite son utilisation à haute concentration. Afin de moduler cette activation, l'utilisation de médicaments inhibant l'hyperplasie néo-intimale est nécessaire. Ce procédé doit fournir une concentration de

médicaments appropriée et un délai de délivrance d'au moins 30 jours après intervention qui correspond à la période de la reformation néo-intimale [142, 143].

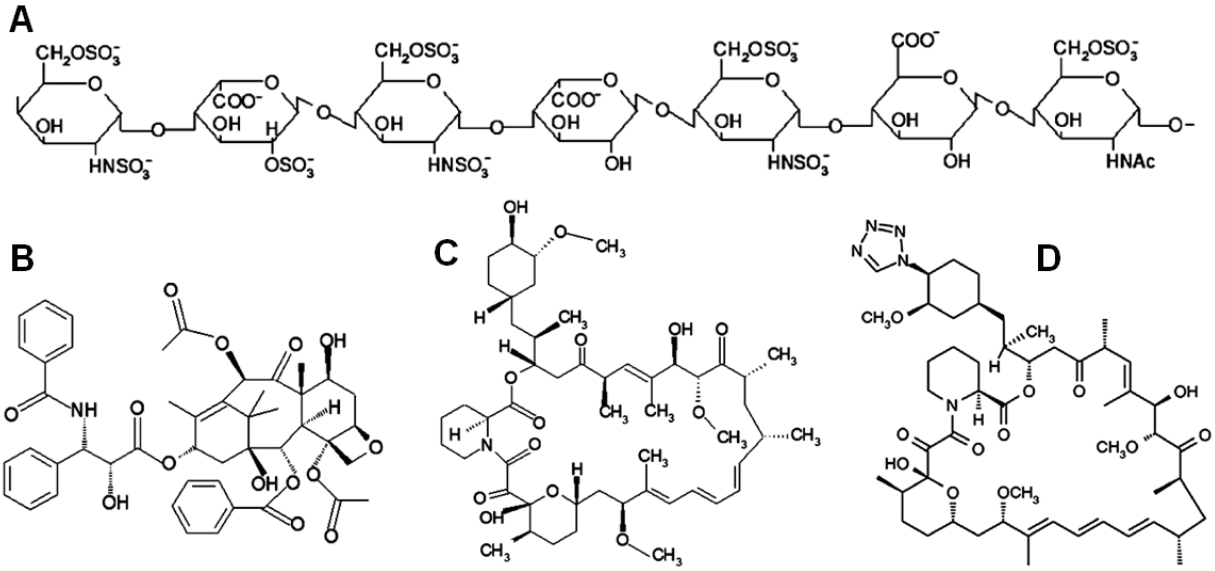


Figure I-16. Structure chimique de (A) héparine, (B) paclitaxel, (C) sirolimus et (D) zotarolimus [142, 143].

Le paclitaxel (figure I-16) est un médicament utilisé dans le traitement du cancer. Il se lie à la protéine qui permet à la cellule de se diviser et de croître. Le complexe protéine-paclitaxel au niveau de la CML inhibe la réplication cellulaire [144].

Le sirolimus et le zotarolimus sont des agents immunosuppresseurs. Ils se lient au récepteur d'une protéine intracellulaire et inhibent la prolifération et la migration des CMLs [227]. [227 228]. Le zotarolimus est le premier médicament synthétisé exclusivement pour le traitement de la resténose intra-stent. Il est produit par une substitution du groupement hydroxyle à la position C40 du sirolimus par un cycle tétrazole (figure I-16) [147].

Pour vectoriser ces différents principes actifs, les polyesters biodégradables tels que la poly(ε-caprolactone) (PCL), le poly(acide glycolique) (PGA), le poly(acide lactique) (PLA) et leurs copolymères (PGLA) sont les matériaux de choix les plus utilisés dans la littérature. Le PLA est le polyester le plus utilisé comme support des SEMs ces dernières années (annexe A) [148-150].

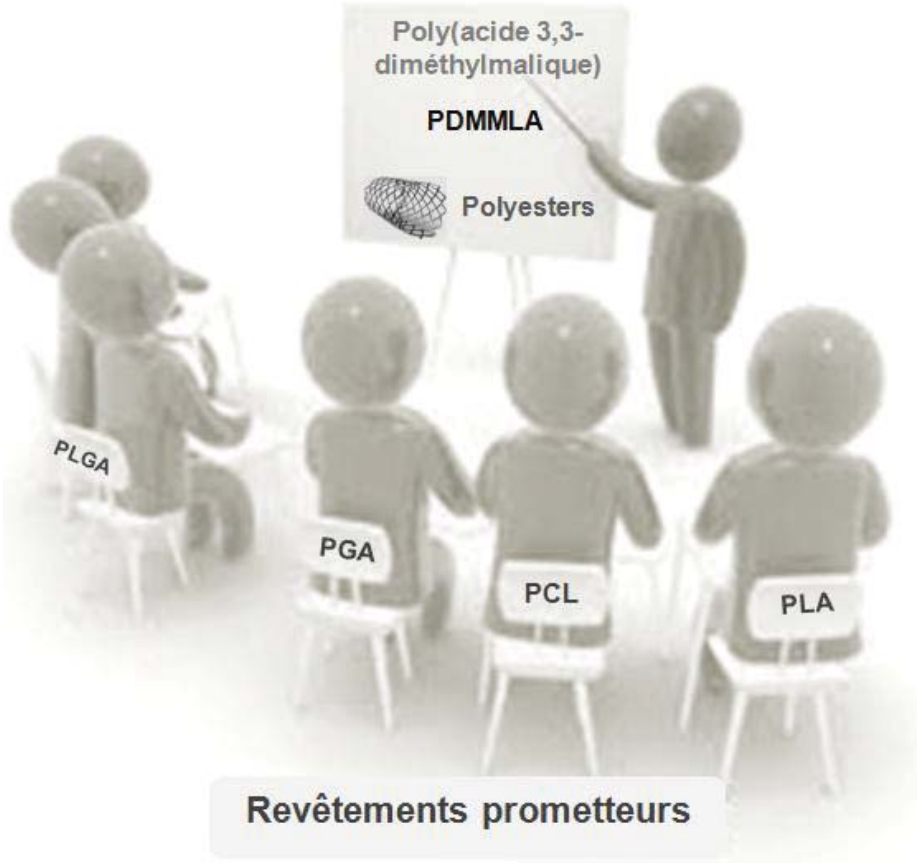
Ainsi, dans la 3ème partie de ce chapitre, une étude bibliographique détaillée est décrite sur les polyesters biodégradables qui sont étudiés comme revêtement de stents cardiovasculaires.

Chapitre I : étude bibliographique

3ème partie :

Polymère biodégradable prometteur

« POLYESTERS ALIPHATIQUES BIODEGRADABLES »



I- Généralités

Les polymères sont des macromolécules obtenues par la répétition d'un grand nombre d'unités monomères reliées par des liaisons chimiques pour donner un seul segment (homopolymère) ou plusieurs segments (copolymères). La chaîne polymère formée peut être linéaire, ramifiée ou réticulée. Les monomères sont des groupements simples fonctionnels qui se diffèrent des polymères principalement par leur masse molaire et leur solubilité.

Un grand nombre de polymères biodégradables a été utilisé pour des applications biomédicales en tant que biomatériau (régénération tissulaire, systèmes d'administration de médicaments, etc.) [151, 152] et notamment dans le domaine cardiovasculaire comme déjà décrit dans la deuxième partie de ce chapitre. En se basant sur la définition d'un biomatériau, un polymère utilisé pour cette fin doit présenter des caractéristiques spécifiques et répondre à certaines exigences [153, 154]. En effet, le matériau doit présenter une durée de stabilité suffisante et une résistance appropriée au processus de traitement. Or, il ne doit pas provoquer une réponse inflammatoire ou toxique après implantation *in vivo*. Ainsi, si ce matériau est conçu pour être biodégradable, son changement au cours de la dégradation doit être prévisible et compatible avec le processus du traitement et le temps de dégradation doit être respecté. Les produits intermédiaires et finaux de dégradation doivent être métabolisés par l'organisme, c'est à dire biorésorbables et biocompatibles. Pour bien comprendre les différentes définitions des biomatériaux polymères, il est important de présenter brièvement quelques généralités [155-159] :

- *Biomatériau* : dans un but thérapeutique, un matériau est destiné à être implanté dans l'organisme et être en contact avec le fluide, les tissus ou l'os d'une manière temporaire ou permanente.
- *Bioabsorbabilité* : dissolution d'un matériau dans le fluide corporel et absorption par l'organisme sans aucune diminution de la masse molaire.
- *Biodégradation* : décomposition du matériau par clivage de ses chaînes macromoléculaires sous l'action des microorganismes naturels (bactéries, champignons et algues) en sous-produits non toxiques pour le milieu biologique (CO_2, H_2O et/ou CH_4 et une nouvelle biomasse). Cette décomposition est accompagnée par la modification ou la perte des propriétés fonctionnelles du matériau.
- *Biofragmentation* : fragmentation du matériau sous l'action des microorganismes.

- *Bioassimilation* : transformation totale d'un corps étranger par des microorganismes en CO_2, CH_4, H_2O, sels minéraux ou biomasse assimilés par l'organisme.
- *Biorésorbabilité* : dégradation d'un matériau *in vivo* jusqu'à la disparition totale de ses produits de dégradation et ne nécessitant pas une élimination mécanique. Il est destiné à se résorber naturellement hors de l'organisme (par filtration rénale ou par métabolisation).
- *Biocompatibilité* : capacité d'un matériau à être accepté par l'organisme vivant tout en assurant sa fonction avec une réponse appropriée et sans effets indésirables. Un matériau est déclaré biocompatible s'il est capable de respecter les différentes normes décrivant les tests biologiques auxquels il doit satisfaire selon son utilisation.

La dégradation et la biocompatibilité de ces matériaux sont strictement affectées par leurs propriétés (structure chimique, charge, cristallinité, solubilité, masse molaire, caractère hydrophile/hydrophobe, énergie de surface, rugosité, corrosion et porosité …) [160].

Les biopolymères sont des polyesters qui peuvent être obtenus par fermentation par des microorganismes (biopolymères naturels) tels que les poly(hydroxyalcanoates) (PHAs) ou par polymérisation des monomères (biopolymères synthétiques) issus de la biomasse tels que le poly(acide lactique) (PLA) ou des ressources fossiles tels que la poly(caprolactone) (PCL), le polyesteramide (PEA) et divers copolymères aromatiques ou aliphatiques.

Selon la définition indiquée ci-dessus, les polymères biodégradables doivent avoir une structure chimique spécifique pour pouvoir se décomposer dans les conditions physiologiques et apporter ainsi des propriétés thermomécaniques et biologiques requises lors de leur utilisation [161]. Les polyesters aliphatiques biodégradables sont actuellement les plus attractifs étant donné qu'ils répondent aux exigences des diverses applications biomédicales. Ceci est principalement dû à leur biocompatibilité élevée, leurs taux de dégradation acceptables et la diversité de leurs propriétés physicochimiques [159, 162]..Cette famille de polyesters sera détaillée dans ce chapitre.

II- Les polyesters biodégradables

Les polyesters (aliphatiques et aromatiques) sont théoriquement dégradables par simple hydrolyse. Les polyesters aliphatiques présentent un intérêt major par leur vitesse de dégradation plus au mois rapide contrairement aux aromatiques. L'hydrophobie et la cristallinité des polyesters aromatiques limitent leur dégradation dans un milieu aqueux ce qui élargi le champ d'utilisation des polyesters aliphatiques aussi bien dans le domaine

biomédical qu'environnemental [154]. Cette étude bibliographique se concentre sur les polyesters aliphatiques.

Les polyesters aliphatiques (figure I-17) constituent un enchaînement des fonctions esters associées à des segments aliphatiques de tailles variables. Leurs unités structurales peuvent être modulées ce qui leur fournit un intérêt supplémentaire.

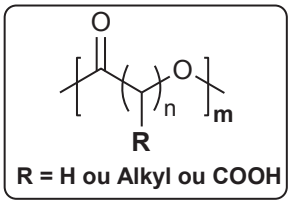


Figure I-17. Structure chimique d'un polyester aliphatique.

Ils peuvent être d'origine naturelle (poly(β-hydroxyacides) ou synthétique (poly(α-hydroxyacides), poly(β-hydroxyacides) et poly(ε-hydroxyacides)). La structure des polyesters aliphatiques les plus utilisés actuellement est présentée dans le tableau I-4 ci-dessous :

Tableau I-4. Les différents polyesters aliphatiques les plus utilisés [149, 163].

Type des polyesters aliphatiques		Noms des Polymères et abréviations	Structures chimiques
(a) Naturels	Poly(β-hydroxyacides)	**(1)** Poly(hydroxybutyrate) PHB	$-[C(=O)-CH_2-CH(CH_3)-O]_n-$
		(2) Poly(hydroxyvalérate) PHV	$-[C(=O)-CH_2-CH(CH_2CH_3)-O]_n-$
		(3) Poly(β-acide malique) PMLA	$-[C(=O)-CH_2-CH(COOH)-O]_n-$
(b) Synthétiques	Poly(α-hydroxyacides)	**(4)** Poly(acide glycolique) PGA	$-[C(=O)-CH_2-O]_n-$
		(5) Poly(acide lactique) PLA	$-[C(=O)-CH(CH_3)-O]_n-$
		(6) Poly(α-acide malique) PMLA	$-[C(=O)-CH(H_2C-COOH)-O]_n-$
	Poly(β-hydroxyacides)	**(7)** Poly(β-acide malique) PMLA	$-[C(=O)-CH_2-CH(COOH)-O]_n-$
	Poly(ε-hydroxyacides)	**(8)** Poly(ε-caprolactone) PCL	$-[C(=O)-(CH_2)_5-O]_n-$

II-1- Les polyesters naturels

II-1-1- Poly(β-hydroxyalcanoates) (PHAs)

Les poly(β-hydroxyalcanoates) (PHAs) sont des polyesters naturels obtenus par fermentation par des microorganismes [164]. Ils ont été découverts pour la première fois par Lemoigne en 1926 [165]. Les PHAs ont depuis attiré l'attention dans le domaine de la recherche scientifique et industrielle en raison de leur biocompatibilité, leur biodégradation, leur fabrication à partir de ressources renouvelables de carbone et de leur diversité chimique [166].

Une molécule du PHA peut être constituée de 600 à 35 000 unités monomères [167]. Le groupement –R de la chaîne latérale (figure I-17) est généralement un groupement alkyle saturé, mais aussi un alkyle insaturé, ramifié ou substitué [168]. Les différents types de PHA peuvent être synthétisés par les microorganismes présents dans la nature selon la source de carbone disponible et la réaction biochimique qui s'opère dans la cellule. Ils sont placés dans un «bioréacteur» et alimentés avec une source de carbone (principalement les sucres et l'amidon, …), ce qui les oblige à fabriquer le produit désiré. Cette stratégie exploite essentiellement un processus naturel que certains microorganismes subissent quand l'excès de carbone est disponible. Dans ce cas, les PHAs naturels agissent comme un stockage d'énergie et de carbone dans les cellules des bactéries placées en condition de fermentation et favorise ainsi la survie à long terme de bactéries sous-alimentées [169].

Actuellement, il existe plus de 90 microorganismes qui accumulent les PHAs stockés sous formes de granules. Après séchage des cellules, ces granules sont extraites par dissolution dans des solvants organiques et précipitées dans le méthanol ou l'éthanol. En fonction du nombre total de carbone du monomère, la chaîne du PHA peut être courte (3 à 5 carbones), moyenne (6-14 carbones), ou longue (15 carbones ou plus) [167]. Environ 150 différents monomères de PHA ont été identifiés, un nombre qui continue à augmenter avec l'introduction de nouveaux types de PHA par leur modification physique ou chimique [170]. Ceci est aussi possible par la création de microorganismes génétiquement modifiés (OGMs) afin de produire des PHAs avec des groupements fonctionnels particuliers [171].

Le poly(3-hydroxybutyrates) (PHB) et le poly(3-hydroxyvalérate) (PHV) sont les PHAs les plus connus (tableau I-4, a1 et a2, respectivement). Ils présentent de bonnes propriétés telles que la perméabilité à l'oxygène et la résistance au rayonnement mais aussi une faible flexibilité (tableau I-5). Ceci limite ainsi leurs applications. Cependant, leurs copolymères

peuvent également être produits ; les poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalérate)s (PHBVs) présentent de bonnes propriétés et sont largement utilisés dans le domaine d'emballage, d'adhésifs et de filtres.

Tableau I-5. Propriétés des polyesters naturels PHAs (PHB et PHV) et PMLA [171-174].

Propriétés	PHB	PHV	PMLA [(a)]
*T*g (°C)	(-5)-(+5)	(-17)-(-15)	110
*T*m (°C)	175	103-112	216
*T*d (°C)	228	231-258	236
ΔH (x_c = 100%) (J/g)	-	-	42
*T*c (°C)	92	58	-
Cristallinité (%)	58	-	-
Résistance à la traction (MPa)	40	31	-
Module élastique (GPa)	3,5	-	-
Elongation à la rupture (%)	5	14	-
Angle de contact (°C)	89	-	-
Tension de surface (mN/m)	29,8	-	-
Densité (g/cm^3)	1,18-1,26	-	-
Solubilité	Solvants chlorés		H_2O, DMSO, acetone pyridine,
dn/dc (mL/g)			0,169 / eau
Temps de dégradation	> 18 mois	-	50% en 10 heures

[(a)] PMLA obtenu par *Physarum polycephalum* (*Mw* = 36 200 et *Mn* = 29 000).

Les différentes caractéristiques des PHAs peuvent être adaptées pour diverses applications allant des matériaux d'emballage biodégradables aux produits médicaux. Dans certains cas, l'insaturation latérale des PHAs permet leur modification chimique ou biologique pour introduire d'autres groupements fonctionnels (alcynes, époxydes, acide carboxylique et hydroxyle) et ajuster ainsi leur utilisation. La copolymérisation des PHAs avec d'autres polymères (polysaccharides, polyoxazoline, PGA, PLA et PCL) est en développement dans le but d'améliorer leurs propriétés physicochimiques et élargir leur utilisation surtout dans le domaine biomédical [176-178]. Les PHAs sont également considérés comme composés pharmaceutiquement actifs et actuellement étudiés comme médicament potentiel anti-VIH, anticancéreux et antibiotique, etc … [179, 180].

La dégradation de ces homopolymères et copolymères par hydrolyse et leur bioassimilation donnent à cette famille de polymères une grande importance. Par exemple, la biodégradation *in vivo* du PHB donne un constituant naturel du sang (acide D-3-hydroxybutyrique) [181]. Cependant, Il reste encore beaucoup à découvrir et à vérifier à propos des voies de biosynthèse des PHAs pour faciliter la création de nouveaux matériaux.

II-1-2- Poly(β-acide malique) (PMLA)

La famille des polyesters naturels comprend aussi le poly(β-acide malique) (PMLA) qui est un analogue carboxylé du PHB obtenu sous sa forme isomère *R* [182]. C'est un dérivé de l'acide malique qui est relié par des liaisons esters formées entre le groupe hydroxyle et le groupe carboxyle situé en position β (tableau I-4, a3).

La structure de ce polymère lui confère un intérêt particulier. En plus de sa biodégradation par une simple hydrolyse, le PMLA répond au cahier des charges des polymères biorésorbables, bioassimilables et biocompatibles [183]. Il est métabolisé dans le cycle de Krebs [184]. En 1969, le PMLA naturel a été identifié dans les raisins et les pommes comme un inhibiteur de la protéinase. Par conséquent, différentes masses molaires du PMLA naturel ont été obtenues à partir de divers microorganismes (*penicillium cyclopium, physarum polycephalum, aureobasidium sp.* et *cladosporium sp.*) [185].

Le PMLA forme un complexe spécifique avec l'ADN polymérase du microorganisme et inhibe son activité (réplication d'ADN) [186]. Les systèmes biologiques synthétisent uniquement l'énantiomère de configuration L et de structure β [187]. Selon le microorganisme utilisé (saison de récolte et cycle de vie) et les conditions de la biosynthèse (composition du milieu de culture), l'architecture du PMLA peut être linéaire ou ramifiée et la masse molaire peut être faible ou élevée (tableau I-6).

Tableau I-6. Production du PMLA naturel par des microorganismes [188].

Microorganismes	**Quantité du polymère (mg/L) [(a)]**	***Mw* (g/mole) [(b)]**	**D [(c)]**
Penicillium cyclopium	7,8 – 62 200	5 000 – 11 000	1,1
Physarum polycephalum	400 – 2 700	10 000 – 300 000	1,2 – 3,7
Aureobasidium sp.	5 700	5 000	-
Cladosporium sp.	24 – 350	-	-

[(a)] Concentration du PMLA dans le milieu de culture.
[(b)] Masse molaire du PMLA produit dans le milieu par le microorganisme.
[(c)] Distribution de lamasse molaire (*Mw/Mn*).

En effet, le polymère est d'abord produit dans le noyau des cellules pour une libération ultérieure dans le milieu de croissance par l'intermédiaire du cytosol. Les précurseurs de la production du PMLA sont obtenus à partir du D-glucose qui implique le cycle de krebs. La quantité libérée du PMLA dans le milieu est proportionnelle à sa teneur en D-glucose [91] Par ailleurs, il a été démontré qu'une source de carbone ($CaCO_3$) stimule fortement la production du PMLA [188] Le PMLA naturel est stéréorégulier et semi-cristallin. Il est obtenu par le *physarum polycephalum* sous forme de cristaux blancs ayant une *Tm* et une T_d élevées (tableau I-5) [189].

Contrairement aux autres polyesters cités ci-dessus, le PMLA comporte un groupement carboxylique latéral qui permet sa solubilité dans l'eau sous forme acide ou sel (tableau I-4, a3). Il est fortement ionisé à pH 7 et a une faible valeur de pKa qui varie entre 3 et 4 en fonction de son origine [190]. La réactivité de ces groupements carboxyliques confère au PMLA la particularité d'être modifiable et d'avoir des propriétés ajustables (solubilité, vitesse de dégradation, greffage des molécules de ciblage et encapsulation et libération des principes actifs) [191, 192]. Cette fonctionnalisation du PMLA naturel est possible seulement par modification chimique.

II-2- Les polyesters synthétiques usuels : synthèse chimique, propriétés et biodégradation

Les polyesters synthétiques présentent des structures chimiques et des propriétés physicochimiques différentes et ajustables. Ils attirent actuellement une large attention dans le domaine de la recherche scientifique et industrielle [193]. Ils sont obtenus par polycondensation de diacides, de diols ou d'hydroxyacides ou par ouverture de cycles de type lactone. Les monomères proviennent d'agro-ressources (polylactide) ou d'origine pétrochimique (poly(ε-caprolactone)). Les poly(α-hydroxyacides) (PGA, PLA et PMLA), le Poly(β-acide malique) (PMLA) et le poly(ε-hydroxyacides) (PCL) (tableau I-4) et leurs copolymères sont les principaux polyesters synthétiques utilisés en raison de leurs propriétés de biodégradabilité et de biocompatibilité. Ils présentent des liaisons fragiles (esters) sur leurs chaînes macromoléculaires permettant leur dégradation par simple hydrolyse en libérant en conséquence des oligomères et des monomères décomposables par les microorganismes suivant des réactions identiques à celles des polymères naturels catalysées par des enzymes [194].

II-2-1- Synthèse chimique

a- Synthèse des poly(α-hydroxyacides) (PGA, PLA) et dpoly(ε-hydroxyacides) (PCL)

La mise au point des polyesters synthétiques (PGA, PLA, et PCL) est possible selon deux voies de synthèse, soit par une simple polycondensation du monomère bifonctionnel (diol, diacide ou acide hydroxycarboxylique) (figure I-18, a) ou par polymérisation par ouverture de cycle (POC) de monomères cycliques (lactides, anhydrides ou lactones) (figure I-18, b) [195].

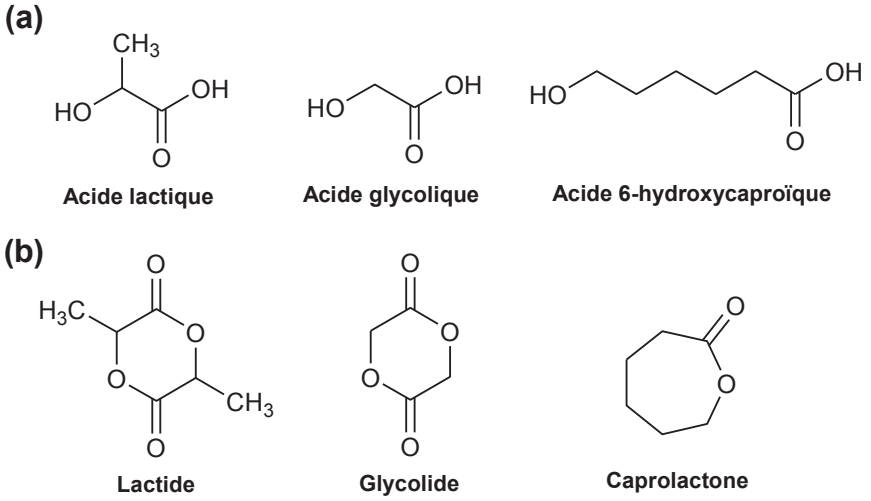


Figure I-18. Structure chimique des monomères (a) linéaires (hydroxyacides) pour la polycondensation et (b) cycliques (lactones) pour la POC.

La polycondensation des hydroxyacides est simple en raison de leur faible coût et leur disponibilité [196, 197]. Or, elle nécessite une haute température et des temps de réaction très élevés. Cette réaction s'accompagne également de la libération d'une molécule d'eau ce qui conduit malheureusement à la limitation de la masse molaire des polymères.

Cependant, la POC est la solution trouvée par les chimistes afin d'obtenir des polymères de masse molaire élevée et de plus faibles dispersités dans des conditions plus douces et des vitesses de réactions plus élevées [197-199]. Selon l'amorceur utilisé (organique ou complexe métallique), la POC peut avoir un mécanisme cationique, anionique ou par coordination. Néanmoins, comme toute technique de synthèse, la POC peut avoir quelques limitations telles que la préparation et la purification longues et coûteuses des monomères cycliques et les réactions secondaires rencontrées (réactions de transfert et de transestérification) [200]. La synthèse enzymatique est donc un procédé de la biotechnologie moderne envisagé afin de réduire ces limitations [201]. Dans nos activités de recherche, nous nous sommes intéressés uniquement à la POC de type anionique.

La POC anionique présente plusieurs avantages par rapport aux autres POCs. Elle a une grande réactivité et peut atteindre des vitesses de réaction plus élevées [202]. Cela peut malheureusement conduire à des réactions secondaires et à des distributions de lamasse molaire très importants [203-205]. Les amorceurs utilisés sont souvent des alcoolates, carboxylates ou des métaux alcalins [192].

Selon la nature du cycle et l'amorceur utilisé, les mécanismes réactionnels de la POC mis en jeu diffèrent. Dans le cas des cycles lactoniques de plus de quatre chaînons, l'amorceur nucléophile attaque sur le carbone électropositif de la fonction carbonyle provoquant le clivage de la liaison O-acyle (schéma I-1, a). Dans ce cas les centres actifs sont donc des alcoolates [206].

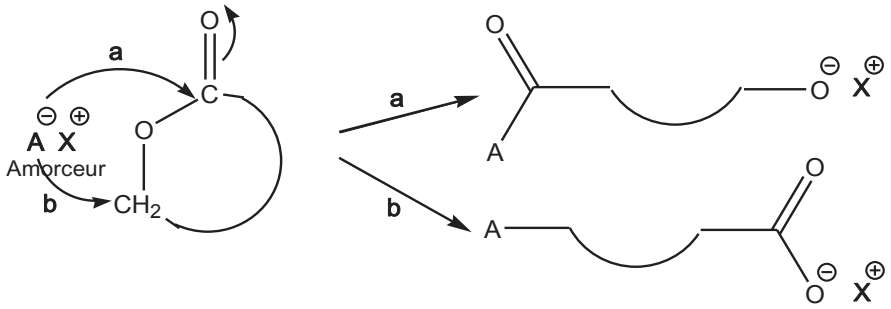


Schéma I-1. Mécanisme de la POC anionique des (a) lactones à plus de 4 atomes et (b) β-lactones [207].

Dans le cas des cycles lactoniques à quatre chaînons (β-lactones) possédant une tension du cycle très élevée, l'amorceur nucléophile utilisé est soit faible (carboxylates) ou fort (alcoolates ou métaux alcalins). Par conséquent, la polymérisation se fait par rupture de la liaison O-alkyle (schéma I-1, b) ou par la rupture de la liaison O-acyle et O-alkyle (schéma I-1, a et b). Les centres actifs en propagation sont alors des alcoolates et des carboxylates [207-211].

b- Synthèse chimique des poly(α, β-acide maliques) (PMLAs)

La synthèse chimique du PMLA a été effectuée par M. Vert en 1979 [212] avant la découverte de sa synthèse biologique par K. Rathberger en 1999 [213]. Il existe deux énantiomères du PMLA synthétique : le poly (α-acide malique) et le poly (β-acide malique) (tableau I-4).[20] La polycondensation directe de L-acide malique donne des PMLAs à des faibles masses molaires (poly (α, β-acide maliques)) (schéma I-2, a) [214]. Le poly (α-acide malique) qui est un analogue fonctionnalisé du PLA a été préparé par T. Ouchi et *al*. [215].

Ensuite, les copolymères poly(α-acide malique-*co*- acide glycolide)s ont également été préparés [216].

Par ailleurs, les PMLAs de masse molaire élevée (poly (β-acide malique)) ont été obtenus par POC des β-lactones-β-substituées (malolactonate de benzyle (MLABn)) suivie d'une hydrogénolyse catalytique pour permettre de déprotéger les groupements acides carboxyliques (schéma I-2, b)) [207, 212, 217].

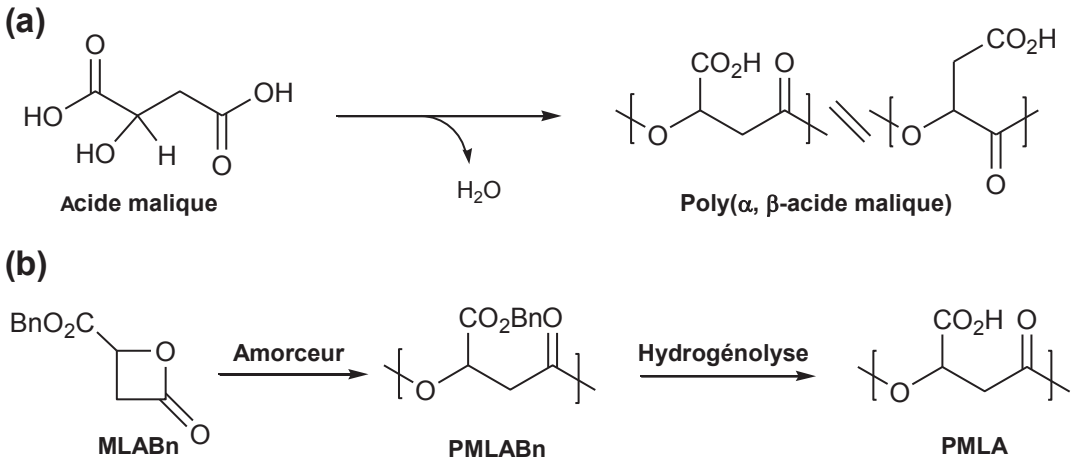


Schéma I-2. Synthèse chimique des PMLAs par (a) polycondensation de l'acide malique et (b) POC de la MLABn.

La β-lactone-β-substituée racémique peut être synthétisée à partir de l'acide bromosuccinique [218] et la β-lactone-β-substituée optiquement active peut être synthétisée à partir de l'acide malique ou l'acide aspartique (figure I-19)) [219].

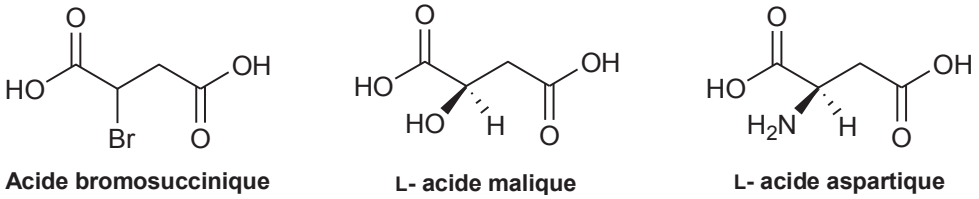


Figure I-19. Structure chimique des précurseurs de synthèse des β-lactones-β-substituées.

La polymérisation des β-lactones-β-substituées se fait soit par clivage de la liaison O─acyle ou par clivage de la liaison O─alkyle ou par les deux (schéma I-3) [220]. Cela dépend de la contrainte du cycle, de sa polarité et de la nature du catalyseur / amorceur utilisé [220].

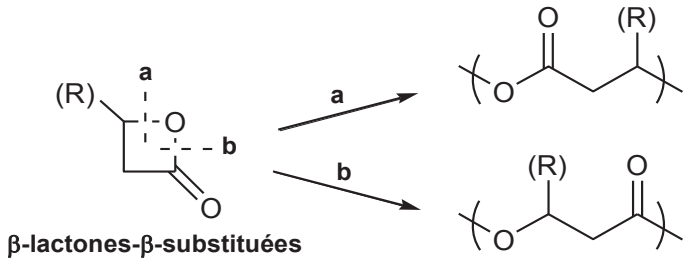


Schéma I-3. POC des β-lactones-β-substituées ouvertes soit par le clivage de la liaison (a) O─alkyle ou (b) O─acyle.

Les propriétés physicochimiques du PMLA peuvent être ajustées par la synthèse des copolymères amphiphiles. Ces copolymères peuvent être préparés soit par une hydrogénolyse catalytique partielle du groupement benzyle du polymère soit par couplage chimique des différents alcools sur le PMLA complètement déprotégé [221]. De plus, une copolymérisation des β-lactones portant différents groupements fonctionnels peut donner une diversité de copolymères amphiphiles avec différents comportements en milieu aqueux [222, 223].

De plus, le PMLA est considéré comme non toxique (DL50 = 3.3 g/Kg chez la souris) et non immunogène. Lors de son utilisation chez le lapin, aucun anticorps spécifique n'a été détecté [207]. L'hydrolyse totale du PMLA donne l'acide malique dont un des énantiomères est un métabolite du cycle de Krebs [224].

Ces propriétés confèrent au PMLA un réel potentiel dans le domaine thérapeutique. Le PMLA et ses dérivés ont été utilisés en tant que plateforme pour les systèmes de délivrance de médicaments. Le principe actif est attaché au polymère d'une manière covalente (réaction chimique) [225, 226] ou physique [227-230] En effet, des résultats intéressants ont été obtenus sur la libération prolongée des anticancéreux [231-234]. La fonctionalisation et la copolymérisation du PMLA avec d'autres polymères ont largement été étudiées dans la littérature afin d'améliorer la dégradation et les propriétés physicochimiques de ce dernier [235, 236].

En revanche, la voie de synthèse du PMLA précédemment décrite possède quelques désavantages. Lors de l'ouverture des β-lactones-β-substituées, des réactions de transfert ont lieu. La chaîne polymère en croissance peut arracher l'hydrogène labile en position α du carbonyle du monomère ce qui met fin à la propagation de la chaîne macromoléculaire. De plus, cette abstraction peut être accompagnée par la réinitialisation de la polymérisation par le sel de l'acide fumarique formé lors de cette étape. Cela conduit à des chaînes de petites

masses molaires inattendu pour une polymérisation anionique vivante (schéma I-4) [237, 238].

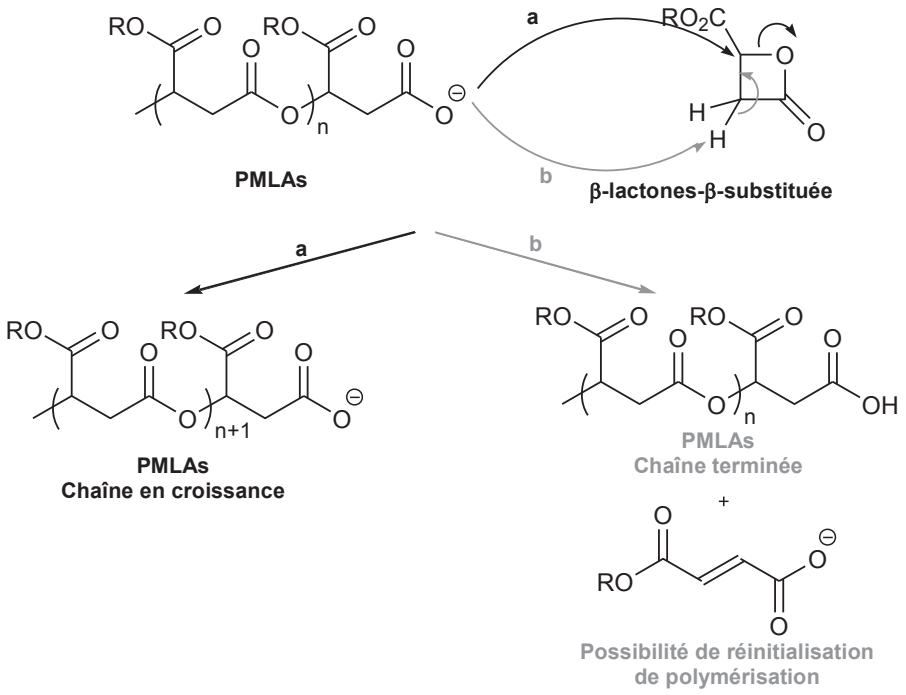


Schéma I-4. Mécanisme de (a) synthèse des PMLAs par POC et (b) la réaction de transfert.

Cette réaction de transfert ne gène pas seulement la synthèse contrôlée du PMLA mais aussi son utilisation *in vivo* en contact avec le sang. En effet, la faible masse molaire du PMLA entraîne sa rapide excrétion. Ceci peut être expliqué par l'élimination du PMLA par une rapide excrétion rénale ou à cause de sa dégradation très rapide. Le produit de dégradation du PMLA (acide malique) est éliminé par voie pulmonaire sous forme de CO_2. Cependant, il a été confirmé que l'excrétion du PMLA est causée par sa filtration rénale qui prend seulement quelques minutes suivant son administration [239, 240].

II-2-2- Différentes propriétés physicochimiques

a- Poly(acide glycolique) (PGA)

Le PGA est le polyester le plus simple de la famille des poly(α- hydroxyacides) (tableau I-4). Il peut être synthétisé par POC du glycolide, une dilactone à base d'acide glycolique (figure I-18) en utilisant un sel d'étain ou de zinc comme catalyseur [241, 242]. Les principales caractéristiques du PGA sont résumées dans le tableau I-7.

Tableau I-7. Les différentes caractéristiques des polyesters synthétiques (PGA, PLA, PCL et leurs copoltmères) [153, 200, 243-246].

Polymères		**PGA**	**PLLA**	**PDLLA**	**PCL**	**PLGA**	**PLCL**
*T*g (°C)		35-40	60-65	57-59	(-65)–(-60)	45-55	-
*T*m (°C)		225-230	173-178	-	60	-	-
T_d (°C)		-	200	185-200	-		-
ΔH (x_c = 100%) (J/g)		180-207	93	-	142		-
Cristallinité (%)		-	10-40	-	-	-	-
$[\alpha]^{25}_D$ dans le chloroforme		-	-155	0	0		-
Elongation à la rupture (%)		< 3	6	6	300-500	3-10	175-854
Résistance à la traction (MPa)		70	28-50	29-35	20,7	41,4-55,2	0,57-8,55
Module élastique (MPa)		6900	1200-2700	1900-2400	0,21-0,24	1,4-2,8	0,192-68,573
Angle de contact (°C)		61	75	-	95	71	-
Energie de surface (mJ/m^2)		-	39	-	16	-	-
Densité (g/cm^3)		1,50-1,69	1,25-1,29	1,27	1,06-1,13	1,3-1,4	-
Solubilité		solvants organiques fluorés	C_6H_6, C_2H_3N, $CHCl_3$, dioxane, THF, …		$CHCl_3$, CH_2Cl_2, toluène CCl_4, C_6H_6, $C_6H_{10}O$, …	-	-
dn/dc (mL/g) à 25°C	THF	0,057	-	0,050	0,072	-	-
	$CHCl_3$	-	-	0,024	-	-	-
	Acétone	-	-	0,097	-	-	-
Temps de dégradation (mois)		6-12	18-24 (50% dans 1-2 ans)	12-16	24 (50% dans 4 ans)	1-6	-

Le PGA a une *T*m et une *T*g relativement élevées. Il est hautement cristallin ce qui le rend insoluble dans la plupart des solvants organiques. Il est par contre soluble dans les solvants organiques fortement fluorés comme l'hexafluoroisopropanol [247]. Sa densité est plus élevée que celle du PLA. Il a également une grande résistance à la traction, une grande rigidité et une faible élongation à la rupture. Ces paramètres limitent l'utilisation du PGA en

tant que fil de suture ou implant [248, 249]. En outre, sa vitesse de dégradation relativement élevée est inadaptée et peut causer un endommagement cellulaire par une baisse locale du pH. Cependant sa copolymérisation avec d'autres polyesters tels que le PLA et la PCL est une solution envisagée qui a apporté, avec succès, d'excellentes propriétés au PGA pour une meilleure utilisation dans les applications biomédicales [250].

b- Poly(acide lactique) (PLA)

Le PLA a fait l'objet d'importants travaux de recherche au cours des 40-50 dernières années. Il est couramment synthétisé à partir des α-hydroxyacides par polycondensation de l'acide lactique ou par POC du lactide (dimère cyclique) (figure I-18) [200]. En raison de la chiralité du carbone central, l'acide lactique a deux énantiomères. Leur homopolymérisation conduit à deux formes cristallines du PLA : le poly(L-acide lactique) (PLLA) et le poly(D-acide lactique) (PDLA). Toutefois, le mélange synthétique des deux monomères isomères donne la forme amorphe du PLA, le poly(D,L-acide lactique) (PDLLA). En effet, ces trois structures du PLA présentent différentes propriétés. Le PLLA et le PDLA sont des polymères semi-cristallins ayant des propriétés physicochimiques différentes de celles du PDLLA. Cette cristallinité leur confère de bonnes propriétés mécaniques (tableau I-7). Le PLA est amorphe à partir de 15/85 % du mélange D/L [251, 252]. Le PLA cristallin est soluble dans les solvants chlorés et le benzène à des températures élevées alors que le PDLLA est soluble dans la plupart des solvants organiques et n'est pas soluble dans les alcools et les hydrocarbures aliphatiques. Sa densité est de 1,27 g/mL [204].

Les propriétés mécaniques les plus importantes sont résumées dans le tableau I-7 [195]. La forme semi-cristalline du PLLA est utilisée pour des applications de support de charge tels que des dispositifs orthopédiques et des échafaudages de tissu dur étant donné qu'elle possède une résistance élevée à la traction et un faible allongement [253]. Par contre, le PDLLA a une résistance plus faible à la traction, un allongement élevé et un temps de dégradation beaucoup plus rapide qui le rend plus attrayant en tant que système de délivrance de médicaments.

Le PLA amorphe ou semi-cristallin est un polymère dur et cassant possédant une *Tg* importante. Le PLLA possède en plus une *Tm* importante (avec une petite dépendance de la masse molaire et le degré de cristallinité) (tableau I-7) [200]. De plus, la masse molaire du PLA, le taux de cristallinité et la microstructure des chaînes sont des paramètres qui lui confèrent une large gamme de propriétés (stabilité, dégradation, viscoélasticité, …), comme pour tous les polymères cités ci-dessus.

c- Poly(ε-caprolactone) (PCL)

La PCL est un polyester semi-cristallin composé d'une unité de répétition d'acide 6-hydroxycaproïque, synthétisée par POC d'ε-caprolactone (figure I-18) [254, 255]. Elle possède la plus petite valeur de *T*m et de *T*g par rapport aux autres polyesters synthétiques [249] et une T_d élevée ce qui facilite sa mise en forme (tableau I-7). Elle est soluble dans le chloroforme, le dichlorométhane, le tétrachlorure de carbone, le benzène, le toluène, la cyclohexanone et le 2-nitropropane à température ambiante. Elle est peu soluble dans l'acétone, la 2-butanone, l'acétate d'éthyle, le diméthylformamide et l'acétonitrile et elle est insoluble dans les alcools, l'éther de pétrole et l'éther diéthylique [247].

Elle possède des propriétés mécaniques qui indiquent qu'elle est assez résistante et ductile. En comparant ces propriétés à celles des PLA et PGA, la PCL présente une faible résistance à la traction, une faible rigidité et une très grande élongation à la rupture (~ 10 fois plus élevée). Bien qu'elle soit l'un des premiers polyesters biodégradables synthétisés dans les années 1930, son utilisation dans le domaine biomédical a été limitée. Ceci est dû à sa vitesse de dégradation par hydrolyse des liaisons esters trop lente et sa forte cristallinité [256]. Cette hydrophobie est expliquée par la longueur de la chaîne carbonée de la PCL. Elle a une faible interaction avec l'eau étant donné qu'elle a une valeur de l'angle de contact élevée et une faible tension de surface (tableau I-7) [162, 257].

d- Copolyesters

Un copolymère est formé à partir de deux monomères ou plus possédant généralement des propriétés différentes de celles de chaque homopolymère. Un copolymère amphiphile est caractérisé par son affinité à la fois hydrophile et lipophile (hydrophobe) dans un milieu aqueux. Comme évoqué ci-dessus, les propriétés des homopolyesters (dégradation rapide du PGA, hydrophobie et cristallinité élevées du PLA et PCL, …) limitent parfois leurs utilisations pour les applications souhaitées comme la libération contrôlée d'un médicament. Par contre, la synthèse de leurs copolymères amphiphiles ou bien le mélange physique de ces polyesters a amélioré leurs propriétés physicochimiques et leur temps de dégradation (tableau I-7) [249, 257, 258].

En particulier, les copolymères de PLA et PGA (poly(acide lactide-*co*-acide glycolide) PLGA) étaient les premiers à être commercialisés en tant qu'implants et fils de suture et pour l'encapsulation de médicaments. Bien que les deux homopolymères (PLA et PGA) aient tendance à être cristallins, leurs copolymères sont très amorphes. Cela est dû à l'irrégularité

de la chaîne par la présence d'un second composant [259]. Leurs propriétés mécaniques sont proches de celles du PDLA et leur durée de dégradation est de l'ordre de plusieurs mois. Par exemple, le PLGA 50/50 (glycolide et DL-lactide) se dégrade plus rapidement que les homopolymères correspondants PLA et PGA (tableau I-7) [195, 199, 249, 260].

En outre, les copolymères, principalement à bloc, du lactide et d'ε-caprolactone (PLCL) sont aussi couramment utilisés dans le but d'ajuster la ductilité et l'hydrophobie du PCL (tableau I-7). Ainsi, ces copolymères combinent à la fois la bonne dégradation par hydrolyse du PLA, à un temps plus court [261], et la bonne perméabilité et encapsulation du PCL aux principes actifs qui est de 104 fois plus élevée que celle du PLA [262].

Ainsi, le poly(acide lactide-*co*-β-acide malique) (PLMA) est ses dérivés sont de nouveaux matériaux biodégradables, biocompatibles et bioassimilables qui ont été synthétisés ces dernières années pour les utiliser en ingénierie tissulaire des tissus osseux et vasculaires. Les propriétés physicochimiques, l'hydrophilie/hydrophobie et la cinétique de dégradation du copolymère PLMA et ses dérivés sont adaptées par sa composition en PMLA. [235, 236, 263-270].

II-2-3- Biodégradation

Dans un environnement aqueux, les polyesters se dégradent par hydrolyse. L'absorption d'eau par les polymères est nécessaire pour leur dégradation hydrolytique. Dans un premier temps, cette dégradation nécessite un clivage hydrolytique de la fonction ester en présence d'eau ou d'enzymes. Dans un second temps, les produits de dégradation de faibles masses molaires et les oligomères sont converti en molécules d'eau et de CO_2. Ces derniers sont ensuite éliminés par l'organisme. D'une manière générale, la perte de masse du polymère et le changement de sa forme sont les dernières étapes à suivre lors de sa dégradation. Les polymères ont un profil caractéristique commun de dégradation en quatre étapes (figure I-20) [271] :

a- absorption de l'eau : pénétration des molécules d'eau et gonflement du polymère ce qui déclenche sa dégradation chimique ;

b- perte de la masse molaire ;

c- perte des propriétés mécaniques ;

d- perte du poids total : diffusion des produits de dégradation hors de la matrice polymère.

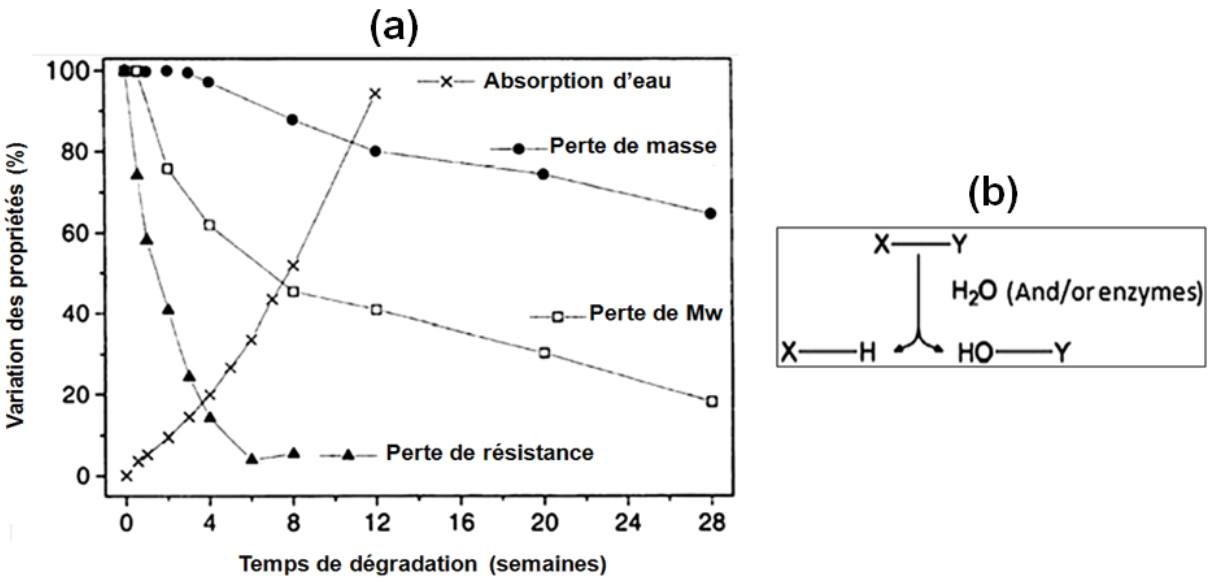


Figure I-20. (a) Mécanisme du changement des propriétés d'un polymère au cours de sa biodégradation (b) hydrolyse d'une fonction chimique.

Selon son mécanisme de dégradation, un matériau peut se dégrader selon deux processus : par érosion de la surface ou bien par dégradation en masse (autocatalysée ou non) (figure I-21) [260, 272, 273].

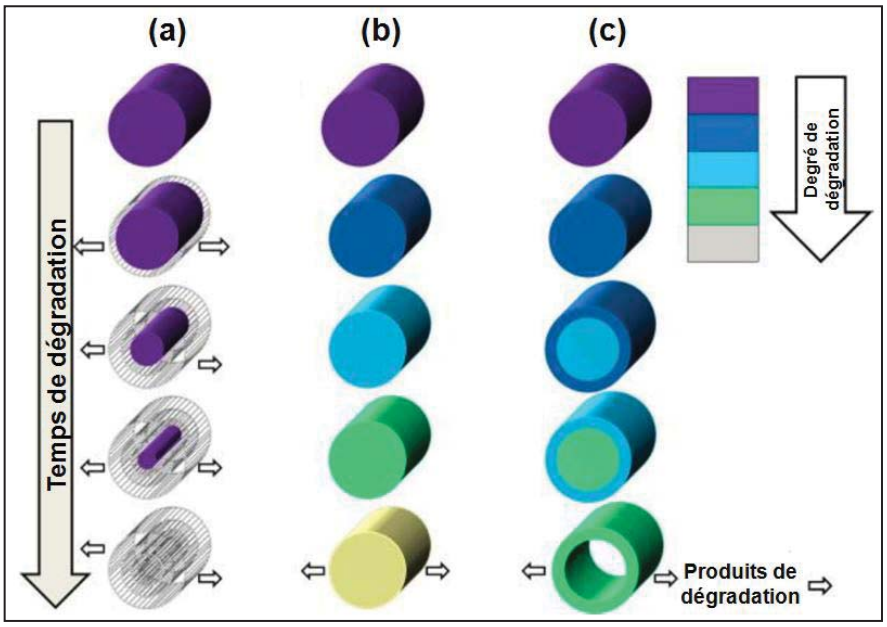


Figure I-21. Représentation schématique des différents modes de dégradation des polymères *(a) dégradation en surface, (b) dégradation en masse non autocatalysée et (c) dégradation en masse autocatalysée.*

La dégradation des polymères en surface est un mécanisme particulier qui se produit à l'interface eau/matériau. Cela est produit lorsque le clivage hydrolytique des liaisons labiles

disposées à l'extérieur est plus rapide que la diffusion d'eau à l'intérieur de la structure du matériau. Elle est caractérisée par une perte de masse linéaire avec une conservation de leur masse molaire comme la dégradation des poly(anhydrides) et des poly(ortho esters) [46, 23] (figure I-21, a) [274, 275].

Lorsque l'absorption d'eau est plus rapide par rapport au clivage hydrolytique des liaisons labiles, la dégradation du matériau peut être effectuée par hydrolyse interne selon une érosion en masse. Ce processus d'hydrolyse est connu pour la famille des poly(α-hydroxyacides).

La dégradation en masse non autocatalysée est caractérisée par une dégradation de la chaîne polymère de façon homogène sur toute la matrice (figure I-21, b). Lorsque les molécules d'eau se diffusent plus rapidement dans la chaîne polymère, l'hydrolyse est plus rapide à l'intérieur du matériau plutôt que sur sa surface (dégradation autocatalysée). Cela est dû à la difficulté des chaînes de petites masses molaires (acides) à se diffuser à l'extérieur en raison du volume élevé de l'échantillon (figure I-21, c). Dans ce cas, la masse reste constante pendant un certain temps. Ensuite, une perte de masse accrue et rapide est observée. Cette chute soudaine de la masse est causé par l'élimination des produits de dégradation qui sont solubles dans l'eau (monomères, oligomères) en dehors de la matrice polymère [272, 274]. Le PGA, PLA et PCL sont dégradés selon ce mode d'hydrolyse. Cette réaction se produit spontanément et ne nécessite pas la présence d'enzymes catalytiques et conduit à la formation respective d'acide glycolique, d'acide lactique et d'acide 6-hydroxyhexanoïque qui sont des métabolites présents dans l'organisme [276].

La capacité de l'eau à se diffuser à travers la chaîne polymère joue un rôle important dans la détermination du taux de dégradation des polymères. Par exemple, dans le cas du PLA, sa dégradation peut être retardée, par rapport aux autres polymères, en raison de la présence du « pendentif méthyle » ce qui provoque une contrainte stérique à l'eau à être absorbée (tableau I-7). De plus, de nombreux facteurs influencent l'hydrolyse des polymères tels que la cristallinité, la température, l'hydrophilie/hydrophobie, l'humidité, la masse molaire, la taille et la forme des polymères, l'acidité du milieu et la présence ou non d'un catalyseur [277]. Les temps de dégradation moyens des polyesters synthétiques précédemment décrits sont présentés dans le tableau I-7 ci-dessus.

Il est connu que les régions amorphes se dégradent plus rapidement que les régions cristallines. Ceci est observé dans le cas du PDLLA et PLLA ayant tout les deux la même

masse molaire (tableau I-7) [278]. La cristallinité d'une structure polymère augmente sa rigidité et diminue ainsi la flexibilité de la chaîne polymère. Ce phénomène peut réduire non seulement le temps d'hydrolyse du polymère mais aussi sa dégradation enzymatique en présence de microorganismes. Une enzyme a une structure spécifique et nécessite une certaine flexibilité du matériau pour pouvoir former une éventuelle rupture de la fonction ester. Dans le cas de l'hydrolyse enzymatique, la dégradation se fait par une simple hydrolyse jusqu'à obtention des produits de faibles masses molaires. Ensuite, ces derniers peuvent être bioassimilés par les microorganismes présents dans le milieu [279].

La présence d'un grand nombre de carbones dans la chaîne d'un polymère lui donne un caractère fortement hydrophobe, c'est le cas de la PCL qui a un temps de dégradation supérieur à 24 mois (tableau I-7). Ceci limite son utilisation en tant qu'implant pour la libération prolongée d'un principe actif [280] ou en tant que matrice en ingénierie tissulaire [257].

Ces polyesters (PGA, PLA et PCL) ont des temps de dégradation allant de quelques mois à quelques années. Par conséquent, l'obtention d'un temps de dégradation adapté de quelques jours à quelques mois nécessite la conception et la synthèse des copolymères avec des groupements fonctionnels sur leurs chaînes macromoléculaires (carboxyles ou hydroxyles). Pour ce fait, le PMLA est largement étudié en raison de ses groupements fonctionnels et de son mode de dégradation hydrolytique rapide, spontané ou enzymatique [91]. En fonction du pH, le clivage non aléatoire de la chaîne principale du PMLA se produit par dégradation autocatalysée avec une vitesse élevée [190, 281]. Le taux d'hydrolyse a son minimum dans des solutions PBS neutres (diminution de la masse molaire de 50% après 10 heures à pH 7,0 et à 37 °C) [282-284].

Le produit de dégradation hydrolytique final du PMLA est le L-acide malique qui est un métabolite bioassimilable du cycle de Krebs (Figure I-22) [285]. La vitesse de dégradation des dérivés synthétiques du PMLA (esters d'alkyle) dépend de la composition du polymère. [286, 287]. En outre, les tests de cytotoxicité ont été réalisés sur les produits de dégradation d'une grande variété des dérivés du PMLA *in vivo*. Il est considéré comme un matériau biodégradable non immunogène, non toxique et biorésorbable [158, 286, 288, 289].

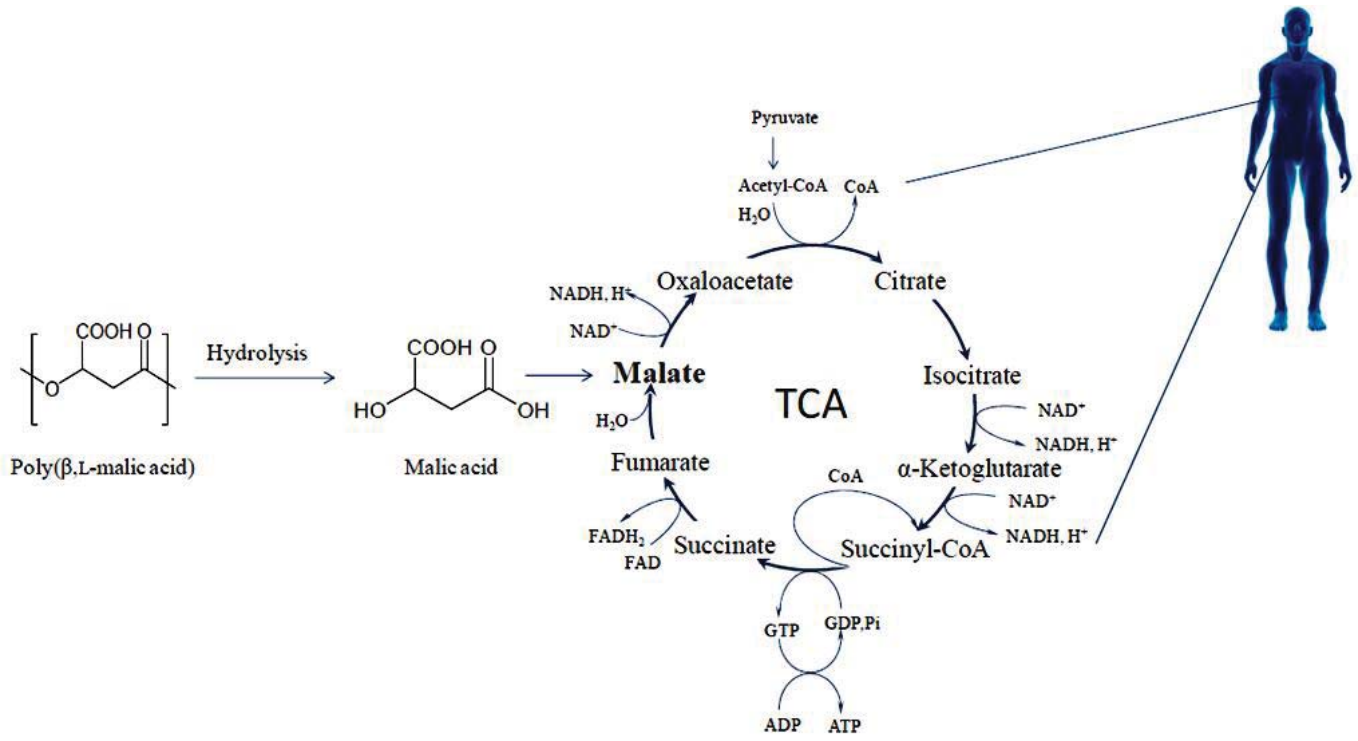


Figure I-22. Dégradation hydrolytique du PMLA (cycle de Krebs) [290].

II-3- Principales applications biomédicales des polyesters

Les polyesters biodégradables naturels ou synthétiques susmentionnés et leurs copolymères sont largement utilisés dans de nombreux domaines médicaux. Leurs propriétés physicochimiques, leur biocompatibilité et leur mode de dégradation leur confèrent un grand potentiel dans ces domaines. Dans un premier temps, les polyesters biodégradables synthétiques ont été utilisés pour les sutures chirurgicales et ensuite comme dispositifs de fixation orthopédiques [291, 292]. Actuellement, ils sont aussi utilisés en ingénierie tissulaire [153, 260, 293, 294], comme systèmes d'administration de médicaments [153, 295-299] et comme prothèses vasculaires (figure I-23 et Annexe B).

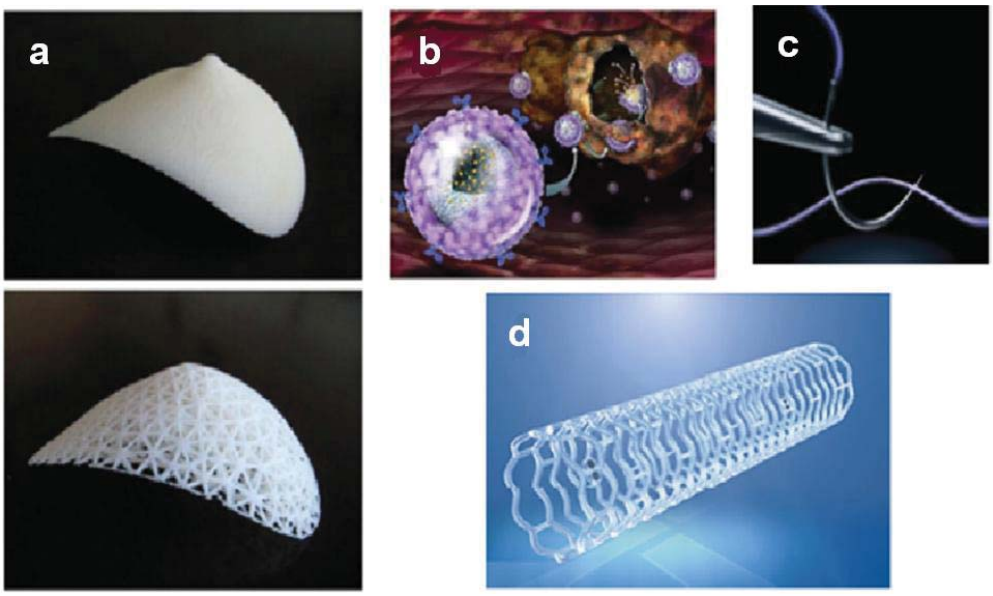


Figure I-23. Utilisation biomédicale des polyesters biodégradables (a) ingénierie tissulaire, (b) systèmes d'administration de médicaments, (c) sutures chirurgicales et (d) stents cardiovasculaires [290].

Ils sont largement étudiés pour l'ancrage des tissus mous à l'os, pour la régénération tissulaire et dans le domaine cardiovasculaire comme implants, valves, supports de régénération tissulaires ou comme revêtements passifs ou actifs des stents (Annexes A et B) [148, 179, 290, 300]. Par conséquent, certains stents actifs à base de ces matériaux ont été commercialisés (Supralimus, BioMime, Nobori, …) (Annexe A) [148]. En effet, ces matériaux associés à des molécules antiprolifératives ont permis une réduction significative du taux de resténose. Néanmoins, ces dispositifs ne présentent pas une entière satisfaction ; Leur coût et les problèmes rencontrés au moment de l'implantation du stent recouvert ou après la revascularisation restent importants [301]. En effet, les résultats des études cliniques ont donné à moyen terme un taux très important de thrombose tardive [302, 303]. Cela est principalement dû au deux principaux mécanismes physiopathologiques [304]:

- la cicatrisation tardive de l'endothélium due au mode d'actions des substances bioactives utilisées [305, 306],
- le phénomène pro-inflammatoire des polymères utilisés [307-309].

Ainsi, certaines propriétés physicochimiques des revêtements polymères utilisés (cristallinité, hydrophobie, *T*g trop élevées et vitesse de dégradation lente …) limitent leur utilisation. Dans ces conditions, des problèmes peuvent être rencontrés au niveau de l'adhérence du revêtement au métal ainsi que l'adhésion des cellules sur la surface du polymère après le déploiement et le placement du *stent* au niveau de la lésion. [226, 241, 310-

313]. Des fissures et des défaillances au niveau du revêtement peuvent se produire, entraîner un risque d'endommagement endothélial et de corrosion de la surface du matériau (libération de particules, ions et oligomères dans le milieu biologique) et induire une thrombose tardive.

A la suite de ces réactions, ces réactions inflammatoires dues à l'implantation du stent (corps étranger), une fixation des cellules de la paroi artérielle sur le matériau ou à sa proximité est observée. Ces cellules secrètent ainsi des acides et des oxydants puissants afin de tenter l'élimination de cet implant ce qui induit une baisse du pH (entre 3 et 4) de l'environnement [314]. La prédiction de la tolérance d'un individu pour un biomatériau semble impossible de nos jours. Donc, la compréhension du mécanisme d'adhésion et de prolifération cellulaires à la surface des polymères est très importante pour le développement d'un revêtement prometteur de stents cardiovasculaires et pour le contrôle de la morphologie, l'attachement, la différenciation, la prolifération et la migration cellulaires.

II-4- La réponse cellulaire à la chimie et aux propriétés physicochimiques de la surface des polymères

II-4-1- Interface matériau-cellule : adhésion et comportement cellulaires

A l'exception du PMLA, les autres polyesters naturels ou synthétiques cités ci-dessus sont non chargés et de nature hydrophobe ce qui signifie qu'ils ont une faible mouillabilité. Les cellules ont une faible affinité aux surfaces hydrophobes. Elles s'attachent généralement aux surfaces de moyenne mouillabilité. Par conséquent, la surface d'un matériau hydrophobe est physiquement ou chimiquement modifiée pour favoriser l'adhérence et la différenciation cellulaires [315, 316].

De même, l'adhésion des protéines depend de la nature de la surface (hydrophile et hydrophobe). Les cellules se fixent sur les surfaces synthétiques par l'intermédiaire de ces protéines d'adhésion de la MEC (fibronectine, collagène, vitronectine, laminine, …). Ces protéines qui sont adsorbées sur la surface du matériau dirigent l'attachement et la migration cellulaires sur ce dernier. Le contrôle de la composition chimique du matériau permet donc la modulation de leur adsorption [317].

Par conséquent, le comportement et le fonctionnement cellulaires (migration, prolifération, différenciation et viabilité à long terme) peuvent être contrôlés par la mesure de l'adhérence cellulaire initiale (étalement). L'étalement de la cellule est définit par sa taille et sa forme dans une zone d'ancrage au substrat bien définie. La figure I-24 montre le

comportement cellulaire vis-à-vis de la surface modifiée ou non du polystyrène pour une éventuelle utilisation en culture cellulaire [318].

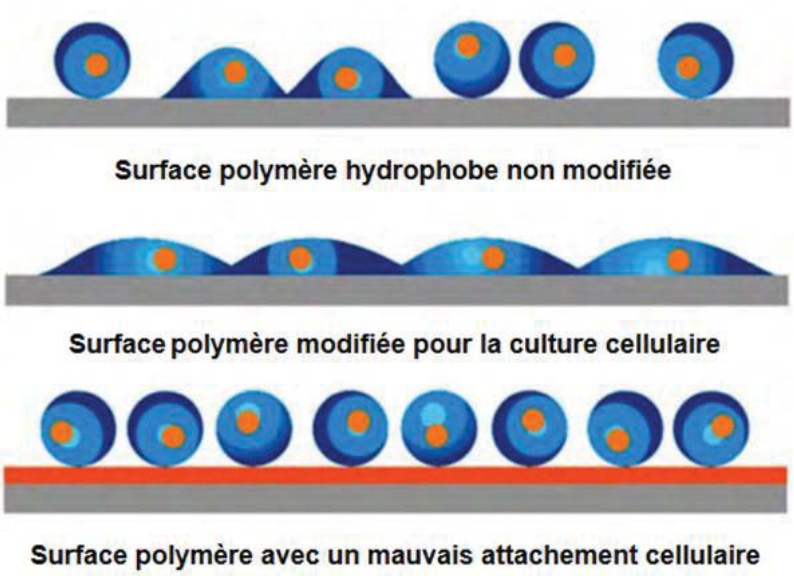


Figure I-24. Profil d'adhérence cellulaire sur une surface polymère modifiée ou non [318].

Dans le cas d'une faible adhérence, la cellule est ronde et légèrement attachée à la surface. Cela entraine généralement sa mort cellulaire. A une moyenne adhérence, les cellules sont les plus actives dans la migration et la prolifération. Toutefois, si la zone de contact cellule-substrat est très grande avec de multiples sites d'adhésion associés à un cytosquelette très riche (forte adhérence), les cellules ont tendance à rentrer directement dans la phase de différenciation. Le tableau I-8 résume cette corrélation entre la force d'adhésion cellule-matériaux et le comportement de la cellule.

Tableau I-8. Corrélation entre la force d'adhésion et le comportement cellulaire [318].

Comportement cellulaire / étalement (Spreading)	Viabilité	Migration	Prolifération	Différentiation
Cellule de petite taille	↘	↘	↘	↘
Cellule de taille moyenne	↗	↗	↗	↘
Cellule de grande taille	↗	↘	↘	↗

II-4-2- Les facteurs influençant l'adhésion cellulaire

La surface du revêtement polymère est définie par sa partie externe qui est en contact directe avec le sang. La biocompatibilité et l'adsorption des molécules d'adhésion cellulaires à la surface polymère (interface polymère-milieu biologique) dans des conditions appropriées (quantité, conformation, flexibilité et accessibilité pour les récepteurs impliqués dans l'adhésion cellulaire) sont fortement influencées par différentes propriétés. Ces dernières représentent les propriétés physicochimiques (rugosité, topographie, géométrie et énergie de surface) et mécaniques (rigidité ou flexibilité) de la surface du matériau et par sa composition chimique (charge électrique, solubilité, pH, mouillabilité et groupements fonctionnels (amines, carbones insaturés, -OH, $-SO_3H$, …)) [319, 320].

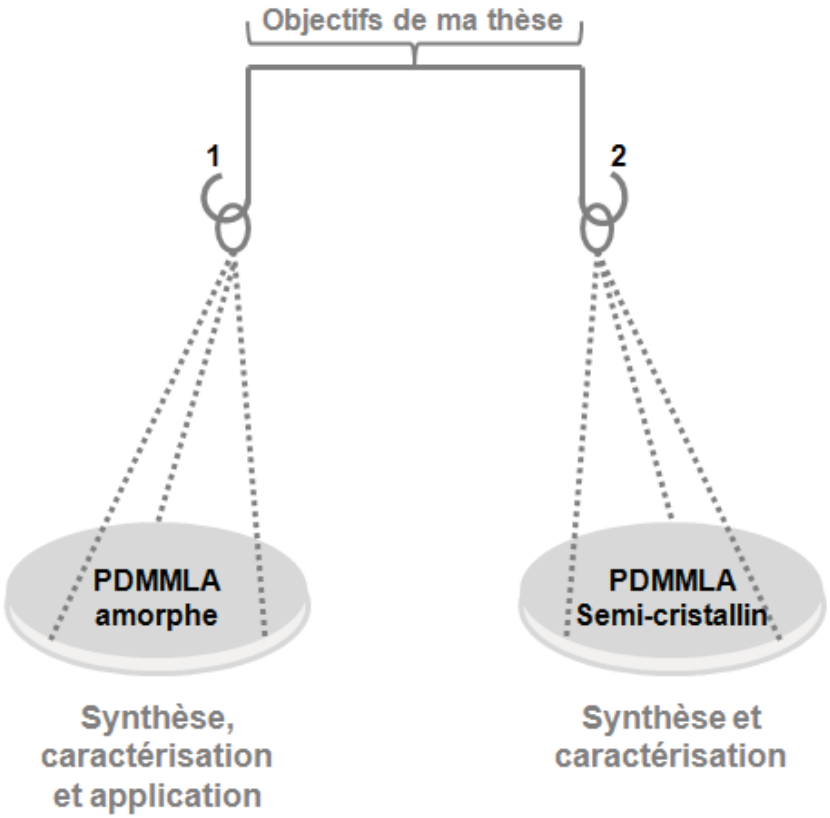
La connaissance de ces propriétés et la compréhension des phénomènes mis en jeu à l'interface matériau-milieu biologique et associés à la pose du stent cardiovasculaire présentent un intérêt fondamental que l'on se propose d'étudier dans ce travail de thèse.

Chapitre I : étude bibliographique

4ème partie :

Conclusion et description du projet de recherche

« OBJECTIFS »



En résumé, dans sa forme actuelle, une endoprothèse coronaire ne peut pas être utilisée sans endommager les vaisseaux sanguins et induire une resténose. Les SEMs présentent une véritable solution à ce problème. Cependant, les SEMs actuellement utilisés sont loin d'être parfaits. La plupart des SEMs commerciaux utilisent une matrice polymère biodégradable pour le revêtement et la libération de principes actifs. De plus, des réactions indésirables peuvent être causées par ces polymères. D'après la littérature, il est nécessaire que le matériau utilisé pour recouvrir le stent doive avoir de bonnes propriétés mécaniques, des propriétés de surface appropriées, une excellente hémocompatibilité, une bonne biocompatibilité et la capacité de délivrance de médicaments.

L'étude bibliographique décrite ci-dessus sur les polyesters les plus utilisés pour le revêtement du stent nous a permis de comparer leurs caractéristiques générales. En effet, nous avons conclu que chaque polymère a des avantages et des inconvénients. Il n'est pas possible qu'un seul polymère possède toutes les exigences souhaitées. Par conséquent, la recherche d'un nouveau polymère avec les caractéristiques essentielles (hémocompatibilité, adhérence à la surface du stent, biodégradabilité, …) et qui peut libérer une molécule bioactive est primordiale. Actuellement Le PLA reste le polymère le plus utilisé à cette fin.

En particulier, l'étude *in vitro* sur le copolymère susmentionné PLMA (copolymère du PLA et PMLA) comme matériaux d'ingénierie tissulaire osseuse et cardiovasculaire a été réalisée sur plusieurs types cellulaires (MC3T3-E1[e], 3T3[f], HUVECs[g], …) [235, 236, 263-270, 284, 321]. En effet, le PMLA est utilisé afin de :

- favoriser l'adsorption des protéines,
- ajuster l'hydrophilie et la fonctionnalisation du matériau,
- améliorer l'affinité, l'attachement et la prolifération cellulaires [236, 263, 284, 321].

Par conséquent, de meilleurs résultats ont été obtenus par rapport au PLA vis-à-vis de tous les types cellulaires étudiés. Ainsi, les tests effectués *in vitro* sur des CEs humaines (HUVECs) ont montré une meilleure hémocompatibilité (endothélialisation) par rapport au PLA. Une inhibition de l'activation et de l'agrégation plaquettaire a également été observée [321].

[e] **MC3T3-E1** : lignées cellulaires ostéoblastiques de souris.
[f] **3T3** : lignées cellulaires de fibroblastes de souris.
[g] **HUVEC** (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) : cellules endothéliales humaines matures isolées à partir de la veine de cordon ombilical.

Le PMLA possède donc de nombreuses propriétés intéressantes telles que la non-toxicité *in vitro* et *in vivo*, la non-immunogénicité, la biodégradabilité, la stabilité dans la circulation sanguine et l'affinité cellulaire [322-326]. Cependant, son application est limitée en raison des conditions de synthèse (temps et coût) et des réactions de transfert détaillée dans le paragraphe II-2-1ci-dessus [327-337].

Sur la base de ces informations, le but de mon travail est d'élaborer un nouveau matériau biodégradable qui peut répondre aux exigences du cahier des charges pour un revêtement prometteur. La conception d'un matériau sur mesure qui favorise la prolifération des CEs, inhibe la prolifération et la migration des CMLs et possède des qualités intrinsèques particulièrement intéressantes (propriétés de surfaces adaptées) est le premier objectif de ce travail. De plus, ce matériau peut comporter une molécule bioactive à libérer de manière prolongée.

Le matériau utilisé pour notre étude est un polyester synthétique biodégradable de la famille des poly(β-acide malique)s (PMLAs), il s'agit des dérivés du poly(β-acide 3,3-diméthylmalique) « PDMMLA ». Les polyesters décrits ci-dessus (PGA, PLA, PCL, …) ont une diversité limitée de leurs structures. C'est pourquoi les études récentes dans la littérature portent sur la possibilité de greffer sur le squelette de ces polyesters des sites réactionnels afin de modifier leurs caractéristiques physicochimiques et leur vitesse de dégradation.

Au contraire, le polymère choisi pour cette étude présente la particularité d'être :

- fonctionnalisable pour avoir des propriétés ajustables avec les exigences de notre application (hydrophilie/hydrophobie, *T*g, topographie, dégradation, comportement cellulaire, …)
- obtenu avec des masses molaires bien contrôlées sans réactions de transfert qui sont présentes lors de la synthèse du PMLA.

En effet, afin d'éviter ces réactions de transfert, nous avons pensé à bloquer la position α de la β-lactone-β-substituée (précurseur de synthèse du PMLA) [237, 238]. Cette β-lactone est remplacée par la β-lactone-α,α,β-trisubstituée pour donner le polymère correspondant, le PDMMLA (figure I-24).

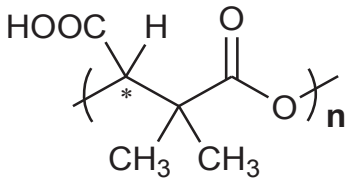


Figure I-24. Structure du poly(β-acide [*R*,*S*]-3,3-diméthylmalique) PDMMLA.

I- Poly(β-acide [*R*,*S*]-3,3-diméthylmalique) (PDMMLA)

Le PDMMLA est un polyester biodégradable. Il présente de nombreux intérêts liés à son caractère hydrosoluble et bioassimilable. Le choix de ce polymère n'est pas anodin. En effet, l'acide *R*-3,3-diméthylmalique qui sera son produit de dégradation intervient dans le cycle métabolique du pentothénate et dans la biosynthèse du « coenzyme A » grâce à la présence de la β,β-diméthylmalate déshydrogénase (EC 1.1.1.84). Cette enzyme catalyse la décarboxylation oxydative de l'acide *R*-3,3-diméthylmalique pour donner la cétovaline lors de la dégradation du pentothénate [338-340] (figure I-25).

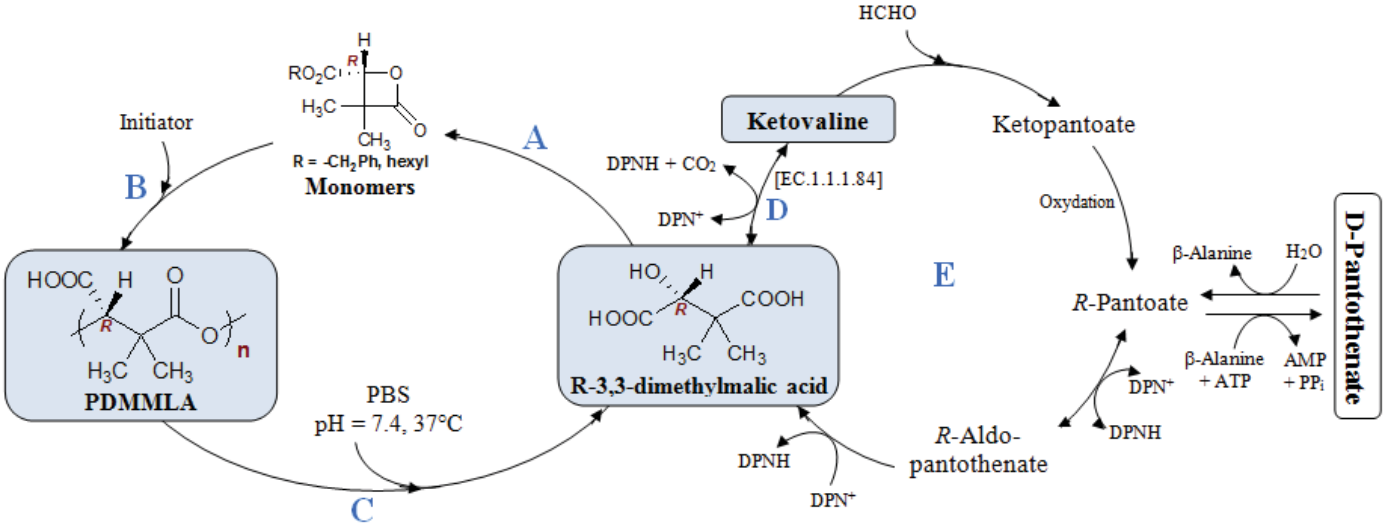


Figure I-25. (A) Synthèse des β-lactones-α,α,β-trisubstituées, (B) Synthèse du PDMMLA par POC des β-lactones-α,α,β-trisubstituées, (C) dégradation par hydrolyse du PDMMLA en acide *R*-3,3-diméthylmalique, (D) décarboxylation par la β,β-diméthylmalate déshydrogénase (EC.1.1.1.84) de l'acide *R*-3,3-diméthylmalique en cétovaline et (E) cycle de dégradation du pentothénate.

La présence d'un centre de chiralité dans l'unité répétitive du PDMMLA donne accès à toute une série de stéréocopolymères permettant ainsi de faire varier la nature configurationnelle du polymère en partant de précurseurs optiquement actifs et de moduler et

d'ajuster les propriétés physicochimiques du matériau (cristallinité, solubilité, dégradabilité …) en fonction de la tacticité de la chaîne.

Le PDMMLA comporte deux groupements méthyles en position α de la fonction ester, ce qui augmente le caractère hydrophobe de la chaîne principale par rapport au poly(acide malique). La présence de la fonction acide latérale induit une solubilité du polymère en milieu aqueux [341]. Cette fonction acide permet également la modification chimique du matériau qui conduit à toute une série de dérivés comportant différents groupements esters latéraux, dans le but de modifier la balance hydrophile/hydrophobe et d'ajuster les propriétés physicochimiques du matériau.

La synthèse de copolymères comportant des unités avec un groupement acide carboxylique (hydrophile chargé), un groupement alcool (hydrophile neutre) et des unités avec des groupements ester hexylique (hydrophobe) permettra d'étudier l'influence de cette balance hydrophile/hydrophobe sur la solubilité en milieu aqueux et sur la dégradabilité du polymère. La préparation de ces copolymères nécessite d'abord la synthèse de trois β-lactones α,α,β-trisubstituées différentes. Ces lactones comportent des fonctions ester benzylique, ester benzyloxypropylique et ester hexylique, respectivement. Ces trois monomères cycliques sont ensuite polymérisés par ouverture de cycle en présence d'un amorceur anionique. Le rôle du groupement benzylique et benzyloxypropylique est de protéger la fonction acide carboxylique et la fonction alcool portées par la lactone. Après polymérisation le groupement benzylique et benzyloxypropylique peuvent être éliminés par hydrogénolyse catalytique afin d'obtenir les différents homopolymères et copolymères amphiphiles souhaités.

Le PDMMLA et ses dérivés peuvent être de bons candidats dans le domaine biomédical pour des applications temporaires. Différents systèmes peuvent être élaborés : micelles, nanoparticules, terpolymères, polymères associatifs. Ces nouveaux polyesters pourraient être utilisés en tant que vecteurs macromoléculaires en thérapie génique, comme systèmes de libération contrôlée de médicaments et dans l'ingénierie tissulaire. Par la présente étude les copolymères amphiphiles du PDMMLA seront évalués comme un revêtement de stent dans le but d'élaborer le SEM prometteur.

II- Méthodologie du projet

L'objectif principal de ce travail de thèse est d'élaborer un revêtement de stent prometteur à base de PDMMLA. Les principaux résultats décrits dans les articles de 1 à 6 sont présentés dans le chapitre II et III :

(i) la synthèse et la caractérisation chimique, physicochimique et biologique et le comportement de dégradation dans des conditions physiologiques des PDMMLAs amorphes (articles de 1 à 4)

(ii) la synthèse et caractérisation d'une nouvelle famille de PDMMLA semi-cristallins (articles 5 et 6).

Article 1 (publié) : synthèse et caractérisation chimique des PDMMLAs amorphes et résultats obtenus de la caractérisation de la mouillabilité et de l'énergie de surface et ces composantes sur des films PDMMLAs amorphes.

Article 2 (sous révision) : étude de la mouillabilité de la surface en dynamique (tensiométrie) et ses avantages à homogénéiser la surface des PDMMLAs amphiphiles.

Article 3 (en cours) :

- étude de la rugosité de la surface (AFM) et l'étude thermomécanique (*T*g, TGA et rhéologie) sur les films polymères.
- étude de la biocompatibilité de ces films vis-à-vis des cellules endothéliales (HUVEC) (comportement étalement et adhésion cellulaires).

Article 4 (en cours) :

- l'étude du comportement de dégradation *in vitro* des PDMMLAs de compositions chimiques et de masses molaires différentes sur une durée de 6 mois dans différentes conditions : enzymes, température, pH et masse molaire.
- l'étude de cytotoxicité des produits de dégradation vis-à-vis des HUVECs.

Article 5 (publié) : synthèse et caractérisation d'une variété de monomères (β-lactones α,α',β-trisubstituées) pour l'élaboration de nouvaux stéréopolyesters dérivés de PDMMLA.

Article 6 (sous presse) : synthèse et caractérisation de nouveaux PDMMLAs isotactiques et semi-cristallins.

Autres résultats (à publier) : synthèse et caractérisation de nouveaux PDMMLAs possèdant deux centres stéréogènes (ditacticité).

➢ Références bibliographiques

1. OMS/maladies cardiovasculaires. *Aide mémoire* **Mars 2013**, source: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/fr/index.html.
2. Warnod, V.; Emile, C., Livre: Votre cœur à l'ouvrage. **septembre 2000**, 58; http://www.abacon.com/dia/exphys/five.html, **octobre 2011**.
3. Lusis, A. J., Atherosclerosis. *Nature* **2000,** 407, (6801), 233.
4. McVeigh, G. E.; Hamilton, P. K.; Morgan, D. R., Evaluation of mechanical arterial properties: clinical, experimental and therapeutic aspects. *Clinical Science* **2002,** 102, (1), 51.
5. Eroschenko, V. P., DiFiore's Atlas of Human Histology. *Eds L.W. Wilkins, Moscow, Idaho* **2000**, 363. Sophie Jacopin; Sanofi adventis.
6. TURPIN, G., Pourquoi, quand, comment traiter les dyslipoprotéinémies? *Dijon, Editions laboratoires FOURNIER - THYLMER* **1991**.
7. Baudino, T. A.; Carver, W.; Giles, W.; Borg, T. K., Cardiac fibroblasts: friend or foe? *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **2006,** 291, (3), H1015-H1026.
8. Savage, C. O. S., The biology of the glomerulus: Endothelial cells. *Kidney Int* **1994,** 45, (2), 314.
9. Wall, R. T.; Harker, L. A., The Endothelium and Thrombosis. *Annual Review of Medicine* **1980,** 31, (1), 361-371.
10. King, A. J.; Brenner, B. M., Endothelium-derived vasoactive factors and the renal vasculature. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **1991,** 260, (4), R653-R662.
11. Takano, T.; Brady, H. R., The endothelium in glomerular inflammation. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* **1995,** 4, (3), 277-286.
12. Stary, H. C.; Chandler, A. B.; Glagov, S.; Guyton, J. R.; Insull, W.; Rosenfeld, M. E.; Schaffer, S. A.; Schwartz, C. J.; Wagner, W. D.; Wissler, R. W., A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **1994,** 14, (5), 840-56.
13. Moncada, S.; Higgs, A.; Simionescu, M.; Antohe, F., Functional Ultrastructure of the Vascular Endothelium: Changes in Various Pathologies. In *The Vascular Endothelium I*, Springer Berlin Heidelberg: 2006; Vol. 176/I, pp 41-69.
14. Sima, A.; Stancu, C.; Simionescu, M., Vascular endothelium in atherosclerosis. *Cell and Tissue Research* **2009,** 335, (1), 191-203.
15. Holifield, B.; Helgason, T.; Jemelka, S.; Taylor, A.; Navran, S.; Allen, J.; Seidel, C., Differentiated vascular myocytes: are they involved in neointimal formation? *The Journal of Clinical Investigation* **1996,** 97, (3), 814.
16. Rzucidlo, E. M.; Martin, K. A.; Powell, R. J., Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *Journal of Vascular Surgery* **2007,** 45, (6, Supplement), A25.
17. Owens, G. K., Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiological Reviews* **1995,** 75, (3), 487-517.
18. Owens, G. K.; Kumar, M. S.; Wamhoff, B. R., Molecular Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Development and Disease. *Physiological Reviews* **2004,** 84, (3), 767-801.
19. Raines, E. W.; Ross, R., Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Br Heart J.* **1993,** 69, (1 Suppl), S30–S37.
20. Benamer, N. Etude des proprietés et de l'impact fonctionnel de canaux potassiques dans les fibroblastes cardiaques. Poitiers, 2009.

21. Spector, A. A., Plasma lipid transport. **1984,** 2, (2-3), 123-34.
22. Cobbold, C. A.; Sherratt, J. A.; Maxwell, S. R. J., Lipoprotein oxidation and its significance for atherosclerosis: A mathematical approach. *Bulletin of Mathematical Biology* **2002,** 64, (1), 65-95.
23. Bowry, V. W.; Stocker, R., Tocopherol-mediated peroxidation. The prooxidant effect of vitamin E on the radical-initiated oxidation of human low-density lipoprotein. *Journal of the American Chemical Society* **1993,** 115, (14), 6029.
24. Nielsen, L. B., Transfer of low density lipoprotein into the arterial wall and risk of atherosclerosis. *Atherosclerosis* **1996,** 123, (1-2), 1.
25. Libby., P., Atherosclerosis: The New View. *Scienti c American* **2002,** 286, 29-37.
26. Cox, D. A.; Cohen, M. L., Effects of oxidized low-density lipoprotein on vascular contraction and relaxation: clinical and pharmacological implications in atherosclerosis. *Pharmacological Reviews* **1996,** 48, (1), 3-19.
27. Parthasarathy, S.; Barnett, J.; Fong, L. G., High-density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1990,** 1044, (2), 275.
28. Upston, J. M.; Terentis, A. C.; Stocker, R., Tocopherol-mediated peroxidation of lipoproteins: implications for vitamin E as a potential antiatherogenic supplement. *The FASEB Journal* **1999,** 13, (9), 977-994.
29. Björnheden, T.; Babyi, A.; Bondjers, G.; Wiklund, O., Accumulation of lipoprotein fractions and subfractions in the arterial wall, determined in an in vitro perfusion system. *Atherosclerosis* **1996,** 123, (1-2), 43.
30. Luc, G.; Lecerf, J. M.; Bard, J. M.; Hachulla, E.; Fruchart, J. C.; Devulder, B., Cholestérol et athérosclérose. *Paris MASSON Editeur* **1991**.
31. Giral, P., Athérome: Anatomie pathologique, physiopathologie, épidémiologie et facteurs de risque, prévention. *Rev Prat* **1998,** 48, 99-106.
32. Stary, H. C.; Chandler, A. B.; Glagov, S.; Guyton, J. R.; Insull, W.; Rosenfeld, M. E.; Schaffer, S. A.; Schwartz, C. J.; Wagner, W. D.; Wissler, R. W., A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* **1994,** 89, (5), 2462-78.
33. Healthwise, Incorporated. *Medical Review: Rakesh K. Pai, MD, FACC - Cardiology, Electrophysiology & Brian D. O'Brien, MD - Internal Medicine & Robert A. Kloner, MD, PhD - Cardiology* **2014**.
34. Ku, D. N.; Giddens, D. P., Pulsatile flow in a model carotid bifurcation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **1983,** 3, (1), 31-9.
35. Zarins, C. K.; Giddens, D. P.; Bharadvaj, B. K.; Sottiurai, V. S.; Mabon, R. F.; Glagov, S., Carotid bifurcation atherosclerosis. Quantitative correlation of plaque localization with flow velocity profiles and wall shear stress. *Circulation Research* **1983,** 53, (4), 502-14.
36. Dzau, V. J.; Braun-Dullaeus, R. C.; Sedding, D. G., Vascular proliferation and atherosclerosis: New perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med* **2002,** 8, (11), 1249.
37. Nissen S.E., Tuzcu E.M., Schoenhagen P., Brown B.G., Ganz P., Vogel R.A., Crowe T., Howard G., Cooper C.J., Brodie B., Grines C.L., DeMaria A.N.; Reversal Investigators., Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis: A randomized controlled trial. *JAMA* **2004,** 291, (9), 1071.
38. Nichols, W. W.; O'Rourke, M. F., Vascular impedance. *McDonald's Blood Flow in Arteries: Theoretical, Experimental and Clinical Principles* **1998,** 4th ed. London, UK: Edward Arnold, 54, 201, 284,347.

39. Ambrosi, P.; Rolland, P.; Garçon, D., Homocysteine, a risk factor of atherosclerosis. *Arch Mal Coeur Vaiss* **1996,** 89, (12), 1667-71.
40. Strong, J. P.; Malcom, G. T.; Oalmann, M. C., Environmental and genetic risk factors in early human atherogenesis: Lessons from the PDAY study. *Pathology International* **1995,** 45, (6), 403.
41. Stary, H. C.; Chandler, A. B.; Dinsmore, R. E.; Fuster, V.; Glagov, S.; Insull, W.; Rosenfeld, M. E.; Schwartz, C. J.; Wagner, W. D.; Wissler, R. W., A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis: A Report From the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* **1995,** 92, (5), 1355-1374.
42. Stary, H. C., Natural History and Histological Classification of Atherosclerotic Lesions: An Update. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **2000,** 20, (5), 1177-1178.
43. Davies, M. J.; Richardson, P. D.; Woolf, N.; Katz, D. R.; Mann, J., Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *British Heart Journal* **1993,** 69, (5), 377-381.
44. Parés-Herbuté, N.; Brillant, L.; Lameynardie, S.; Oliveira, C.; Paiwão, A., Paroi vasculaire et diabète.
45. Bauters, C.; Amouyel, P.; Ferrières, J.; Durand-Zaleski, I., Athérothrombose. Tome 1, Physiopathologie, facteurs de risque, épidémiologie, données économiques. *John Libbey Eurotext* **2001**, 5-6.
46. Thomas, D., Livre: Cardiologie. **1996**.
47. Ait-Oufella, H.; Taleb, S.; Mallat, Z.; Tedgui, A., Recent Advances on the Role of Cytokines in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31, (5), 969-979.
48. Brunner, H.; Cockcroft, J. R.; Deanfield, J.; Donald, A.; Ferrannini, E.; Halcox, J.; Kiowski, W.; Lüscher, T. F.; Mancia, G.; Natali, A.; Oliver, J. J.; Pessina, A. C.; Rizzoni, D.; Rossi, G. P.; Salvetti, A.; Spieker, L. E.; Taddei, S.; Webb, D. J., Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *Journal of Hypertension* **2005,** 23, (2), 233-246.
49. Tabas, I., Nonoxidative Modifications of Lipoproteins in Atherogenesis. *Annual Review of Nutrition* **1999,** 19, (1), 123-139.
50. Berliner, J. A.; Heinecke, J. W., The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radical Biology and Medicine* **1996,** 20, (5), 707.
51. Westhuyzen, J., The oxidation hypothesis of atherosclerosis: an update. *Annals of clinical and laboratory science* **1997,** 27, (1), 1-10.
52. Khan, B. V.; Parthasarathy, S. S.; Alexander, R. W.; Medford, R. M., Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. *The Journal of Clinical Investigation* **1995,** 95, (3), 1262.
53. Cushing, S. D.; Berliner, J. A.; Valente, A. J.; Territo, M. C.; Navab, M.; Parhami, F.; Gerrity, R.; Schwartz, C. J.; Fogelman, A. M., Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1990,** 87, (13), 5134-5138.
54. Tedgui, A.; Mallat, Z., Cytokines in Atherosclerosis: Pathogenic and Regulatory Pathways. *Physiological Reviews* **2006,** 86, (2), 515-581.
55. Glass, C. K.; Witztum, J. L., Atherosclerosis: The Road Ahead. *Cell* **2001,** 104, (4), 503.
56. Ross, R., Atherosclerosis-an Inflammatory Disease. *New England Journal of Medicine* **1999,** 340, (2), 115-126.

57. Hansson, G. r. K., Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *New England Journal of Medicine* **2005,** 352, (16), 1685-1695.
58. Fuster, V.; Badimon, L.; Badimon, J. J.; Chesebro, J. H., The Pathogenesis of Coronary Artery Disease and the Acute Coronary Syndromes. *New England Journal of Medicine* **1992,** 326, (4), 242-250.
59. Fuster, V.; Badimon, L.; Badimon, J. J.; Chesebro, J. H., The Pathogenesis of Coronary Artery Disease and the Acute Coronary Syndromes. *New England Journal of Medicine* **1992,** 326, (5), 310-318.
60. Landesberg, G., The pathophysiology of perioperative myocardial infarction: Facts and perspectives. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia* **2003,** 17, (1), 90.
61. Libby, P.; Theroux, P., Pathophysiology of Coronary Artery Disease. *Circulation* **2005,** 111, (25), 3481-3488.
62. Casscells, W.; Naghavi, M.; Willerson, J. T., Vulnerable Atherosclerotic Plaque: A Multifocal Disease. *Circulation* **2003,** 107, (16), 2072-2075.
63. Fuster, V.; Fayad, Z. A.; Badimon, J. J., Acute coronary syndromes: biology. *The Lancet* **1999,** 353, s5.
64. Hoffmeister, H. M.; Heller, W.; Seipel, L., Activation Markers of Coagulation and Fibrinolysis: Alterations and Predictive Value in Acute Coronary Syndromes. *Thrombosis and Haemostasis* **1999,** 82, (13), 76.
65. Li, Z.-Y.; Howarth, S. P. S.; Tang, T.; Gillard, J. H., How Critical Is Fibrous Cap Thickness to Carotid Plaque Stability? A Flow-Plaque Interaction Model. *Stroke* **2006,** 37, (5), 1195-1199.
66. Li, Z.-Y.; Howarth, S.; Trivedi, R. A.; U-King-Im, J. M.; Graves, M. J.; Brown, A.; Wang, L.; Gillard, J. H., Stress analysis of carotid plaque rupture based on in vivo high resolution MRI. *Journal of Biomechanics* **2006,** 39, (14), 2611.
67. Food and Drug Administration. *"Guidance for Industry and FDA Staff, Non-Clinical Tests and Recommended Labeling for Intravascular Stents and Associated Delivery Systems"* **2009**, source: http://www.fda.gov/cdrh/ode/guidance/1545.pdf.
68. Food and Drug Administration. *"Guidance for Industry - Coronary Drug-Eluting Stents - Non Clinical and Clinical Tests"* **2009**, source: http://www.fda.gov/cdrh/ode/guidance/6255.pdf.
69. Leon, L.; Greisler, H. P., Vascular grafts. *Expert Review of Cardiovascular Therapy* **2003,** 1, (4), 581-594.
70. Haidopoulos, M.; Turgeon, S.; Sarra-Bournet, C.; Laroche, G.; Mantovani, D., Development of an optimized electrochemical process for subsequent coating of 316 stainless steel for stent applications. *Journal Of Materials Science-Materials In Medicine* **2006,** 17, (7), 647-657.
71. Gershlick, A. H.; Baron, J., Dealing with in-stent restenosis. *Heart* **1998,** 79, (4), 319-323.
72. Serruys, P. W.; Dejaegere, P.; Kiemeneij, F.; Macaya, C.; Rutsch, W.; Heyndrickx, G.; Emanuelsson, H.; Marco, J.; Legrand, V.; Materne, P.; Belardi, J.; Sigwart, U.; Colombo, A.; Goy, J. J.; Vandenheuvel, P.; Delcan, J.; Morel, M. A., A Comparison Of Balloon-Expandable-Stent Implantation With Balloon Angioplasty In Patients With Coronary-Artery Disease. *New England Journal of Medicine* **1994,** 331, (8), 489-495.
73. Jan, F.; Lancelin, B., Les prothèses endocoronaires. *La presse medicale* **1997,** 26, 525-540.
74. Fischman, D. L.; Leon, M. B.; Baim, D. S.; Schatz, R. A.; Savage, M. P.; Penn, I.; Detre, K.; Veltri, L.; Ricci, D.; Nobuyoshi, M.; Cleman, M.; Heuser, R.; Almond, D.; Teirstein, P. S.; Fish, R. D.; Colombo, A.; Brinker, J.; Moses, J.; Shaknovich, A.; Hirshfeld, J.; Bailey, S.; Ellis, S.; Rake, R.; Goldberg, S., A Randomized Comparison Of Coronary-Stent Placement And Balloon Angioplasty In The Treatment Of Coronary-Artery Disease. *New England Journal Of Medicine* **1994,** 331, (8), 496-501.

75. Roriz, R.; Revel, D., L'angioplastie par ballon et endoprothèses vasculaires. *Bulletin d'information de l'agence Rhône-Alpes pour les technologies biomédicales* **1998**, 1-3.
76. Dewey, M., Cardiac CT Second Edition. *Book* **2014,** 23, (1), 57-59.
77. Ross, R., The Pathogenesis Of Atherosclerosis - A Perspective For The 1990s. *Nature* **1993,** 362, (6423), 801-809.
78. Lowe, H. C.; Oesterle, S. N.; Khachigian, L. M., Coronary in-stent restenosis: Current status and future strategies. *Journal Of The American College Of Cardiology* **2002,** 39, (2), 183-193.
79. Rensing, B. J.; Hermans, W. R.; Strauss, B. H.; Serruys, P. W., Regional Differences In Elastic Recoil After Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty - A Quantitative Angiographic Study. *Journal Of The American College Of Cardiology* **1991,** 17, (6), B34-B38.
80. Lafont, A.; Guzman, L. A.; Whitlow, P. L.; Goormastic, M.; Cornhill, J. F.; Chisolm, G. M., Restenosis After Experimental Angioplasty - Intimal, Medial, And Adventitial Changes Associated With Constrictive Remodeling. *Circulation Research* **1995,** 76, (6), 996-1002.
81. Feldman, L. J.; Steg, P. G., Perspectives de thérapie génique de la resténose. *médecine/sciences* **1996,** 12, 47-55.
82. Clowes, A. W.; Reidy, M. A.; Clowes, M. M., Mechanisms Of Stenosis After Arterial Injury. *Laboratory Investigation* **1983,** 49, (2), 208-215.
83. Kivela, A.; Hartikainen, J., Restenosis related to percutaneous coronary intervention has been solved? *Annals Of Medicine* **2006,** 38, (3), 173-187.
84. Bittl, J. A., Coronary-Stent Placement Compared With Balloon Angioplasty. *New England Journal Of Medicine* **1995,** 332, (8), 536-536.
85. Rogers, C.; Edelman, E. R., Endovascular Stent Design Dictates Experimental Restenosis And Thrombosis. *Circulation* **1995,** 91, (12), 2995-3001.
86. Erbel, R.; Haude, M.; Hopp, H. W.; Franzen, D.; Rupprecht, H. J.; Heublein, B.; Fischer, K.; De Jaegere, P.; Serruys, P.; Rutsch, W.; Probst, P., Coronary-artery stenting compared with balloon angioplasty for restenosis after initial balloon angioplasty. *New England Journal Of Medicine* **1998,** 339, (23), 1672-1678.
87. Puel, J.; Lacapere, B.; Sabathier, M.; Schmitt, R.; Monassier, J. P.; Valeix, B.; Labrunie, P.; Bounhoure, J. P., Coronary Revascularization During The Acute Phase Of Myocardial-Infarction - Short And Medium Term Survival Of 359 Patients - A Cooperative Study. *Archives Des Maladies Du Coeur Et Des Vaisseaux* **1986,** 79, (4), 409-417.
88. Eeckhout, E.; Kappenberger, L.; Goy, J. J., Stents for intracoronary placement: Current status and future directions. *Journal Of The American College Of Cardiology* **1996,** 27, (4), 757-765.
89. Hindlet, P.; Fargeot, C.; Juliard, J. M.; Farinotti, R., Endoprothèses coronaires : critères de choix et élaboration d'une fiche technique type. *Journal de Pharmacie Clinique* **2005,** 24, (1), 40-46.
90. Goodfellow, "Propriétés des matériaux - Alliage". **2011**. Available: http://www.goodfellow.com/.
91. Mani, G.; Feldman, M. D.; Patel, D.; Agrawal, C. M., Coronary stents: a materials perspective. *Biomaterials* **2007,** 28, (9), 1689-1710.
92. M. Haïdopoulos; F. Elfeninat; D. Mantovani, Memory Metals. *in "Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering", Wnek G., Bowlin G., Eds. Marcel Dekker, New York* **2004**, 1340-1347.
93. Koster, R.; Vieluf, D.; Kiehn, M.; Sommerauer, M.; Kahler, J.; Baldus, S.; Meinertz, T.; Hamm, C. W., Nickel and molybdenum contact allergies in patients with coronary in-stent restenosis. *Lancet* **2000,** 356, (9245), 1895-1897.

94. Jaganathan, S. K.; Supriyanto, E.; Murugesan, S.; Balaji, A.; Asokan, M. K., Biomaterials in cardiovascular research: applications and clinical implications. *BioMed research international* **2014,** 2014.
95. Pasterkamp, G.; Smits, P. C., Remodelling of coronary arteries. *Journal Of Cardiovascular Risk* **2002,** 9, (5), 229-235.
96. Moses, J. W.; Leon, M. B.; Popma, J. J.; Fitzgerald, P. J.; Holmes, D. R.; O'Shaughnessy, C.; Caputo, R. P.; Kereiakes, D. J.; Williams, D. O.; Teirstein, P. S.; Jaeger, J. L.; Kuntz, R. E., Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *New England Journal Of Medicine* **2003,** 349, (14), 1315-1323.
97. Bennett, M. R.; O'Sullivan, M., Mechanisms of angioplasty and stent restenosis: implications for design of rational therapy. *Pharmacology & Therapeutics* **2001,** 91, (2), 149-166.
98. Puranik, A. S.; Dawson, E. R.; Peppas, N. A., Recent advances in drug eluting stents. *International journal of pharmaceutics* 441, (1), 665-679.
99. Srinivasan, R.; Marchant, R. E.; Sen Gupta, A., In vitro and in vivo platelet targeting by cyclic RGD-modified liposomes. *Journal Of Biomedical Materials Research Part A* 93A, (3), 1004-1015.
100. Schober, A.; Manka, D.; von Hundelshausen, P.; Huo, Y. Q.; Hanrath, P.; Sarembock, I. J.; Ley, K.; Weber, C., Deposition of platelet RANTES triggering monocyte recruitment requires P-selectin and is involved in neointima formation after arterial injury. *Circulation* **2002,** 106, (12), 1523-1529.
101. Gaspardone, A.; Versaci, F., Coronary stenting and inflammation. *American Journal Of Cardiology* **2005,** 96, (12A), 65L-70L.
102. Welt, F. G. P.; Rogers, C., Inflammation and restenosis in the stent era. *Arteriosclerosis Thrombosis And Vascular Biology* **2002,** 22, (11), 1769-1776.
103. Muto, A.; Fitzgerald, T. N.; Pimiento, J. M.; Maloney, S. P.; Teso, D.; Paszkowiak, J. J.; Westvik, T. S.; Kudo, F. A.; Nishibe, T.; Dardik, A., Smooth muscle cell signal transduction: Implications of vascular biology for vascular surgeons. *Journal Of Vascular Surgery* **2007,** 45, 15A-24A.
104. Liang, K.-W.; Yin, S.-C.; Ting, C.-T.; Lin, S.-J.; Hsueh, C.-M.; Chen, C.-Y.; Hsu, S.-L., Berberine inhibits platelet-derived growth factor-induced growth and migration partly through an AMPK-dependent pathway in vascular smooth muscle cells. *European Journal Of Pharmacology* **2008,** 590, (1-3), 343-354.
105. Iwasaki, H.; Shimada, A.; Yokoyama, K.; Ito, E., Structure and glycosylation of lipoteichoic acids in Bacillus strains. *Journal of bacteriology* **1989,** 171, (1), 424-429.
106. Sutcliffe, I. C.; Shaw, N., Atypical lipoteichoic acids of gram-positive bacteria. *Journal of bacteriology* **1991,** 173, (22), 7065.
107. Williams, D. F., Biodegradable ImplantsMechanisms of biodegradation of implantable polymers. *Clinical Materials* **1992,** 10, (1), 9.
108. Williams, D. F., *Fundamental aspects of biocompatibility: Vol.1*. CRC Press: Boca Raton, 1981.
109. Feldman, D., Polymer History. *Designed Monomers and Polymers* **2008,** 11, (1), 1.
110. Amass, W.; Amass, A.; Tighe, B., A review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies. *Polymer International* **1998,** 47, (2), 89.
111. Yasin, M.; Holland, S. J.; Jolly, A. M.; Tighe, B. J., Polymers for biodegradable medical devices: VI. Hydroxybutyrate-hydroxyvalerate copolymers: accelerated degradation of blends with polysaccharides. *Biomaterials* **1989,** 10, (6), 400.

112. Wang, S.; Cui, W.; Bei, J., Bulk and surface modifications of polylactide. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2005,** 381, (3), 547-556.
113. Wang, H.; Sun, X.; Seib, P., Properties of poly(lactic acid) blends with various starches as affected by physical aging. *Journal of Applied Polymer Science* **2003,** 90, (13), 3683.
114. Broz, M. E.; VanderHart, D. L.; Washburn, N. R., Structure and mechanical properties of poly(d,l-lactic acid)/poly(ε-caprolactone) blends. *Biomaterials* **2003,** 24, (23), 4181.
115. Chuenjitkuntaworn, B.; Inrung, W.; Damrongsri, D.; Mekaapiruk, K.; Supaphol, P.; Pavasant, P., Polycaprolactone/hydroxyapatite composite scaffolds: Preparation, characterization, and in vitro and in vivo biological responses of human primary bone cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2010,** 94A, (1), 241.
116. Kasuga, T.; Ota, Y.; Nogami, M.; Abe, Y., Preparation and mechanical properties of polylactic acid composites containing hydroxyapatite fibers. *Biomaterials* **2000,** 22, (1), 19.
117. Kasuga, T.; Maeda, H.; Kato, K.; Nogami, M.; Hata, K.; Ueda, M., Preparation of poly(lactic acid) composites containing calcium carbonate (vaterite). *Biomaterials* **2003,** 24, (19), 3247.
118. Makadia, H. K.; Siegel, S. J., Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers* **2011,** 3, (3), 1377.
119. Huh, K. M.; Cho, Y. W.; Park, K., PLGA-PEG block copolymers for drug formulations. *Drug Dev Deliv* **2003,** 3, (5).
120. Sydow-Plum, G.; Tabrizian, M., Review of stent coating strategies: clinical insights. *Materials Science and Technology* **2008,** 24, (9), 1127-1143.
121. Wieneke, H.; Sawitowski, T.; Wnendt, S.; Fischer, A.; Dirsch, O.; Karoussos, I. A.; Erbel, R., Stent coating: a new approach in interventional cardiology. *Herz* **2002,** 27, (6), 518-526.
122. Sigwart, U.; Puel, J.; Mirkovitch, V.; Joffre, F.; Kappenberger, L., Intravascular stents to prevent occlusion and re-stenosis after transluminal angioplasty. *New England Journal of Medicine* **1987,** 316, (12), 701-706.
123. Wieneke, H.; Dirsch, O.; Sawitowski, T.; Gu, Y. L.; Brauer, H.; Dahmen, U.; Fischer, A.; Wnendt, S.; Erbel, R., Synergistic effects of a novel nanoporous stent coating and tacrolimus on intima proliferation in rabbits. *Catheterization and Cardiovascular Interventions* **2003,** 60, (3), 399-407.
124. Misaki, A.; Azuma, I.; Yamamura, Y., Structural and immunochemical studies on D-arabino-D-mannans and D-mannans of Mycobacterium tuberculosis and other Mycobacterium species. *Journal of biochemistry* **1977,** 82, (6), 1759-1770.
125. Ratner, B. D.; Hoffman, A. S.; Schoen, F. J.; Lemons, J. E., *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. Academic press: 2004.
126. Serruys, P. W.; Ruygrok, P.; Neuzner, J.; Piek, J. J.; Seth, A.; Schofer, J. J.; Richardt, G.; Wiemer, M.; Carrie, D.; Thuesen, L., A randomised comparison of an everolimus-eluting coronary stent with a paclitaxel-eluting coronary stent: the SPIRIT II trial. *EuroIntervention: journal of EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology* **2006,** 2, (3), 286-294.
127. Hinrichs, W. L. J.; Zweep, H. P.; Satoh, S.; Feijen, J.; Wildevuur, C. R. H., Supporting, microporous, elastomeric, degradable prostheses to improve the arterialization of autologous vein grafts. *Biomaterials* **1994,** 15, (2), 83-91.
128. Bär, F. W.; Van Der Veen, F. H.; Benzina, A.; Habets, J.; Koole, L. H., New biocompatible polymer surface coating for stents results in a low neointimal response. *Journal of biomedical materials research* **2000,** 52, (1), 193-198.
129. Banai, S.; Gertz, S. D.; Gavish, L.; Chorny, M.; Perez, L. S.; Lazarovichi, G.; Ianculuvich, M.; Hoffmann, M.; Orlowski, M.; Golomb, G., Tyrphostin AGL-2043 eluting stent reduces neointima formation in porcine coronary arteries. *Cardiovascular Research* **2004,** 64, (1), 165-171.

130. Atalar, E.; Aytemir, K.; Aksöyek, S.; Övünç, K.; Oto, A., Effects of stent coating on platelets and endothelial cells after intracoronary stent implantation. *Clinical cardiology* **2001,** 24, (2), 159-164.
131. Van Der Giessen, W. J.; Lincoff, A. M.; Schwartz, R. S.; Van Beusekom, H. M. M.; Serruys, P. W.; Holmes, D. R.; Ellis, S. G.; Topol, E. J., Marked inflammatory sequelae to implantation of biodegradable and nonbiodegradable polymers in porcine coronary arteries. *Circulation* **1996,** 94, (7), 1690-1697.
132. Edelman, E. R.; Adams, D. H.; Karnovsky, M. J., Effect of controlled adventitial heparin delivery on smooth muscle cell proliferation following endothelial injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1990,** 87, (10), 3773-3777.
133. Grenadier, E.; Roguin, A.; Hertz, I.; Peled, B.; Boulos, M.; Nikolsky, E.; Amikam, S.; Kerner, A.; Cohen, S.; Beyar, R., Stenting very small coronary narrowings (< 2 mm) using the biocompatible phosphorylcholine-coated coronary stent. *Catheterization and cardiovascular interventions* **2002,** 55, (3), 303-308.
134. Lewis, A. L.; Furze, J. D.; Small, S.; Robertson, J. D.; Higgins, B. J.; Taylor, S.; Ricci, D. R., Long-term stability of a coronary stent coating post-implantation. *Journal of biomedical materials research* **2002,** 63, (6), 699-705.
135. Lewis, A. L.; Stratford, P. W., Phosphorylcholine-coated stents. *Journal of long-term effects of medical implants* **2002,** 12, (4).
136. Verheye, S.; Markou, C. P.; Salame, M. Y.; Wan, B.; King, S. B.; Robinson, K. A.; Chronos, N. A. F.; Hanson, S. R., Reduced thrombus formation by hyaluronic acid coating of endovascular devices. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2000,** 20, (4), 1168-1172.
137. Pitt, W. G.; Morris, R. N.; Mason, M. L.; Hall, M. W.; Luo, Y.; Prestwich, G. D., Attachment of hyaluronan to metallic surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2004,** 68, (1), 95-106.
138. Heublein, B.; Evagorou, E. G.; Rohde, R.; Ohse, S.; Meliss, R. R.; Barlach, S.; Haverich, A., Polymerized degradable hyaluronan--a platform for stent coating with inherent inhibitory effects on neointimal formation in a porcine coronary model. *The International journal of artificial organs* **2002,** 25, (12), 1166-1173.
139. Holmes, D. R.; Camrud, A. R.; Jorgenson, M. A.; Edwards, W. D.; Schwartz, R. S., Polymeric stenting in the porcine coronary artery model: differential outcome of exogenous fibrin sleeves versus polyurethane-coated stents. *Journal of the American College of Cardiology* **1994,** 24, (2), 525-531.
140. McKenna, C. J.; Camrud, A. R.; Sangiorgi, G.; Kwon, H. M.; Edwards, W. D.; Holmes, D. R.; Schwartz, R. S., Fibrin-Film Stenting in a Porcine Coronary Injury Model: Efficacy and Safety Compared With Uncoated Stents 1. *Journal of the American College of Cardiology* **1998,** 31, (6), 1434-1438.
141. Byer, A.; Peters, S.; Settepani, F.; Pagliaro, M.; Galletti, G., Fibrin sealant coated stents compared with non-coated stents in a procine carotid artery model: Preliminary study report. *Journal of Cardiovascular Surgery* **2001,** 42, (4), 543.
142. Rogers, C.; Welt, F. G. P.; Karnovsky, M. J.; Edelman, E. R., Monocyte recruitment and neointimal hyperplasia in rabbits Coupled inhibitory effects of heparin. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **1996,** 16, (10), 1312-1318.
143. Page, C., Heparin and related drugs: Beyond anticoagulant activity. *ISRN pharmacology* 2013.
144. Liistro, F.; Bolognese, L., Drug-eluting stents. *Heart Drug* **2003,** 3, (4), 203-213.

145. Marx, S. O.; Jayaraman, T.; Go, L. O.; Marks, A. R., Rapamycin-FKBP inhibits cell cycle regulators of proliferation in vascular smooth muscle cells. *Circulation research* **1995,** 76, (3), 412-417.
146. Poon, M.; Marx, S. O.; Gallo, R.; Badimon, J. J.; Taubman, M. B.; Marks, A. R., Rapamycin inhibits vascular smooth muscle cell migration. *Journal of Clinical Investigation* **1996,** 98, (10), 2277.
147. Huang, Y.; Ng, H. C. A.; Ng, X. W.; Subbu, V., Drug-eluting biostable and erodible stents. *Journal of Controlled Release* 193, 188-201.
148. Huang, Y.; Ng, H. C. A.; Ng, X. W.; Subbu, V., Drug-eluting biostable and erodible stents. *Journal of Controlled Release* **2014,** 193, 188-201.
149. Nottelet, B. Synthèse et caractérisation de nouveaux polyesters biodégradables et hydrosolubles Ã fonctions cationiques ou amphotères. Université Montpellier II-Sciences et Techniques du Languedoc, 2005.
150. Ponsart, S.P. Modification chimique de polyesters aliphatiques biorésorbables par voie anionique: une nouvelle voie d'accès à des copolyesters fonctionnalisés. Montpellier 1, 2000.
151. Törmälä, P.; Pohjonen, T.; Rokkanen, P., Bioabsorbable polymers: materials technology and surgical applications. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine* **1998,** 212, (2), 101-111.
152. Lloyd, A. W., Interfacial bioengineering to enhance surface biocompatibility. *Medical device technology* **2001,** 13, (1), 18-21.
153. Ikada, Y.; Tsuji, H., Biodegradable polyesters for medical and ecological applications. *Macromolecular rapid communications* **2000,** 21, (3), 117-132.
154. Eastmond, P. J.; Graham, I. A., Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. *Trends in Plant Science* **2001,** 6, (2), 72.
155. Grima, S. Biodégradation de matériaux polymères à usage agricole: étude et mise au point d'une nouvelle méthode de test, analyse des produits de dégradation et impact environnemental. Toulouse, INPT, 2002.
156. Pagga, U.; Beimborn, D. B.; Boelens, J.; De Wilde, B., Determination of the aerobic biodegradability of polymeric material in a laboratory controlled composting test. *Chemosphere* **1995,** 31, (11-12), 4475.
157. Firenzuoli, A. M.; Vanni, P.; Mastronuzzi, E.; Zanobini, A.; Baccari, V., Participation of the glyoxylate cycle in the metabolism of germinating seed of Pinus pinea. *Life Sciences* **1968,** 7, (24), 1251.
158. Vert, M.; Li, S. M.; Spenlehauer, G.; Guérin, P., Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *Journal of materials science: Materials in medicine* **1992,** 3, (6), 432-446.
159. Nair, L. S.; Laurencin, C. T., Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in polymer science* **2007,** 32, (8), 762-798.
160. Vroman, I.; Tighzert, L., Biodegradable polymers. *Materials* **2009,** 2, (2), 307-344.
161. Scott, G., *Degradable polymers: principles and applications*. Springer Science & Business Media: 2013.
162. Ponsart, S. p.; Mallard, C.; Université de Montpellier, I.; biologiques, U. F. R. d. s. p. e. Modification chimique de polyesters aliphatiques biorésorbables par voie anionique: une nouvelle voie d'accès à des copolyesters fonctionnalisés. [s.n.], [S.l.], 2000.
163. Lee, S. Y., Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and bioengineering* **1996,** 49, (1), 1-14.
164. Anderson, A. J.; Dawes, E. A., Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological reviews* **1990,** 54, (4), 450-472.

165. Shah, A. A.; Hasan, F.; Hameed, A.; Ahmed, S., Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnology advances* **2008,** 26, (3), 246-265.
166. Khanna, S.; Srivastava, A. K., Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry* **2005,** 40, (2), 607-619.
167. Lu, J.; Tappel, R. C.; Nomura, C. T., Mini-review: biosynthesis of poly (hydroxyalkanoates). *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews* **2009,** 49, (3), 226-248.
168. Stevens, E. S., *Green plastics: an introduction to the new science of biodegradable plastics*. Princeton University Press: 2002.
169. Zinn, M.; Hany, R., Tailored material properties of polyhydroxyalkanoates through biosynthesis and chemical modification. *Advanced Engineering Materials* **2005,** 7, (5), 408-411.
170. Escapa, I. F.; Morales, V.; Martino, V. n. P.; Pollet, E.; Avérous, L.; Garcia, J. L.; Prieto, M. A., Disruption of β-oxidation pathway in Pseudomonas putida KT2442 to produce new functionalized PHAs with thioester groups. *Applied microbiology and biotechnology* **2011,** 89, (5), 1583-1598.
171. Townsend, K. J.; Busse, K.; Kressler, J.; Scholz, C., Contact Angle, WAXS, and SAXS Analysis of Poly (β-hydroxybutyrate) and Poly (ethylene glycol) Block Copolymers Obtained via Azotobacter vinelandii UWD. *Biotechnology progress* **2005,** 21, (3), 959-964.
172. Yu, L., Biodegradable Polymer Blends and Composites from Renewable Resources. **2009**, 214-215.
173. Aldo R. Boccaccini, J. E. G., Tissue Engineering Using Ceramics and Polymers. **2007**, 77.
174. Bugnicourt, E.; Cinelli, P.; Lazzeri, A.; Alvarez, V., Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polymer Letters* 8, (11).
175. Jacquel, N.; Lo, C. W.; Wu, H. S.; Wei, Y. H.; Wang, S. S., Solubility of polyhydroxyalkanoates by experiment and thermodynamic correlations. *AIChE journal* **2007,** 53, (10), 2704-2714.
176. Renard, E.; Tanguy, P. Y.; Samain, E.; Guerin, P., Synthesis of novel graft polyhydroxyalkanoates. *Macromolecular Symposia* **2003,** 197, 11-18.
177. Bear, M. M.; LeboucherDurand, M. A.; Langlois, V.; Lenz, R. W.; Goodwin, S.; Guerin, P., Bacterial poly-3-hydroxyalkenoates with epoxy groups in the side chains. *Reactive & Functional Polymers* **1997,** 34, (1), 65-77.
178. Renard, E.; Poux, A.; Timbart, L.; Langlois, V.; Guerin, P., Preparation of a novel artificial bacterial polyester modified with pendant hydroxyl groups. *Biomacromolecules* **2005,** 6, (2), 891-896.
179. Rai, R.; Keshavarz, T.; Roether, J. A.; Boccaccini, A. R.; Roy, I., Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. *Materials Science and Engineering: R: Reports* **2011,** 72, (3), 29-47.
180. de Roo, G.; Kellerhals, M. B.; Ren, Q.; Witholt, B.; Kessler, B., Production of chiral R-3-hydroxyalkanoic acids and R-3-hydroxyalkanoic acid methylesters via hydrolytic degradation of polyhydroxyalkanoate synthesized by pseudomonads. *Biotechnology and bioengineering* **2002,** 77, (6), 717-722.
181. Holmes, P. A., Applications of PHB-a microbially produced biodegradable thermoplastic. *Physics in technology* **1985,** 16, (1), 32.
182. Vert, M., Aliphatic polyesters: great degradable polymers that cannot do everything. *Biomacromolecules* **2005,** 6, (2), 538-546.
183. Aldor, I. S.; Kim, S.-W.; Prather, K. L. J.; Keasling, J. D., Metabolic engineering of a novel propionate-independent pathway for the production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-

hydroxyvalerate) in recombinant Salmonella enterica serovar typhimurium. *Applied and environmental microbiology* **2002,** 68, (8), 3848-3854.

184. Valentin, H. F.; Dennis, D., Metabolic pathway for poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) formation in Nocardia corallina: inactivation of mutB by chromosomal integration of a kanamycin resistance gene. *Applied and environmental microbiology* **1996,** 62, (2), 372-379.
185. Satoh, H.; Mino, T.; Matsuo, T., PHA production by activated sludge. *International journal of biological macromolecules* **1999,** 25, (1), 105-109.
186. Matsumoto, A. H.; Teitelbaum, G. P.; Barth, K. H.; Carvlin, M. J.; Savin, M. A.; Strecker, E. P., Tantalum vascular stents: in vivo evaluation with MR imaging. *Radiology* **1989,** 170, (3), 753-755.
187. Matsuno, H.; Yokoyama, A.; Watari, F.; Uo, M.; Kawasaki, T., Biocompatibility and osteogenesis of refractory metal implants, titanium, hafnium, niobium, tantalum and rhenium. *Biomaterials* **2001,** 22, (11), 1253-1262.
188. Leng, Y. X.; Chen, J. Y.; Yang, P.; Sun, H.; Wang, J.; Huang, N., The biocompatibility of the tantalum and tantalum oxide films synthesized by pulse metal vacuum arc source deposition. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **2006,** 242, (1), 30-32.
189. Foti, R.; Tamburino, C.; Galassi, A. R.; Russo, G.; Nicosia, A.; Grassi, R.; Monaco, A.; Azzarelli, S.; Mammana, C.; Calvi, V., [Safety, feasibility and efficacy of a new single-wire stent in the treatment of complex coronary lesions: the angiostent]. *Cardiologia (Rome, Italy)* **1998,** 43, (7), 725-730.
190. Zitter, H.; Plenk, H., The electrochemical behavior of metallic implant materials as an indicator of their biocompatibility. *Journal of biomedical materials research* **1987,** 21, (7), 881-896.
191. Loyer, P.; Cammas-Marion, S., Natural and synthetic poly (malic acid)-based derivates: a family of versatile biopolymers for the design of drug nanocarriers. *Journal of drug targeting* **2014,** 22, (7), 556-575.
192. Sosnowski, S.; Slomkowski, S.; Penczek, S., Kinetics of the anionic polymerization of ε-caprolactone with K+ · (dibenzo-18-crown-6 ether) counterion. Propagation via macroions and macroion pairs. *Die Makromolekulare Chemie* **1991,** 192, (3), 735.
193. Rundback, J.; Rozenblat, G.; Poplausky, M.; Crea, G.; Maddineni, S.; Olson, C.; Agrawal, U., Re: Jejunal Artery Angioplasty and Coronary Stent Placement for Acute Mesenteric Ischemia. *Cardiovascular and Interventional Radiology* **2000,** 23, (5), 410-412.
194. Pagga, U.; Beimborn, D. B.; Yamamoto, M., Biodegradability and compostability of polymers-Test methods and criteria for evaluation. *Journal of environmental polymer degradation* **1996,** 4, (3), 173-178.
195. Domb, A. J.; Kost, J.; Wiseman, D., *Handbook of biodegradable polymers*. CRC Press: 1998; Vol. 7.
196. Lim, L. T.; Auras, R.; Rubino, M., Processing technologies for poly (lactic acid). *Progress in polymer science* **2008,** 33, (8), 820-852.
197. Okada, M., Chemical syntheses of biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science* **2002,** 27, (1), 87-133.
198. Narayanan, N.; Roychoudhury, P. K.; Srivastava, A., L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic journal of Biotechnology* **2004,** 7, (2), 167-178.
199. Tirelli, N., Biopolymers for Medical and Pharmaceutical Applications. In Wiley Online Library: 2006.
200. Garlotta, D., A literature review of poly (lactic acid). *Journal of Polymers and the Environment* **2001,** 9, (2), 63-84.

201. Chanfreau, S. b.; Mena, M.; Porras-Dominguez, J. R.; Ramirez-Gilly, M.; Gimeno, M.; Roquero, P.; Tecante, A.; Bárzana, E., Enzymatic synthesis of poly-l-lactide and poly-l-lactide-co-glycolide in an ionic liquid. *Bioprocess and biosystems engineering* **2010,** 33, (5), 629-638.
202. Jedliński, Z.; Wałach, W.; Kurcok, P.; Adamus, G. y., Polymerization of lactones, 12. Polymerization of L-dilactide and L, D-dilactide in the presence of potassium methoxide. *Die Makromolekulare Chemie* **1991,** 192, (9), 2051-2057.
203. Ropson, N.; Dubois, P.; Jérôme, R.; Teyssie, P., Macromolecular engineering of polylactones and polylactides. 20. Effect of monomer, solvent, and initiator on the ring-opening polymerization as initiated with aluminum alkoxides. *Macromolecules* **1995,** 28, (23), 7589-7598.
204. Hartmann, M. H., High molecular weight polylactic acid polymers. In *Biopolymers from renewable resources*, Springer: 1998; pp 367-411.
205. Penczek, S.; Duda, A.; Slomkowski, S. The reactivity-selectivity principle in polymerization. The case of polymerization of ε-caprolactone, *Makromolekulare Chemie. Macromolecular Symposia*, 1992; Wiley Online Library: 1992; pp 31-40.
206. Kricheldorf, H. R.; Kreiser-Saunders, I., Polylactones, 19. Anionic polymerization of L-lactide in solution. *Die Makromolekulare Chemie* **1990,** 191, (5), 1057-1066.
207. Coulembier, O.; Degée, P.; Hedrick, J. L.; Dubois, P., From controlled ring-opening polymerization to biodegradable aliphatic polyester: especially poly (β-malic acid) derivatives. *Progress in Polymer Science* **2006,** 31, (8), 723-747.
208. Jedlinski, Z.; Kurcok, P.; Lenz, R. W., First facile synthesis of biomimetic poly-(R)-3-hydroxybutyrate via regioselective anionic polymerization of (S)-β-butyrolactone. *Macromolecules* **1998,** 31, (19), 6718-6720.
209. Hofman, A.; Slomkowski, S.; Penczek, S., Structure of active centers and mechanism of the anionic polymerization of lactones. *Die Makromolekulare Chemie* **1984,** 185, (1), 91-101.
210. Jedlinski, Z.; Kurcok, P.; Kowalczuk, M., Polymerization of. β-lactones initiated by potassium solutions. *Macromolecules* **1985,** 18, (12), 2679-2683.
211. Jedlinski, Z.; Kowalczuk, M.; Kurcok, P., What is the real mechanism of anionic polymerization of β-lactones by potassium alkoxides? A critical approach. *Macromolecules* **1991,** 24, (5), 1218-1219.
212. Vert, M.; Lenz, R. W., Preparation And Properties of Poly-β-Malic Acid - Functional Polyester Of Potential Biomedical Importance. *Abstracts of Papers of The American Chemical Society* **1979**, (APR), 113-113.
213. Rathberger, K.; Reisner, H.; Willibald, B.; Molitoris, H. P.; Holler, E., Comparative synthesis and hydrolytic degradation of poly (L-malate) by myxomycetes and fungi. *Mycological Research* **1999,** 103, 513-520.
214. Kajiyama, T.; Kobayashi, H.; Taguchi, T.; Kataoka, K.; Tanaka, J., Improved synthesis with high yield and increased molecular weight of poly(α,β-malic acid) by direct polycondensation. *Biomacromolecules* **2004,** 5, (1), 169-174.
215. Ouchi, T.; Fujino, A., Synthesis Of Poly(α-Malic Acid) And Its Hydrolysis Behavior Invitro. *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry And Physics* **1989,** 190, (7), 1523-1530.
216. Kimura, Y.; Shirotani, K.; Yamane, H.; Kitao, T., Ring-Opening Polymerization of 3(S)-[(Benzyloxycarbonyl)Methyl]-1,4-Dioxane-2,5-Dione - A New Route To A Poly(α-Hydroxy Acid) With Pendant Carboxyl Groups. *Macromolecules* **1988,** 21, (11), 3338-3340.
217. Cammas, S.; Guerin, P.; Girault, J. P.; Holler, E.; Gache, Y.; Vert, M., Natural Poly(L-Malic Acid) - Nmr Shows A Poly(3-Hydroxy Acid)-Type Structure. *Macromolecules* **1993,** 26, (17), 4681-4684.

218. Johns, D. B.; Lenz, R. W.; Vert, M., Poly (Malic Acid) Part I-Preparation and Polymerization of Benzyl Malolactonate. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **1986,** 1, (1), 47-60.
219. Guerin, P.; Vert, M.; Braud, C.; Lenz, R. W., Optically active poly (β-malic-acid). *Polymer Bulletin* **1985,** 14, (2), 187-192.
220. Jaffredo, C. d. G.; Guillaume, S. M., Benzyl β-malolactonate polymers: a long story with recent advances. *Polymer Chemistry* 5, (14), 4168-4194.
221. Braud, C.; Bunel, C.; Garreau, H.; Vert, M., Evidence for the amphiphilic structure of partially hydrogenolyzed poly (β-malic acid benzyl ester). *Polymer Bulletin* **1983,** 9, (4-5), 198-203.
222. Cammas, S.; Leboucher, M. A.; Renard, I.; Boutault, K., Tailor-Making of Multimeric Poly (β-malic acid) Derivatives: Property Adjustment through Ester Pendant Groups. *Studies in polymer science* **1994,** 12, 534-534.
223. Cammas-Marion, S.; Guérin, P. In *Design of malolactonic acid esters with a large spectrum of specified pendant groups in the engineering of biofunctional and hydrolyzable polyesters*, Macromolecular Symposia, 2000; Wiley Online Library: 2000; pp 167-186.
224. Vert, M., Polyvalent polymeric drug carriers. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems* **1985,** 2, (3), 291-327.
225. Köster, R.; Vieluf, D.; Kiehn, M.; Sommerauer, M.; Kähler, J.; Baldus, S.; Meinertz, T.; Hamm, C. W., Nickel and molybdenum contact allergies in patients with coronary in-stent restenosis. *The Lancet* **2000,** 356, (9245), 1895-1897.
226. Adams, G. J.; Baltazar, U.; Karmonik, C.; Bordelon, C.; Lin, P. H.; Bush, R. L.; Lumsden, A. B.; Morrisett, J. D., Comparison of 15 different stents in superficial femoral arteries by high resolution MRI ex vivo and in vivo. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* **2005,** 22, (1), 125-135.
227. Bhargava, B.; De Scheerder, I.; Ping, Q. B.; Yanming, H.; Chan, R.; Soo Kim, H.; Kollum, M.; Cottin, Y.; Leon, M. B., A novel platinum-iridium, potentially gamma radioactive stent: Evaluation in a porcine model. *Catheterization and cardiovascular interventions* **2000,** 51, (3), 364-368.
228. Maitz, M. F.; Shevchenko, N., Plasma-immersion ionic-implanted nitinol surface with depressed nickel concentration for implants in blood. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2006,** 76, (2), 356-365.
229. Shih, C. C.; Lin, S.-J.; Chung, K.-H.; Chen, Y.-L.; Su, Y.-Y., Increased corrosion resistance of stent materials by converting current surface film of polycrystalline oxide into amorphous oxide. *Journal of biomedical materials research* **2000,** 52, (2), 323-332.
230. Nakamura, S.; Degawa, T.; Nishida, T.; Anzai, H.; Mitsuo, K.; Sakatani, H.; Tsunoda, T.; Ui, K.; Yabuki, S.; Yamaguchi, T., Preliminary experience of Act-One coronary stent implantation. *Journal of the American College of Cardiology* **1996,** 27, (2 SUPPL. A), 53A.
231. Abdellaoui, K.; Boustta, M.; Vert, M.; Morjani, H.; Manfait, M., Metabolite-derived artificial polymers designed for drug targeting, cell penetration and bioresorption. *European journal of pharmaceutical sciences* **1998,** 6, (1), 61-73.
232. Ding, H.; Inoue, S.; Ljubimov, A. V.; Patil, R.; Portilla-Arias, J.; Hu, J.; Konda, B.; Wawrowsky, K. A.; Fujita, M.; Karabalin, N., Inhibition of brain tumor growth by intravenous poly (β-L-malic acid) nanobioconjugate with pH-dependent drug release. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010,** 107, (42), 18143-18148.
233. Patil, R.; Portilla-Arias, J.; Ding, H.; Inoue, S.; Konda, B.; Hu, J.; Wawrowsky, K. A.; Shin, P. K.; Black, K. L.; Holler, E., Temozolomide delivery to tumor cells by a multifunctional nano vehicle based on poly (β-L-malic acid). *Pharmaceutical research* **2010,** 27, (11), 2317-2329.

234. Cammas-Marion, S.; Béar, M. M.; Harada, A.; Guérin, P.; Kataoka, K., New macromolecular micelles based on degradable amphiphilic block copolymers of malic acid and malic acid ester. *Macromolecular Chemistry And Physics* **2000,** 201, (3), 355-364.
235. Suo, A.; Qian, J.; Yao, Y.; Zhang, W., Galactosylated poly (ethylene glycol)-b-poly (l-lactide-co-β-malic acid) block copolymer micelles for targeted drug delivery: preparation and in vitro characterization. *International journal of nanomedicine* **2010,** 5, 1029.
236. Wang, W.; Liu, Y.; Wang, J.; Jia, X.; Wang, L.; Yuan, Z.; Tang, S.; Liu, M.; Tang, H.; Yu, Y., A novel copolymer poly (lactide-co-β-malic acid) with extended carboxyl arms offering better cell affinity and hemacompatibility for blood vessel engineering. *Tissue Engineering Part A* **2008,** 15, (1), 65-73.
237. Mabille, C.; Masure, M. l.; Hemery, P.; Guérin, P., Obvious complexity of the anionic polymerization of malolactonic acid esters. *Polymer Bulletin* **1998,** 40, (4-5), 381-387.
238. Barbaud, C.; Abdillah, F.; Fabienne, F.; Guerrouache, M.; Guerin, P., Synthesis of new α, α', β-trisubstituted b-lactones as monomers for hydrolyzable polyesters. *Designed Monomers and Polymers* **2003**, (4), 353-368.
239. Coulembier, O.; Degée, P.; Guérin, P.; Dubois, P., тensioactive Properties of Poly([*R*,*S*]-β-malic acid-*b*-ε-caprolactone) Diblock Copolymers in Aqueous Solution. *Langmuir* **2003,** 19, (21), 8661-8666.
240. Fournie, P.; Domurado, D.; Guerin, P.; Braud, C.; Vert, M.; Madelmont, J.-C., In vivo fate of end-chain radiolabelled poly (β-malic acid), a water-soluble biodegradable drug carrier. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **1990,** 5, (4), 381-395.
241. Gunn, J.; Cumberland, D., Stent coatings and local drug delivery. State of the art. *European Heart Journal* **1999,** 20, (23), 1693-1700.
242. Tosin, M.; Degli-Innocenti, F.; Bastioli, C., Detection of a toxic product released by a polyurethane-containing film using a composting test method based on a mineral bed. *Journal of environmental polymer degradation* **1998,** 6, (2), 79-90.
243. Amass, W.; Amass, A.; Tighe, B., A review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies. *Polymer international* **1998,** 47, (2), 89-144.
244. Ginsac, N. Caractérisation de matériaux composite polyacide lactique-bioverre pour application dans la réparation osseuse. INSA de Lyon, 2011.
245. Jarroux, N., Les Biopolymères: Différentes Familles, Propriétés et Applications. 14.
246. Subhani, A., Influence of the processes parameters on the properties of the polylactides based bio and eco-biomaterials.
247. Kucharczyk, P., Preparation and modifications of biodegradable polyesters for medical application. *Thesis* **2009**.
248. de Oca, H. M.; Ward, I. M., Structure and mechanical properties of PGA crystals and fibres. *Polymer* **2006,** 47, (20), 7070-7077.
249. Middleton, J. C.; Tipton, A. J., Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials* **2000,** 21, (23), 2335-2346.
250. Todo, M.; Takayama, T., Fracture Mechanisms of Biodegradable PLA and PLA/PCL Blends.
251. Gupta, A. P.; Kumar, V., New emerging trends in synthetic biodegradable polymers-Polylactide: A critique. *European polymer journal* **2007,** 43, (10), 4053-4074.
252. Rasal, R. M.; Janorkar, A. V.; Hirt, D. E., Poly (lactic acid) modifications. *Progress in polymer science* **2010,** 35, (3), 338-356.
253. Brighton, C. T., The biology of fracture repair. *Instructional course lectures* **1983,** 33, 60-82.
254. Cardarelli, F. o., Ferrous metals and their alloys. In *Materials Handbook*, Springer: 2000; pp 1-43.

255. Natta, F. J. v.; Hill, J. W.; Carothers, W. H., Studies of Polymerization and Ring Formation. XXIII. 1 ε-Caprolactone and its Polymers. *Journal of the American Chemical Society* **1934,** 56, (2), 455-457.
256. 44-167, N. X. U., Amendements pour sols organiques - Biotest pour l'évaluation de la phytotoxicité en conditions d'utilisation.
257. Huang, M.-H. Polymères biorésorbables dérivés poly (ε-caprolactone) en ingiénerie tissulaire. Montpellier 1, 2004.
258. Gimenez, S.; Ponsart, S.; Coudane, J.; Vert, M., Synthesis, properties and in vitro degradation of carboxyl-bearing PCL. *Journal of bioactive and compatible polymers* **2001,** 16, (1), 32-46.
259. Inoue, S.; Ding, H.; Portilla-Arias, J.; Hu, J.; Konda, B.; Fujita, M.; Espinoza, A.; Suhane, S.; Riley, M.; Gates, M., Polymalic Acid Based Nanobiopolymer Provides Efficient Systemic Breast Cancer Treatment by Inhibiting both HER2/neu Receptor Synthesis and Activity. *Cancer research* 71, (4), 1454-1464.
260. Woodruff, M. A.; Hutmacher, D. W., The return of a forgotten polymer-polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science* **2010,** 35, (10), 1217-1256.
261. Bramfeld, H.; Sabra, G.; Centis, V.; Vermette, P., Scaffold vascularization: a challenge for three-dimensional tissue engineering. *Current medicinal chemistry* 17, (33), 3944-3967.
262. Rueda-Sànchez, J.; Ceroni Galloso, M., Synthesis of Amphiphilic Graft Copolymers with Poly (2-methyl-2-oxazoline) Side Chains and a Backbone Containing Chloromethylstyrene and Methyl Methacrylate. *Macromolecular rapid communications* **2001,** 22, (11), 859-863.
263. Wang, L.; Neoh, K.-G.; Kang, E.-T.; Shuter, B.; Wang, S.-C., Biodegradable magnetic-fluorescent magnetite/poly (dl-lactic acid-co-α−β-malic acid) composite nanoparticles for stem cell labeling. *Biomaterials* **2010,** 31, (13), 3502-3511.
264. He, B.; Bei, J.; Wang, S., Morphology and degradation of biodegradable poly(L-lactide-co-β-malic acid). *Polymers for Advanced Technologies* **2003,** 14, (9), 645-652.
265. He, B.; Bei, J.; Wang, S., poly(DL-lactide-co-RS-β-malic acid). *Polymer* **2003,** 44, (4), 989-994.
266. Wang, J.; Ni, C.; Zhang, Y.; Zhang, M.; Li, W.; Yao, B.; Zhang, L., Preparation and pH controlled release of polyelectrolyte complex of poly (L-malic acid-co-D, L-lactic acid) and chitosan. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2014,** 115, 275-279.
267. Mozafari, M.; Gholipourmalekabadi, M.; Chauhan, N. P. S.; Jalali, N.; Asgari, S.; Caicedoa, J. C.; Hamlekhan, A.; Urbanska, A. M., Synthesis and characterization of nanocrystalline forsterite coated poly (l-lactide-co-β-malic acid) scaffolds for bone tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C* **2015,** 50, 117-123.
268. Liu, Y.; Wang, W.; Wang, J.; Wang, Y.; Yuan, Z.; Tang, S.; Liu, M.; Tang, H., Blood compatibility evaluation of poly(D,L-lactide-co-β-malic acid) modified with the GRGDS sequence. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2010,** 75, (1), 370-376.
269. Qian, J.; Xu, W.; Zhang, W.; Jin, X., Preparation and characterization of biomorphic poly (l-lactide-co-β-malic acid) scaffolds. *Materials Letters* **2014,** 124, 313-317.
270. He, B.; Wan, Y.; Bei, J.; Wang, S., Synthesis and cell affinity of functionalized poly (L-lactide-co-β-malic acid) with high molecular weight. *Biomaterials* **2004,** 25, (22), 5239-5247.
271. Kronenthal, R. L., Biodegradable polymers in medicine and surgery. In *Polymers in medicine and surgery*, Springer: 1975; pp 119-137.
272. Von Burkersroda, F.; Schedl, L.; Göpferich, A., Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion. *Biomaterials* **2002,** 23, (21), 4221-4231.
273. Göpferich, A., Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* **1996,** 17, (2), 103-114.

274. Tamada, J. A.; Langer, R., Erosion kinetics of hydrolytically degradable polymers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1993,** 90, (2), 552-556.
275. Göpferich, A.; Tessmar, J. r., Polyanhydride degradation and erosion. *Advanced drug delivery reviews* **2002,** 54, (7), 911-931.
276. Soares, J. S.; Moore Jr, J. E.; Rajagopal, K. R., Constitutive framework for biodegradable polymers with applications to biodegradable stents. *Asaio Journal* **2008,** 54, (3), 295-301.
277. Engineer, C.; Parikh, J.; Raval, A., Review on hydrolytic degradation behavior of biodegradable polymers from controlled drug delivery system. *Trends Biomater. Artif. Organs* **2011,** 25, 79-85.
278. Miller, R. A.; Brady, J. M.; Cutright, D. E., Degradation rates of oral resorbable implants (polylactates and polyglycolates): rate modification with changes in PLA/PGA copolymer ratios. *Journal of biomedical materials research* **1977,** 11, (5), 711-719.
279. Torres, A.; Li, S. M.; Roussos, S.; Vert, M., Poly (lactic acid) degradation in soil or under controlled conditions. *Journal of Applied Polymer Science* **1996,** 62, (13), 2295-2302.
280. Ueda, H.; Tabata, Y., Polyhydroxyalkanonate derivatives in current clinical applications and trials. *Advanced drug delivery reviews* **2003,** 55, (4), 501-518.
281. Holmes, D. R., State of the art in coronary intervention. *The American journal of cardiology* **2003,** 91, (3), 50-53.
282. Biehl, V.; Wack, T.; Winter, S.; Seyfert, U. T.; Breme, J., Evaluation of the haemocompatibility of titanium based biomaterials. *Biomolecular engineering* **2002,** 19, (2), 97-101.
283. Lanz-Landázuri, A.; de Ilarduya, A. M.; García-Alvarez, M.; Muñoz-Guerra, S., Poly (β,L-malic acid)/Doxorubicin ionic complex: A pH-dependent delivery system. *Reactive and Functional Polymers* **2014** 81, 45-53.
284. Wang, J.; Wang, W.; Liu, Y.; Zhu, X.-C.; Yuan, Z.; Tang, S.-M.; Liu, M.; Tang, H., HUVEC Adhesion on Polylactides with Pendant Carboxyl Arms and Its Cell Activity. *Chemical Journal of Chinese Universities* **2008,** 11, 042.
285. Vert, M.; Li, S. M.; Spenlehauer, G.; Guerin, P., Bioresorbability And Biocompatibility of Aliphatic Polyesters. *Journal of Materials Science-Materials In Medicine* **1992,** 3, (6), 432-446.
286. Martinez Barbosa, M. E.; Cammas, S.; Appel, M.; Ponchel, G., Investigation of the degradation mechanisms of poly(malic acid) esters in vitro and their related cytotoxicities on J774 macrophages. *Biomacromolecules* **2004,** 5, (1), 137-143.
287. Mauduit, J.; Boustta, M.; Vert, M., Hydrolytic Degradation of Benzylated Poly(β-malic Acid) - Influence of Sample-Size, Sample Shape, And Polymer Composition. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* **1995,** 7, (3), 207-220.
288. Jeanbat-Mimaud, V.; Barbaud, C.; Caruelle, J. P.; Barritault, D.; Langlois, V.; Cammas-Marion, S.; Guerin, P., Functionalized polymers of malic acid stimulate tissue repair presumably by regulating heparin growth factors bioavailability. In *Biomedical Polymers And Polymer Therapeutics*, Kluwer Academic/Plenum Publ: New York, 2001; pp 243-251.
289. Holler, E.; Lee, B. S., Analysis of poly[β-L-malic acid] in tissue and solution. *Recent Research Developments In Analytical Chemistry, Vol 2* **2002**, 177-192.
290. Lanz-Landázuri, A.; García-Alvarez, M.; Muñoz-Guerra, S., Modification of microbial polyacids for drug delivery systems. **2014**.
291. Xu, H.H.; Quinn, J.B., Calcium phosphate cement containing resorbable fibers for short-term reinforcement and macroporosity. *Biomaterials* **2002,** 23, (1), 193-202.
292. Ciccone, W. J.; Motz, C.; Bentley, C.; Tasto, J. P., Bioabsorbable implants in orthopaedics: new developments and clinical applications. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* **2001,** 9, (5), 280-288.

293. Smith, I. O.; Liu, X. H.; Smith, L. A.; Ma, P. X., Nanostructured polymer scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2009,** 1, (2), 226-236.
294. Dhandayuthapani, B.; Yoshida, Y.; Maekawa, T.; Kumar, D. S., Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review. *International Journal of Polymer Science* **2011,** 2011.
295. Siepmann, J.; Siepmann, F., Microparticles used as drug delivery systems. In *Smart Colloidal Materials*, Springer: 2006; pp 15-21.
296. Singh, V.; Tiwari, M., Structure-processing-property relationship of poly (Glycolic Acid) for drug delivery systems 1: Synthesis and catalysis. *International Journal of Polymer Science* **2010,** 2010.
297. Fukuzaki, H.; Yoshida, M.; Asano, M.; Kumakura, M.; Mashimo, T.; Yuasa, H.; Imai, K.; Yamanaka, H., In vivo characteristics of low molecular weight copolymers composed of L-lactic acid and various DL-hydroxy acids as biodegradable carriers for drug delivery systems. *Biomaterials* **1990,** 11, (6), 441-446.
298. Stloukal, P.; Kucharczyk, P.; Sedlarik, V.; Bazant, P.; Koutny, M., Low molecular weight poly (lactic acid) microparticles for controlled release of the herbicide metazachlor: preparation, morphology, and release kinetics. *Journal of agricultural and food chemistry* **2012,** 60, (16), 4111-4119.
299. Kumar, M., Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. *J. Pharm. Pharm. Sci* **2000,** 3, (2), 234-258.
300. Dimetex, Etude des perspectives de développement des technologies textiles en ingénierie cellulaire et tissulaire **2008**. http://www.in2lifesciences.eu/sites/i2ls/files/technologies_textiles_ingenierie_tissulaire_cellulaire.pdf.
301. Hill, R.; Bagust, A.; Bakhai, A.; Dickson, R.; Dündar, Y.; Haycox, A.; Mota, R. M.; Reaney, A.; Roberts, D.; Williamson, P., Coronary artery stents: a rapid systematic review and economic evaluation. **2004**.
302. Palmerini, T.; Biondi-Zoccai, G.; Della Riva, D.; Stettler, C.; Sangiorgi, D.; D'Ascenzo, F.; Kimura, T.; Briguori, C.; Sabatè, M.; Kim, H.-S., Stent thrombosis with drug-eluting and bare-metal stents: evidence from a comprehensive network meta-analysis. *The Lancet* **2012,** 379, (9824), 1393-1402.
303. Daemen, J.; Wenaweser, P.; Tsuchida, K.; Abrecht, L.; Vaina, S.; Morger, C.; Kukreja, N.; Jüni, P.; Sianos, G.; Hellige, G., Early and late coronary stent thrombosis of sirolimus-eluting and paclitaxel-eluting stents in routine clinical practice: data from a large two-institutional cohort study. *The Lancet* **2007,** 369, (9562), 667-678.
304. Farb, A.; Burke, A. P.; Kolodgie, F. D.; Virmani, R., Pathological mechanisms of fatal late coronary stent thrombosis in humans. *Circulation* **2003,** 108, (14), 1701-1706.
305. Joner, M.; Finn, A. V.; Farb, A.; Mont, E. K.; Kolodgie, F. D.; Ladich, E.; Kutys, R.; Skorija, K.; Gold, H. K.; Virmani, R., Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk. *Journal of the American College of Cardiology* **2006,** 48, (1), 193-202.
306. Finn, A. V.; Kolodgie, F. D.; Harnek, J.; Guerrero, L. J.; Acampado, E.; Tefera, K.; Skorija, K.; Weber, D. K.; Gold, H. K.; Virmani, R., Differential response of delayed healing and persistent inflammation at sites of overlapping sirolimus-or paclitaxel-eluting stents. *Circulation* **2005,** 112, (2), 270-278.
307. Kolandaivelu, K.; Swaminathan, R.; Gibson, W. J.; Kolachalama, V. B.; Nguyen-Ehrenreich, K.-L.; Giddings, V. L.; Coleman, L.; Wong, G. K.; Edelman, E. R., Stent thrombogenicity early in high-risk interventional settings is driven by stent design and deployment and protected by polymer-drug coatings. *Circulation* **2011,** 123, (13), 1400-1409.

308. Lincoff, A. M.; Popma, J. J.; Ellis, S. G.; Hacker, J. A.; Topol, E. J., Abrupt vessel closure complicating coronary angioplasty: clinical, angiographic and therapeutic profile. *Journal of the American College of Cardiology* **1992,** 19, (5), 926-935.
309. Virmani, R.; Guagliumi, G.; Farb, A.; Musumeci, G.; Grieco, N.; Motta, T.; Mihalcsik, L.; Tespili, M.; Valsecchi, O.; Kolodgie, F. D., Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent should we be cautious? *Circulation* **2004,** 109, (6), 701-705.
310. Pescatore, P.; Meier-Willersen, H. J.; Manegold, B. C., A severe complication of the new self-expanding spiral nitinol biliary stent. *Endoscopy* **1997,** 29, (5), 413-415.
311. Ribeiro, P. A.; Gallo, R.; Antonius, J.; Mimish, L.; Sriram, R.; Bianchi, S.; Duran, C. G., A new expandable intracoronary tantalum (Strecker) stent: early experimental results and follow-up to twelve months. *American heart journal* **1993,** 125, (2), 501-510.
312. Hofma, S. H.; van Beusekom, H. M.; Serruys, P. W.; van Der Giessen, W. J., Recent Developments in Coated Stents. *Current interventional cardiology reports* **2001,** 3, (1), 28-36.
313. Liu, C. L.; Chu, P. K.; Lin, G. Q.; Qi, M., Anti-corrosion characteristics of nitride-coated AISI 316L stainless steel coronary stents. *Surface and Coatings Technology* **2006,** 201, (6), 2802-2806.
314. Brunot-Gohin, C. l. Optimisation des états de surface du titane et des alliages en nickel-titane par des films multicouches de polyélectrolytes. Université Claude Bernard-Lyon I, 2009.
315. Hoffman, A. S., Letter to the Editor: A general classification scheme for "hydrophilic" and "hydrophobic" biomaterial surfaces. *Journal of biomedical materials research* **1986,** 20, (9).
316. Hoffman, A. S., Modification of Material Surfaces to Affect How They Interact with Blooda. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1987,** 516, (1), 96-101.
317. Klee, D.; Höcker, H., Polymers for biomedical applications: improvement of the interface compatibility. In *Biomedical Applications Polymer Blends*, Springer: **1999**; pp 1-57.
318. Blau, A., Interactions between biological and nonbiological devices. http://www.physik.uni-kl.de/blau/2005_DISC_155.pdf. **2005**.
319. Curtis, A.; Wilkinson, C., Topographical control of cells. *Biomaterials* **1997,** 18, (24), 1573-1583.
320. Ponsonnet, L.; Reybier, K.; Jaffrezic, N.; Comte, V.; Lagneau, C.; Lissac, M.; Martelet, C., Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour. *Materials Science and Engineering: C* **2003,** 23, (4), 551-560.
321. Liu, Y.; Wang, W.; Wang, J.; Yuan, Z.; Tang, S.; Liu, M.; Tang, H., HUVEC cell affinity evaluation and integrin-mediated mechanism study on PHSRN-modified polymer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2011,** 84, (1), 6-12.
322. Hietala, E.-M., *Poly-L/D-lactide Stents as Intravascular Devices: An Experimental Study*. Eeva-Maija Hietala: 2004.
323. Hoffmann, R.; Mintz, G. S.; Dussaillant, G. R.; Popma, J. J.; Pichard, A. D.; Satler, L. F.; Kent, K. M.; Griffin, J.; Leon, M. B., Patterns and mechanisms of in-stent restenosis a serial intravascular ultrasound study. *Circulation* **1996,** 94, (6), 1247-1254.
324. Indolfi, C.; Mongiardo, A.; Curcio, A.; Torella, D., Molecular mechanisms of in-stent restenosis and approach to therapy with eluting stents. *Trends in cardiovascular medicine* **2003,** 13, (4), 142-148.
325. Dorgan, J. R.; Lehermeier, H.; Mang, M., Thermal and rheological properties of commercial-grade poly (lactic acid) s. *Journal of Polymers and the Environment* **2000,** 8, (1), 1-9.
326. Nelson, K. D.; Romero, A.; Waggoner, P.; Crow, B.; Borneman, A.; Smith, G. M., Technique paper for wet-spinning poly (L-lactic acid) and poly (DL-lactide-co-glycolide) monofilament fibers. *Tissue engineering* **2003,** 9, (6), 1323-1330.

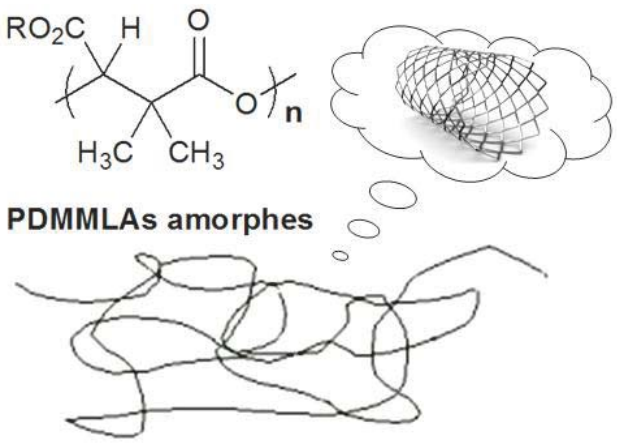
327. Rajagopal, K. R.; Srinivasa, A. R., Mechanics of the inelastic behavior of materials Part 1, theoretical underpinnings. *International Journal of Plasticity* **1998,** 14, (10), 945-967.
328. Rajagopal, K. R.; Srinivasa, A. R.; Wineman, A. S., On the shear and bending of a degrading polymer beam. *International Journal of Plasticity* **2007,** 23, (9), 1618-1636.
329. Lee, B. S.; Vert, M.; Holler, E., Water-soluble Aliphatic Polyesters: Poly(malic acid)s. *Biopolymers Online* **2002**.
330. Gasslmaier, B.; Krell, C. M.; Seebach, D.; Holler, E., Synthetic substrates and inhibitors of β-poly(L-malate)-hydrolase (polymalatase). *European Journal of Biochemistry* **2000,** 267, (16), 5101-5105.
331. Braud, C.; Bunel, C.; Vert, M., Poly (β-malic acid): a new polymeric drug-carrier. *Polymer Bulletin* **1985,** 13, (4), 293-299.
332. Cammas, S.; Béar, M.M.; Moine, L.; Escalup, R. l.; Ponchel, G.; Kataoka, K.; Guérin, P., Polymers of malic acid and 3-alkylmalic acid as synthetic PHAs in the design of biocompatible hydrolyzable devices. *International journal of biological macromolecules* **1999,** 25, (1), 273-282.
333. Domurado, D.; Fournié, P.; Braud, C.; Vert, M.; Guérin, P.; Simonnet, F. o., In vivo fates of degradable poly (β-malic acid) and of its precursor, malic acid. *Journal of bioactive and compatible polymers* **2003,** 18, (1), 23-32.
334. Coulembier, O.; Degée, P.; Gerbaux, P.; Wantier, P.; Barbaud, C.; Flammang, R.; Guérin, P.; Dubois, P., Synthesis of Amphiphilic Poly((R,S)-β-malic acid)-graft-poly(ε-caprolactone): "Grafting From" and "Grafting Through" Approaches. *Macromolecules* **2005,** 38, (8), 3141-3150.
335. Yang, X.; Grailer, J. J.; Pilla, S.; Steeber, D. A.; Gong, S., Tumor-targeting, pH-responsive, and stable unimolecular micelles as drug nanocarriers for targeted cancer therapy. *Bioconjugate chemistry* 21, (3), 496-504.
336. Poon, Y. F.; Cao, Y.; Zhu, Y. B.; Judeh, Z. M. A.; Chan-Park, M. B., Addition of β-malic Acid-Containing Poly(ethylene glycol) Dimethacrylate To Form Biodegradable and Biocompatible Hydrogels. *Biomacromolecules* **2009,** 10, (8), 2043.
337. Zhao, Z.; He, M.; Yin, L.; Bao, J.; Shi, L.; Wang, B.; Tang, C.; Yin, C., Biodegradable nanoparticles based on linoleic acid and poly (β-malic acid) double grafted chitosan derivatives as carriers of anticancer drugs. *Biomacromolecules* **2009,** 10, (3), 565-572.
338. Nurmikko, V.; Salo, E.; Hakola, H.; Mäkinen, K.; Snell, E. E., The Bacterial Degradation of Pantothenic Acid. II. Pantothenate Hydrolase. *Biochemistry* **1966,** 5, (2), 399.
339. Goodhue, C. T.; Snell, E. E., The Bacterial Degradation of Pantothenic Acid. III. Enzymatic Formation of Aldopantoic Acid. *Biochemistry* **1966,** 5, (2), 403-408.
340. Lähdesmäki, M.; Mäntsälä, P., Comparison of D-malate and β,β-dimethylmalate dehydrogenases from Pseudomonas fluorescens UK-1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology* **1980,** 613, (2), 266-274.
341. Fischman, D. L.; Leon, M. B.; Baim, D. S.; Schatz, R. A.; Savage, M. P.; Penn, I.; Detre, K.; Veltri, L.; Ricci, D.; Nobuyoshi, M., A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. *New England Journal of Medicine* **1994,** 331, (8), 496-501.

Chapitre II : PDMMLAs amorphes

OBJECTIF 1

Après avoir exposé les contextes et les objectifs de ce travail de thèse, ce chapitre présente le premier objectif sur la synthèse, la caractérisation (chimique, physicochimique et biologique) et l'étude de dégradation du polymère utilisé pour notre étude. Après la mise en place d'une série d'homopolymères et de copolymères, la première démarche repose sur l'étude de leurs propriétés de surface sur le plan morphologique, leur mouillabilité et leus énergis de surface (articles 1 et 2). En plus des propriétés thermomécaniques de ces polymères, la deuxième démarche consiste à corréler les propriétés de la fonctionnalisation de ces polymères et les propriétés physicochimiques de leur surface avec leur comportement biologique vis-à-vis des cellules endothéliales humaines (HUVECs) (comportement, adhésion, attachement et prolifération) (article 3 en cours). Une étude de dégradation dans les conditions physiologiques et une étude de cytotoxicité des produits de dégradation font l'objet de l'article 4 présenté à la fin de ce chapitre. Ce chapitre comporte deux parties :

- **1ère partie** : matériels et méthodes (différentes techniques de caractérisation de la surface);
- **2ème partie** : résultats et discussions (articles 1-4).

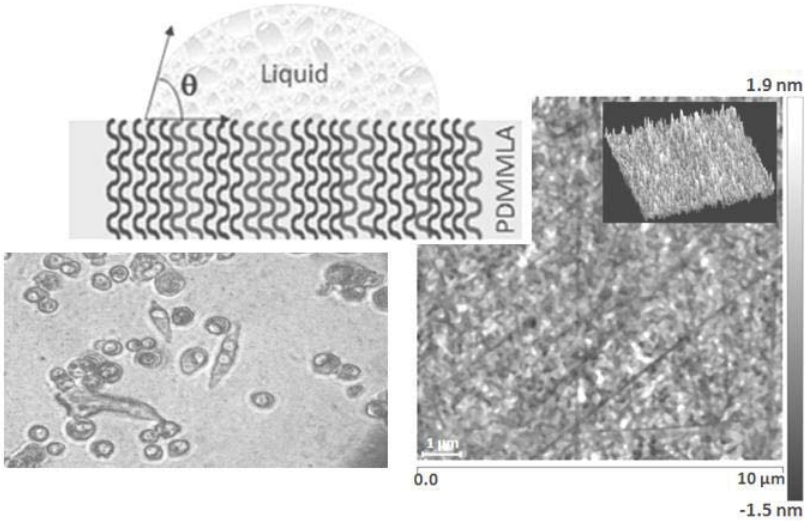


Chapitre II : PDMMLAs amorphes

OBJECTIF 1

1ère partie :

Matériels et méthodes



I- Synthèse, purification et caractérisation des polymères amorphes

La synthèse des dérivés du poly(acide[*R*,*S*]-3,3-diméthyle malique) (PDMMLA) a été effectuée par polymérisation anionique par ouverture de cycle des β-lactones α,α,β-trisubstituées (schéma II-1) [1, 2].

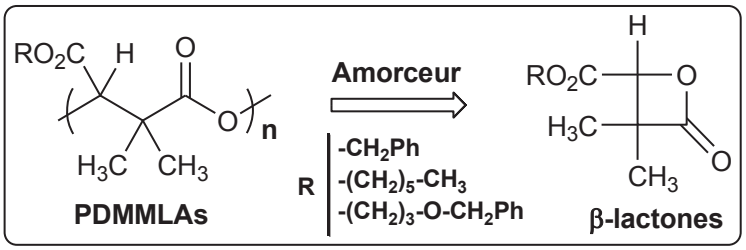


Schéma II-1. Rétrosynthèse des PDMMLAs.

I-1- Synthèse des monomères β-lactones α,α,β-trisubstituées racémiques

La synthèse des différents monomères a été facilement réalisée selon la littérature en deux étapes à partir du diacide. Ce dernier a été préparé à partir de 2-oxalpropionate de diéthyle commercial en trois étapes (schéma II-2) [3].

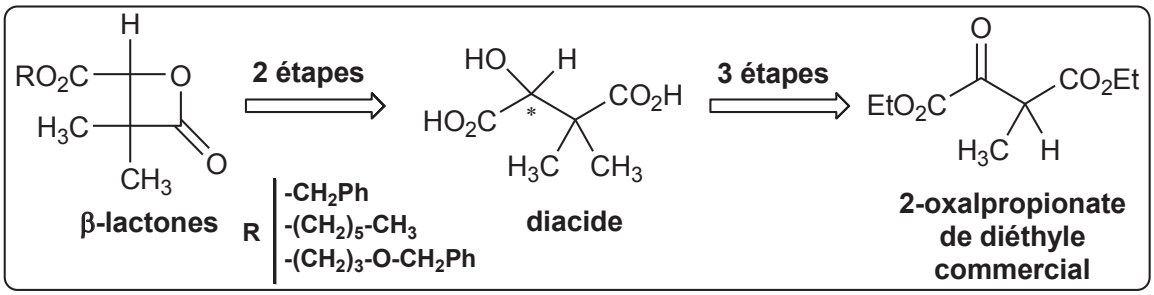


Schéma II-2. Rétrosynthèse des β-lactones α,α,β-trisubstituées.

I-1-1- **Préparation de l'acide 3,3-diméthylmalique**

Les trois étapes de synthèse nécessaires pour obtenir le diacide intermediaire à partir du 2-oxalpropionate de diéthyle commercial sont une méthylation, une réduction et une hydrolyse basique [3, 4].

I-1-1-a- <u>Méthylation</u>

Le 2-oxalpropionate de diéthyle subit tout d'abord une méthylation en α de la fonction cétone donnant lieu au 2-méthyl-2-oxalpropionate de diéthyle (**1**). Cette réaction se fait en une étape en présence de tert-butylate de potassium (^{t}BuOK), d'éther couronne (18-crown-6),

d'iodure de méthyle (CH_3I) dans du toluène à température ambiante (schéma II-3). La base ^tBuOK arrache le proton en α de la cétone qui est le plus acide de la molécule grâce à sa position entre deux fonctions carbonyles (cétone et ester). L'éther couronne utilisé en quantité catalytique a été choisi comme chélateur d'ion potassium (K^+) permettant l'augmentation de la réactivité de la base. Le carbanion intermédiaire formé attaque l'iodure de méthyle présent dans le milieu réactionnel selon une substitution nucléophile d'ordre 2 conduisant au produit **1** avec un bon rendement de 98%. Aucune purification n'a été effectuée à cette étape de synthèse. Un singulet à 1,39 ppm intégrant pour 6 protons correspondant aux deux méthyles a été observé en RMN ^1H confirmant la structure chimique du produit **1**.

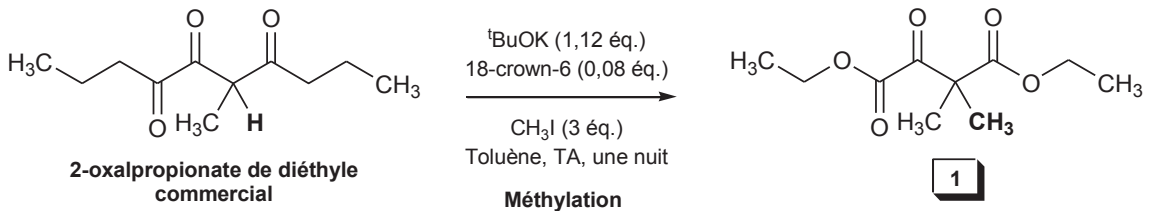


Schéma II-3. Réaction de méthylation : synthèse de 2-méthyl-2-oxalpropionate de diéthyle (**1**).

I-1-1-b- <u>Réduction</u>

La deuxième étape concerne la réduction sélective de la fonction cétone en fonction alcool en présence du borohydrure de sodium ($NaBH_4$) dans l'éthanol absolu pour former le 3,3-dimétylmalate de diéthyle (**2**) (schéma II-4).

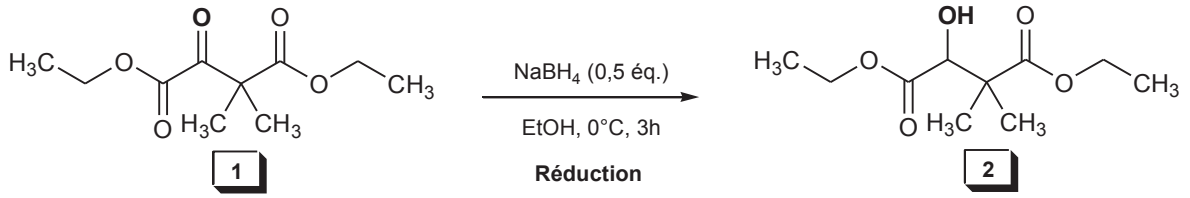


Schéma II-4. Réaction de réduction : synthèse du 3,3-diméthylmalate de diéthyle (**2**).

L'excès des sels du réactif ($NaBH_4$) ainsi que les borates formés ($NaB(OEt)_4$) lors de la réaction sont neutralisés avec une solution de HCl 2M (pH ≈ 6) puis éliminés par une extraction en utilisant l'éther éthylique. Le produit **2** a été obtenu sans aucune purification avec un bon rendement de 78%. Un doublet à 4,16 ppm qui correspond au proton porté par le carbone asymétrique a été observé en RMN ^1H confirmant la réduction totale de la fonction cétone.

I-1-1-c- Hydrolyse basique

La troisième étape est une réaction d'hydrolyse basique des fonctions esters éthyliques du composé **2** en fonctions acides carboxyliques de l'acide 3,3-diméthylmalique (schéma II-5).

Le protocole décrit dans la littérature [3] consiste en une réaction en milieu basique en utilisant une solution de potasse (KOH) dans l'EtOH à température ambiante pendant 6 jours. Une purification par précipitation dans le chloroforme à froid est ensuite nécessaire afin d'obtenir le diacide **3** pur sous forme de cristaux blancs. Malheureusement, la réaction effectuée dans ces conditions n'a pas été totale et le diacide purifié a été obtenu avec un rendement inferieur à 30%.

Afin d'améliorer la conversion, le temps et le rendement de cette étape, nous avons procédé à utiliser une solution aqueuse de carbonate de potassium (K_2CO_3) portée à reflux pendant 2h (schéma II-5) [4].

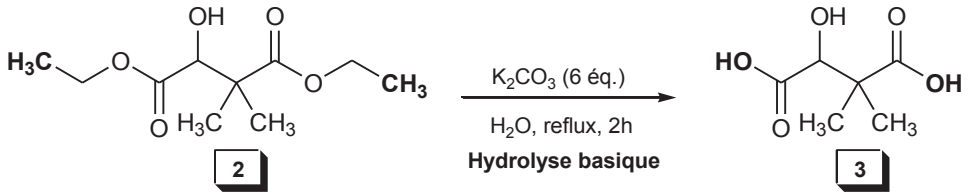


Schéma II-5. Réaction d'hydrolyse basique : synthèse de l'acide 3,3-diméthylmalique (**3**).

La réaction est totale et le rendement obtenu du diacide **3** purifié par précipitation dans le chloroforme froid a été augmenté à 85% dans ces conditions avec un point de fusion de 122°C. La disparition des signaux correspondants aux deux groupements éthyle en RMN ^{1}H a confirmé la structure du diacide [4].

I-1-2- Synthèse des β-lactones α,α,β-trisubstituées

A partir du diacide **3**, deux étapes de synthèse ont été envisagées pour obtenir les différentes β-lactones : une monoestérification et une lactonisation.

I-1-1-a- Monoestérification

Cette étape va définir chimiquement la nature de l'unité de répétition de la chaîne macromoléculaire des différents polymères. En effet, trois différents monoesters ont été synthétisés : le monoester benzylique, benzyloxypropylique et hexylique. Les deux monoesters benzylique et benzyloxypropylique donnent après hydrogénolyse des polymères une fonction acide carboxylique et une fonction alcool apportant le caractère hydrophile acide

et hydrophile neutre aux polymères, respectivement. Par ailleurs, le groupement hexyle apportera le caractère hydrophobe aux polymères.

La monoestérification nécessite, dans un premier temps, une réaction du diacide **3** avec l'anhydride trifluoroacétique (TFAA) qui joue le rôle de réactif et de solvant. Un anhydride cyclique intermédiaire non isolé est formé pour réagir de façon régiospécifique avec les différents alcools (alcool benzylique, benzyloxypropylique et hexylique) et donner les monoesters lactonisables correspondants : l'acide 3-benzyloxycarbonyl-2,2-diméthyl-3-hydroxypropanoïque (**4a**), l'acide 3-(3'-benzyloxypropyl)oxycarbonyl-2,2-dimethyl-3-hydroxypropanoïque (**4b**) et l'acide 2,2-diméthyl-3-hexyloxycarbonyl-3-hydroxypropanoïque (**4c**) (schéma II-6). Les monoesters **4a** (T_f = 98°C) et **4b** (T_f = 92°C) ont été obtenus après purification par chromatographie sur colonne sous forme d'un solide blanc (88% et 52%, respectivement) tandis que le monoester **4c** est une huile transparante (82%).

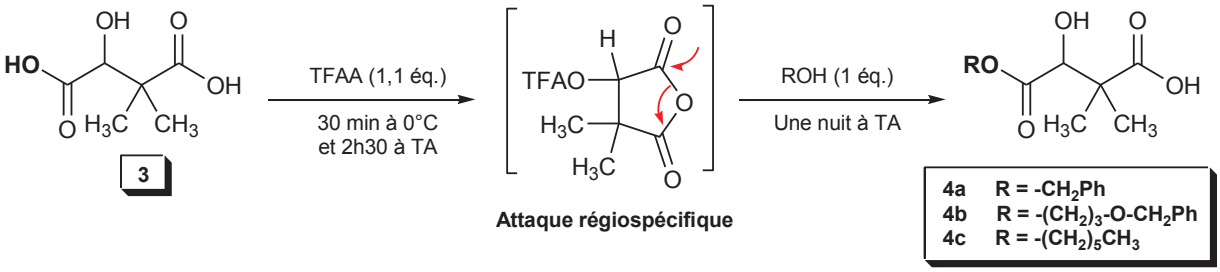


Schéma II-6. Réaction de monoestérification de l'acide 3,3-diméthyle malique.

L'obtention des trois monoesters a été confirmée par RMN ^{1}H. Des signaux caractéristiques au $-CH_2$ benzylique et aux protons aromatiques ont été observés à 5,18 ppm et 7,36 ppm, respectivement. Les signaux à 1.93, 3.54, 4.27 et 4.49 ppm correspondent aux différents groupements benzyloxypropyliques. Le triplet à 0,88 ppm correspondant au $-CH_3$ hexylique a été constaté.

I-1-1-b- <u>Lactonisation</u>

Trois lactones correspondant aux trois monoesters décrits ci-dessus ont été préparées : 4-benzyloxycarbonyl-3,3-diméthyl-2-oxétanone (**5a**), 4-benzyloxypropyloxycarbonyl-3,3-diméthyl-2-oxétanone (**5b**) et 4-hexyloxycarbonyl-3,3-diméthyl-2-oxétanone (**5c**) à partir des monoesters **4a**, **4b** et **4c**, respectivement. Ceci a été réalisé en présence de la triphénylphosphine (PPh_3) et du diisopropylazodicarboxylate (DIAD) dans le THF anhydre selon la réaction de Mitsunobu avec une inversion de configuration du carbone asymétrique (schéma II-7) [3].

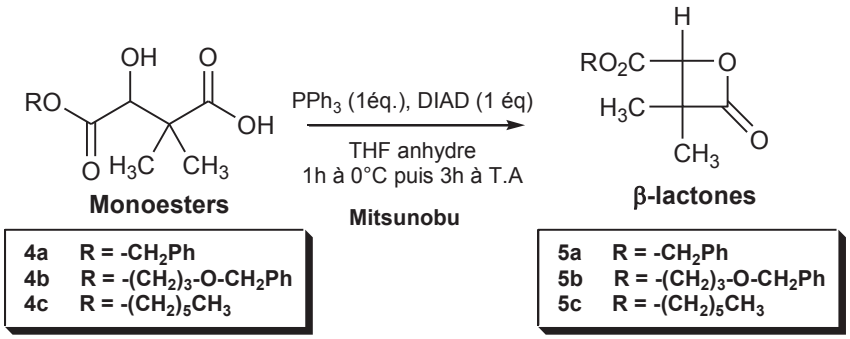


Schéma II-7. Réaction de lactonisation.

Le spectre IR des trois lactones synthétisées a montré l'apparition d'une bande d'absorption correspondant au C=O de la fonction ester vers 1750 cm^{-1} et une bande d'absorption caractéristique au C=O de la lactone vers 1840 cm^{-1}. En RMN ^1H, la structure des différentes lactones a été confirmée par l'écart du déplacement chimique des deux différents signaux correspondants aux protons des deux méthyles présents en α de la fonction cétone, dû à la formation d'un cycle à 4 chaînons qui empêchent leur libre rotation. En effet l'écart des deux singulets était quasi nul pour les monoesters (0,04 ppm) alors qu'un écart plus important a été observé pour les signaux des deux méthyles dans la lactone (0,3 ppm) [4].

Afin de réussir la polymérisation de ces lactones monomères, une purification est nécessaire. En effet, la chromatographie sur colonne a permis d'obtenir les trois lactones pures **5a**, **5b** et **5c** sous forme d'une huile transparente avec de bons rendements (76%, 52% et 62%, respectivement)

La synthèse en cinq étapes de ces lactones a été refaite plusieurs fois afin d'obtenir une masse suffisante en monomères. Le rendement global de chaque monomère a été calculé à partir d'une seule série de synthèse pour chaque lactone et présenté dans le tableau II-1 :

Tableau II-1. Rendement global sur cinq étapes de synthèse des différentes lactones.

Monomère	Rendement global
5a	43 %
5b	26 %
5c	33 %

I-2- Polymérisation anionique des β-lactones synthétisées

Une fois que les trois différentes lactones décrites ci-dessus sont préparées, divers homopolymères et copolymères peuvent être préparés. Afin d'évaluer ces polymères comme revêtement de stent cardiovasculaire, plusieurs caractérisations physicochimiques, thermiques et biologies sont nécessaires. Pour cela, nous avons décidé de synthétiser sur mesure, une variété de polymères avec des chaînes latérales ou de masses molaires différentes.

La polymérisation anionique contrôlée à caractère vivant se fait par ouverture de cycle des β-lactones racémiques en utilisant le benzoate de tétraéthylammonium (Et_4N^+ $PhCO_2^-$) comme amorceur en quantité catalytique. L'attaque de cet amorceur se fait sur le carbone en β du carbonyle de la lactone par substitution nucléophile de type SN_2 avec une ouverture du cycle lactonique, en provoquant une inversion de configuration. Cette attaque est favorisée par la présence du groupement ester électroattracteur qui appauvrit ce site en électrons et par la structure tendue du cycle à quatre *chaînons*. Des espèces anioniques carboxylates sont générées, favorisant la propagation de la polymérisation par attaque nucléophile et ouverture des autres lactones présentes dans le milieu réactionnel (schéma II-8) [1, 2].

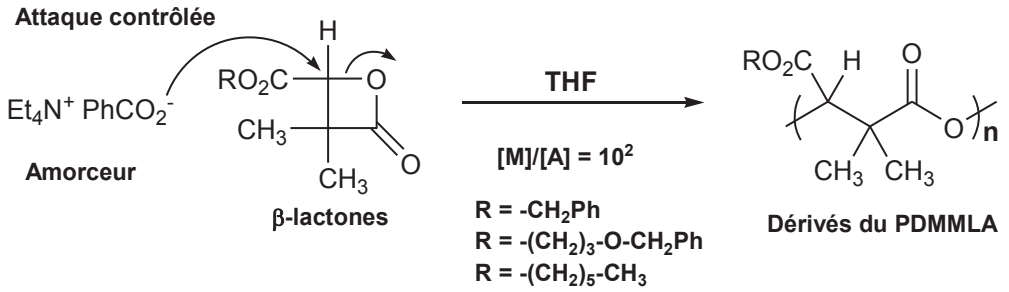


Schéma II-8. Réaction de polymérisation anionique par ouverture de β-lactones.

La polymérisation est poursuivie pendant 24 h pour les polymères de basse masse molaire (MnTh comprise entre 20 000 et 30 000 g/mol) et pendant 6 jours pour les polymères de masse molaire élevée (Mn_{Th} comprise entre 200 000 et 300 000 g/mol). La réaction est suivie par IR en observant la disparition progressive de la bande caractéristique du C=O de la lactone vers 1850 cm^{-1}. La conversion de la polymérisation est totale. La polymérisation est stoppée par addition d'une goutte d'acide acétique et les polymères sont donc purifiés par précipitation dans l'éthanol absolu (figure 2-chapitre II-article 1).

De plus, la polymérisation a été caractérisée par RMN ^1H et RMN ^{13}C. En effet, le pourcentage de chaque lactone présente dans la chaîne des copolymères a été confirmée par

RMN ^{1}H en calculant le rapport d'intégration du « CH_2 » benzylique à 5.20 ppm et du « CH_2 » hexylique le plus déblindé (—OCH_2) à 4.15 ppm (figure 3-chapitre II-article 1).

Une fois que les polymères ont été purifiés et caractérisés, une étape de déprotection des fonctions alcool et acide carboxylique a été est effectuée selon une réaction d'hydrogénolyse catalytique en présence de palladium sur charbon à température ambiante dans l'acétone pur (schéma II-9). Après filtration du palladium sur filtre Millipore® 0,2 µm, les polymères ont été séchés sous vide pour donner un rendement de 100%.

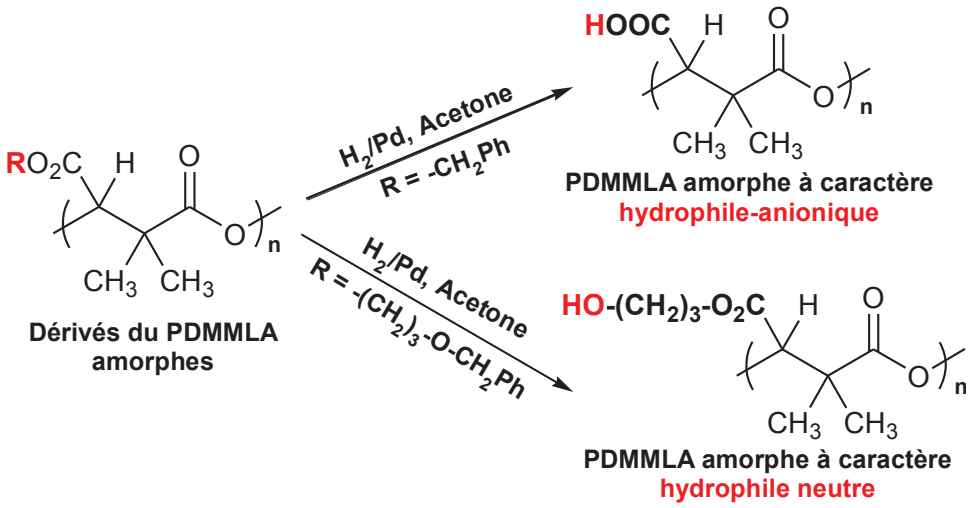


Schéma II-9. Déprotection des fonctions alcool et acide carboxylique par hydrogénolyse catalytique.

La déprotection a été confirmée par RMN ^{1}H. Une disparition des signaux correspondant au cycle aromatique et au « CH_2 » présent en α du phényle (benzylique et benzyloxypropylique) a été constatée (figure 3-chapitre II-article 1).

Une série d'homopolymères et de copolymères à été préparée de cette façon suivant le même processus. Cependant, les synthèses des copolymères de différentes masses molaires ont été effectuées en faisant varier le ratio monomère /amorceur. Le détail de la synthèse et de la caractérisation chimique par les différentes techniques d'analyse (RMN, FTIR, …) a été rapporté dans l'article 1 du 2ème chapitre.

II- Les PDMMLAs amorphes étudiés

Dans ce présent travailde thèse, trois homopolymères et trois copolymères statistiques amorphes ont été utilisés :

1- l'homopolymère hexylique PDMMLA-He (0/100). Il est nommé 0/100 car il ne comporte que des groupements hexyliques hydrophobes dans sa chaîne latérale (100% He) et donc 0% de groupements hydrophiles acide (0% H) (figure II-1).

2- l'homopolymère hydrophile acide PDMMLA-H (100/0). Il est nommé 100/0 car il ne contient que des groupements acides carboxyliques hydrophiles dans sa chaîne latérale (100% H) et donc 0% de groupements hexyles hydrophobes (0% He) (figure II-1).

3- l'homopolymère hydrophile neutre PDMMLA-OH (HP-OH). Il ne possède que des fonctions hydrophiles neutres (alcools) dans sa chaîne latérale (figure II-1).

4- le copolymère PDMMLAH_{10}-*co*-He_{90} (10/90). Il contient 10% des groupements acides carboxyliques et 90% des groupements hexyles hydrophobes. Il correspond au copolymère le plus hydrophobe (figure II-1).

5- le copolymère PDMMLAH_{20}-*co*-He_{80} (20/80). Il possède 20% des groupements acides carboxyliques et 80% des groupements hexyles hydrophobes (figure II-1).

6- le copolymère PDMMLAH_{30}-*co*-He_{70} (30/70). Il comporte 30% des groupements acides carboxyliques et 70% des groupements hexyles hydrophobes. Il correspond au copolymère le plus hydrophile (figure II-1).

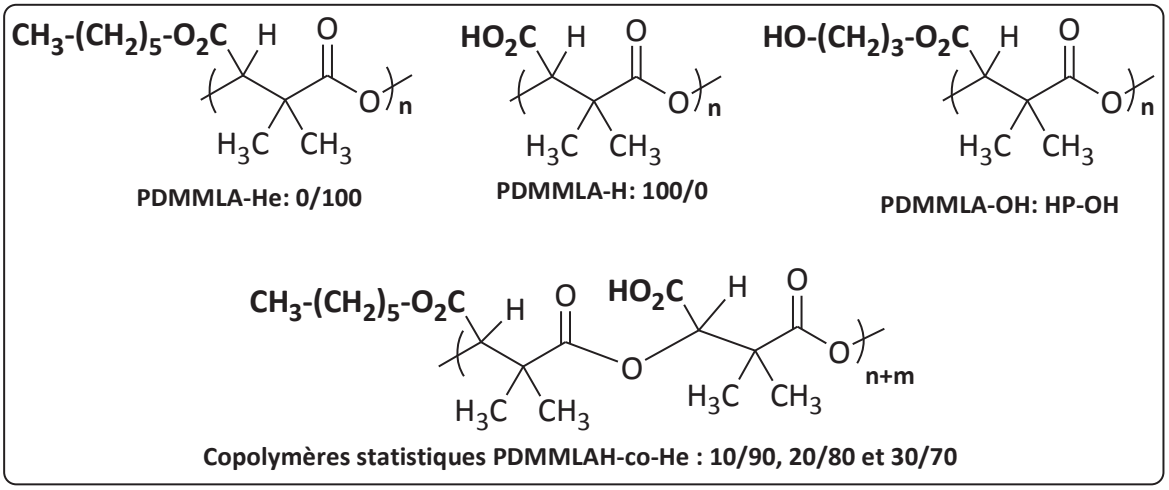


Figure II-1. Les différents homopolymères et copolymères amorphes utilisés.

III- Caractérisation physicochimique des films polymères

III-1- Préparation des films polymères

Pour obtenir les différents films polymères, les PDMMLAs amorphes ont été solubilisés dans l'acétone et le PLA dans le chloroforme avec une concentration connue. Ensuite, la solution des polymères a été déposée sur des lamelles de verre (Objektträger, 10 x 25.53 mm, 0.99 mm épaisseur, MENZEL-GLASER, Braunschweig, Allemagne) qui ont été préalablement lavées à l'eau, acétone et éthanol. Les plaques ont été séchées une nuit dans l'étuve à 37°C après avoir évaporé le solvant à température ambiante.

Pour les études AFM et goutte posée, la solution du polymère a été déposée sur une seule face de la lamelle de verre (figure II-2). Pour l'étude DCA, la solution du polymère a été déposée sur les deux faces de la lamelle.

Figure II-2. Préparation des films polymères pour les études : AFM, mouillabilité, énergie de surface et dégradation.

III-2- Etude de la rugosité de la surface par AFM

III-2-1- Principe

La topographie de la surface a été étudiée par microscopie à force atomique (AFM). Le principe de cette technique est présenté dans la figure II-3. Il est basé sur l'interaction entre une pointe en silicium montée sur microlevier et l'échantillon à étudier. La pointe balaie la surface de l'échantillon à mesurer. La mesure se réalise par un laser qui se réfléchit au dos de la pointe pour mesurer des forces d'interaction d'origine atomique (répulsions ou attractions) entre la surface et la pointe. Le faisceau laser réfléchi atteint un quadrant de photodiodes qui mesure la déviation de la pointe et construit ainsi l'image de la topographie de la surface. Cette topographie est obtenue sous forme d'une image avec une résolution du dixième de nanomètre. Le balayage suivant les trois axes X, Y et Z est effectué par des systèmes piézo-électriques [5].

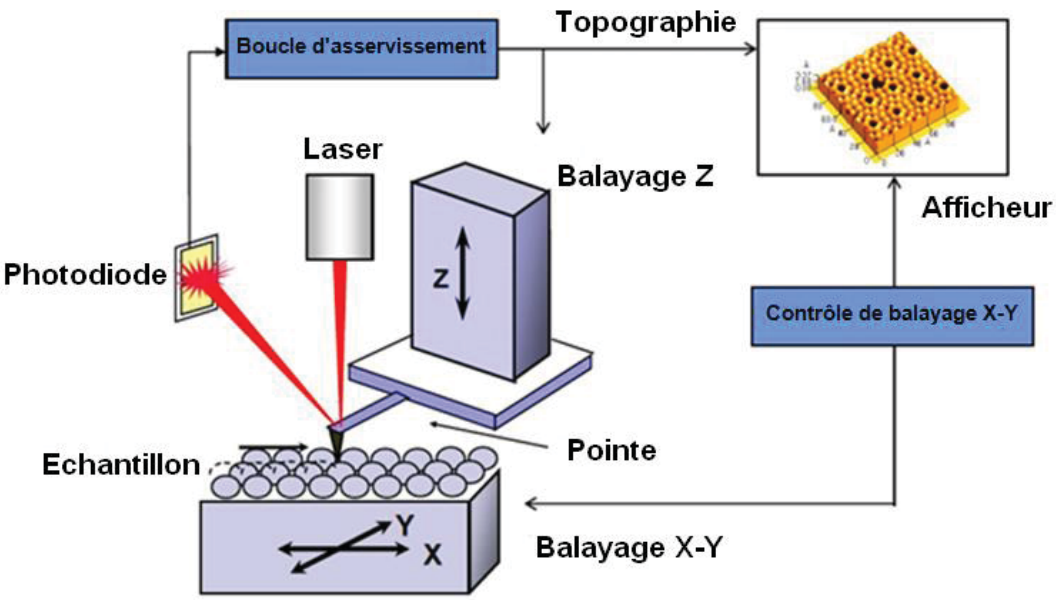


Figure II-3. Principe de la microscopie à force atomique (AFM) [6].

III-2-2- Caractérisation de la surface

En plus de l'image en 2D ou en 3D, les techniques statistiques permettent de transformer le déplacement de la pointe sur la surface en signal électrique, de le numériser et enfin de traiter et afficher les résultats sur un ordinateur.

- ***Topographie de la surface : image AFM et son profil transverse***

D'une part, la rugosité peut être caractérisée par la hauteur maximale observée sur une image AFM et par le profil de section transversale. Une image AFM en 3D d'une surface plane obtenue dans notre étude sur le verre propre et son profil de section transversale (cross-sectional profile) en fonction de la distance verticale, sont présentés dans la figure II-4. Plus la hauteur (image) et l'intensité du signal (profil de section transversale) maximales de la surface sous mesure augmentent, plus la rugosité de la surface est importante [5].

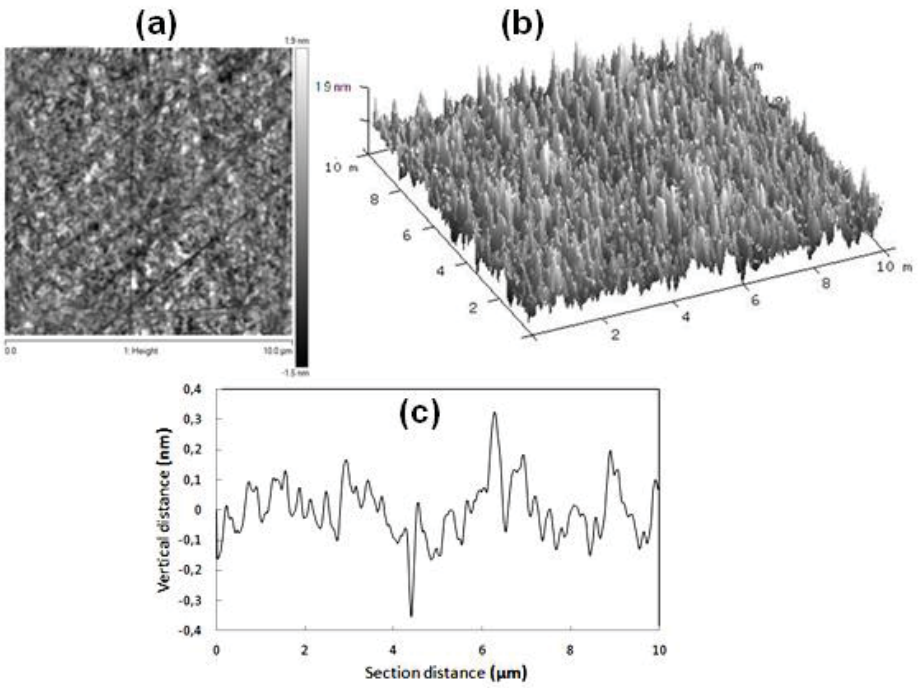


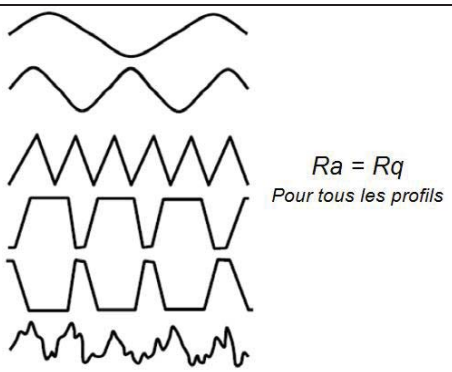
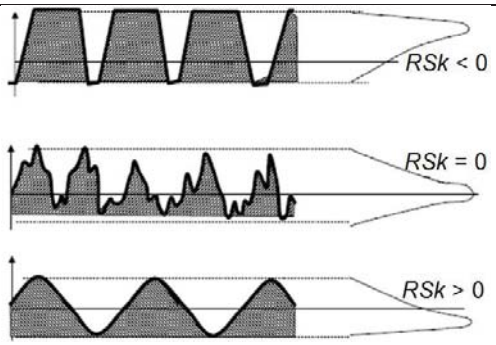
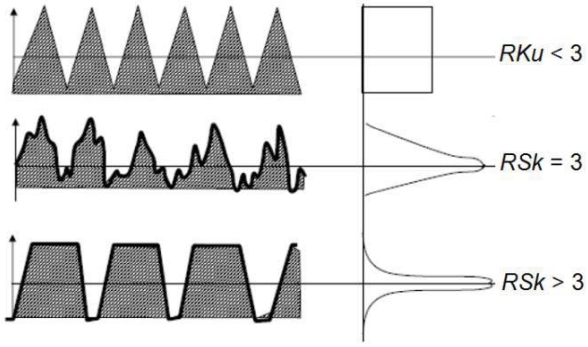
Figure II-4. AFM d'un substrat du verre propre (a) image 2D, (b) image 3D et (c) image du profil de section transversale.

L'image montre que la hauteur maximale est de 1,9 nm ce qui caractérise une surface lisse.

- ***Principaux paramètres statistiques***

D'autre part, plusieurs paramètres statistiques permettent d'interpréter et de caractériser la topographie de la surface : les paramètres qui caractérisent la hauteur mais pas la forme (*Ra* et *Rq*) et les paramètres qui caractérisent la qualité de la surface (*RSk* et *RKu*) [5] (tableau II-2).

Tableau II-2. Les principaux paramètres statistiques de la caractérisation de la topographie de la surface.

Paramètre	Définition	Profil
Ra (Roughness Average)	Ra et RMS représentent deux valeurs différentes (très proches) de la rugosité de la surface mais sont calculés différemment. Ra est calculé comme étant la moyenne des valeurs absolues et RMS est la racine carrée des valeurs moyennes d'une surface mesurée.	
***Rq* (*RMS*)** (Random Mean Square)		
RSk (skewness)	*RSk est le p*aramètre d'asymétrie du profil de la surface. La prédominance de vallées est indiquée si *RSk*<0. Si *RSk*>0, la surface est riche plutôt en crêtes. Donc, un profil avec *RSk*<0 est le meilleur comportement aux frottements et à la corrosion.	
RKu (kurtosis)	*Rku est le p*aramètre d'aplatissement du profil de la surface. Rku = 3 pour une distribution à amplitude gaussienne. Si Rku> 3, le profil indique une répartition irrégulière, tandis que si Rku <3, la surface est plane.	

III-3- Etude de la mouillabilité de la surface

III-3-1- Mesure de l'angle de contact en statique

L'étude de la mouillabilité d'un matériau permet de comprendre son comportement vis-à-vis de son environnement. Les propriétés de mouillage d'une surface solide au contact d'un liquide sont caractérisées par l'angle de contact (figure II-5). L'adhésion du liquide au substrat est assurée par des interactions créées à l'interface liquide / solide. Ces interactions

sont thermodynamiquement interprétées par les forces d'attraction inter et intramoléculaires entre les molécules de la surface, du liquide et des vapeurs avoisinantes. Ces forces sont reliées par l'équation de Young [7] :

$$\gamma_{SV} = \gamma_{LS} + \gamma_{LV} \cos\theta$$

γ_{SV} : énergie libre de la surface
γ_{LS} : énergie libre interfaciale
γ_{LV} : tension superficielle
θ : angle de contact

La tension de surface est donc interprétée par une interaction entre le liquide et le matériau par des liaisons chimiques comme les liaisons hydrogènes. Avec une faible tension de surface (moins de liaisons chimiques), l'eau a du mal à s'étaler sur le substrat. Un angle de contact supérieur à 90° est observé. La surface du matériau est hydrophobe. En revanche, plus les interactions matériau-liquide sont présentes à l'interface, plus l'angle de contact est faible et la surface est hydrophile [7] (figure II-4).

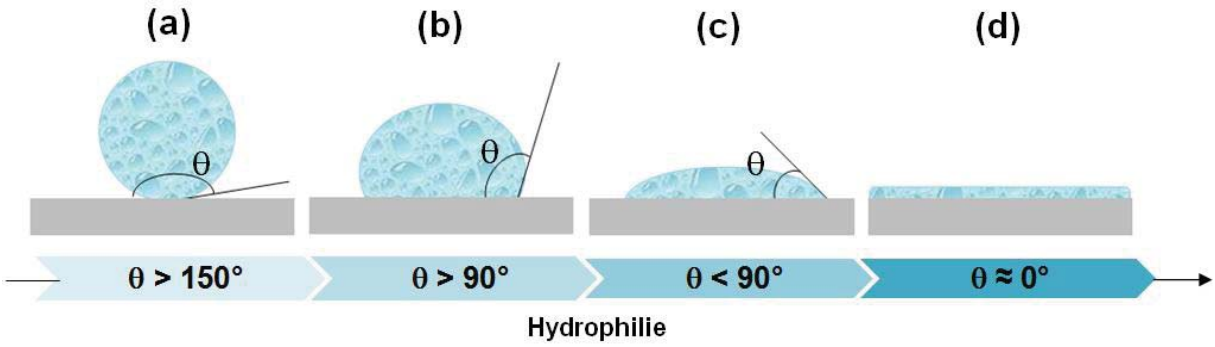


Figure II-5. L'aspect de la goutte d'eau et la valeur de l'angle de contact en fonction de l'hydrophobie de la surface.

La mesure de l'angle de contact permet donc de comprendre les interactions possibles à l'interface liquide / solide et de déterminer l'énergie libre de la surface considérée selon Young comme une surface plate et lisse (figure II-6, a). Cependant, les propriétés superficielles du solide étudié (topographie, morphologie et composition chimique) peuvent altérer cette mesure. Un angle dit « apparent θ* » est décrit dans la littérature pour étudier la mouillabilité des surfaces hétérogènes chimiquement ou rugueuses.

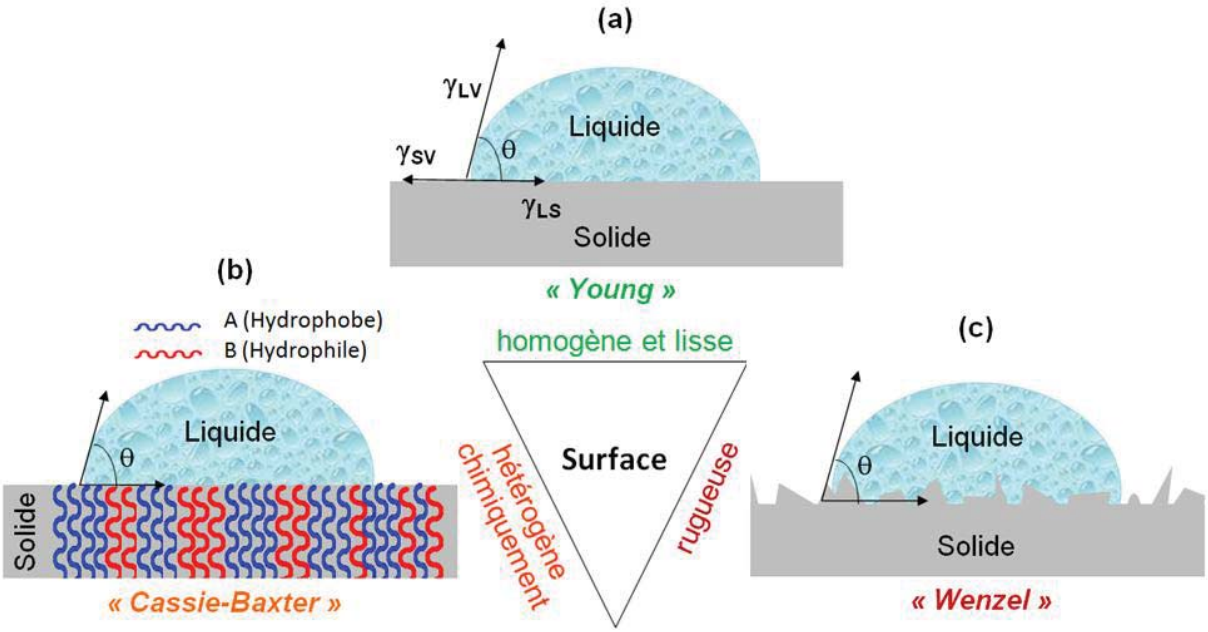


Figure II-6. Angle de contact θ d'une surface mouillée selon le modèle de (a) Young, (b) Cassie-Baxter et (c) Wenzel.

Deux modèles ont été décrits dans la littérature : le modèle de Cassie-Baxter [7] sur les surfaces hétérogènes chimiquement (figure II-6, b) et le modèle de Wenzel [7] sur les surfaces rugueuse (figure II-6, c).

Le modèle de Cassie-Baxter est appliqué sur une surface constituée d'un mélange de deux composés chimiques différents A,qui a un angle de contact de Young (θ_A), et B, qui a un angle de contact de Young (θ_B) (figure II-6, b), avec les fractions correspondantes f_A et f_B ($f_A+f_B = 1$). L'équation utilisée pour ce modèle est :

$$\cos\theta^* = f_A \cos\theta_A + f_B \cos\theta_B$$

θ^* est donc compris entre les deux valeurs de θ_A et θ_B.

Le modèle de Wenzel a été étudié sur des surfaces d'une seule composition chimique mais d'une rugosité variable (figure II-6, c) afin de comprendre l'effet de la rugosité sur la mouillabilité de la surface, l'équation de Wenzel correspondante est :

$$\cos\theta^* = r_W \cos\theta$$

Le rapport $r_w = 1$ pour une surface lisse.

Il a été démontré que :

- Si la surface est hydrophile ($\theta < 90°$), $\theta^* < \theta_Y$ (θ_Y est l'angle de contact de Young obtenu sur une surface théoriquement lisse).
- Si la surface est hydrophobe ($\theta > 90°$), $\theta^* > \theta_Y$.

Cela montre que la mouillabilité de la surface est affectée, d'une part, par l'hétérogénéité chimique du matériau, et d'autre part, par la rugosité de la surface. *Des études qui ont été réalisées sur des surfaces de polymères ont montré que les effets de la rugosité de la surface sur son angle de contact sont négligeables si sa rugosité moyenne de la surface est inférieure à 0,1 µm (Ra < 0,1 µm)* [8].

III-3-2- Détermination de l'énergie de surface et de ses composantes

La caractérisation des différentes surfaces en faisant intervenir l'énergie libre totale de la surface γ_{TOT} a été décrite dans ce travail. Selon le modèle utilisé pour le calcul, γ_{TOT} est la somme de deux composantes (polaire et dispersive) ou une fonction de trois autres composantes (dispersive, acide et basique) qui décrivent les différents types d'interactions physiques [9, 10].

Dans notre étude, nous avons utilisé le modèle de Van Oss qui caractérise la globalité des interactions dispersives et polaires (interactions de Van der Walls et interactions acido-basiques) dans un système interfacial entre le liquide et la surface. Cette énergie a été déterminée par la mesure de la mouillabilité (cf. § III-3-1) de deux solvants polaires (eau et formamide) et d'un solvant apolaire (diiodométhane). Dans ce modèle, l'énergie de surface (γ_{TOT}) est la somme de deux composantes : la composante dispersive γ_{LW} (Lifshitz-Van der Waals) et la composante polaire (γ_{AB}). Cette dernière est à fonction de la racine carrée de deux composantes : acide γ_A (accepteur d'électrons) et basique γ_B (donneur d'électrons) [11]:

$$\gamma_{TOT} = \gamma_{LW} + 2\,(\gamma_A \cdot \gamma_B)^{1/2}$$

γ_{TOT} : énergie libre totale de la surface
γ_{LW} : composante dispersive
γ_A : composante acide
γ_B : composante basique

III-3-3- Mesure de l'angle de contact en mode dynamique

La mesure de l'angle de contact en mode dynamique (DCA : Dynamic Contact Angle) a été effectuée selon la méthode de Wilhelmy. Cette méthode consiste à calculer les angles de contact à l'avancée (θ_A) et au retrait (θ_R) sur des solides de géométrie régulière (figure II-7a). Ces angles de contact sont calculés à partir de la mesure de la force exercée sur le capteur de force connecté à l'échantillon, lors de son immersion et de son émersion dans le liquide sonde. La force de mouillage sur le solide est mesurée en fonction de la profondeur de son immersion dans le liquide dont la tension superficielle est connue selon l'équation :

$$F = p \cdot \gamma_{LV} \cdot \cos\theta$$

F : Force mesurée (mN/isotherme)
γ_{LV} : tension de surface du liquide (mN/m)
p : Périmètre du substrat (cm)
θ : Angle de contact (°)

Dans notre travail, la mesure a été réalisée grâce à un tensiomètre (Krüss Gmbh) constitué d'une microbalance qui mesure la force exercée sur un échantillon lors de sa plongée dans l'eau (figure II-7b).

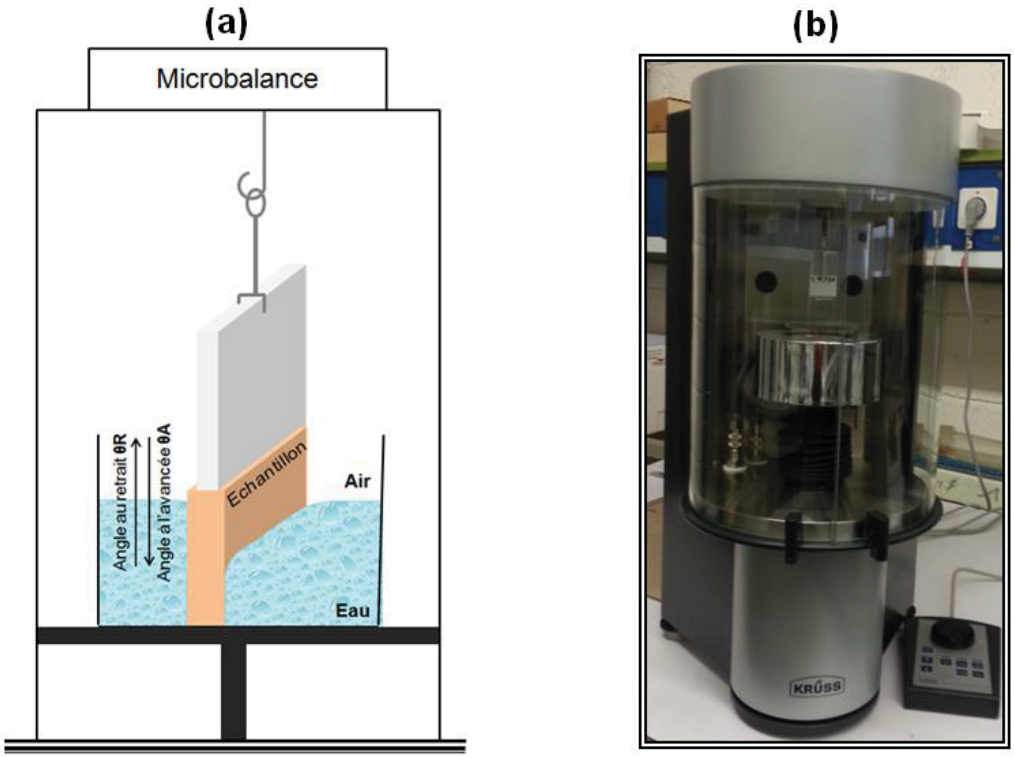


Figure II-7. (a) Schéma du principe du tensiomètre. (b) Photo du tensiomètre utilisé.

Pour chaque échantillon, 10 cycles de mesure successifs ont été enregistrés à une vitesse d'immersion et d'émersion de 3 mm/min. La courbe d'immersion représente θ_A et celle

d'émersion représente θ_R. L'hystérèse (H) correspond à la différence entre ces deux angles ($H = \theta_A - \theta_R$).

L'hystérèse se décompose en deux contributions, l'hystérèse thermodynamique et l'hystérèse cinétique. Elle est à l'origine de plusieurs facteurs :

- pour l'hysterèse thermodynamique :
  - l'hétérogénéité chimique (groupements chimiques) et morphologique (zones cristallines et amorphes) du solide ;
  - la rugosité (hétérogénéité topographique pour *Ra > 100 nm*) et déformation de la surface [12].
- pour l'hysterèse cinétique :
  - la mobilité (réorientation et re-conformation) des groupements chimiques et des chaînes polymères ;
  - le phénomène d'adsorption / désorption à la surface [13].

Par conséquent, la diminution de l'hystérèse signifie une homogénéisation de la chimie de la surface de l'échantillon et/ou une stabilisation de la rétention d'eau de l'échantillon (ou de la réorientation des molécules à sa surface au cours des cycles).

La figure II-8 représente les tensiographes des profils du premier cycle d'immersion et d'émersion des échantillons étudiés dans ce travail (Verre nu, PLA, 0/100, 10/90, 20/80, 30/70 et 100/0). Comme exemple, le profil des 10 cycles d'immersion et d'émersion de l'échantillon 30/70 est également présenté dans la figure II-8a.

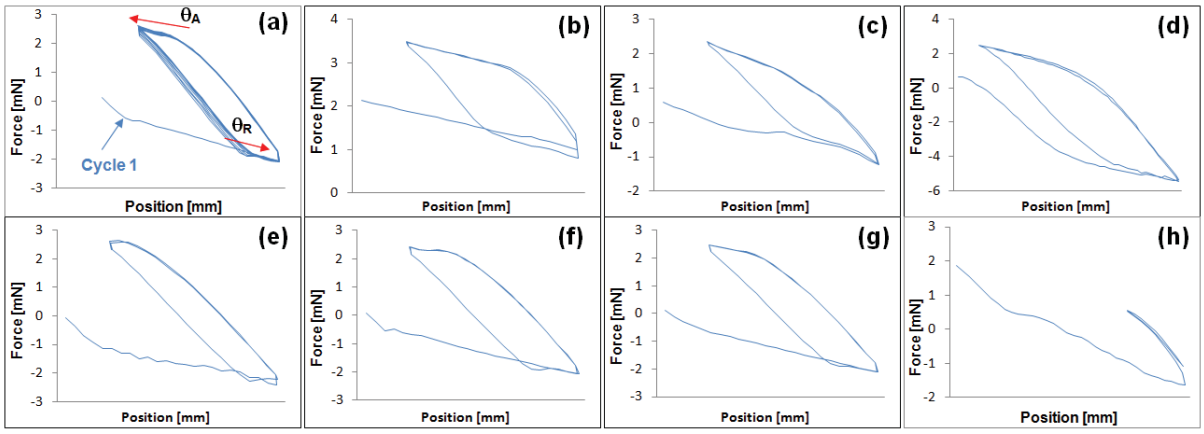


Figure II-8. Tensiographes des 10 cycles d'immersion et d'émersion du (a) 30/70 et du cycle 1 des échantillons : (b) verre nu, (c) PLA, (d) 0/100, (e) 10/90, (f) 20/80, (g) 30/70 et (h) 100/0.

IV- Etude de la rhéologie

L'étude de la rhéologie a été effectuée dans ce travail afin d'étudier le comportement viscoélastique des copolymères du PDMMLA. Lors de cette étude, le matériau est cisaillé (contrainte) et la réponse est ensuite mesurée. De nombreux paramètres peuvent être mesurés tels que la fréquence ou le taux de cisaillement. Pour cette première étude, nous avons mesuré le module de conservation (G') et de perte (G") en fonction de la fréquence (ω) à température constante (37°C). D'un point de vu général, le facteur de pertes (tan δ = G"/ G') indique, pour δ = π/2, que le matériau présente un comportement 100% élastique car la contrainte imposée est proportionnelle à la déformation de celui-ci. Inversement pour δ = 0 le matériau présente un comportement 100% visqueux. De plus, entre ces deux modèles élastique et visqueux, les polymères fluides adoptent un comportement viscoélastique de type :

$$\mathbf{0 < \delta < \frac{\pi}{2}}$$

Ceci implique que :

- si G' > G", le matériau a un comportement majoritairement élastique.
- si G' < G", le matériau a un comportement majoritairement visqueux.

La grandeur tan δ = G"/ G' est également étudiée en rhéologie :

- si δ < 1, le comportement du polymère est majoritairement élastique.
- si δ > 1, le comportement du polymère est majoritairement visqueux.

Les expériences de rhéologie ont été effectuées en géométrie plan/plan, avec un diamètre de 40 mm. L'évolution de G' et G" a été mesurée en fonction de la fréquence à la température fixée à 37°C. La gamme de fréquence choisie s'étalait entre 0 et 2 Hz (dont la valeur de la fréquence du rythme cardiaque est de 1Hz), avec 5 points par décade, régulièrement espacés en échelle logarithmique. La contrainte était de 1 Pa. Enfin, pour chaque point, nous avons laissé équilibrer l'échantillon pendant 3 s ("conditioning time") et chaque valeur est une moyenne prise ultérieurement, sur une durée de 3s ("sampling time"). La figure II-9 présente une photo du rhéomètre utilisé pour cette étude lors de la manipulation du polymère 20/80.

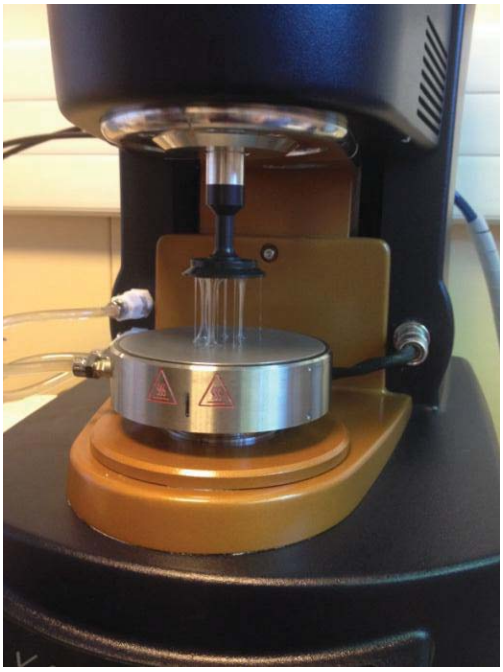


Figure II-9. Photo du rhéomètre utilisé.

V- Etudes biologiques

L'objectif de cette étude est de créer un matériau biocompatible et bioassimilable qui recouvrera le stent pour limiter les phénomènes de resténose. Le comportement cellulaire à été ainsi effectué principalement sur des cellules endothothéliales humaines (HUVECs), en contact avec la surface des polymères synthétisés. Les cellules endothéliales sont des cellules adhérentes et ont donc besoin de s'étaler sur une surface.

Afin d'évaluer le comportement cellulaire, l'étude englobe plusieurs tests : attachement, étalement, morohologie, adhésion et prolifération cellulaires sur la surface de films polymères PDMMLA 10/90, 20/80 et 30/70. Les différentes études effectuées sont détaillées dans la seconde partie de ce chapitre (Article 3).

➢ *Préparation des films pour la dégradation*

Pour l'étude de la morphologie et de la prolifération cellulaires, les solutions polymères ont été déposées dans des petits cristallisoirs en verre ayant la même taille que les puits de 24 (figure II-9). Pour l'étude de la morphologie et de la prolifération cellulaires, les solutions polymères ont été déposées dans des petits cristallisoirs en verre ayant la même taille que les puits de 24 (figure II-10). Ainsi, après évaporation du solvant à température ambiante, les échantillons ont été séchés une nuit à l'étuve vide à 37°C puis stérilisés 1 heure avant les tests

de la culture cellulaire sous rayonnement ultraviolet puis placés dans des boites de culture cellulaire de 12 puits.. Trois échantillons de chaque film polymère ont été étudiés à trois différents temps (n = 3). La prolifération est mesurée par le test LDH.

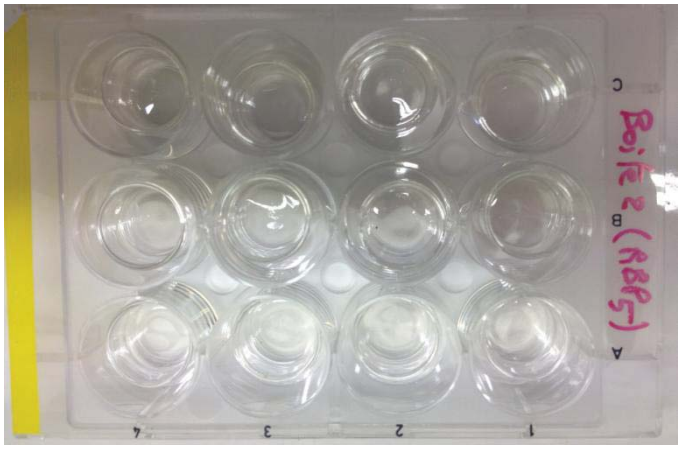


Figure II-10. Préparation des films polymères pour les tests de morphologie (observation de comportement) et de la prolifération cellulaires.

Par ailleurs, pour l'étude de l'étalement et de l'adhésion cellulaires, les solutions polymères ont été déposées sur des plaques de verre contenant 8 à 16 puits (Labtek). L'étude de l'adhésion cellulaire à été procédé d'une part avec des HUVECs et d'autre part avec des monocytes. Le comportement de ces cellules par ces différentes études a été observé par microscopie à contraste de phase ou à fluorescence.

VI- Etude de dégradation hydrolytique in vitro

L'étude de la cinétique de dégradation est étudiée tout d'abord à condition physiologique (à 37°C et à pH 7,4 sous atmosphère humide contenant 5% de CO2. De plus plusieurs paramètres ont été également étudiés tels que

- la température : 25°C, 37°C et 50°C,
- le pH : 5, 7,4 et 9,
- l'activité enzymatique : sans enzyme (PBS seul), en présence d'une enzyme spécifique (estérase) et non spécifique (amylase).

La biodégradation est suivie par chromatographie d'exclusion stérique (SEC).

➢ *Préparation des films pour la dégradation*

Le polymère, de masse connue, est solubilisé dans un minimum d'acétone (concentration connue). Il est ensuite déposé par fine couche sur une face d'une lamelle en verre (figure II-1). La lamelle est séchée une nuit à température ambiante et introduite dans des flacons contenant une solution de PBS avec une concentration de 4mg/ml. L'étude s'est effectuée pour une période de 8 ou 24 semaines selon les conditions choisies.

➢ *Cytotoxicité des produits de dégradation*

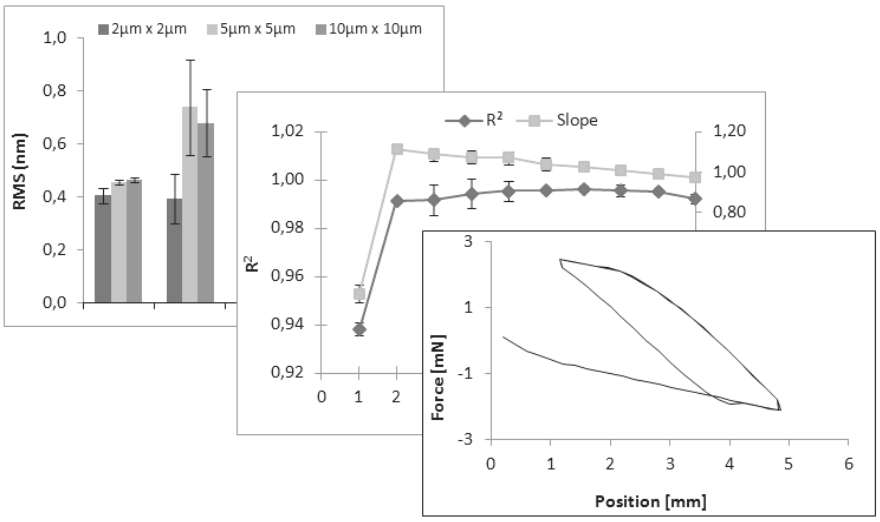
La cytotoxicité des produits de dégradation a été réalisée par deux méthodes différentes: le test MTT et le test live & dead. L'article 4, *l'étude in vitro de la dégradation des PDMMLA*, reprend en détail le protocole de cette étude.

Chapitre II : PDMMLAs amorphes

OBJECTIF 1

2ème partie :

Résultats et discussions



➢ Introduction

La biocompatibilité, les propriétés thermomécaniques et la capacité de libérer un médicament sont les principales considérations du choix d'un revêtement de SEMs. En effet, les propriétés de surface du revêtement jouent un rôle très important dans la détermination de sa biocompatibilité et de la réponse cellulaire (adhésion, morphologie, attachement, comportement, orientation, prolifération, migration et différenciation des cellules). Comme déjà évoqué dans le premier chapitre, ces propriétés de surface sont la morphologie, la composition chimique, la mouillabilité et l'énergie de surface. Elles ne sont pas toujours indépendantes les unes des autres [14, 15].

- ***Influence de la topographie et de la rugosité de la surface***

Plusieurs études ont montré que la morphologie et la rugosité de la surface sont des paramètres importants qui peuvent influencer la réponse biologique (échelle supérieure à 10 µm) [16]. En effet, des études *in vitro* qui ont été effectuées sur le comportement de plusieurs types cellulaires (fibroblastes, ostéoblastes et cellules épithéliales) vis-à-vis de la surface d'un même matériau ayant une rugosité variable ont démontré que l'impact de la rugosité de la surface sur la réponse cellulaire diffère selon la nature des cellules. [16]. Par exemple, une bonne adhésion et prolifération des fibroblastes ont été observées sur des surfaces lisses du titane plus que sur les surfaces rugueuses. En revanche, un comportement inverse a été obtenu pour les ostéoblastes sur des surfaces de rugosité importante [17, 18].

Généralement, l'adhésion des grosses cellules augmente avec l'augmentation de la rugosité de la surface [15]. En effet, l'adhésion et l'activation des macrophages sont importantes sur une surface rugueuse [19, 20]. Comme exemple, cet effet a été observé sur une prothèse vasculaire à base de PTFE à surface rugueuse [21, 22].

- ***Influence de la mouillabilité***

L'hydrophilie/hydrophobie de la surface détermine la mouillabilité. Les groupements fonctionnels de la surface d'un matériau en contact avec le milieu biologique et les cellules s'orientent et rendent la surface plus hydrophile ou plus hydrophobe. Généralement, les cellules se fixent sur les surfaces synthétiques ayant une moyenne mouillabilité [18]. L'adhésion cellulaire est favorisée par l'adsorption des protéines à la surface du matériau. Il a été démontré que les surfaces hydrophobes favorisent l'adsorption et la stabilisation des protéines d'adhésion [18]. Par ailleurs, un rinçage de la surface à l'eau peut dissocier le

complexe surface-protéine formé. Par conséquent, le mouillage/démouillage d'une surface hétérogène résulte une hystérèse de mouillage qui influence de son côté l'adhésion protéique.

- ***Influence de la charge***

La nature de la charge du matériau est un paramètre important sur l'adhésion cellulaire. Il a été démontré qu'une meilleure adhésion cellulaire est observée sur un biomatériau de charge négative [18]. La surface des cellules est généralement chargée négativement. En présence d'un biomatériau, les protéines d'adhésion forment rapidement une couche sur sa surface. Le matériau peut adopter les propriétés de la couche protéique qui couvre sa surface. En effet, dans le cas d'un matériau possédant un caractère hydrophile/hydrophobe, l'effet de la charge négative des groupements fonctionnels sur l'adhésion peut être négligeable.

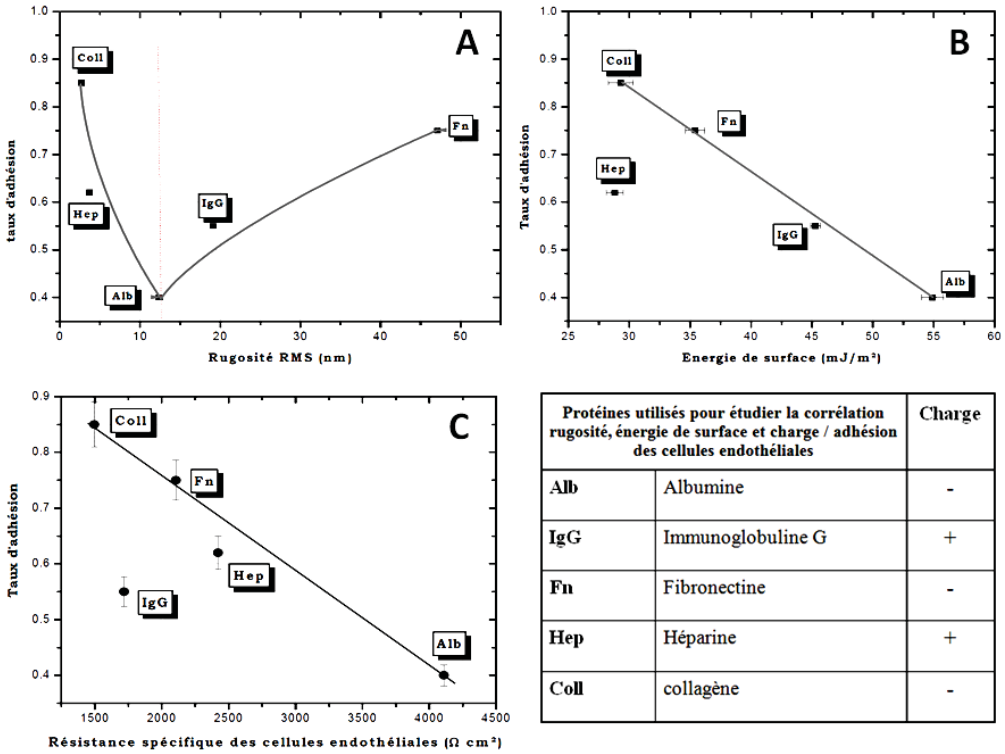
- ***Influence de la composition chimique***

La composition chimique d'un matériau implanté dans l'organisme est le premier paramètre qui va conditionner la réponse biologique [18]. Les constituants du matériau au nivaux de la surface ou à l'intérieur de la structure influencent sa biocompatibilité d'une manière directe ou tartive respectivement. L'identification de la composition chimique des biomatériaux est nécessaire pour l'étude de leur biocompatibilité.

- ***Influence de l'énergie de surface***

Les phénomènes interfaciaux biomatériau-milieu biologique sont interprétés par l'énergie de surface du biomatériau. Cette énergie est déterminée par la densité et la polarité des charges (négatives et positives) de la surface considérée hydrophile (somme des charges différente de zéro) ou hydrophobe (somme des charges nulle) [18]. Selon la littérature, l'énergie de surface est le facteur le plus important dans la détermination de l'adhésion des cellules [18]. Par exemple, une étude *in vitro* a montré une meilleure prolifération des fibroblastes sur une surface possédant une valeur de l'énergie de surface de 65 $mJ.m^{-2}$ (multiplcation cellulaire optimale) en comparant à celle qui ne possède qu'une valeur inférieure ou égale à 50 $mJ.m^{-2}$ (multiplcation cellulaire de seulement 10%). De plus, l'adhérence des cellules endothéliales aux substrats ayant une énergie de surface supérieure à 40 mJ/m^2 ou à 5 mJ/m^2 est limitée [18]. Par conséquent, l'augmentation de l'énergie de surface favorise la prolifération des fibroblates. En revanche, l'affinité de la surface du matériau avec le milieu physiologique augmente avec l'énergie de surface et donc la possibilité de l'augmentation de la thrombogénicité des vaisseaux sanguins [23].

Une étude a été réalisée afin de corréler la rugosité, l'énergie de surface et la charge de la surface et l'adhésion des cellules endothéliales en utilisant des surfaces (protéines) possédant différentes rugosités (figure II-9). La meilleure adhésion a été obtenue sur une surface possédant une rugosité (1,8 nm) et une énergie de surface (29 mJ/m²) minimales (collagène) et une charge négative. [18].



Protéines utilisés pour étudier la corrélation rugosité, énergie de surface et charge / adhésion des cellules endothéliales		Charge
Alb	Albumine	-
IgG	Immunoglobuline G	+
Fn	Fibronectine	-
Hep	Héparine	+
Coll	collagène	-

Figure II-9. Variation du taux d'adhésion des cellules endothéliales en fonction de : (A) la rugosité (RMS) de la surface, (B) de l'énergie de surface et (C) de la charge du substrat [18]

En conclusion, la composition, la charge, la morphologie, la mouillabilité et l'énergie de surface des biomatériaux doivent être étudiées afin d'ajuster leur réponse biologique et l'adhésion protéique et cellulaire. Ainsi, les propriétés de surface doivent avoir toutes été étudiées avant de faire le choix de la plateforme médicamenteuse favorable comme revêtement de stent. Nous allons procéder dans ce chapitre, dans un premier temps, à l'étude de la mouillabilité en statique et en dynamique, la rugosité et la topographie, l'énergie de surface et ses composantes des polymères utilisés pour notre étude (PDMMLAs amorphes). Dans un second temps, l'étude de la réponse biologique *in vitro* (adhésion, attachement, comportement et prolifération) des CEs (HUVECs) sera présentée aussi qu'une étude de la dégradation de ces polymères dans les conditions physiologiques en présence ou non d'enzymes. L'étude de la cytotoxicité des produits de dégradation *in vitro* fera aussi partie des résultats présentés dans ce chapitre.

➢ Références bibliographiques

1. Ouhib, F.; Randriamahefa, S.; Guerin, P.; Barbaud, C., Synthesis of new statistical and block co-polyesters by ROP of α,α,β-trisubstituted β-lactones and their characterizations. *Designed Monomers And Polymers* **2005,** 8, (1), 25-35.

2. Barbaud, C.; Faÿ, F.; Abdillah, F.; Randriamahefa, S.; Guérin, P., Synthesis of New Homopolyester and Copolyesters by Anionic Ring-opening Polymerization of α,α′,β-Trisubstituted β-Lactones. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2004,** 205, (2), 199.

3. Barbaud, C.; Abdillah, F.; Faÿ, F.; Guerrouache, M.; Guérin, P., Synthesis of new α,α,β-trisubstituted beta-lactones as monomers for hydrolyzable polyesters. *Designed Monomers and Polymers* **2003,** 6, (4), 353.

4. Belibel, R.; Barbaud, C., Synthesis of new optically active α,α',β-trisubstituted β-lactones as monomers for stereoregular biopolyesters. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2015,** 53, (22), 2586-2597.

5. Ninove, F.P. Texturation de surface par LASER femtoseconde en régime ElastoHydroDynamique et limite : application au contact Segment / Piston / Chemise d'un moteur thermique à combustion Ecully, Ecole centrale de Lyon, 2011.

6. LPSI, C., Microscopie à Force Atomique **2014**.

   http://hosting.umons.ac.be/php/lpsi/fr/microscopie-a-force-atomique/.

7. Bouteau, M. Propriétés de mouillage de surfaces chimiquement hétérogènes. Université de Cergy-Pontoise, **2007**.

8. Busscher, H. J.; Van Pelt, A. W. J.; De Boer, P.; De Jong, H. P.; Arends, J., The effect of surface roughening of polymers on measured contact angles of liquids. *Colloids and Surfaces* **1984,** 9, (4), 319-331.

9. Wu, S., Polar and nonpolar interactions in adhesion. *The Journal of Adhesion* **1973,** 5, (1), 39-55.

10. Owens, D. K.; Wendt, R. C., Estimation of the surface free energy of polymers. *Journal of applied polymer science* **1969,** 13, (8), 1741-1747.

11. Fowkes, F. M., Physical-chemical aspect of polymer surfaces, Vol. 2., Mittal, KL Ed. In Plenum, New York: 1983.

12. Vergelati, C.; Perwuelz, A.; Vovelle, L.; Romero, M. A.; Holl, Y., Poly (ethylene terephthalate) surface dynamics in air and water studied by tensiometry and molecular modelling. *Polymer* **1994,** 35, (2), 262-270.

13. Extrand, C. W.; Kumagai, Y., Contact angles and hysteresis on soft surfaces. *Journal of colloid and interface science* **1996,** 184, (1), 191-200.

14. Ponsonnet, L.; Reybier, K.; Jaffrezic, N.; Comte, V.; Lagneau, C.; Lissac, M.; Martelet, C., Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour. *Materials Science and Engineering: C* **2003,** 23, (4), 551-560.

15. Curtis, A.; Wilkinson, C., Topographical control of cells. *Biomaterials* **1997,** 18, (24), 1573-1583.

16. Giljean, S. Caractérisation Multi-échelles de la Rugosité de Matériaux Métalliques à Usage Biomédical: Effet sur la Mouillabilité et l'Adhésion de Cellules Osseuses. Mulhouse, **2007**.

17. Wirth, C.; Comte, V.; Lagneau, C.; Exbrayat, P.; Lissac, M.; Jaffrezic-Renault, N.; Ponsonnet, L., Nitinol surface roughness modulates in vitro cell response: a comparison between fibroblasts and osteoblasts. *Materials Science and Engineering: C* **2005,** 25, (1), 51-60.

18. épouse Ltaief, A. B. Caractérisation et quantification de l'adhésion des cellules endothéliales à des biomatériaux fonctionnalisés. 2006.

19. Salthouse, T. N., Some aspects of macrophage behavior at the implant interface. *Journal of biomedical materials research* **1984,** 18, (4), 395-401.

20. von Recum, A. F., *Handbook of biomaterials evaluation: scientific, technical and clinical testing of implant materials*. CRC Press: 1998.

21. Anderson, J. M., Inflammation and the foreign body response. *Problems in General Surgery* **1994,** 11, 147-147.

22. Sharkawy, A. A.; Klitzman, B.; Truskey, G. A.; Reichert, W. M., Engineering the tissue which encapsulates subcutaneous implants. I. Diffusion properties. *Journal of biomedical materials research* **1997,** 37, (3), 401-412.

23. Huang, Y., *Drug Eluting Stents: Anti-Inflammatory Approach To Prevent Restenosis After Stent Implantation*. Leuven University Press: 2003.

ARTICLE 1

(Publié)

« Materials Science and Engineering C »

Résumé :

Selon les informations évoquées dans l'introduction de ce chapitre, la biocompatibilité d'un matériau est influencée par différentes propriétés physicochimiques telles que la topographie, la mouillabilité et l'énergie de surface. Ce premier article porte sur l'étude des propriétés de surface des PDMMLAs qui sont chimiquement homogènes ou qui présentent une surface chimiquement hétérogène. Une étude de la mouillabilité de la surface d'une série de polymères (PLA, 0/100, 10/90, 20/80, 30/70, 100/0 et HP-OH) a été réalisée par la méthode de la goutte posée. Ainsi, deux solvants polaires (eau, formamide) et un solvant apolaire (diiodométhane) ont été utilisés afin de calculer l'énergie de surfaces et ses composantes de tous les polymères selon le modèle de Van Oss. Ces études ont été effectuées sur des films polymères lisses homogènes ou hétérogènes chimiquement. La rugosité de la surface est négligeable. Elle a été caractérisée par AFM. En revanche, l'impact de l'hétérogénéité chimique sur la mouillabilité et sur l'énergie de surface et ses composantes a été étudié. Une correction théorique de l'hétérogénéité de la surface a été effectuée sur tous les paramètres de la mouillabilité par l'application de l'équation de Cassie-Baxter. La corrélation de ces paramètres corrigés ou non avec le pourcentage des fonctions acides latérales des copolymères (10/90, 20/80 et 30/70) a été effectuée. L'impact de ce pourcentage d'acidité sur la mouillabilité, la morphologie et les propriétés de surface ont également été étudiés. Une meilleure connaissance de ces propriétés de surface permettrait de comprendre certains phénomènes interraciaux des films de PDMMLAs et d'envisager le bon polymère (% de –COOH) pour une éventuelle utilisation comme biomatériau.

Effect of chemical Heterogeneity of biodegradable polymers on surface energy: a static contact angle analysis of polyester model films

R. Belibel[1], T. Avramoglou[1], A. Garcia[2], C. Barbaud[1] and L. Mora[1]*.

[1] INSERM U1148, Laboratory for Vascular Translational Science (LVTS), Institut Galilée, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, 99 Avenue Jean-Baptiste Clément, Villetaneuse, F-93430, France.

[2] CNRS UPR 3407, Laboratoire des Sciences des Procédés et des Matériau, Institut Galilée, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, 99 Avenue Jean-Baptiste Clément, Villetaneuse, F-93430, France.

*Corresponding author. Tel.: +33 (0)1 49 40 20 35; fax: +33(0)1 49 40 30 08

E-mail address: Laurence.mora@univ-paris13.fr (L. Mora ex Ponsonnet).

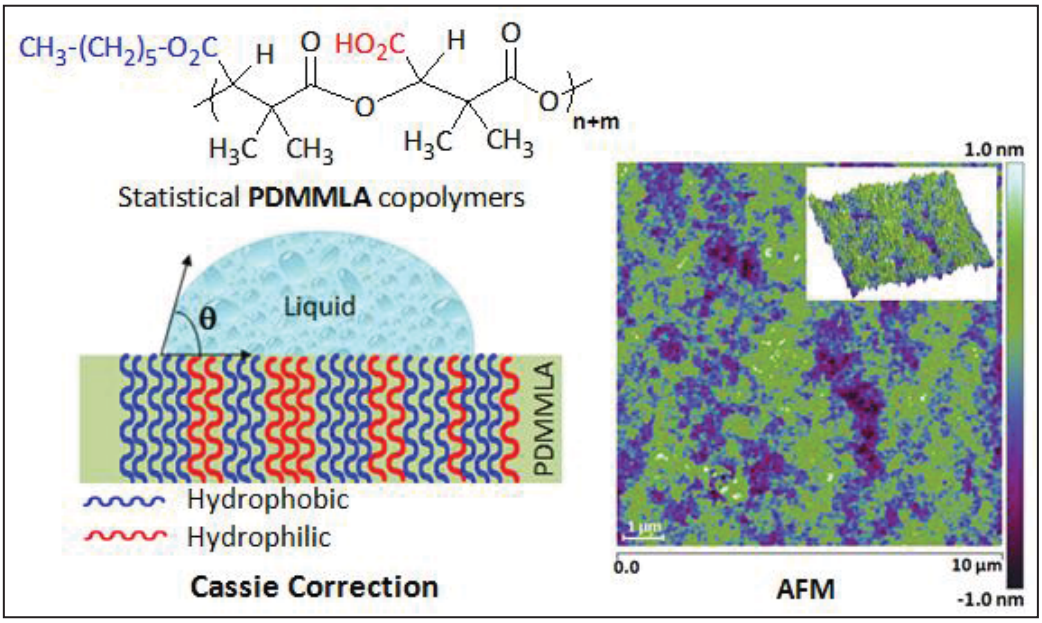
Abstract:

Biodegradable and bioassimilable poly((*R,S*)-3,3 dimethylmalic acid) (PDMMLA) derivatives were synthesized and characterized in order to develop a new coating for coronary endoprosthesis enabling the reduction of restenosis. The PDMMLA was chemically modified to form different custom groups in its side chain. Three side groups were chosen: the hexyl group for its hydrophobic nature, the carboxylic acid and alcohol groups for their acid and neutral hydrophilic character, respectively. Sessile drop method was applied to characterize the wettability of biodegradable polymer film coatings. Surface energy and components were calculated. Van Oss approach helped reach not only the dispersive and polar acid-base components of surface energy but also acid and basic components. Surface topography was quantified by atomic force microscopy (AFM) and subnanometer average values of roughness (Ra) were obtained for all the analyzed surfaces. Thus, roughness was considered to have a negligible effect on wettability measurements. In contrast, heterogeneous surfaces had to be corrected by Cassie-Baxter equation for copolymers (10/90, 20/80 and 30/70). The impact of this correction was quantified for all the wettability parameters. Very high relative corrections (%) were found, reaching 100% for energies and 30% for contact angles.

Keywords:

Biodegradable (poly((*R,S*)-3,3 dimethylmalic acid) derivatives; contact angle; sessile drop; surface tension; heterogeneous surfaces.

Graphical abstract



Highlights

1- We develop different biodegradable with various chemical compositions.

2- Wettability properties were calculated using Cassie corrected contact angles

3- Percentage of acid groups in polymers is directly correlated to acid part of SFE

4- Cassie corrections are necessary for heterogeneous polymers.

I. Introduction

Bio-polyesters are widely recommended in biomedical applications [1] as drug carriers [2] such as poly(L-lactic acid) (PLA), poly(glycolic acid) (PGA), poly(ε-caprolactone) (PCL) [3] and *poly*(*malic acid*) (PMLA) [4-8]. These biodegradable polyesters were used either alone or as copolymers side-chains to improve their mechanical properties, hydrolysis, long-term biodegradation or biocompatibility behavior for the desired therapeutic applications (PLGA [9, 10], PLMA [11-15], …). Among this class of polymers, the PMLA is known to present good biocompatibility, non-toxicity in vitro and in vivo, non-immunogenic properties and stability in the bloodstream [5, 16-19]. The particularity that led us to choose this family of polyesters is the presence of functionalized groups in their side-chain which, furthermore, allow chemical modification for grafting and thus, delivering drugs [20]. The copolymers derived from PMLA studied in this work were chosen to cover a coronary stent, and thus deliver a drug.

Indeed, surface wettability of the film coatings is directly governed by their chemical composition, which is known to modulate the implant biointegration [21]. Thus, it is of importance to measure contact angles in order to calculate the values of surface free energy and its components (dispersive, polar, acid and basic) for the films coatings. Indeed, this characterization could then be used to research relationships between surface chemical composition and cell response for further studies. However, copolymer surfaces are chemically heterogeneous and wettability of non-ideal surfaces is still under consideration in literature [22, 23].

Basically, it is necessary to bring correction to contact angles because the different chemical composition in amphiphilic polymers is responsible for surface energy modifications compared to ideal homogeneous surfaces. Cassie-Baxter equation is generally used to perform theses corrections [24, 25]. For heterogeneous surfaces composed of two homogeneous component surfaces (labelled 1 and 2 respectively) the equation is [26]:

$$\cos \theta^* = f_1 \cos \theta_1 + f_2 \cos \theta_2 \qquad (1)$$

Where θ_1, θ_2, f_1 and f_2 (with $f_1 + f_2 = 1$) are contact angles and area surface fractions respectively for each component individually. θ^* is the Cassie apparent contact angle.

Moreover, surface roughness is also a parameter that has to be taken into account when contact angles studies are undertaken because in cases where average surface roughness (Ra) is important, contact angles can be increased due to this roughness [27]. Finally, correction

due to the different chemical composition was calculated and the impact of this correction on surface free energies and components (dispersive, polar (acid and basic)) values was quantified. This quantification was performed as a function of the acidic percentage (AP) of the polymers chemical formulae.

The purpose of the present study was the characterization of polymer surfaces having a wide range of chemical composition by determining the contact angle, surface roughness and surface free energies and components for each sample. Therefore, this material is the poly((*R,S*)-3,3 dimethylmalic acid) (PDMMLA) obtained by anionic ring-opening polymerization of racemic α,α,β-trisubstituted-β-lactones as previously published [28-30].

II. Material and methods

II.1. Polymers synthesis

Amorphous PLA (M_n = 20 000 g/mol) was purchased from Sigma Aldrich (France). Anhydrous THF was distilled on sodium-benzophenone. In all other cases, the commercially available chemicals were purchased from Sigma Aldrich (France) and employed as received. All reactions, with anhydrous organic solvents were performed under nitrogen atmosphere. Synthetic PDMMLAs were prepared in anhydrous THF solution using the previously reported procedure [30]**.** The *β*-lactones monomers were synthesized according to the literature procedure as well [31]. Benzylic lactone (4-benzyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone), hexylic lactone (4-hexyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone) and benzyloxypropylic lactone (4-(3-benzyloxypropyl)carbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone) were used for the synthesis of corresponding homopolymers PDMMLA-H, PDMMLA-He and PDMMLA-OH, respectively. For the synthesis of the different copolymers, only benzylic and hexylic lactones were used. Briefly, as an example for the preparation of $PDMMLAH_{20}$-co-He_{80} (20/80), 513 mg (2,9 mmol) of benzylic lactone and 2 g (8,76 mmol) of hexylic lactone were dissolved in 50 mL of anhydrous THF solution and added, to a two-neck flask containing initiator (10^{-2} equiv, 0.116 mmol, 29.26 mg) under nitrogen atmosphere. The polymerization was followed by FTIR spectroscopy analysis indicating the disappearance of the lactone band at 1850 cm^{-1} and stirred at room temperature for 24h (100 % conversion). The polymer was isolated by precipitation in ethanol and then it underwent a catalytic hydrogenolysis in presence of palladium on charcoal to obtain carboxylic acid (PDMMLA-H and PDMMLA copolymers) and alcohol (PDMMLA-OH) [30]. The polymers with 0, 10, 20, 30 and 100% of acidic groups were named as 0/100, 10/90, 20/80, 30/70 and 100/0, respectively.

II.2. Samples preparation

To obtain polymer films, the PDMMLAs were dissolved in acetone and PLA in chloroform. The polymer solution was then deposited on glass slides. After the evaporation of solvent at room temperature, glass slides were dried at 37°C overnight in a vacuum oven. Glass is used as a reference sample.

II.3. PDMMLA Polymers characterization

II.3.1. Characterization of chemical structure

FTIR spectra were recorded on AVATAR 370 TF-IR Thermo Nicolet spectrometer using Nicolet OMNI-Sampler ATR Smart Accessory (Ge, DTGS). Adsorption bands are given in cm^{-1}.

^{1}H and ^{13}C NMR spectra were recorded on BRUKER AM-400 MHz spectrometer using CD_3COCD_3 as solvent and with the residual solvent signals as internal standard, unless otherwise indicated. Chemical shifts were given in ppm (δ) and coupling constants in Hz. The following abbreviations were used to describe the peak pattern: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet) and m (multiplet).

The absolute average molecular weights and molecular weight distributions were determined at room temperature by coupling online a high performance size exclusion chromatograph (HPSEC), a multi-angle laser light scattering detector (MALLS), a viscometer and a differential refractive index (dRI) detector. THF, used as carrier, was filtered through a 0.1 µm filter unit (Millipore, Billerica, USA), carefully degassed (DGU-20A3R Shimadzu, Kyoto, Japan), and eluted at a 0.5 mL/min flow rate (LC10Ai Shimadzu, Kyoto, Japan). 100 µL of a 0.2 µm-filtered sample solution (at about 20 mg/mL) were injected with an automatic injector (SIL-20A HT Shimadzu, Kyoto, Japan). The column packing was a polystyrene-divinylbenzene gel. The MALLS photometer, a miniDawn TREOS from Wyatt Technology Inc. (Santa Barbara, CA, USA) was provided with a fused silica cell and a Ga-As laser (λ = 665.8 nm). The whole collected data: light scattering (LS), dRI were analyzed using the Astra v6.0.6 software package. Molar mass were obtained with the Zimm order 1 method. The concentration of each eluted fraction was determined with dRI (RID10A Shimadzu, Kyoto, Japan) according to the measured values of dn/dc (0.05 mL/g)[32].

All glass transition (*T*g) temperatures of different polymers were obtained using Differential Scanning Calorimetry (DSC). DSC was measured on a SDT Q600 analyser (TA instrument, Guyancourt, France). In a typical run, polymers were first put in the furnace and

heated from -60°C to 200°C by means of a temperature ramp of 10°C/min. This operation was repeated twice. *T*g was determined from the inclination point of the second heating curve.

II.3.2. Atomic Force Microscopy (AFM)

AFM was used to obtain topographic images of surface samples. The AFM machine was a nanoscope 5 (Bruker-Nano) and the cantilever was a Veeco tip silicon probe with aluminum reflex coating (resonant frequency: 300 kHz) and with a constant force of 40N/m. Imaging was performed in the air, at room temperature, and using the tapping mode. Surface morphology and roughness parameters were determined by the AFM software program. The (10 µm x 10 µm) 2D images of topography were obtained with a resolution of 256_256 pixels. Surface roughness (Ra (nm)) was then evaluated from 10 µm x 10 µm (100 μm^2) images.

II.3.3. Contact angle measurements and surface free energy (SFE) calculations

Contact angles were carried out using a GBX Scientific Instrument (Romans, France). A drop of 2 µL of a chosen probe liquid was deposited on the sample surface through a syringe. The drop image was stored by a video camera and an image analysis system (Windrop ++ software) calculated the contact angle (θ) from the shape of the drop. Before measurement, samples were rinsed in distilled water and dried under N_2. Contact angles were measured in the air at room temperature. For each substratum, three probe liquids (L) of different polarities were used: distilled water, formamide (Sigma Chemical CO) and diiodomethane (Sigma Chemical CO–St Louis MO USA). For each probe liquid and surface, 10 contact angles were measured (with two separate samples) and the mean value was calculated. The total SFE (γ_{TOT}) of the different surfaces were calculated using the Van Oss model [33] which brings together the dispersive (γ_{LW}) and the polar acid–base (γ_{AB}) components. The polar acid–base (γ_{AB}) components are itself divided into two parts, acid (γ_A) and basic (γ_B).

II.3.4. Statistical Analysis

The statistics used here for contact angle and AFM measurements were based on a comparison of variances and means of two populations by the Student test (t-test with Excel software). Statistical calculations were performed using n = 10 different values (two separate samples) for contact angles measurements and using n = 3 different areas (4 μm^2, 25 μm^2 and 100 μm^2 separate samples) for AFM roughness calculations. The probability of correlation

was based on the Pearson coefficient (p). While p-value is less than 0.01, a statistically significant difference is achieved between the two populations of values that are compared.

III. Results and discussion

III.1. PDMMLA polymers synthesis

For this study, six polymers were chosen: three homopolymers and three statistical copolymers. Only copolymers are tested in selected biomedical applications in other studies (data not shown). For a closer characterization of the behavior of polymers, the homopolymers should also be studied. Since the six polymer films were deposited on glass slides and the PLA was the most used polymer for the coating of stents in recent years [34], all results in this study were also compared for each case with glass and PLA. The –COOH group in the side-chain furnishes the acid hydrophilic character for copolymers, the hexyl group brings the hydrophobic character and the –OH group provides the neutral hydrophilic character. The alcohol functions on the homopolymer chains (PDMMLA-OH named HP-OH) were often used for its opsonization phenomenon [35]. At the same time, acid hydrophilic and hexylic homopolymers (PDMMLA-H 100/0 in the present paper and PDMMLA-He labeled as 0/100, respectively) were synthesized. Three statistical copolymers with different hydrophobic / hydrophilic balance in the side-chain of copolymers were also prepared: PDMMLAH$_{10}$-*co*-He$_{90}$ named 10/90, PDMMLAH$_{20}$-*co*-He$_{80}$ named 20/80 and PDMMLAH$_{30}$-*co*-He$_{70}$ named 30/70 (figure 1).

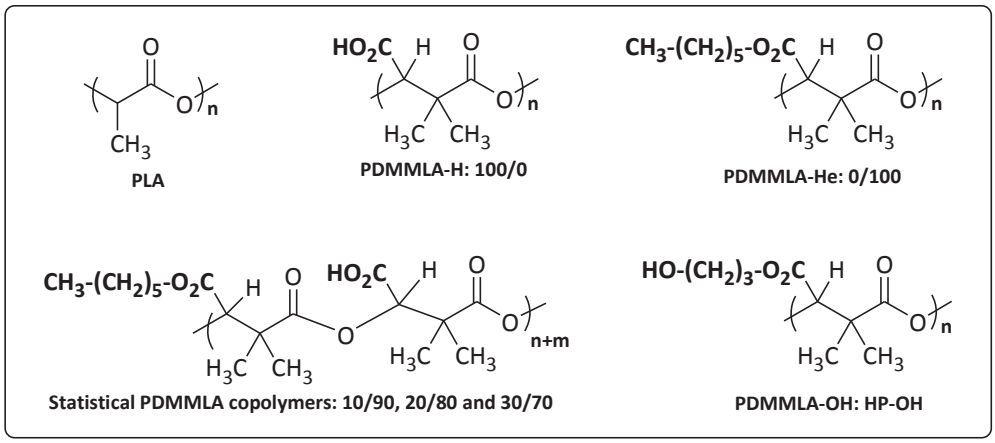


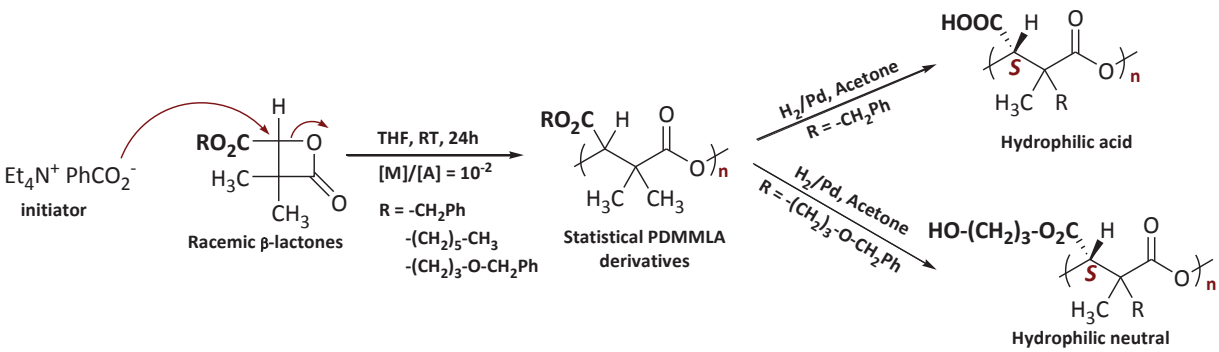
Figure 1. Chemical structures of different studied polymers.

These carboxylic acid ratios incorporated during the polymer synthesis (translated by "AP") were selected to vary the kinetic of hydrolysis. The degradation, regardless of carboxylic acid percentage (10, 20 and 30), was more or less slower. Since these materials

will be in direct contact with blood and vascular cells, it is important to study the wettability, thermomechanical and viscoelastic properties and cell interaction behavior. Finally, we will be able to determine the appropriate PDMMLA copolymer having the best qualities to cover the metallic stent. Such an attempt is essential to overcome the limitations of the existing degradable polymers such as PLA. Despite its widespread use for medical applications, PLA exhibits frequently a limited cell response and poor interaction with body tissue and fluids [14, 19, 36-38]. Its major disadvantages are slow degradation, poor hydrophilicity and poor ductility (higher glass temperature (*Tg*)) which limit its applications [36, 39]. Therefore, the modification of PLA surface properties has become crucial to especially meet the requirements of biomedical applications [9, 11, 14, 40]. Unfortunately, adjusting its rate of degradation, surface wettability, functionalization and thermo-mechanical properties is somewhat deficient.

The objective of this work is to determinate the surface properties of different PDMMLA polymer films.

Synthetic PDMMLAs were successfully prepared by a living anionic ring-opening polymerization of corresponding *β*-lactones as monomers : benzylic lactone "R = $-CH_2Ph$", hexylic lactone "R = $-(CH_2)_5-CH_3$" and benzyloxypropylic lactone "R = $-(CH_2)_3-O-CH_2Ph$" in anhydrous THF solution using the previously reported procedure (scheme 1) [30]**.** PDMMLA statistical copolyesters were prepared from two different racemic *β*-lactones (benzylic and hexylic lactones). The latter were chosen because they bring the hydrophilic and hydrophobic characters to these copolymers. The tetraethylammonium benzoate was used as initiator (scheme 1).



Scheme 1. Synthetic route to PDMMLA derivatives.

III.2. Polymer characterization

III.2.1. Characterization of polymers chemical structure

The different polymers were characterized by FTIR, ^{1}H and ^{13}C NMR, SEC and DSC. The different copolymers characteristics are given in table. FTIR spectroscopy analysis showed the ester characteristic band at 1751 cm^{-1} and the disappearance of the lactone band at 1838 cm^{-1} for all polymers (figure 2).

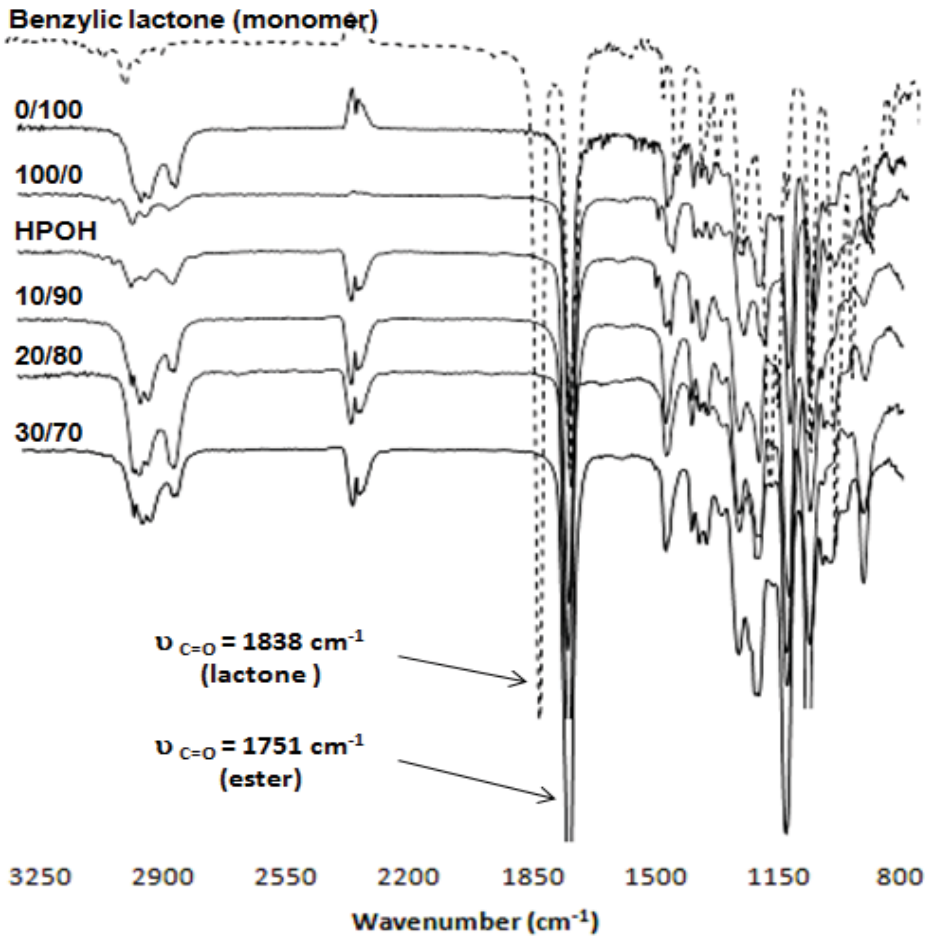


Figure 2. FTIR spectra of the benzylic lactone monomer and PDMMLA polymers.

The chemical structure of all PDMMLA polymers was confirmed by ^{1}H and ^{13}C NMR (table 1). Therefore, signals around 5.20 and 7.38 ppm on ^{1}H NMR spectrum confirmed the presence of benzylic group and those around 0.89, 1.26 and 4.10 ppm characterized the hexylic group. In addition, signals assigned to benzyloxypropylic group are appeared at 1.93, 3.54, 4.27 and 4.49 ppm.

Table 1. ^{1}H and ^{13}C NMR data for all PDMMLA homopolymers and copolymers.

Polymers		^{1}H NMR (δ ppm) [(a)]	^{13}C NMR (δ ppm) [(a)]
Homopolymers	**0/100**	0.86 (m, 3H, C<u>H</u>$_3$-CH$_2$), 1.26 (m, 9H, CH$_3$, 3 x CH$_2$), 1.40 (m, 3H, CH$_3$), 1.59 (m, 2H, CH$_2$), 4.10 (m, 2H, CH$_2$-O), 5.38 (m, 1H, CH).	14.47 (<u>C</u>H$_3$-CH$_2$), 23.35 (CH$_3$), 26.34 (<u>C</u>H$_2$-CH$_3$), 29.34 (CH$_3$), 32.25 (3 x CH$_2$), 46.03 (C), 66.29 (CH$_2$-O), 77.15 (CH), 168.25, 173.71 (2 x C=O).
	100/0	1.20 (m, 3H, CH$_3$), 1.29 (m, 3H, CH$_3$), 5.17 (m, 2H, CH$_2$), 5.35 (m, 1H, CH), 7.36 (m, 5H, Ph).	21.54, 30.60 (2 x CH$_3$), 45.78 (C), 67.72 (CH$_2$-O), 76.83 (CH), 129.18, 129.32, 136.08, 136.17 (Ph), 167.88, 173.57 (2 x C=O).
	HPOH	1.24 (m, 6H, 2 x CH$_3$), 1.93 (m, 2H, CH$_2$), 3.54 (m, 2H, CH$_2$-O), 4.27 (s, 2H, CH$_2$-CO$_2$), 4.49 (s, 2H, C<u>H</u>$_2$-Ph), 5.39 (m, 1H, CH), 7.28 (m, 5H, Ph).	22.35 (2 x CH$_3$), 45.74 (C), 63.47, 63,56 (-O-<u>C</u>H$_2$-CH$_2$-<u>C</u>H$_2$-O-), 66.95 (-<u>C</u>H$_2$-CH$_2$-O-), 73.21 (<u>C</u>H$_2$-Ph), 77.01 (CH), 128.09, 128,20, 128,98, 139,56 (Ph), 168.04, 173,62 (2 x C=O).
Copolymers	**10/90**	0.89 (t, 3H, C<u>H</u>$_3$-CH$_2$), 1.31 (m, 18H, 4 x CH$_3$ and 3 x CH$_2$), 1.64 (m, 2H, CH$_2$), 4.15 (m, 2H, CH$_2$-C<u>H</u>$_2$-O), 5.20 (m, 2H, Ph-C<u>H</u>$_2$-O), 5.33 (m, 2H, 2 x CH), 7.40 (m, 5H, Ph).	14.45 (<u>C</u>H$_3$-CH$_2$), 23.32 (2 x CH$_3$), 26.31 (<u>C</u>H$_2$-CH$_3$), 29.31 (2 x CH$_3$), 32.22 (3 x CH$_2$), 45.98 (2 x C), 66.28 (CH$_2$-<u>C</u>H$_2$-O), 67.88 (Ph-<u>C</u>H$_2$-O), 77.14 (2 x CH), 129.38, 129.62 136.45 (Ph), 168.22, 168.29, 173.68, 173.90 (4 x C=O).
	20/80		
	30/70		

(a) NMR data for all PDMMLA polymers before hydrogenolysis. ^{1}H NMR (400 MHz in CD_3COCD_3) and ^{13}C NMR (100 MHz in CD_3COCD_3).

The co-monomers relative contents (10, 20 and 30%) were obtained by ^{1}H NMR using the integration ratio of peak at 4.15 ppm corresponding to -CH$_2$-O- hexyl and that at 5.20 ppm corresponding to -CH$_2$-O- benzyl (figure. 3a).

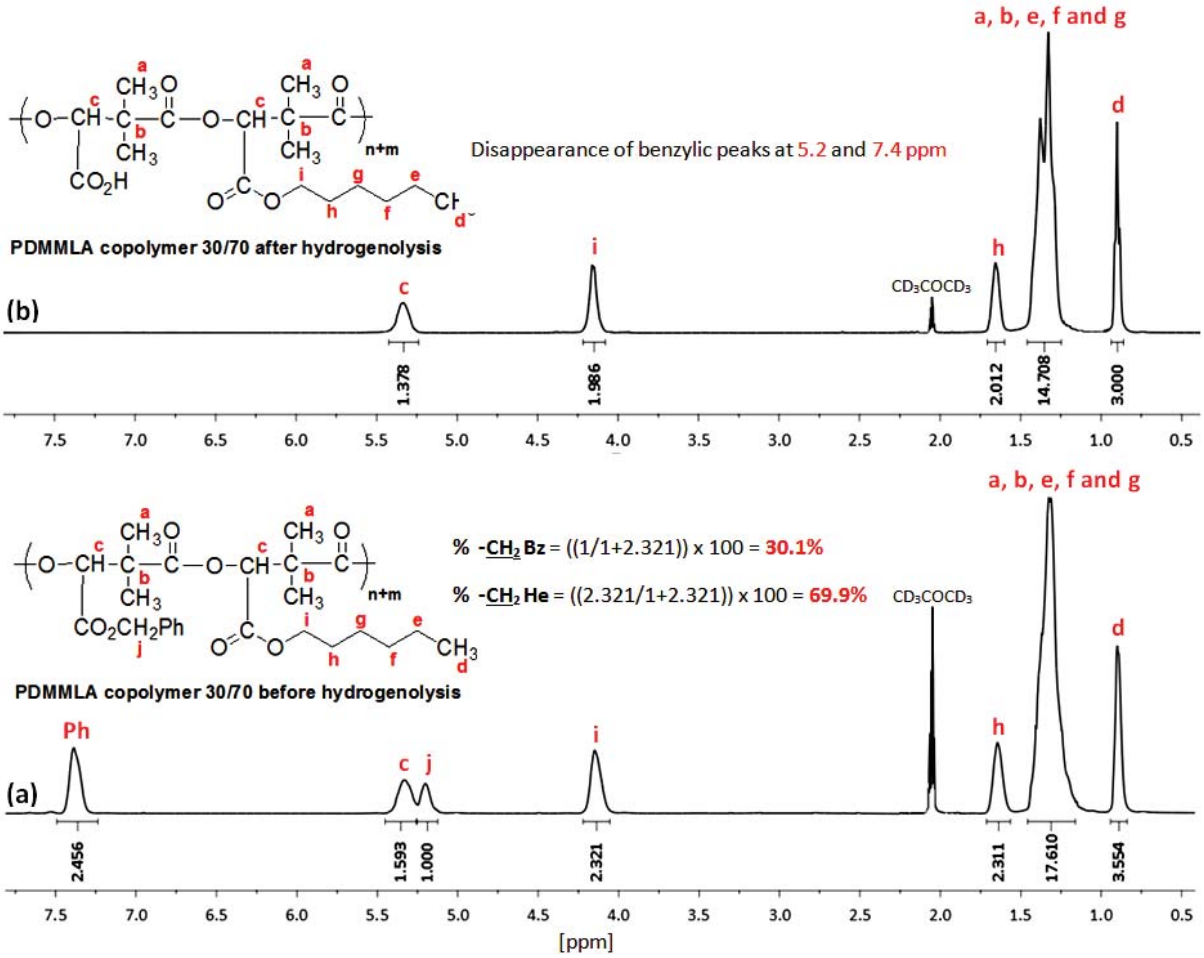


Figure 3. ^{1}H NMR spectra of PDMMLA copolymer 30/70 (a) before hydrogenolysis and (b) after hydrogenolysis.

Figure 3a showed that the proportion of the benzylic and the hexylic units in the copolymer 30/70 was 30.1% and 69.9%, respectively.

After a catalytic hydrogenolysis in presence of 10% of palladium on charcoal on the polyester, it's possible to obtain carboxylic acid group (when R = $-CH_2Ph$) and alcohol group (when R = $-(CH_2)_3-O-CH_2Ph$) (scheme 1). As mentioned above, these ionic and non-charged groups (carboxylic acid and alcohol, respectively) are used one hand for their hydrophilic properties and other hand for the possibility to react with bioactive or targeting molecules [28, 41, 42]. The hexyl group is used for their hydrophobic properties, which gives access to a wide variety of amphiphilic copolymers. Polymers catalytic hydrogenolysis was confirmed by the disappearance of benzylic peaks at 5.2 and 7.4 ppm on ^{1}H NMR spectrum for 100/0 and copolymers (figure 3b) and with the disappearance of benzyloxypropylic peaks at 1.93, 3.54, 4.27 and 4.49 ppm.

Glass temperature (*Tg*) of PDMMLA copolymers don't exceed 20°C which is lower than the physiological temperature whereas PLA has a higher *Tg* (about 63°C) having thus less ductility and softness (table 2). These thermal properties of PDMMLA polymers present an encouraging result for applying these biomaterials to cover the cardiovascular stents.

Table 2. Characterization of different homopolymers and copolymers.

Polymers		Copolymers composition (%) [b]		Characterization of polyesters				
		PDMMLA-H	PDMMLA-He	M_{nTh} (g/mol) [c]	M_n (g/mol) [c]	M_w (g/mol) [c]	D [c]	*T*g (C°) [d]
Homopolyesters	PLA [a]	/	/	20 000	12 805	13 042	1.02	+63.4 [e]
	0/100	/	/	23 400	19 789	21 283	1.07	-15.0
	100/0	/	/	22 800	29 393	30 120	1.02	+67.9
	HP-OH	/	/	29 200	19 955	20 842	1.04	+7.6
copolyesters	10/90	9.99	90.01	22 860	18 062	19 109	1.05	-14.2
	20/80	19.90	80.10	22 920	18 293	20 015	1.09	+8.2
	30/70	30.10	69.90	22 980	18 549	20 776	1.12	+20.0

M_{nTh} = theoretical M_n.
[a] Commercial amorphous PLA.
[b] Calculated from ^{1}H NMR results.
[c] HPSEC-MALLS-dRI in THF, 0.5 min.
[d] Determined by DSC.
[e] Obtained from literature [41].

III.2.2. Atomic Force Microscopy

AFM images of surfaces are shown in figure 4a. Roughness surface distribution appears to be more homogeneous 10/90 (0.106 ± 0.002) surface compared to the two other copolymers 20/80 (0.184 ± 0.008) and 30/70 (0.216 ± 0.014). All the other surfaces, except homopolymers 0/100 (0.056 ± 0.009) and 100/0 (0.169 ± 0.014), are more heterogeneous in term of surface topography (glass (0.362 ± 0.004), PLA (0.486 ± 0.075) and HP-OH (1.112 ± 0.355)). Figure 4b summarizes the Ra values of all the considered surfaces. Because surface roughness was on the order of nanometers, it did not affect contact angles. Also, the potential impact of surface roughness on surface energy calculation and contact angle values was considered as negligible. Thus, it was not taken into account in this paper, as in other studies [43, 44]. Moreover, a statistically linear correlation (R^2=0.98, $p<0.01$) was found between the four polymers versus AP (0/100, 10/90, 20/80 and 30/70) (figure 4b). For all these samples, average roughness Ra (nm) was found to be statistically different, two by two using n = 3 different values for each group. Indeed, a statistical significance difference was observed

between two groups: PLA─0/100 ($p < 0.01$), 0/100─10/90 ($p < 0.001$), 10/90─20/80 ($p < 0.001$), 20/80─30/70 ($p < 0.01$), 30/70─100/0 ($p < 0.01$) and 100/0─HP-OH ($p < 0.001$). A significant difference was also obtained between "glass" and PLA, 0/100, 10/90, 20/80, 30/70, 100/0 and HP─OH ($p < 0.05$, $p < 0.0001$, $p < 0.0001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$ and $p < 0.001$, respectively).

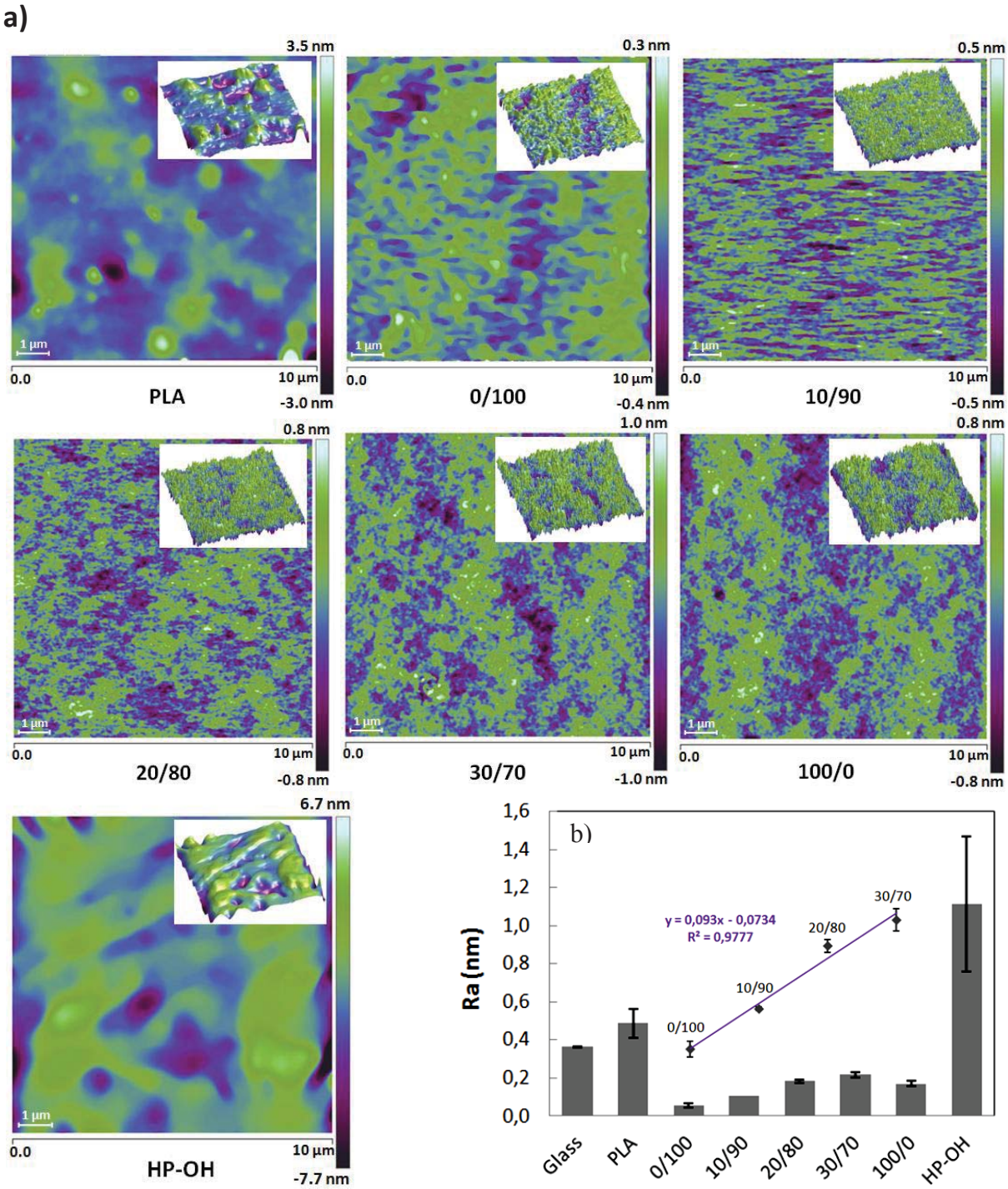


Figure 4. Polymers AFM: (a) 2D and 3D images and (b) average roughness Ra (nm) and Ra linear correlation with % A of polymers.

III.2.3. Rough wettability

Water sessile drop contact angle values are shown in table 3. Hydrophobicity in PDMMLA copolymers increases with the decreasing of the acidic group's percentage incorporated in the side-chain of copolymer (AP). The statistical analysis between all the samples two by two, using n = 20 different values for each group, revealed that a statistical significance difference was observed between two groups: PLA─0/100, 0/100─10/90, 10/90─20/80, 20/80─30/70, 30/70─100/0, 100/0─glass and 100/0─HP-OH ($p < 0.0001$ for all groups).

The PLA water contact angle is in accordance with the literature [45, 46]. Formamide and diiodomethanne contact angle values are also shown in table 3. They are used to calculate the total surface free energies and components (dispersive, polar (acid and basic)) for all samples.

For formamide contact angle values, a statistical analysis between all the samples two by two, using n = 20 different values for each group, gave that a statistical significant difference was observed between two groups: PLA─0/100, 0/100─10/90, 10/90─20/80, 20/80─30/70 and 30/70─100/0 ($p < 0.001$ for all groups) and no significant difference between 100/0─HP-OH group ($p > 0.05$). In the same manner, for diiodomethane contact angle values, a statistical analysis between all these samples groups indicated a significant difference, for the same couples of surfaces as just above for formamide ($p < 0.001$).

Table 3. Water, formamide and diiodomethane contact angles by sessile drop method for all the surfaces.

Samples	Glass	PLA	0/100	10/90	20/80	30/70	100/0	HP-OH
Water contact angle (°)	39.24 ± 0.80	77.28 ± 0.58	92.44 ± 0.36	88.73 ± 0.61	85.94 ± 0.09	81.10 ± 0.88	25.68 ± 1.35	72.15 ± 0.18
Formamide contact angle (°)	30,04 ± 1,47	37,45 ± 1,05	66,44 ± 0,08	71,76 ±0,74	76,65 ± 0,14	78,21 ± 0,47	21,96 ±1,07	22,11 ± 0,80
Diiodomethane contact angle (°)	44,6 ± 1,18	25,34 ± 1,70	41,42 ± 0,01	42,69 ± 0,04	45,25 ± 0,50	47,25 ± 0,49	53,13 ± 1,50	43,35 ± 1,04

Figure 5a shows the total surface free energy (γ_{TOT}) for each surface (non Cassie corrected). Its value clearly increases with AP. It also indicates the values of non-corrected dispersive (γ_{LW}) and polar acid-base component (γ_{AB}) of the surface free energy. Polar

interactions are due to Coulomb interactions between permanent dipoles but also to interactions between induced and permanent ones whereas time fluctuations in the molecules charge distribution contribute to dispersive interactions [47]. For surface free energy, dispersive and polar acid-base components, the statistical analysis between all the samples two by two (PLA─0/100, 0/100─10/90, 10/90─20/80, 20/80─30/70, 30/70─100/0, 100/0─glass and 100/0─HP-OH), using n = 20 different values for each group, revealed that a statistical significance difference was observed between all groups ($p < 0.001$ for all groups).

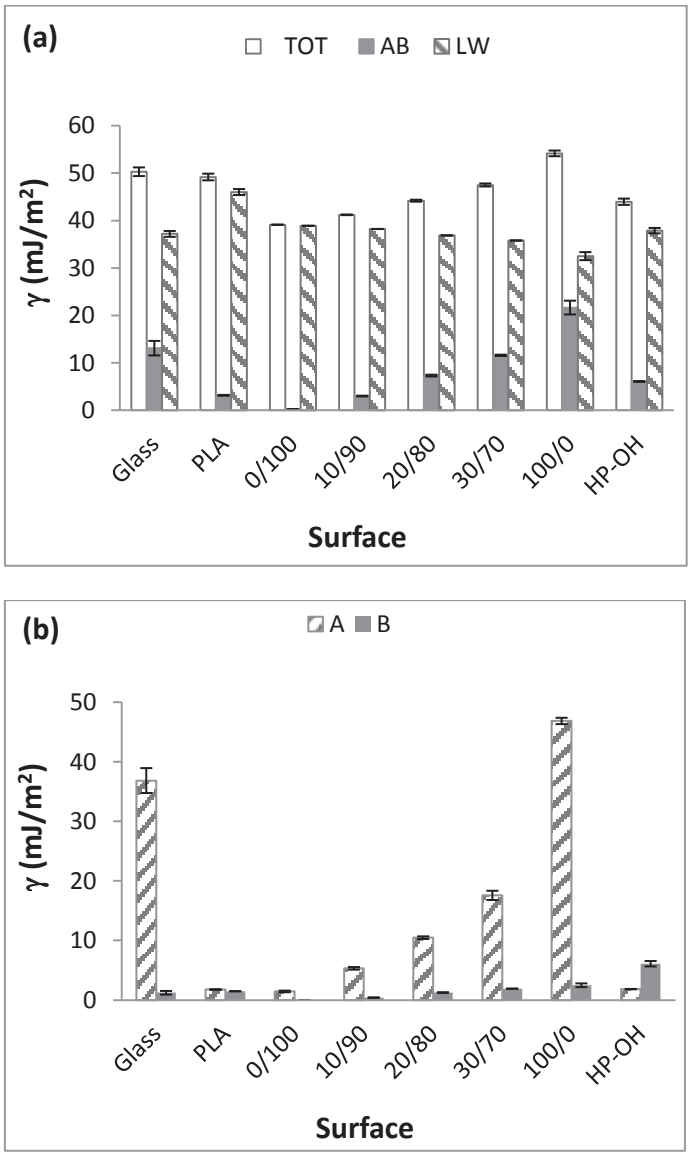


Figure 5. (a) Total surface free energy (γTOT) dispersive (LW) and polar acid-base (AB). (b) Acidic and basic components of surface energy for each surface.

For all the surfaces γ_{LW} is higher than γ_{AB} due to the major presence of $–CH_2$ groups inside the polymer chains. However γ_{AB} is not negligible and is increasing regularly with AP

which brings polar oxygen atoms in the structure. This correlation includes not only the chemically heterogeneous copolymers (10/90. 20/80. 30/70) but also the two homogeneous references (0/100 and 100/0). Glass exhibits a high polar component due to its oxygen atoms containing free electrons as well. This is confirmed by figure 5b where it can be seen that non-corrected basic component of the surface energy is very small for all the samples and statistically significantly different ($p < 0.001$ for all groups), two by two (10/90─20/80, 20/80─30/70, 30/70─100/0 and 100/0─HP-OH), using n = 20 different values for each group. No significant difference ($p > 0.05$) between groups (PLA─0/100, 0/100─10/90) was observed. In addition, the non-corrected acidic components (figure 5b) are related to AP and statistically significantly different, two by two (0/100─10/90, 10/90─20/80, 20/80─30/70, 30/70─100/0 and 100/0─HP-OH) using n = 20 different values for each group ($p < 0.001$ for all groups) except for PLA─0/100 group ($p > 0.05$).

All of the above data of PLA sample were in accordance with the reported studies in the literature [46].

III.3. Cassie corrections of contact angles and surface energies

Figure 6a details the linear fit of relationship between the Cassie corrected surface energy and components versus the Cassie corrected water contact angle for the two references samples and the three copolymers. These five samples range from 0 to 100% of AP with the references located at the extremes. All the energy components are found to be different significantly, two by two ($p<0.01$), except 0/100 compared to 10/90 for basic component because of very small values.

All the energies, except the LW component, decrease when contact angle increases (surface more and more hydrophobic). Figure 6b shows the reverse behavior versus AP.

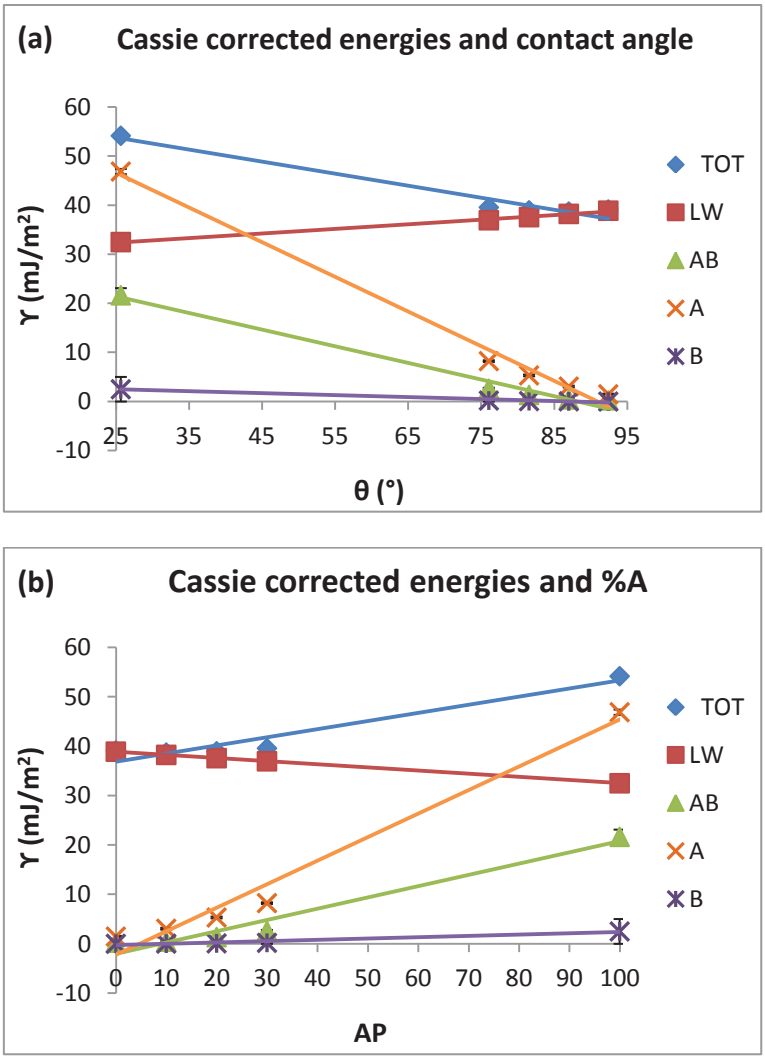


Figure 6. Surface free energy and components versus water contact angle after Cassie correction (a) versus θ and (b) versus % A.

However, little discrepancies were observed between the two representations and this was quantified by the values of R^2 correlation coefficient (linear fit extrapolation) in all the cases (figure 7). The linear fits were compared for corrected (*) or non-corrected contact angles and energy values in versus contact angle or AP. The basic component is the one that needs to be corrected the most.

It was worth noting that if Cassie correction is applied, representations versus contact angles or versus AP bring both R^2 values closer to 1 than if not corrected (figure 7). After correction it was observed that R^2 for contact angle was higher than for AP whereas it is the reverse if no correction is made. In case it is impossible to apply Cassie correction, it is better to represent the relationship between surface energy and components versus AP than versus water contact angle.

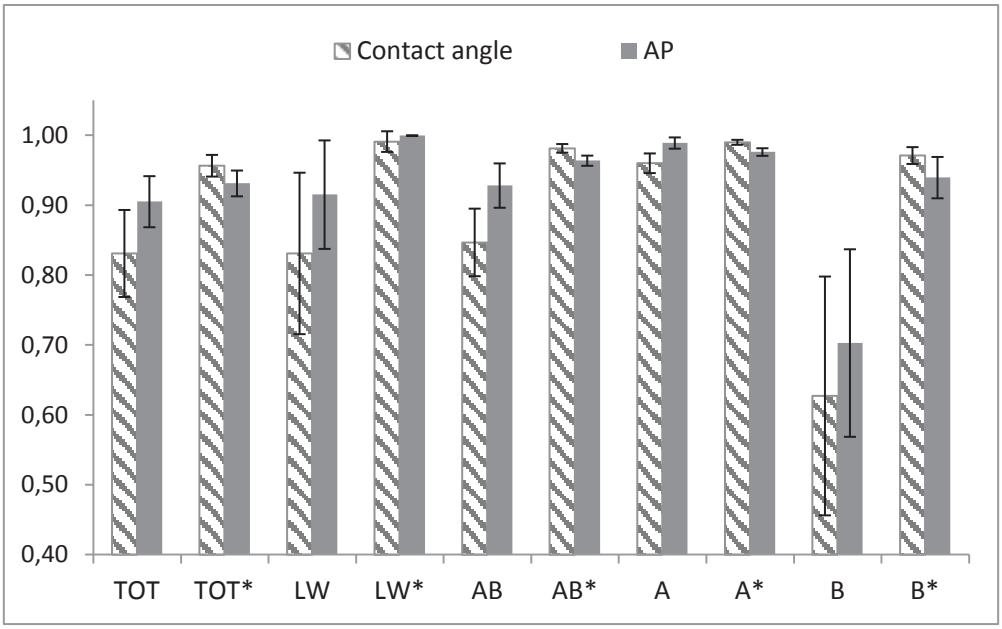


Figure 7. Linear correlation coefficient R^2 as a function of water contact angle or AP. for surface energy components.

In order to go further on the evaluation of the impact of Cassie correction on contact angles (figure 8a) and on surface energies (figure 8b) relative percentage of the correction was calculated as a function of AP. Relative impact of Cassie correction is maximum for formamide first (maximum 28%). then water (6% maximum) and finally diiodomethane. This result can be explained by the fact that formamide and water are polar solvents compared to diiodomethane. The necessity for correction increases with AP.

Moreover, total and acid energy components relative corrections (%) increase with AP whereas base and acid-base ones diminish. Corrections could reach 100% for basic component around 80% for acid-base one and around 50% for acidic surface energy.

It is important to quantify Polar acid-base and/or apolar surface energy components with accuracy for a better understanding of cell behavior in contact with a biomaterial [27]. Indeed, water contact angle and total surface free energy are generally not sufficient parameters to explain differences in cell response. In contrast, acidic or basic surface energy components can be parameters but enable us to discriminate between biomaterial surfaces [27]. That is why it is of importance, in biomaterial research, not only to reach these values but also to correct them from artefacts such as those induced by the different chemical composition of polymers structure. Besides, an analysis of protein adsorption onto the surfaces of interest

could help to go further in the understanding of the correlations between material surface chemistry and biocompatibility. For example, dynamic contact angle (DCA) could detect particular protein adsorption behavior depending on the biomaterial surface chemistry as it has been shown for polysaccharides polyelectrolytes films. In this study, endothelial cell proliferation was found to be in relation with the ability of fibronectin to easily change the conformation during DCA cycling depending on the film surface chemistry [21].

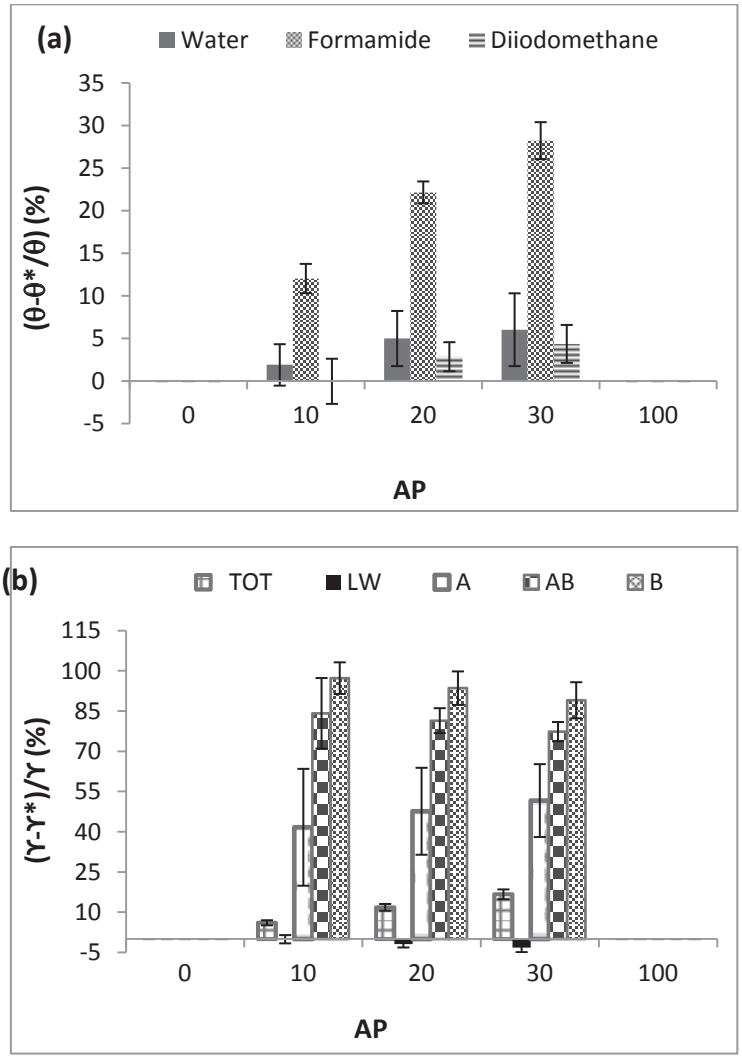


Figure 8. (a) Impact of Cassie-Baxter correction on contact angle versus AP for water. formamide and diiodomethane probe liquids. (b) Relative modification of surface energy values after Cassie-Baxter correction.

Biocompatibility, mechanical properties, and drug-loading capacity are the general considerations of a selected polymer as stent-coating for eluting drugs. Indeed, the surface properties of the polymer which covers the stent are the main factor that affects the biological response (immediate and long-term response) between the stent and the vascular tissue and

blood. These stent-coating surface properties are the surface texture, charge and energy. According to literature, the surface energy is the most important factor in determining the thrombogenicity in blood. The affinity of the polymer surface with water increases with increasing surface energy and therefore the increase of thrombogenicity in the blood medium [48].

Another very important factor is the surface roughness. The thrombogenicity increases on rougher surfaces. This due to the higher blood protein adsorption, activation and aggregation of platelet [48]. Thus, a stent coating should have good interaction with blood, be incorporated by the vascular tissue and present the advantage to minimize the inflammatory response. This is thanks to its good surface properties.

The present work shows that this biomaterial presents good thermal and surface properties (low *Tg* and surface energy and functional hydrophilic molecules on its chain which adjusts their properties and interactions with body tissue). This is precisely meet the requirements of the intended cardiovascular application.

IV. Conclusion

In this work, the wettability of the different PDMMLA derivatives surfaces was successfully characterized. On the one hand, the surface free energy and its components (dispersive. polar. acid and basic) were determined for each surface. On the other hand, influence of acidic percentage incorporated in the side-chain of copolymers on wettability, morphology and surfaces properties of polyesters was investigated because three of these samples exhibited a heterogeneous chemical composition. Cassie-Baxter equation was used to bring corrections to the experimental contact angles. Finally, the impact of this correction on contact angles and subsequent surface energy and components was quantified. It was found necessary to apply correction in order to improve the quality of the relationships obtained between the wettability parameters and the percentage of acid indicated in the chemical formula of the polymer. Moreover, as shown in this study, adding only 10% of acidic hydrophilic group in a polymer chemical composition, allows not only to shape rational design structure and the morphology of the PDMMLA copolymers, but also to control and tailor their wettability properties. This approach that focuses on their thermomechanical properties is important to study their degradation rate and their biological effects considering that hydrophilic/hydrophobic balance plays an important role in the material/cell's interactions.

References

[1] H.Y. Tian. Z.H. Tang. X.L. Zhuang. X.S. Chen. X.B. Jing. Biodegradable synthetic polymers: Preparation. functionalization and biomedical application. Progress In Polymer Science 37 (2011) 237-280.

[2] K. Fu. D.W. Pack. A.M. Klibanov. R. Langer. Visual evidence of acidic environment within degrading poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres. Pharmaceutical Research 17 (2000) 100-106.

[3] R. De Santis. A. Russo. A. Gloria. U. D'Amora. T. Russo. S. Panseri. M. Sandri. A. Tampieri. M. Marcacci. V.A. Dediu. C.J. Wilde. L. Ambrosio. Towards the Design of 3D Fiber-Deposited Poly(epsilon-caprolactone)/Iron-Doped Hydroxyapatite Nanocomposite Magnetic Scaffolds for Bone Regeneration. Journal Of Biomedical Nanotechnology 11 (2015) 1236-1246.

[4] Z.W. Huang. V. Laurent. G. Chetouani. J.Y. Ljubimov. E. Holler. T. Benvegnu. P. Loyer. S. Cammas-Marion. New functional degradable and bio-compatible nanoparticles based on poly(malic acid) derivatives for site-specific anti-cancer drug delivery. International Journal Of Pharmaceutics 423 (2012) 84-92.

[5] J.Y. Ljubimova. J. Portilla-Arias. R. Patil. H. Ding. S. Inoue. J.L. Markman. A. Rekechenetskiy. B. Konda. P.R. Gangalum. A. Chesnokova. A.V. Ljubimov. K.L. Black. E. Holler. Toxicity and efficacy evaluation of multiple targeted polymalic acid conjugates for triple-negative breast cancer treatment. Journal of Drug Targeting 21 (2013) 956-967.

[6] P. Loyer. S. Cammas-Marion. Natural and synthetic poly(malic acid)-based derivates: a family of versatile biopolymers for the design of drug nanocarriers. Journal of Drug Targeting 22 (2014) 556-575.

[7] A. Lanz-Landázuri. A. Martínez de Ilarduya. M. García-Alvarez. S.n. Muñoz-Guerra. Poly(β.L-malic acid)/Doxorubicin ionic complex: A pH-dependent delivery system. Reactive and Functional Polymers 81(2014) 45.

[8] Y. Qiao. X. Duan. L. Fan. W. Li. H. Wu. Y. Wang. Synthesis of controlled molecular weight poly (β-malic acid) and conjugation with HCPT as a polymeric drug carrier. Journal of Polymer Research 21 (2014) 1-9.

[9] P. McDonald. J. Lyons. L. Geever. C. Higginbotham. In vitro degradation and drug release from polymer blends based on poly(dl-lactide). poly(l-lactide-glycolide) and poly(ε-caprolactone). Journal of Materials Science 45 (2009) 1284-1292.

[10] S.T. Schmitz-Hertzberg. W.C. Mak. K.K. Lai. C. Teller. F.F. Bier. Multifactorial design of poly(d.l-lactic-co-glycolic acid) capsules with various release properties for differently sized filling agents. Journal of Applied Polymer Science 130 (2013) 4219.

[11] L. Wang. X. Jia. Y. Chen. Y. Che. Z. Yuan. Synthesis. degradability. and cell affinity of poly (DL-lactide-co-RS-hydroxyethyl-beta-malolactonate). Journal Of Biomedical Materials Research Part A 87A (2008) 459-469.

[12] K.L. Lai. B. He. Z.W. Gu. Preparation and cell compatibility of functionalized biodegradable poly(DL-lactide-co-RS-beta-malic acid). Chinese Journal Of Polymer Science 26 (2008) 177-186.

[13] Y. Liu. W. Wang. J. Wang. Y. Wang. Z. Yuan. S. Tang. M. Liu. H. Tang. Blood compatibility evaluation of poly(d.l-lactide-co-beta-malic acid) modified with the GRGDS sequence. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 75 (2010) 370.

[14] J. Qian. W. Xu. W. Zhang. X. Jin. Preparation and characterization of biomorphic poly(l-lactide-co-β-malic acid) scaffolds. Materials Letters 124 (2014) 313.

[15] Y. Zhang. C. Ni. G. Shi. J. Wang. M. Zhang. W. Li. The polyion complex nano-prodrug of doxorubicin (DOX) with poly(lactic acid-co-malic acid)-block-polyethylene glycol: preparation and drug controlled release. Medicinal Chemistry Research 24 (2015) 1189-1195.

[16] H. Ding. G. Helguera. J.A. Rodriguez. J. Markman. R. Luria-Perez. P. Gangalum. J. Portilla-Arias. S. Inoue. T.R. Daniels-Wells. K. Black. E. Holler. M.L. Penichet. J.Y. Ljubimova. Polymalic acid nanobioconjugate for simultaneous immunostimulation and inhibition of tumor growth in HER2/neu-positive breast cancer. Journal of Controlled Release 171 (2013) 322-329.

[17] Lee, B.-S., M. Vert, and E. Holler, Water-soluble Aliphatic Polyesters: Poly(malic acid)s. Biopolymers Online. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA (2005).

[18] Gasslmaier, B., et al., Synthetic substrates and inhibitors of β-poly(L-malate)-hydrolase (polymalatase). European Journal of Biochemistry 267 (2000) 5101.

[19] He, B., J. Bei, and S. Wang, Morphology and degradation of biodegradable poly(L-lactide-co-β-malic acid). Polymers for Advanced Technologies. 14 (2003) 645-652.

[20] L.K. Sarah. X.T. Vinh. K. Cathrin. P.B. Anaïs. P.D. Andrew. Synthetic strategies. sustainability and biological applications of malic acid-based polymers. Green Materials 2 (2014) 107-122.

[21] S. Benni. T. Avramoglou. H. Hlawaty. L. Mora. Dynamic contact angle analysis of protein adsorption on polysaccharide multilayer's films for biomaterial reendothelialization. BioMed research international 2014 (2014) 679031.

[22] D. Bonn. J. Eggers. J. Indekeu. J. Meunier. E. Rolley. Wetting and spreading. Reviews Of Modern Physics 81 (2009) 739-805.

[23] E.H. Sohn. B.G. Kim. J.S. Chung. H. Kang. J.C. Lee. Wettability of the morphologically and compositionally varied surfaces prepared from blends of well ordered comb-like polymer and polystyrene. Journal of Colloid and Interface Science 354 (2011) 650.

[24] T.T. Chau. W.J. Bruckard. P.T.L. Koh. A.V. Nguyen. A review of factors that affect contact angle and implications for flotation practice. Advances In Colloid And Interface Science 150 (2009) 106-115.

[25] R. Di Mundo. F. Bottiglione. G. Carbone. Cassie state robustness of plasma generated randomly nano-rough surfaces. Applied Surface Science 316 (2014) 324-332.

[26] E. Bormashenko. Why does the Cassie-Baxter equation apply? Colloids And Surfaces A-Physicochemical And Engineering Aspects 324 (2008) 47-50.

[27] L. Ponsonnet. K. Reybier. N. Jaffrezic. V. Comte. C. Lagneau. M. Lissac. C. Martelet. Relationship between surface properties (roughness. wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour. Materials Science & Engineering C-Biomimetic And Supramolecular Systems 23 (2003) 551-560.

[28] C. Barbaud. S. Cammas-Marion. P. Guerin. Poly(beta-malic acid) derivatives with non-charged hydrophilic lateral groups: synthesis and characterization. Polymer Bulletin 43 (1999) 297-304.

[29] C. Barbaud. F. Faÿ. F. Abdillah. S. Randriamahefa. P. Guérin. Synthesis of New Homopolyester and Copolyesters by Anionic Ring-opening Polymerization of α.α′.β-Trisubstituted β-Lactones. Macromolecular Chemistry and Physics 205 (2004) 199.

[30] F. Ouhib. S. Randriamahefa. P. Guerin. C. Barbaud. Synthesis of new statistical and block co-polyesters by ROP of α,α,β-trisubstituted beta-lactones and their characterizations. Designed Monomers And Polymers 8 (2005) 25-35.

[31] C. Barbaud. F. Abdillah. F. Faÿ. M. Guerrouache. P. Guérin. Synthesis of new alpha.alpha.beta-trisubstituted beta-lactones as monomers for hydrolyzable polyesters. Designed Monomers and Polymers 6 (2003) 353.

[32] Kohn, F.E., et al., The Ring-Opening Polymerization Of D,L-Lactide In The Melt Initiated With Tetraphenyltin. Journal Of Applied Polymer Science 29 (1984) 4265-4277.

[33] J. Van Oss Carel. Forces interfaciales en milieux aqueux. Chimie (ed. Masson) (1996) 14-402.

[34] Y. Huang. H.C.A. Ng. X.W. Ng. V. Subbu. Drug-eluting biostable and erodible stents. Journal of Controlled Release 193 (2014) 188.

[35] F.M. Zambaux. F. Bonneaux. R. Gref. E. Dellacherie. C. Vigneron. MPEO-PLA nanoparticles: Effect of MPEO content on some of their surface properties. John Wiley & Sons. Inc. 44 (1999) 109-115.

[36] Xiao, L., et al., Poly(Lactic Acid)-Based Biomaterials: Synthesis, Modification and Applications. Chapter 11. INTECH Open Access Publisher (2012) 248-282.

[37] Persson, M., et al., Effect of bioactive extruded PLA/HA composite films on focal adhesion formation of preosteoblastic cells. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 121 (2014) 409.

[38] Wang, Y.-Q. and J.-Y. Cai, Enhanced cell affinity of poly(l-lactic acid) modified by base hydrolysis: Wettability and surface roughness at nanometer scale. Current Applied Physics 1 (2007) 108.

[39] De Rosa, I.M., et al., Poly(lactic acid)/Phormium tenax composites: Morphology and thermo-mechanical behavior. Polymer Composites 32 (2011) 1362.

[40] Wang, J., et al., Preparation and pH controlled release of polyelectrolyte complex of poly(l-malic acid-co-d,l-lactic acid) and chitosan. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 115 (2014) 275.

[41] LeboucherDurand, M.A., V. Langlois, and P. Guerin, 4-carboxy-2-oxetanone as a new chiral precursor in the preparation of functionalized racemic or optically active poly(malic acid) derivatives. Polymer Bulletin 36 (1996) 35-41.

[42] Cammas, S., Bear, M. M., Moine, L., Escalup, R., Ponchel, G., Kataoka, K., Guerin, P. Polymers of malic acid and 3-alkylmalic acid as synthetic PHAs in the design of biocompatible hydrolyzable devices. International Journal of Biological Macromolecules 25 (1999) 273-282.

[43] J. Gaydos. A.W. Neumann. Line tension in multiphase equilibrium systems. Applied Surface Thermodynamics (1996) 169-238.

[44] E.I. Vargha-Butler. E. Kiss. C.N.C. Lam. Z. Keresztes. E. Kalman. L. Zhang. A.W. Neumann. Wettability of biodegradable surfaces. Colloid And Polymer Science 279 (2001) 1160-1168.

[45] D. Cohn. H. Younes. Biodegradable PEO/PLA block copolymers. Journal of Biomedical Materials Research 22 (1988) 993.

[46] I. Spiridon. K. Leluk. A.M. Resmerita. R.N. Darie. Evaluation of PLA-lignin bioplastics properties before and after accelerated weathering. Composites Part B-Engineering 69 (2015) 342-349.

[47] Interfacial Chemistry. Operating manual DataPhysics OCA. DataPhysics Instruments GmbH (2002) 1–4.

[48] Huang, Y., Drug Eluting Stents: Anti-Inflammatory Approach To Prevent Restenosis After Stent Implantation (2003).

- **Conclusion de l'article 1**

Ce premier article a montré que la présence des groupements fonctionnels acides sur la chaîne latérale des polymères permet non seulement la conception de l'architecture des chaînes macromoléculaires mais aussi d'ajuster leurs propriétés de surface. La présence de seulement 10% des groupements hydrophiles acides dans la composition chimique du polymère a permis de contrôler et d'adapter sa mouillabilité de la surface ainsi que son énergie de surface et toutes ses composantes.

Ces matériaux présentent une rugosité négligeable donc le seul paramètre qui influence leurs propriétés de surface est l'hétérogénéité de sa composition chimique. En effet, l'application de l'équation de Cassie-Baxter a permis de corriger théoriquement cette hétérogénéité. De bonnes corrélations ont été obtenues entre le pourcentage d'acide et les paramètres étudié dans ce travail.

Ce travail a également montré que ce matériau présente de bonnes propriétés de surface (basse énergie de surface et des groupements fonctionnels hydrophiles sur sa chaîne qui ajustent ses propriétés de mouillabilité et donc ses interactions avec les tissus de l'organisme) ; Ces premiers résultats obtenus sont encourageants pour envisager l'utilisation de ce matériau comme revêtement de stent cardiovasculaire.

ARTICLE 2

(Sous révision)

« Langmuir »

Résumé :

Après l'implantation du stent recouvert dans l'organisme, le revêtement polymère va être en contact direct avec le sang et les tissus. Les protéines d'adhésion de la MEC sont les premiers sites d'interaction avec ce dernier. Ce complexe (polymère-protéine) va ensuite rapidement interagir avec les cellules vasculaires. Le contrôle de l'activité de ce complexe qui est lié directement à la composition chimique et aux propriétés physicochimiques de la surface est très important. C'est pourquoi nous étudions dans ce deuxième article la mouillabilité et les propriétés de surface des PDMMLAs en dynamique en raison de leur structure et de l'éventuelle mobilité de leurs groupements chimiques (hystérèse). La technique utilisée est la tensiométrie (DCA). Cette technique permettra d'obtenir des informations sur les propriétés locales de la surface, la mobilité moléculaire, l'hétérogénéité chimique et l'adsorption/désorption d'eau, ce qui est très important pour les phénomènes biologiques.

Une série de PDMMLAs homogènes (homopolymères) ou hétérogènes (copolymères) chimiquement a été étudiée dans cet article. La surface des homopolymères est considérée comme surface lisse (rugosité négligeable) et homogène chimiquement (un seul groupement fonctionnel chimique) tandis que celle des copolymères est lisse et hétérogène chimiquement (deux groupements fonctionnels chimiques différents). Le pourcentage d'acide (%A) de ces systèmes varie de 0 à 100% (0, 10, 20, 30 et 100%). Ces polymères ont été choisis afin de comprendre l'effet de l'hétérogénéité chimique et l'effet des groupements hydrophiles négativement chargés et des groupements hydrophobes sur la mouillabilité de la surface des polymères. Trois paramètres ont été étudiés : angle de contact à l'avancée (θ_A) et au retrait (θ_R) et l'hystérèse du mouillage (H). L'équation de Cassie-Baxter a été appliquée sur tous les paramètres étudiés afin de corriger théoriquement l'hétérogénéité chimique et ainsi comparer les angles de contact expérimentaux corrigés (valeurs théoriques) avec ceux non corrigés (valeurs expérimentales) obtenus au fil des cycles. Ceci confirme que la DCA homogénéise

la surface des polymères amphiphiles et hétérogènes chimiquement au fil du temps de mouillage. Cette technique s'est révélée comme homogénéisateur pratique des surfaces chimiquement hétérogènes.

De plus, nous avons confirmé que, contrairement à θ_R, θ_A est influencée par la différence de seulement 10% des groupements acides (% A) à la chaîne latérale des polymères. Elle diminue linéairement avec l'augmentation du %A. Egalement, il a été démontré que l'hystérèse (*H*) est le paramètre le plus sensible au %A. Enfin, nous en concluons que la mouillabilité en dynamique (mouillage au fil des cycles) fournit des informations réelles et permet d'homogénéiser l'hétérogénéité chimique de la surface. Nous n'avons donc pas besoin de la corriger théoriquement.

Cette étude nous a permis de développer un nouveau modèle pour estimer l'angle de contact de Young θ_Y qui caractérise une surface lisse et homogène chimiquement à partir des mesures d'hystérèse des surfaces lisses et hétérogènes chimiquement. Le résultat obtenu selon ce modèle a démontré que θ_Y correspond à une surface qui conporte le même pourcentage des groupements hydrophobes que hydrophiles. Ce modèle pourra être appliqué sur d'autres polymères amphiphiles pour estimer un angle de contact à un pourcentage correspondant de groupements hydrophiles.

DCA cycling homogenizes heterogeneous surfaces

R. Belibel, C. Barbaud and L. Mora*.

INSERM U1148, Laboratory for Vascular Translational Science (LVTS), Institut Galilée, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, 99 Avenue Jean-Baptiste Clément, Villetaneuse, F-93430, France.

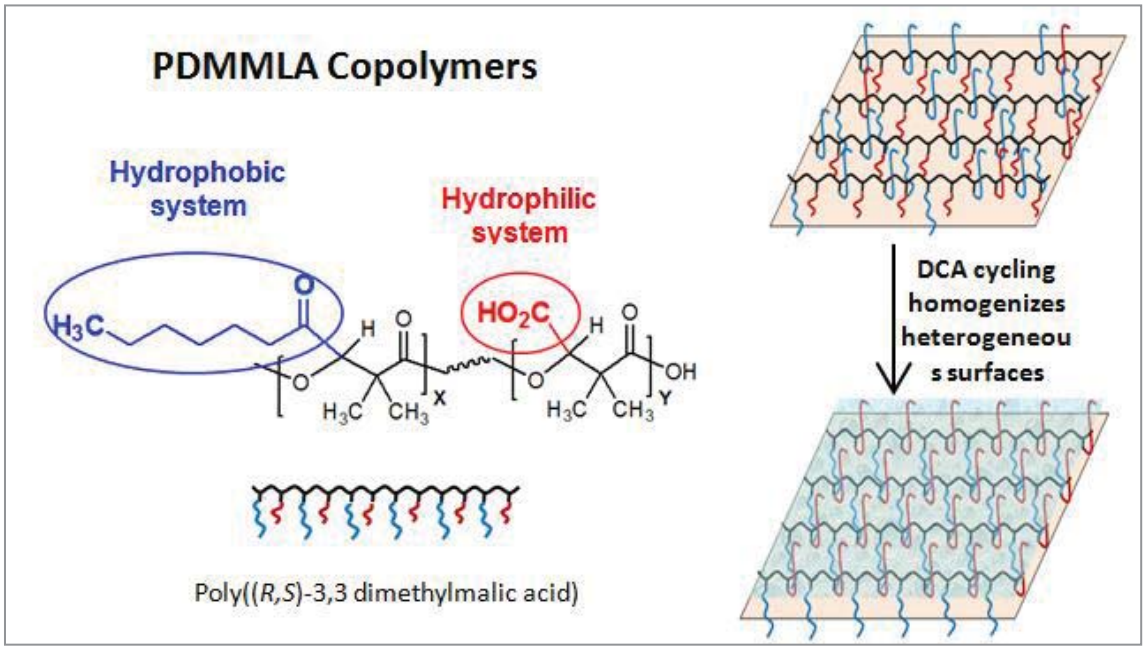
*Corresponding author. Tel.: +33 (0)1 49 40 20 35; fax: +33(0)1 49 40 30 83

E-mail address: Laurence.mora@univ-paris13.fr (L. Mora; ex Ponsonnet)

Abstract

In order to reduce restenosis, the necessity to develop the appropriate coating material of metallic stent is a challenge for biomedicine and scientific research over the past decade. Therefore, biodegradable copolymers of poly((*R,S*)-3,3 dimethylmalic acid) (PDMMLA) were prepared in order to develop a new coating exhibiting different custom groups in its side chain and being able to carry a drug. This material will be in direct contact with cells and blood. It consists of carboxylic acid and hexylic groups used for hydrophilic and hydrophobic character, respectively. The study of this material wettability and dynamic surface properties is of importance due to the influence of the chemistry and the potential motility of these chemical groups on cell adhesion and polymer kinetic hydrolysis. Cassie theory was used for the theoretical correction of contact angles of these chemical heterogeneous surfaces coatings. Dynamic Surface Analysis was used as practical homogenizer of chemical heterogeneous surfaces by cycling during many cycles in water. In this work, we confirmed that, unlike receding contact angle, advancing contact angle is influenced by the difference of only 10% of acidic groups (%A) in side-chain of polymers. It linearly decreases with increasing acidity percentage. Hysteresis (*H*) is also a sensitive parameter which is discussed in this paper. Finally, we conclude that cycling provides real information, thus avoiding theoretical Cassie correction. H^{10} is the most sensible parameter to %A.

Graphical abstract.



Highlights

1. We develop heterogeneous polymer coatings for cardiovascular applications.

2. Correlation between certain dynamic contact angle (DCA) parameters and acidic rate of polymers were obtained with excellent accuracy.

3. Cassie corrections are not necessary if DCA parameters are used for cycles more than 2 and R2 coefficient correlation is then close to 1 for cycles > 2.

4. We developed a new model to estimate the young contact angle from hysteresis measurements of smooth heterogeneous surfaces.

1. Introduction

Biodegradable polyesters are widely used as biomaterials for biomedical applications [1] such as poly(lactic acid) (PLA), poly(glycolic acid) (PGA), poly(ε-caprolactone) (PCL) [2] and *poly*(*malic acid*) (PMLA) [3-7]. The biomaterial biocompatibility of these polymers is generally modulated by its chemical composition in particular by the quantity of the acidic groups (%A) either parent groups or initially integrated during the polymer elaboration. Therefore, it is important to use a relevant structural parameter that could easily and rapidly bring an indication of %A, initially introduced in the polymer. DCA is a dynamic surface analysis method that is able to probe surface chemical wettability. The possibility to perform successive cycles of the material in air / water alternatively allows the experimenter to deeply analyze the hydrophobicity of the surface material. Indeed, cycling during many cycles induces a surface reorganization of polar chemical groups such as acidic groups due to hydrogen bounding with water probe liquid. This leads to a wettability characterization that evolves with the number of cycles and contribute to a more accurate evaluation of the hydrophobic material character (Fig. 1).

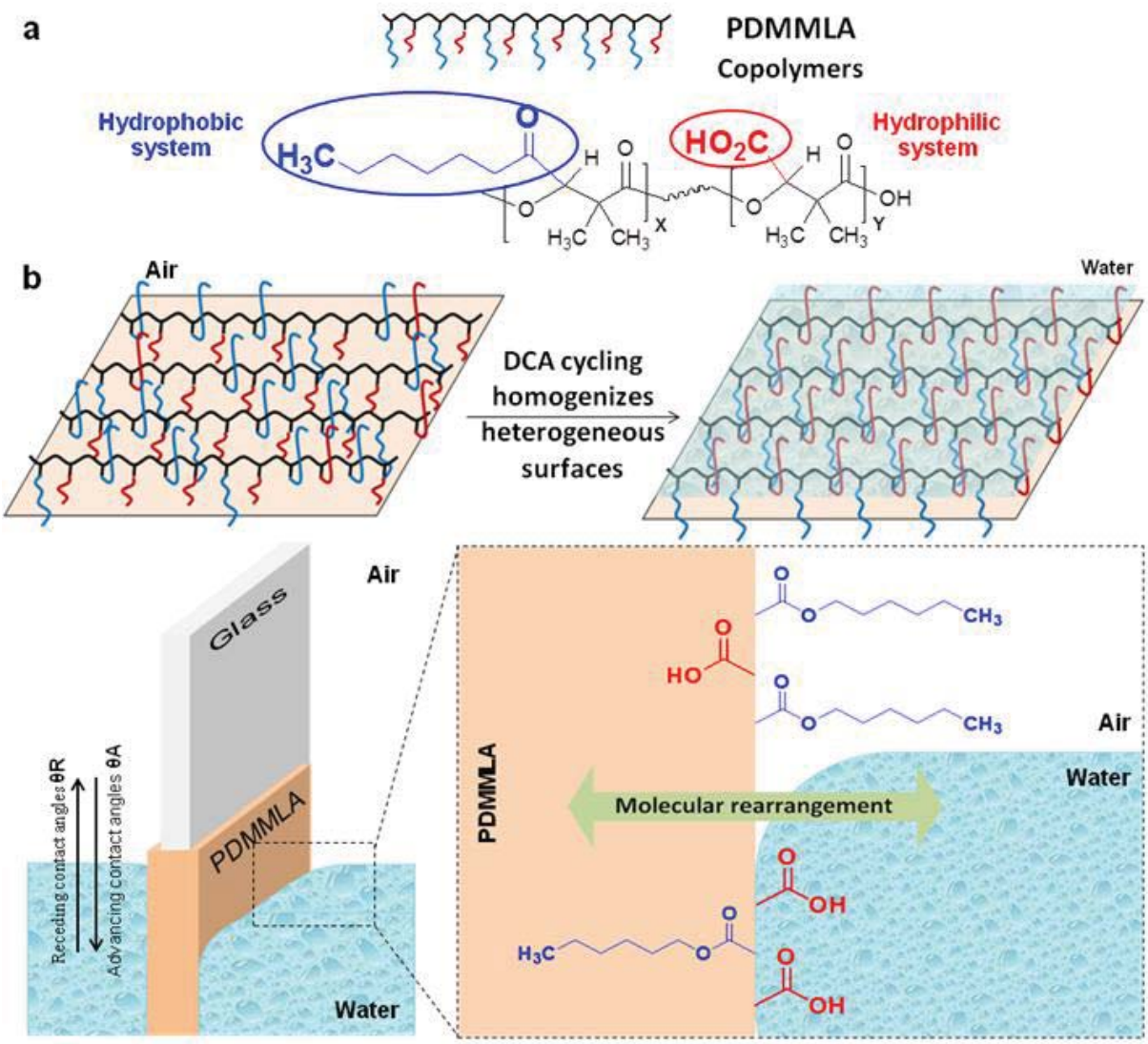


Figure 1. Schematic representation of (a) the copolymer PDMMLA chemical structure and the chain configuration with hydrophilic and hydrophobic parts represented by the red and blue chains corresponding to carboxylic acid and hexylic groups, respectively. (b) The PDMMLA copolymer film deposited on glass slides during the tensiometric immersion in water, the preferential orientation of copolymer side-chains and the molecular reorganization and the homogenization of the copolymer surface after DCA cycling.

In addition, the present work focused on biomaterials used for cardiovascular applications to cover a coronary stent and thus delivering drugs. Therefore, the polyester studied in this paper belongs to the PMLA family. They have better biocompatibility and non-immunogenic properties compared to the above-biodegradable polyesters which are used for these therapeutic application [4, 8]. Our purpose in choosing such a polymer family is also due to the presence of functionalized groups in their side-chain. These groups, unlike others, are incorporated during the tailored polymer synthesis. They also allow chemical modification for

grafting and delivering drugs [9]. This chemical modification allows the optimization of the polymer mechanical properties, hydrolysis, long-term biodegradation or biocompatibility behavior without the need for any copolymerization with another polymer (PLGA [10, 11], PLMA[12-16], …).

Accordingly, this work supplies an advance in research on prominent amphiphilic copolymers. It studies the poly((*R,S*)-3,3 dimethylmalic acid) (PDMMLA) derivatives which contain hydrophilic and hydrophobic systems (Fig. 1). They were synthesized by anionic ring-opening polymerization of racemic α,α,β-trisubstituted-β-lactones as previously published [17-19].

The functional groups in the side-chain of the two copolymer systems are the carboxylic acid group (–H) and hexylic (–He) group incorporated during the polymer synthesis which bring the hydrophilic and hydrophobic character, respectively. Thus, three PDMMLA statistical copolymers are obtained with varying hydrophilic / hydrophobic ratio: $PDMMLAH_{10}$-*co*-He_{90} named 10/90, $PDMMLAH_{20}$-*co*-He_{80} named 20/80 and $PDMMLAH_{30}$-*co*-He_{70} named 30/70. PLA was the most used polymer for the coating of stents in recent years, it exhibits a limited blood biocompatibility despite its good mechanical property [20]. It is used in this study to compare its surface properties with those of PDMMLA. Two PDMMLA homopolymers were also prepared: carboxylic acid and hexylic homopolymers (PDMMLA-H labeled as 100/0 and PDMMLA-He labeled as 0/100, respectively). They present the two extreme properties of the surface wettability of the PDMMLA polymers (hydrophilic and hydrophobic, respectively) used in this study to fully characterize the copolymers surface wettability and find the possible relationships between individual and mixed fractions.

These carboxylic acid ratios (%A = 10, 20 and 30), selected to vary the hydrophilic / hydrophobic balance and thus the kinetic of hydrolysis, were chosen to provide a more or less slow degradation necessary for the selected therapeutic application. Since these materials will be in direct contact with blood and vascular cells, we stress the great importance of studying their wettability. The aim of this study is to explore the relationships between DCA parameters, such as advancing / receding angles or contact angles hysteresis (advancing – receding angles), and the percentage of acidic groups corresponding to the polymer chemical formulae. On one hand, the impact of cycling along ten successive wetting / dewetting cycles was quantified versus the quality of the relationships observed. The DCA parameter able to exhibit the better fit was finally researched. On the other hand, the equilibrium contact angle

(Young contact angle) is well-defined on an ideal surface which can take a value between advancing and receding contact angles. The prediction of this angle is largely studied theoretically in the literature from hysteresis measurements [21-23], but is still experimentally inaccessible. Despite there are several theoretical models that have been developed on smooth and chemically homogeneous surfaces or rough / homogeneous surfaces [24], no experimental studies on smooth / heterogeneous surfaces were performed to determine the Young angle. At the end of this work, we present a model based on the literature which would allow the estimation of this contact angle when no more hysteresis phenomenon is observed for smooth / heterogeneous surfaces. Then, the determination of the acidity percentage related to this angle is deduced.

2. Experimental Section

2.1. Polymer films synthesis and sample preparation

Amorphous PLA (M_n = 20 000 g/mol) was purchased from Sigma Aldrich (France). Synthetic PDMMLAs were prepared by a living anionic ring-opening polymerization of corresponding monomers β-lactones in anhydrous THF solution using the previously reported procedure [19]**.** PDMMLA statistical copolyesters were prepared from two different racemic β-lactones. They have been chosen because they brought the hydrophilic and hydrophobic characters to these copolymers. They were synthesized according to the literature procedure as well [25]. The tetraethylammonium benzoate was used as initiator (10^{-2} equiv per mol). The different polymers were characterized by ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR and Size-Exclusion Chromatography (SEC) for obtaining absolute molecular weights of M_n = 20 000-25 000 g/mol with a very good molar mass distribution value (D) close to unity. The ^{1}H-NMR results have confirmed the ratio of hydrophilic and hydrophobic systems of different copolymers: 10/90 (9.99 / 90.01), 20/80 (19.90 / 20.10) and 30/70 (29.98 / 70.02).

Glass slides (Objektträger, 10 x 25.53 mm, 0.99 mm thick, MENZEL-GLASER, Braunschweig, Germany) cleaned by acetone, chloroform and ethanol. The PDMMLAs were dissolved in acetone and PLA in chloroform. Glass slides were covered with the polymer solution. The solvent was evaporated at room temperature. Covered glass slides were dried at 37°C overnight in a vacuum oven. Glass is used as a reference sample.

2.2. Sample characterization

2.2.1. Static contact angle measurements

Contact angles were carried out using a GBX Scientific Instrument (Romans, France). A 2 µL drop of distilled water was deposited on the sample surface using a syringe. The drop image was registered by a video camera and an image analysis software (Windrop ++) used to calculate the contact angle. Before measurement, each sample was submitted to distilled water rinsing before being dried under N_2. Then, contact angles were measured in air at room temperature. For each surface, 10 contact angles were calculated (from 2 separate samples) as well as the mean value.

2.2.2. Dynamic contact angle measurements (DCA)

Tensiometry experiments were performed using the K100MK2 Wilhelmy balance tensiometer fitted with a computer module for contact angle and sorption analysis (Krüss Gmbh). The theoretical background of the Wilhelmy experiment and the calculation of the contact advancing (θ_A) and receding (θ_R) angles from tensiometer experimental cycles are described in detail elsewhere [26, 27]. Hysteresis (H) is the resulting difference between these angles: $H = \theta_A - \theta_R$. Samples were submitted to successive wetting / dewetting cycles in water (10 mm immersion, 53.4 mm perimeter). Experiments were performed at 20 °C in air. For each film 10 wetting / dewetting cycles were registered at 3 mm/min measuring speed. For each cycle, contact angles were calculated as the average of the contact angles of three different samples corresponding to each polymer chemical composition.

2.3. Statistical Analysis

The statistics used here for contact angle (static and dynamic) measurements were based on a comparison of variances and means of two populations by the Student test (t-test with Excel software). Statistical calculations were performed using n = 10 different values (two separate samples) for static contact angles measurements, n = 3 for dynamic contact angles. The probability of correlation was based on the Pearson coefficient (p) whose value, when less than 0.01, corresponds to a statistically significant difference between the two population values that are compared.

3. Results and Discussion

- Cassie corrections of contact angles and hysteresis

Cassie-Baxter equation is generally used to perform theses corrections [28,29]. For heterogeneous surfaces composed of two component surfaces (labelled 1 and 2 respectively) the equation is [30]:

$$\cos\theta^* = f_1 \cos\theta_1 + f_2 \cos\theta_2 \qquad (1)$$

Where θ_1, θ_2, f_1 and f_2 (with $f_1 + f_2 = 1$) are contact angles and area surface fractions respectively for each component individually. θ^* is the Cassie apparent contact angle.

In this study, all the results could be corrected according to the followed model thanks to the use of two extreme reference samples (0/100 with 0%A, and 100/0 with 100%A), taking into account the relative part of each of the two references. Advancing angles, receding angles and contact angle hysteresis were thus corrected for each of the five different (%A) ratios of synthesized polymers.

- DCA measurements

Contact angle is related to surface roughness and chemical heterogeneities (thermodynamic hysteresis). The evolution of contact angles with numerous successive cycles (during time) indicates surface molecule's motility or reorientation and swelling (kinetic hysteresis) (Fig.1). In this work, surface roughness's (Ra) were all smaller than 0.3 nm (data not shown). This parameter was considered as having a negligible impact on contact angle values [31,32]. However, chemical composition (%A) was not only responsible of thermodynamic hysteresis (chemical heterogeneity at five different proportions) but also kinetic hysteresis (observed along the successive cycles). This was mainly due to sample surface interaction with water by hydrogen bonding. Thus, DCA parameters were correlated to this (%A) fraction (Fig. 2).

Fig. 2 shows contact angles for the different surfaces obtained respectively by: sessile drop method (static angle (θ_s)), by tensiometry (dynamic contact angles) at cycle 1 (θ_A^1), cycle 10 (θ_A^{10}) and average between the 10 cycles (θ_{av}). Angle at cycle 1 is always superior to angle at cycle 10. The difference is increasing with %A. This is due to hydration of surfaces polar groups (hydrogen bonding) during cycling, leading to a decrease of advancing contact angle values. Average angle is close to that of sessile drop angle for the 3 copolymers. There are no

statistical differences between the two angles (θ_{av} and θ_s) for all copolymer groups (p > 0.01).

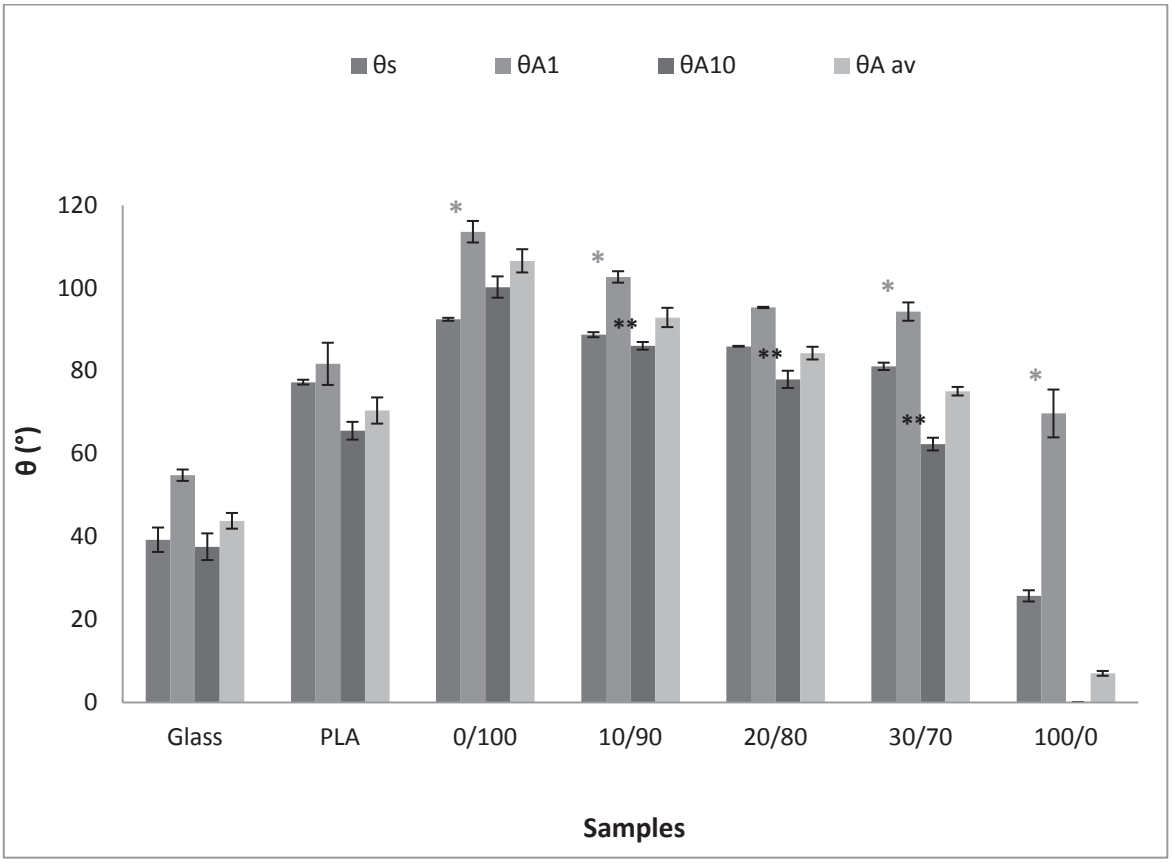


Figure 2. Contact angles for the different surfaces obtained respectively by: sessile drop method (static angle (θ_s)) and by tensiometry (dynamic contact angles) at cycle 1 (θ_A^1), cycle 10 (θ_A^{10}) and average between the 10 cycles (θ_{av}) (n = 3, * p < 0.01, ** p < 0.0001).

For 0/100 homopolymer, average angle is greater than that of sessile drop. This is the reverse for 100/0. Whatever the method, angles are decreasing with %A. Glass is, after 100/0 the most hydrophilic surface but angle to cycle 10 is not zero as for 100/0. Average angle for glass remains close to that of sessile drop while it decreases strongly for 100/0. Cycle 1 contact angle is always higher than the other angles in particular sessile drop. Cycle 10 is always the lowest, except for 0/100 surface. Tensiometry is more sensitive to chemical heterogeneity than sessile drop method because, statistically, some drops can be deposited on homogeneous areas, depending on the scale of the heterogeneity surface distribution. This is due to the fact that tensiometry integrates the overall recto verso surface whereas sessile drop probes only few localized points of the global surface. Heterogeneous samples in this study are all exhibiting more than 70% of hydrophobicity and so surface hydrophilicity is

represented by less than 30% in surface distribution. The probability for a drop to probe these hydrophilic areas is less that 30%. The accuracy of sessile drop method is thus very low compared to that of tensiometry. 0/100 surface, totally hydrophobic, is the only one with a cycle 10 angle higher than for sessile drop. This is in agreement with the reverse observation for 100/0 surface with a cycle 10 angle reduced to zero and lower than sessile drop angle. These results were also confirmed by statistical analysis which revealed sensitivity higher at cycle 10 than cycle 1 for each sample. Indeed, a statistical significance difference was observed, at cycle 1 and for static contact angles measurements, between two groups: 0/100-10/90, 10/90-20/80 and 30/70-100/0 ($p < 0.01$) and no significant difference between 20/80 and 30/70 at cycle 1 ($p > 0.05$). At cycle 10, a much higher level of statistical confidence was obtained ($p < 0.0001$) between all precedent groups.

In summary, tensiometry offers a large range of response in terms of sensitivity towards the hydrophilic character of probed surfaces. Tensiometry amplify the discrimination between surfaces, unlike the sessile drop method for the sessile drop angles are always included between cycle 1 and cycle 10 values, except for the particular 0/100 surface. Thus, tensiometry method is more sensitive to %A (hydrophilicity) than sessile drop one.

Fig. 3 shows advancing contact angles (θ_A) versus cycles for all the surfaces. At cycle 1 the correlation between %A and cycle 1 value is not strong because 20/80 and 30/70 surfaces exhibit the same value. Beyond the second cycle, the angle of the different surfaces (glass, PLA, 0/100, 10/90, 20/80 and 30/70) decreases with time from cycle to cycle. The decreases remain pronounced for glass and copolymers (10/90, 20/80 and 30/70) comparing with homopolymers (PLA and 0/100). Unlike the first cycle, the order between 10, 20 and 30 of %A surface angles is logical for cycle 10 as well as the comparison relatively corresponding to the 10% of difference between % of each of these surfaces (10 to 20 and 20 to 30). For 100/0 surface, angle at cycle 2 falls to zero and all the other successive cycles remain to zero, due to 100% of hydrophilicity of this surface and the capacity of the hydrophilic-acid polymer chains to get wet sufficiently and irreversibly.

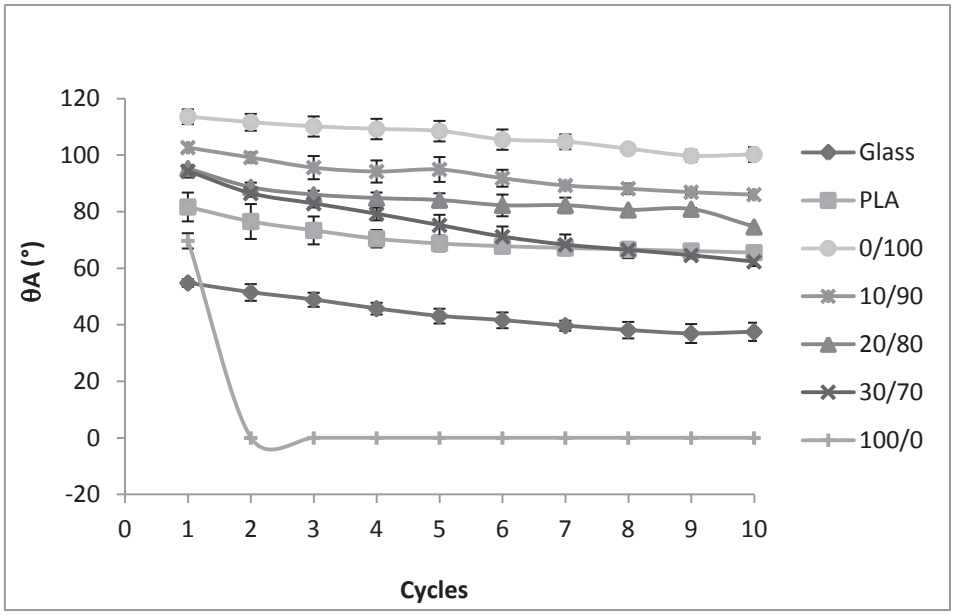


Figure 3. Advancing contact angles versus cycles for all the surfaces.

Fig. 4 shows receding contact angles (θ_R) versus cycles for all the surfaces. Receding contact angle variations are relatively small in comparison with advancing contact angle variations, except for 100/0 surface which is also a specific surface as it was the case for advancing angles. This surface has a receding angle which is strongly and regularly increasing with the cycles. One can notice that if advancing angle was decreasing practically to zero at cycle 2, receding angle is increasing with a progressive evolution even when an asymptote is appearing for the last cycle. The solid and rigid glass, even if hydrophilic, do not have the same receding contact angle behavior during cycling because its ability to modify its surface when interacting with water during advancing cycles is less than that of 100/0. After the fifth cycle, θ_R of 100/0 become essentially constant, the saturation state of the polymer by the liquid being reached. The 3 copolymer heterogeneous surfaces (10/90, 20/80, 30/70) do not show an increase probably because the percentage of hydrophilicity is less than 30% which might be insufficient to make receding angle increasing with the cycles, as seen for 100/0 surface.

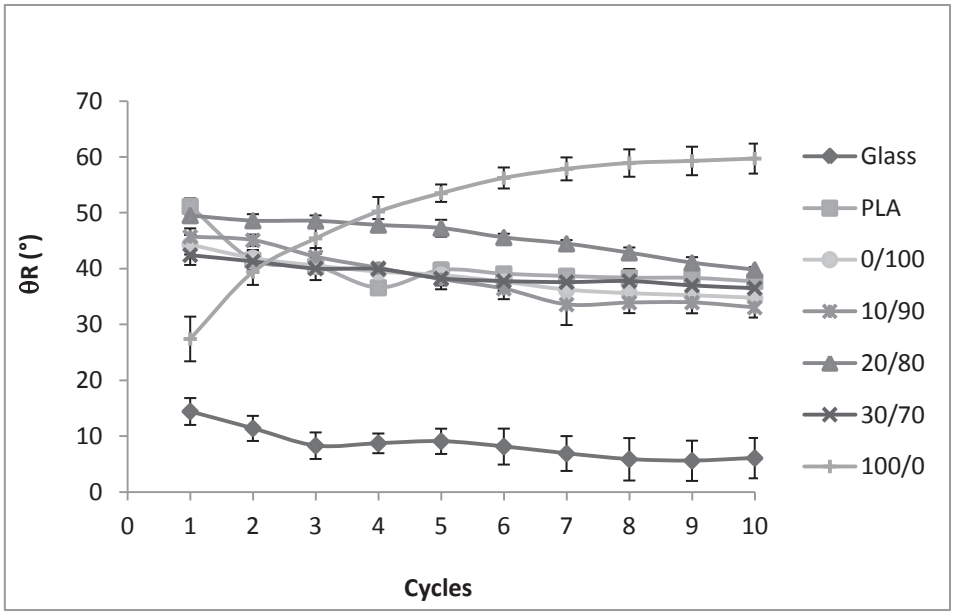


Figure 4. Receding contact angles versus cycles for all the surfaces.

Between these two measured contact angles θ_A and θ_R, there is an equilibrium contact angle (θ_{eq}), associated to the true configuration of thermodynamic equilibrium of the solid-liquid-vapor system. This θ_{eq} reflects in practice the relative strength of the molecular interaction solid-liquid- vapor (Young angle) which is interesting to estimate the solid surface free energy [33]. It can be determined from θ_A and θ_R representing the maximum and minimum values, respectively. This difference represents a parameter named hysteresis (*H*) that is assigned according to the literature to the surfaces roughness [34-36], the chemical heterogeneity [37-40], the metastable states [38, 40-43], the surfaces patch structure [40, 41] and the molecular mobility [44, 45].

Fig. 5 summarizes hysteresis (advancing angles - receding angles) versus cycles. Relationship between hysteresis and hydrophilicity is obvious for cycles superior to cycle 1 whereas it is bad at cycle 1. For all surfaces, *H* decreases with increasing number of cycles. For cycles except cycle 1, *H* is maximum for hydrophobic surface 0/100 and minimum for hydrophilic surface 100/0, which reaches a negative pronounced value from the second cycle. For the other surfaces, *H* values are between these two extremes. These hysteresis results would be used thereafter, in this work, to estimate the Young angle.

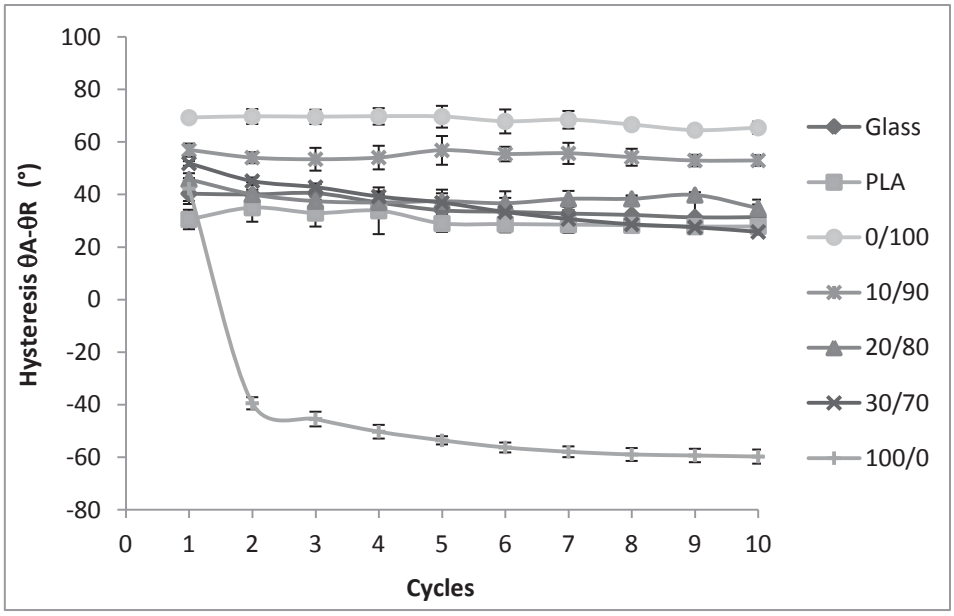


Figure 5. Hysteresis (advancing angles - receding angles) versus cycles.

To compare the different surfaces and understand their behavior during cycling, another parameter was represented in Fig. 6, $\Delta\theta$ which is the difference between contact angles at cycle 1 and contact angles at cycle 10. Fig. 6 histogram shows the variations of the advancing contact angles ($\Delta\theta_A$), receding contact angles ($\Delta\theta_R$) and hysteresis (ΔH) during cycling (cycle 1- cycle 10) for the different surfaces. It appears that the smallest variation of contact angles ($\Delta\theta_A$ and $\Delta\theta_R$) is given for 0/100 surface ($\Delta\theta_A$ = 13.36±1.77° and $\Delta\theta_R$ = 9.54±2.29°). It is a chemically homogeneous surface and thus represents the most hydrophobic surface. By adding 10% of acid to this surface (10/90 ($\Delta\theta_A$ = 16.63±2.30° and $\Delta\theta_R$ = 12.68±0.69°)), we would have a slightly less hydrophobic surface having the same contact angles variation as PLA surface ($\Delta\theta_A$ = 16.15±3.58° and $\Delta\theta_R$ = 13.45±2°). These surfaces did not differ significantly (p > 0.05). ΔH of hydrophobic homopolymer surfaces PLA and 0/100 are also affirmed statistically identical (p > 0.05) (2.69±1.70° and 3.82±0.85°, respectively) while significantly larger for the hydrophobic copolymer 10/90 (3.95±2.89°) (p < 0.01). These parameters ($\Delta\theta_A$ and $\Delta\theta_R$) are also indicators for %A. Indeed, for the most hydrophilic surfaces (20/80, 30/70 and 100/0), $\Delta\theta_A$ (20.68±0.85°, 31.99±0.69° and 69.71±2.70°, respectively) and ΔH (10.97±1.42°, 26.07±0.85° and 102.02±4.33°, respectively) parameters increase significantly (p < 0.01) with increasing of the percentage of acidity whereas $\Delta\theta_R$ (9.71±0.81°, 5.92±0.90° and -32.30±1.75°) significantly (p < 0.01) decrease with increasing of %A. ΔH is the most significant representative parameter of

%A. It presents the smallest p value between each comparison group comparing to $\Delta\theta_A$ and $\Delta\theta_R$ ($p < 0.0001$).

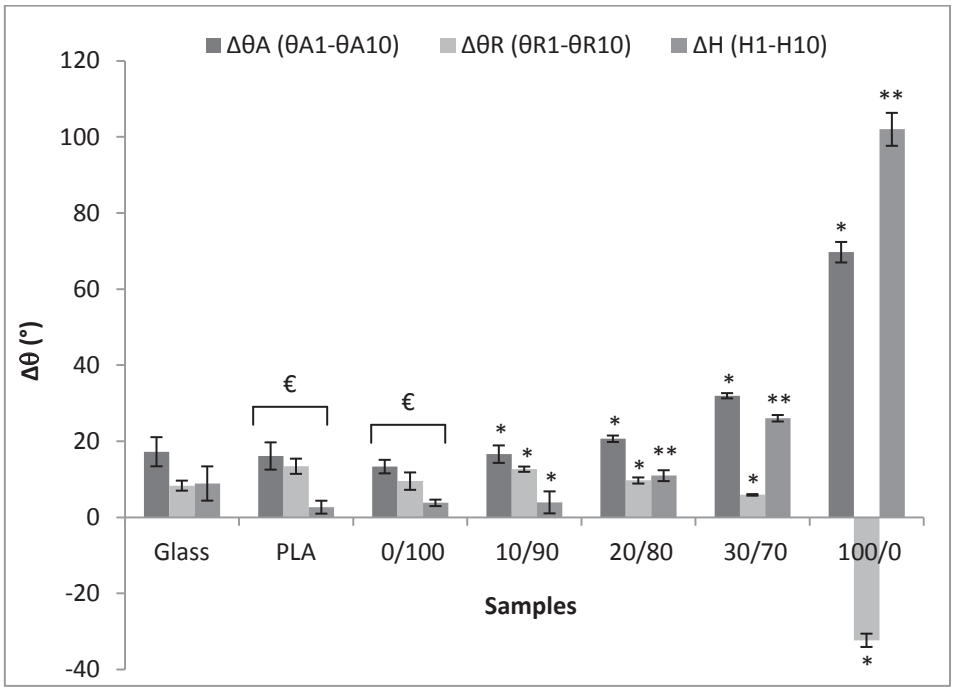


Figure 6. Advancing contact angles Variations ($\Delta\theta_A$), receding contact angles Variations ($\Delta\theta_R$) and hysteresis Variations (ΔH) during cycling (cycle 1- cycle 10) for the different surfaces (n = 3, $^{€}p > 0.05$, $*p < 0.01$, $**p < 0.0001$).

A conclusion drawn on the basis of these results is that, beyond the first cycle, the sample surface has changed, due to interaction with water. A hydrophobic surface has less interaction with water than a hydrophilic surface. This difference is due to the penetration of water to the interior of the polymer chains forming hydrogen interactions with hydrophilic surfaces, partially and irreversibly at the first cycle. Then, the liquid spreads from cycle to another to forming a water film distributed now over the entire surface of the polymer. This action causes the polymer chains mobility and the molecular reorientation which reveal all hydrophilic functions on the surface and therefore the hydrophobic functions inside the film (Fig. 1). This phenomenon increases with increasing of %A. It was previously confirmed with the acute increase of the hysteresis value of the most hydrophilic surface 100/0 (Fig. 5).

Fig. 7 draws contact angles versus %A for tensiometry (advancing (fig 7a)/receding (fig 7b)) angles at cycle 1, cycle 10 and the difference between 1 and 10 cycles). Advancing contact angle (cycle 1 and 10) decrease together with %A but it decreases more rapidly for

cycle 10 than for cycle 1. The difference between cycle 1 and 10 will increase. R^2 coefficient correlation of advancing angle at cycle 1(0.94) is lower than that of cycle 10 (0.99). This difference is deleted (0.99 for cycle 1 corrected and 0.99 for cycle 10) when Cassie correction is applied to cycle 1. Cassie correction is not necessary for cycle 10 to improve R^2. Thus, cycling at cycle 10 corresponds to Cassie correcting. Sensitivity (slope) is higher for cycle 10 (-0.97) than for cycle 1 (-0.39). The amplitude of response of the correlation is more than 2 times higher at cycle 10 than at cycle 1. Moreover, it is not necessary to Cassie correct the angles at cycle 10 to improve R^2. Receding angle decreases and fits badly at cycle 1 with %A (R^2 = 0.85) whereas it increases and fits better for cycle 10 (R^2=0.94). For the difference between receding angles at cycle 1 and 10, R^2 = 0.95 is also good. In any case, as far as receding angle at cycle 10 is concerned, sensitivity of correlation is low (slope = -0.46) compared to advancing angles to cycle 10 with a slope 2 times higher (slope = -0.97).

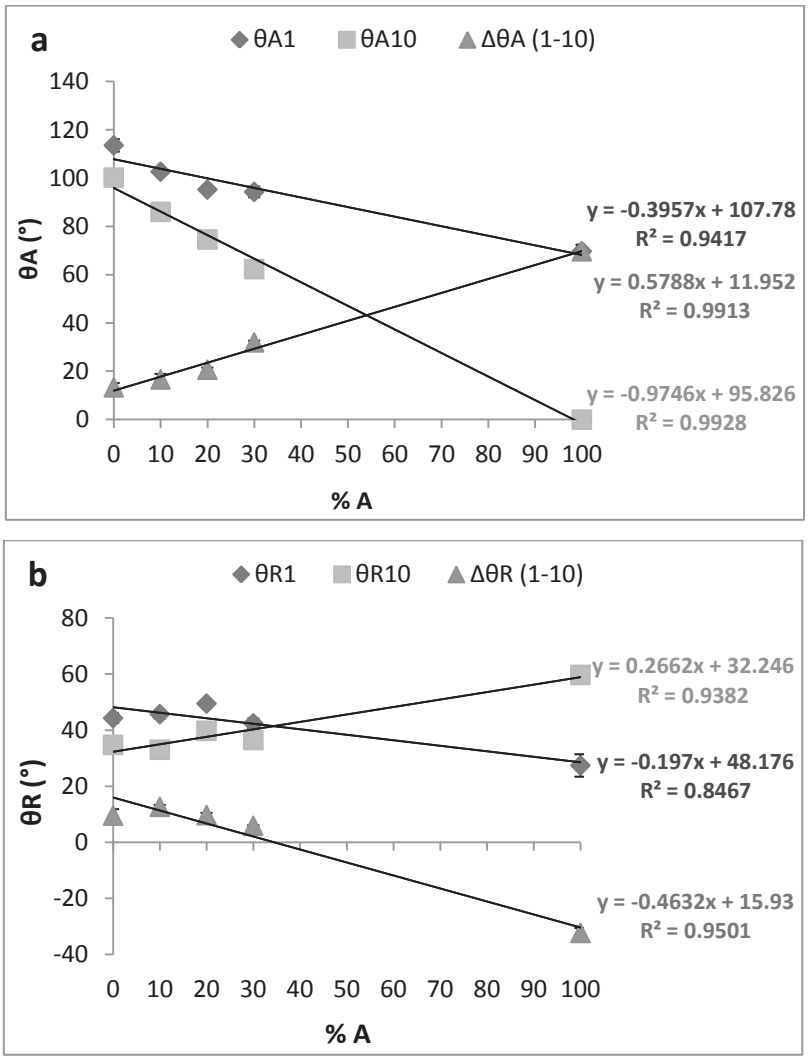


Figure 7. Contact angles versus %A for tensiometry (a) advancing and (b) receding angles, at cycle 1, cycle 10 and the difference betweeen 1 and 10 cycles.

Table 1 summarizes the linear correlation of wettability parameters with %A: y = a x + b. The slope (a) corresponds to the sensitivity of the correlation and R^2 is the quality correlation coefficient. R^2 and slope (a) were calculated for the Dynamic Contact Angles (advancing θ_A or receding θ_R), hysteresis *H*, at cycle 1 or cycle 10, with and without Cassie correction. Hysteresis to cycle 10 exhibits the higher sensitivity (slope a = -1.24, R^2 = 0.9976) associated to an excellent R^2 correlation coefficient (very close to 1). Advancing contact angle at cycle 10 is also interesting (a = -0.97, R^2 = 0.9928) whereas parameters at cycle 1 and receding parameters (at cycle 1 or 10) are not well fitting to %A (law slope and/or R^2 far from 1). Cassie correction inverse R^2 but do not improve significantly the slope, thus the sensitivity towards %A. ($\theta_A^1 - \theta_A^{10}$) slope is positive (0.58) with a decrease of advancing contact angle during cycling whereas it is negative for ($\theta_R^1 - \theta_R^{10}$) (-0.46) with an increase of contact angle at cycle 10 with cycles. For cycle 1, θ_R is not a good correlation (R^2 = 0.84) and should not be considered any more in discussion.

Table 1. Linear correlation of wettability parameters with %A: y = a x + b. The slope (a) corresponds to the sensitivity of the correlation and R^2 is the quality correlation coefficient. The slope (a) of the Dynamic Contact Angles (advancing θ_A or receding θ_R), hysteresis *H*, at cycle 1 or cycle 10, with and without Cassie correction.

Parameter (°)	Slope a	b	R^2
θ_A^1	-0.39	107.78	0.9418
θ_A^{10}	-0.97	95.83	0.9928
Cassie Corrected θ_A^1	-0.44	113.39	0.9999
Cassie Corrected θ_A^{10}	-1.03	104.98	0.9900
θ_R^1	-0.20	48.18	0.8467
θ_R^{10}	0.27	32.25	0.9382
Cassie Corrected θ_R^1	-0.17	44.65	0.9982
Cassie Corrected θ_R^{10}	0.25	35.44	0.9972
H^1	-0.20	59.60	0.5525
H^{10}	-1.24	63.59	0.9976
Cassie Corrected H^1	-0.27	68.74	0.9984
Cassie Corrected H^{10}	-1.27	69,54	0.9950
$\theta_A^1 - \theta_A^{10}$	0.58	11.95	0.9913
$\theta_R^1 - \theta_R^{10}$	-0.46	15.93	0.9501
$H^1 - H^{10}$	1.04	-3.98	0.9846
Cassie Corrected ($\theta_A^1 - \theta_A^{10}$)	0.59	8.41	0.9686
Cassie Corrected ($\theta_R^1 - \theta_R^{10}$)	-0.42	9.21	0.9998
Cassie Corrected ($H^1 - H^{10}$)	1.01	-0.80	0.9901

The order of magnitude of the variation between cycle 1 and 10 is the same for advancing and receding angles but with opposite sign. Because hysteresis is the difference between advancing and receding angle, it will cumulate the two variations versus %A. Indeed, the slope is found to be double, in absolute value, for $H_R^1 - H_R^{10}$ than for advancing or receding angles individual variations with cycles. θ_A Cassie correction changes significantly the R^2 correlation coefficient for the parameters at cycle 1 but not at cycle 10. For H^{10}, $\Delta\theta_A$, ΔH, Cassie correction do not improve R^2 that is already high.

Fig. 8 shows correlation parameters (R^2 and slope of linear relation between contact angles "θ_A (Fig. 8a) and θ_R (Fig. 8b)" and %A) versus cycles. It can be seen in Fig 8a that the advantages brought by cycling at cycle 10 in the analysis of correlation between DCA parameters and %A, are reachable from cycle 2 and for all the successive cycles. Indeed, the R^2 and the slope were very low for the first cycle. They were strongly increased at the second cycle and remained constant thereafter. This observation is consistent with previous results (Fig. 3) which show that the maximum decrease of θ_A was practically reached at cycle 2 for 100% hydrophilic surface. It is finally not necessary to go to cycle 10 to reset the chemical heterogeneity, cycling at cycle 2 is sufficient, for this type of copolymers (lateral chains motility). However, this conclusion was not valid with θ_R correlation observed in Fig. 8b. Unlike the advanced contact angle, in the case of θ_R, there is no obvious improvement of R^2 and slope, indicating that θ_R is not depending on %A and is not the parameter adapted to correlate contact angles and %A. Indeed, receding contact angles results presented in Fig. 8b show that correlation R^2 and slope are low, at any cycles. Thus, receding contact angle is not a well suited parameter to correlate with %A.

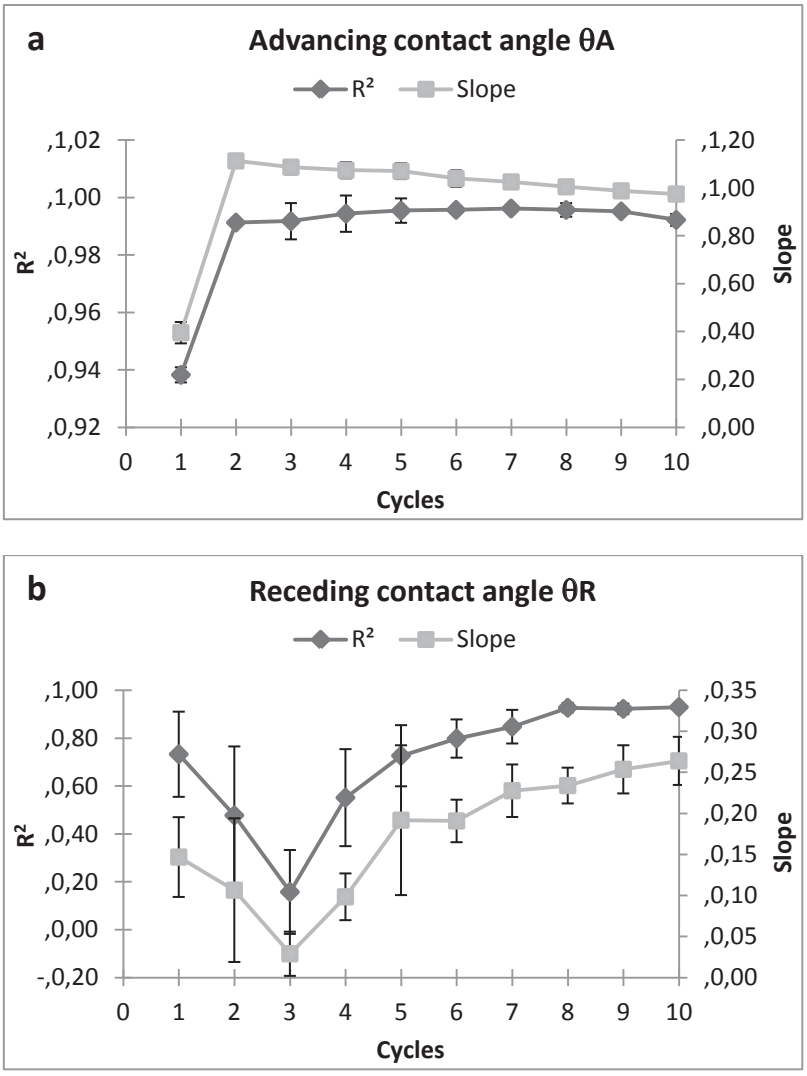


Figure 8. Correlation parameters (R^2 and slope) of linear relation between (a) advancing and (b) receding contact angle and %A versus cycles.

The determination of the equilibrium contact angle (θ_{eq}) of the ideal solid surface defined by Young angle is very important to characterize the solid-liquid interface of the solid materials. In our case, it is important to estimate the interaction of the polymer film with blood, characterize and understand the living cell behavior in contrast with the polymer. This angle is related to the specific interfacial energy which may be determined through the values of the hysteresis of an ideal surface [46]. As noted above, the hysteresis is caused either by the roughness or by the chemical heterogeneity of the surface under investigation. Several theoretical approaches have been proposed in the literature to estimate the equilibrium contact angle from hysteresis, but it is not available on real surfaces, experimentally speaking. The estimation of the angle at equilibrium of homogeneous rough surfaces has been set up on the

basis of several theoretical methods which were described in the literature [24]. However, estimating the Young contact angle on smooth chemically heterogeneous surfaces has not been applied yet on real models in the literature.

In order to study the effect of the roughness, Miguel A. and *al* DCA experiments have been performed on rough chemically homogeneous surfaces with different roughnesses [24]. The values of θ_A and θ_R were graphically represented as a function of the H for each roughness. The Young angle (θ_{eq}) was determined by graphical extrapolation to zero hysteresis angle where θ_A and θ_R are equal.

We develop in the present study a similar but new model on smooth surfaces with very low roughness (Ra < 0.3 nm), but with chemical heterogeneity. Surfaces contain two different chemical species with different percentages: 10, 20 and 30% (copolymers). The homopolymers with 0 and 100% were also used to develop this model. θ_A and θ_R angles at each cycle (1-10) were known as a function of H (each point correspond to the different %A elaborated in this study).

Fig. 9 gives a representation of advancing and receding contact angles as a function of hysteresis, at cycle 1, cycle 2 and cycle 10. By extrapolating the graph to zero hysteresis angle at cycle 1, (H = 0), θ_{eq} = 23.6°, bad R^2 and very low slope for both contact angles were observed. From the second cycle, the curves took another form, then the extrapolation of the graph to zero would not be necessary because θ_A and θ_R intersected at H = zero for an equal contact angle of 41.9°. Thus, R^2 and slope were improved comparing with the first cycle except receding angle R^2 remaining low. Over the cycles and at cycle 10, the graph profile was preserved and an improvement of R^2 ($R^2_{cycle\ 2}(\theta_A)$ = 0.99 and $R^2_{cycle\ 2}(\theta_R)$ = 0.94) and slope for also receding angle was observed. Here again, at cycle 10, the relationship is highly better than other cycles for advancing and receding angles ($R^2_{cycle\ 10}(\theta_A)$ = 0.9953 and $R^2_{cycle\ 10}(\theta_R)$ = 0.9402) and θ_{eq}= 45.8°. These curves allowed to calculate the %A corresponding to θ_{eq} = 45.8° using the R^2 and slope values of figure 7 (θ_A and θ_R as a function of %A). 51.2% of %A was obtained.

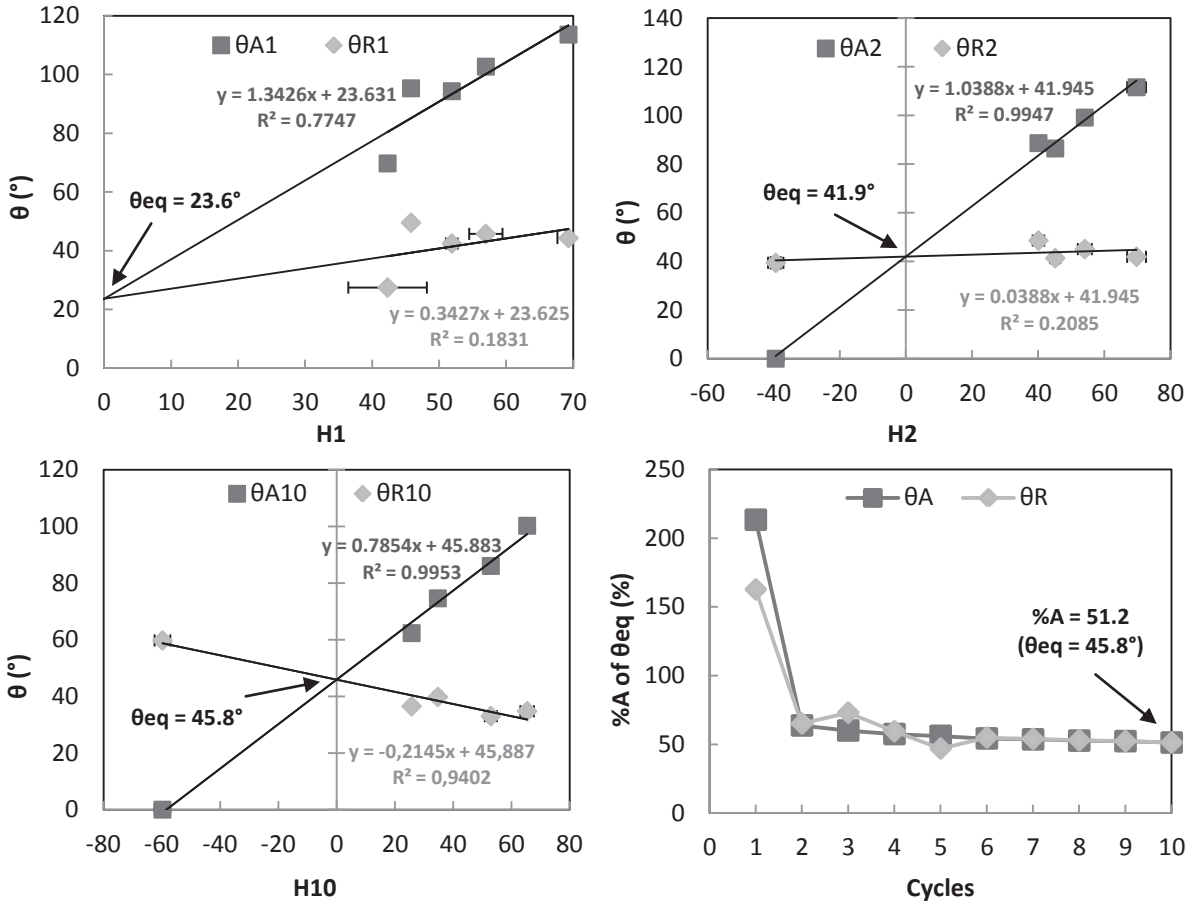


Figure 9. Advancing and receding contact angles versus the corresponding hysteresis at cycle 1, 2 and 10 and the %A of equilibrium contact angle as a function of cycles.

In summary, advancing angles correlate with %A, in any case, better than receding ones. The graphical model in cycle 1 is not ideal to estimate Young angle. Indeed, the surface heterogeneity was not corrected and the amphiphilic chemical functions embedded in the bulk volume of the polymer were not completely revealed outside by a single cycle. This is confirmed by the aberrant and unexpected values of %A derived from θ_A and θ_R (213.3% and 162.2%, respectively) shown in Figure 9 (%A = f(cycles)) at cycle 1.

At cycle 2, a maximum homogenization of the polymer surface was already observed. Thus, for this type of polymer, cycle 2 is sufficient to give information on the Young angle which defines a thermodynamically homogeneous surface. It was also confirmed by this experimental model that %A (51.2%) corresponding to θ_{eq}, for such chemically heterogeneous surface, was found to be equal for both chemical species inducing the chemically heterogeneity (hydrophilic and hydrophobic). Beyond cycle 2, a partial homogenization was observed because R^2 of θ_A , found low for cycle 1, was close to unity at

cycle 2 and slightly varied at cycle 10. This has been observed with the effects of Cassie correction on the correlations mentioned above (Table 1). Cycle 10 acts as a kind of homogenization and increases / amplify the relationship between contact angles and hysteresis. At this level, the competition phenomena accompanying the molecular reorientation are canceled. The model allows us to determinate the Young angle that is required for the estimation of the solid surfaces free energy.

4. Conclusions

Dynamic contact angle measurement was proved to be a way to correct chemical heterogeneity of amphiphilic statistical copolyesters in aqueous media. Cassie-Baxter equation was used to bring theoretical corrections to the experimental contact angles. Thus, we have successfully determinate that cycling permits to avoid Cassie correction. DCA can quantify the hydrophilic/hydrophobic ratios in these copolymers and bring good and actual information of the wettability of these surfaces in contact with aqueous dynamic environments such as in vivo blood. In this case, the polymer will be in direct contact with vascular cells which need specific surfaces and chemical groups for their interactions and adherence. Indeed, tensiometry provides relationships between surface chemical composition and water probe liquid. Various copolymers presenting 10, 20 and 30 ratios of –COOH group were studied as heterogeneous surfaces that will be required to accommodate interactions with polymer/cell's interface and aqueous media. Therefore, different models and parameters were used to fully explore the correlation functions of different parameters such as advancing and receding contact angles and hysteresis to understand the surface interactions of polymers at the air/water interface in dynamic systems. In summary, performing successive and alternative cycles in air/water of chemical homogeneous and heterogeneous surfaces of polymers allowed us to show that data at cycle 1 are not representative of acidic percentage whereas they are at cycle 2 and more. We proposed in this study, a model to estimate the equilibrium contact angle for smooth / heterogeneous surfaces from hysteresis measurements.

We conclude that, unlike receding contact angle, advancing contact angle and hysteresis are correlating to the acidic percentage (%A) in the copolymers side-chain. It was remarked that 10% (%A) proved a more significant difference. These proportions allow not only shaping rational design in copolymers structure, but also controlling the surfaces wettability for the estimation of real contact angles of promising copolymers.

Acknowledgements: Authors would like to thanks Krüss Gmbh for discussion support concerning DCA experiments.

Keywords: Biopolyesters, biodegradable (poly((*R,S*)-3,3 dimethylmalic acid) derivatives, contact angle, sessile drop, Wilhelmy balance, heterogeneous surfaces, hydrophobicity.

References

(1) Tian, H. Y.; Tang, Z. H.; Zhuang, X. L.; Chen, X. S.; Jing, X. B., Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. *Progress In Polymer Science* **2011,** *37*, 237-280.

(2) Fu, K.; Pack, D. W.; Klibanov, A. M.; Langer, R., Visual evidence of acidic environment within degrading poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres. *Pharmaceutical Research* **2000,** *17*, 100-106.

(3) De Santis, R.; Russo, A.; Gloria, A.; D'Amora, U.; Russo, T.; Panseri, S.; Sandri, M.; Tampieri, A.; Marcacci, M.; Dediu, V. A.; Wilde, C. J.; Ambrosio, L., Towards the Design of 3D Fiber-Deposited Poly(epsilon-caprolactone)/Iron-Doped Hydroxyapatite Nanocomposite Magnetic Scaffolds for Bone Regeneration. *Journal Of Biomedical Nanotechnology* **2015,** *11*, 1236-1246.

(4) Huang, Z. W.; Laurent, V.; Chetouani, G.; Ljubimov, J. Y.; Holler, E.; Benvegnu, T.; Loyer, P.; Cammas-Marion, S., New functional degradable and bio-compatible nanoparticles based on poly(malic acid) derivatives for site-specific anti-cancer drug delivery. *International Journal Of Pharmaceutics* **2012,** *423*, 84-92.

(5) Ljubimova, J. Y.; Portilla-Arias, J.; Patil, R.; Ding, H.; Inoue, S.; Markman, J. L.; Rekechenetskiy, A.; Konda, B.; Gangalum, P. R.; Chesnokova, A.; Ljubimov, A. V.; Black, K. L.; Holler, E., Toxicity and efficacy evaluation of multiple targeted polymalic acid conjugates for triple-negative breast cancer treatment. *Journal of Drug Targeting* **2013,** *21*, 956-967.

(6) Loyer, P.; Cammas-Marion, S., Natural and synthetic poly(malic acid)-based derivates: a family of versatile biopolymers for the design of drug nanocarriers. *Journal of Drug Targeting* **2014,** *22*, 556-575.

(7) Lanz-Landázuri, A.; de Ilarduya, A. M.; García-Alvarez, M.; Muñoz-Guerra, S., Poly (β,L-malic acid)/Doxorubicin ionic complex: A pH-dependent delivery system. *Reactive and Functional Polymers* **2014** 81, 45-53.

(8) Qiao, Y.; Duan, X.; Fan, L.; Li, W.; Wu, H.; Wang, Y., Synthesis of controlled molecular weight poly (Î²-malic acid) and conjugation with HCPT as a polymeric drug carrier. *Journal of Polymer Research C7 - 397* **2014,** *21*, 1-9.

(9) McDonald, P.; Lyons, J.; Geever, L.; Higginbotham, C., In vitro degradation and drug release from polymer blends based on poly(dl-lactide), poly(l-lactide-glycolide) and poly(ε-caprolactone). *Journal of Materials Science* **2009,** *45*, 1284-1292.

(10) Schmitz-Hertzberg, S.-T.; Mak, W. C.; Lai, K. K.; Teller, C.; Bier, F. F., Multifactorial design of poly(d,l-lactic-co-glycolic acid) capsules with various release properties for differently sized filling agents. *Journal of Applied Polymer Science* **2013,** *130*, 4219.

(11) Wang, L.; Jia, X.; Chen, Y.; Che, Y.; Yuan, Z., Synthesis, degradability, and cell affinity of poly (DL-lactide-co-RS-hydroxyethyl-beta-malolactonate). *Journal Of Biomedical Materials Research Part A* **2008,** *87A*, 459-469.

(12) Lai, K. L.; He, B.; Gu, Z. W., Preparation and cell compatibility of functionalized biodegradable poly(DL-lactide-co-RS-beta-malic acid). *Chinese Journal Of Polymer Science* **2008,** *26*, 177-186.

(13) Liu, Y.; Wang, W.; Wang, J.; Wang, Y.; Yuan, Z.; Tang, S.; Liu, M.; Tang, H., Blood compatibility evaluation of poly(d,l-lactide-co-beta-malic acid) modified with the GRGDS sequence. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2010,** *75*, 370.

(14) Qian, J.; Xu, W.; Zhang, W.; Jin, X., Preparation and characterization of biomorphic poly(l-lactide-co-β-malic acid) scaffolds. *Materials Letters* **2014,** *124*, 313.

(15) Ding, H.; Helguera, G.; Rodriguez, J. A.; Markman, J.; Luria-Perez, R.; Gangalum, P.; Portilla-Arias, J.; Inoue, S.; Daniels-Wells, T. R.; Black, K.; Holler, E.; Penichet, M. L.; Ljubimova, J. Y., Polymalic acid nanobioconjugate for simultaneous immunostimulation and inhibition of tumor growth in HER2/neu-positive breast cancer. *Journal Of Controlled Release* **2013,** *171*, 322-329.

(16) Zhang, Y.; Ni, C.; Shi, G.; Wang, J.; Zhang, M.; Li, W., The polyion complex nano-prodrug of doxorubicin (DOX) with poly(lactic acid-co-malic acid)-block-polyethylene glycol: preparation and drug controlled release. *Medicinal Chemistry Research* **2015,** *24*, 1189-1195.

(17) Sarah, L. K.; Vinh, X. T.; Cathrin, K.; Anaïs, P.B.; Andrew, P. D., *Synthetic strategies, sustainability and biological applications of malic acid-based polymers*. 2014, *2*, 107-122.

(18) Barbaud, C.; Cammas-Marion, S.; Guerin, P., Poly(β-malic acid) derivatives with non-charged hydrophilic lateral groups: synthesis and characterization. *Polymer Bulletin* **1999,** *43*, 297-304.

(19) Barbaud, C.; Faÿ, F.; Abdillah, F.; Randriamahefa, S.; Guérin, P., Synthesis of New Homopolyester and Copolyesters by Anionic Ring-opening Polymerization of α,α′,β-Trisubstituted β-Lactones. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2004,** *205*, 199.

(20) Ouhib, F.; Randriamahefa, S.; Guerin, P.; Barbaud, C., Synthesis of new statistical and block co-polyesters by ROP of alpha,alpha,beta-trisubstituted beta-lactones and their characterizations. *Designed Monomers And Polymers* **2005,** *8*, 25-35.

(21) Kwok, D. Y.; Gietzelt, T.; Grundke, K.; Jacobasch, H. J.; Neumann, A. W., Contact Angle Measurements and Contact Angle Interpretation. 1. Contact Angle Measurements by Axisymmetric Drop Shape Analysis and a Goniometer Sessile Drop Technique. *Langmuir* **1997,** *13*, 2880.

(22) Wege, H. A.; Holgado-Terriza, J. A.; Rosales-Leal, J. I.; Osorio, R.; Toledano, M.; Cabrerizo-Vilchez, M. A., Contact angle hysteresis on dentin surfaces measured with ADSA on drops and bubbles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2002,** *206*, 469.

(23) Iliev, D.; Pesheva, N.; Iliev, S., Contact Angle Hysteresis and Meniscus Corrugation on Randomly Heterogeneous Surfaces with Mesa-Type Defects. *Langmuir* **2013**, *29*, 5781.

(24) Rodríguez-Valverde, M. A.; Montes Ruiz-Cabello, F. J.; Gea-Jódar, P. M.; Kamusewitz, H.; Cabrerizo-Vílchez, M. A., A new model to estimate the Young contact angle from contact angle hysteresis measurements. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2010,** *365*, 21-27.

(25) Huang, Y.; Ng, H. C. A.; Ng, X. W.; Subbu, V., Drug-eluting biostable and erodible stents. *Journal of Controlled Release* **2014,** *193*, 188.

(26) Bouafsoun, A.; Ponsonnet, L.; Kerkeni, A.; Jaffrézic, N.; Othmane, A., Comparative wettability study of polystyrene functionalized with different proteins. *Materials Science and Engineering: C* **2007,** *27*, 709.

(27) Rupp, F.; Scheideler, L.; Geis-Gerstorfer, J., Effect of Heterogenic Surfaces on Contact Angle Hysteresis: Dynamic Contact Angle Analysis in Material Sciences. *Chemical Engineering & Technology* **2002,** *25*, 877.

(28) Chau, T. T.; Bruckard, W. J.; Koh, P. T. L.; Nguyen, A. V., A review of factors that affect contact angle and implications for flotation practice. *Advances In Colloid And Interface Science* **2009,** *150*, 106-115.

(29) Di Mundo, R.; Bottiglione, F.; Carbone, G., Cassie state robustness of plasma generated randomly nano-rough surfaces. *Applied Surface Science* **2014,** *316*, 324-332.

(30) Bormashenko, E., Why does the Cassie-Baxter equation apply? *Colloids And Surfaces A-Physicochemical And Engineering Aspects* **2008,** *324*, 47-50.

(31) J. Gaydos; Neumann, A. W., Line tension in multiphase equilibrium systems. *In: Neumann A.W., J.K. Spelt (eds). Applied surface thermodynamics* **1996**, 169-238.

(32) Vargha-Butler, E. I.; Kiss, E.; Lam, C. N. C.; Keresztes, Z.; Kalman, E.; Zhang, L.; Neumann, A. W., Wettability of biodegradable surfaces. *Colloid And Polymer Science* **2001,** *279*, 1160-1168.

(33) Marmur, A., Thermodynamic aspects of contact angle hysteresis. *Advances in Colloid and Interface Science* **1994,** *50*, 121.

(34) Bartell, F. E.; Shepard, J. W., The Effect of Surface Roughness on Apparent Contact Angles and on Contact Angle Hysteresis. I. The system Paraffin-Water-Air. *The Journal of Physical Chemistry* **1953,** *57*, 211.

(35) Eick, J. D.; Good, R. J.; Neumann, A. W., Thermodynamics of contact angles. II. Rough solid surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* **1975,** *53*, 235.

(36) Oliver, J. P.; Huh, C.; Mason, S. G., An experimental study of some effects of solid surface roughness on wetting. *Colloids and Surfaces* **1980,** *1*, 79.

(37) Good, R. J., A Thermodynamic Derivation of Wenzel's Modification of Young's Equation for Contact Angles; Together with a Theory of Hysteresis1. *Journal of the American Chemical Society* **1952,** *74*, 5041.

(38) Neumann, A. W.; Good, R. J., Thermodynamics of contact angles. I. Heterogeneous solid surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* **1972,** *38*, 341.

(39) Marmur, A., Contact Angle Hysteresis on Heterogeneous Smooth Surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* **1994,** *168*, 40.

(40) Decker, E. L.; Garoff, S., Contact Line Structure and Dynamics on Surfaces with Contact Angle Hysteresis. *Langmuir* **1997,** *13*, 6321.

(41) Decker, E. L.; Garoff, S., Using Vibrational Noise To Probe Energy Barriers Producing Contact Angle Hysteresis. *Langmuir* **1996,** *12*, 2100.

(42) Brandon, S.; Marmur, A., Simulation of Contact Angle Hysteresis on Chemically Heterogeneous Surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* **1996,** *183*, 351.

(43) Sedev, R. V.; Budziak, C. J.; Petrov, J. G.; Neumann, A. W., Dynamic Contact Angles at Low Velocities. *Journal of Colloid and Interface Science* **1993,** *159*, 392.

(44) Chen, W.; McCarthy, T. J., Layer-by-ayer Deposition: A Tool for Polymer Surface Modification. *Macromolecules* **1997,** *30*, 78.

(45) Fadeev, A. Y.; McCarthy, T. J., Trialkylsilane Monolayers Covalently Attached to Silicon Surfaces: A Wettability Studies Indicating that Molecular Topography Contributes to Contact Angle Hysteresis. *Langmuir* **1999,** *15*, 3759.

(46) Lam, C. N. C.; Ko, R. H. Y.; Yu, L. M. Y.; Ng, A.; Li, D.; Hair, M. L.; Neumann, A. W., Dynamic Cycling Contact Angle Measurements: Study of Advancing and Receding Contact Angles. *Journal of Colloid and Interface Science* **2001,** *243*, 208.

- **Conclusion de l'article 2**

Dans un milieu aqueux en dynamique tel que le flux sanguin, le biomatériau sera en contact direct avec les cellules vasculaires. Pour un meilleur comportement biologique, ces cellules nécessitent des surfaces et des groupements chimiques spécifiques pour leurs interactions vis-à-vis de l'implant. Dans ce deuxième article, nous avons étudié les phénomènes interraciaux des PDMMLAs et l'eau en utilisant la méthode de la goutte d'eau en dynamique (tensiométrie). Nous avons démontré que la DCA est un moyen de correction de l'hétérogénéité chimique des copolymères amphiphiles dans l'eau. Elle permet d'homogénéiser une surface hétérogène chimiquement et donner des informations sur le comportement des groupements fonctionnels hydrophiles et hydrophobes. Nous avons aussi démontré que le cyclage au fil du temps permet d'éviter la correction théorique des angles de contact par le modèle de Cassie-Baxter. Cette homogénéisation reste stable avec le temps ce qui permet d'avoir une réelle information sur la mouillabilité de la surface au contact des liquides en mode dynamique.

La détermination du pourcentage des groupements acides et sa corrélation linéaire avec les paramètres de mouillage est aussi possible à l'aide de cette technique. Les copolymères possédant différents %A peuvent avoir une interaction avec les protéines d'adhésion ou les cellules au premier contact et/ou à long terme. La DCA a été effectuée sur 10 cycles de mouillage. Ce nombre de cycle a été suffisant pour comprendre la première interaction de notre matériau avec l'eau et au fil des cycles. Les paramètres étudiés au cycle 1 ont montré que les résultats obtenus ne sont pas représentatifs du %A contrairement au cycle 2 et plus. Cela a été également confirmé par le modèle développé dans ce travail pour estimer l'angle de contact d'équilibre (surface lisse et homogène) à partir des données d'hystérèse. Ce modèle a évoqué que l'angle à l'équilibre est celui qui correspond à une surface contenant 51,2% du %A. Ce modèle permettra donc d'estimer l'angle de Young des surfaces lisses et chimiquement hétérogènes et de leur énergie de surface réelle.

ARTICLE 3

(En cours)

Résumé :

Afin de réduire le risque de resténose intra-stent et améliorer l'hémocompatibilité des matériaux utilisés, la re-endothélialisation est essentielle. En effet, le comportement des cellules endothéliales est affecté par plusieurs facteurs tels que la mouillabilité et l'énergie de surface du matériau en contact avec les cellules et le sang, ses propriétés thermomécaniques, sa rugosité et sa topographie.

Le but de ce travail est d'évaluer les propriétés physico-chimiques et biologiques de nouveaux polymères dérivés du poly(acide 3,3-diméthylmalique) (PDMMLA) qui vont être utilisés pour revêtir les stents cardiovasculaires. En effet, la mouillabilité et l'énergie de surface de ces matériaux ont déjà été présentées dans les articles ci-dessus. Dans le présent article, une étude approfondie de la topographie et de la rugosité de la surface notamment son aplatissement et sa symétrie a été effectuée par une étude AFM. De plus, l'étude des propriétés thermiques et rhéologiques de ces matériaux a été réalisée en utilisant différentes techniques telles que la DSC, la TGA, et la rhéologie. Par ailleurs, les résultats de l'étude des propriétés physicochimiques ont été complétés et corrélés avec ceux de l'étude de la réponse biologique de ces biomatériaux vis-à-vis des cellules endothéliales humaines HUVECs. En effet, une étude *in vitro* de l'attachement, l'adhésion, la morphologie et la prolifération de ces cellules sur les films polymères à base de PDMMLAs a été réalisée.

Les résultats de ces études ont révélé les bonnes propriétés de surface des PDMMMLAs (films lisses avec une surface aplatie et symétriques), les bonnes propriétés thermiques et thermo-mécaniques (T_g inférieure à la température corporelle, température de dégradation thermique élevée et caractère viscoélastique et souplesse des chaînes polymère) et une bonne réponse biologique en vue de l'attachement, l'adhérence et la morphologie cellulaires qui peuvent être ajustées par une simple modification chimique de la chaîne latérale des polymères étudiés.

Physicochemical and biological evaluation of statistical functional copolyesters of poly([*R*,*S*]-3,3 dimethylmalic acid) derivatives for cardiovascular metallic stent coating application

R. Belibel[1], S. Sali[1], N. Marinval[2], C. Barbaud[1], H. Hlawaty*[2]

[1]INSERM U1148, Laboratory for Vascular Translational Science (LVTS), Institut Galilée, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, 99 Avenue Jean-Baptiste Clément, Villetaneuse, F-93430, France.

[2]Inserm U1148, Laboratory for Vascular Translational Science, UFR SMBH, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Groupe Biothérapies et Glycoconjugués, Bobigny, F-93430, France.

*Corresponding author. Tel.:+33(0)148387752.

E-mail address: hanna.hlawaty@univ-paris13.fr (H. Hlawaty).

Abstract:

To reduce the risk of intra-stent restenosis and improve hemocompatibility of biomaterials, the therapeutic re-endothelialization is required. Indeed, the behavior of endothelial cells is affected by several factors such as the wettability and the surface energy of the material in contact with cells and blood, its thermo-mechanical properties and its roughness and topography. The aim of this study was to evaluate the physicochemical and biological properties of new polymers derived from poly([R,S]-3,3-dimethylmalic acid) (PDMMLA) that will be used as cardiovascular stents coating. In fact, a comprehensive study of the roughness and topography (flattening and symmetry) of the surface was investigated by AFM. In addition, the study of thermal and rheological properties of these materials has been performed using different techniques such as Differential Scanning Calorimetry (DSC), Thermo-Gravimetric Analysis (TGA), and rheology. Furthermore, the results of physicochemical properties study were completed and correlated with those of the biological response study of these biomaterials on human endothelial cells (HUVECs). Indeed, *in vitro* biological study of attachment, spreading, morphology and proliferation of these cells on PDMMLA films was performed. The results of these studies revealed good surface properties of PDMMMLAs (smooth films with a flattened and symmetrical surface), good thermal and thermo-mechanical properties (low T_g, high thermal degradation temperature and viscoelastic character and flexibility of the polymer chains) and a good biological response to cells attachment, cell adhesion and morphology which can be adjusted by simple chemical modification of the side chain of the studied polymers.

Keywords:

Biodegradable poly([*R,S*]-3,3-dimethylmalic acid); biocompatible; roughness and topography; thermal properties; rheology, cell spreading, cell adhesion, cell morphology, cell proliferation, human endothelial cells, adhesion of monocytes.

I. Introduction

Cardiovascular diseases are today an important public health problem. Atherosclerosis which is characterized with artery occlusion is the major etiology of these diseases, thereby representing one of the major causes of death and disability in countries with highest quality of life [1]. Indeed, for treatment of this pathology, the use of metallic endovascular stents has been a revolutionary advance in recent years. Although this progress has been effective in opposing acute elastic recoil of the affected artery, complications observed following stenting procedure have lead to in-stent restenosis in 30% of cases within three months of the intervention [2]. This treated artery re-obstruction is the result of several phenomena: endothelial cells (ECs) death, smooth muscle cells (SMCs) proliferation and the inflammation due to metal corrosion ... [2, 3] Indeed, the coating of metal was a promising solution to overcome this problem in order to enhance re-endothelialization, inhibit SMCs proliferation and improve biological environment/material interactions.

During the last decade, several polymeric coatings (non-degradable and biodegradable polymers) have been successfully used for coating a metal stent and thus reduce the risk of in-stent restenosis compared to bare-metal stents. These polymers are usually used as drug-eluting supports [4, 5]. For this purpose, biodegradable polymers that may be completely metabolized have given the best solution to the long-term effects of durable polymers having then an acute inflammatory response that causes rapid progression of treated artery neo-intimal. This new generation of drug eluting-stents has remarkably decreased the risk of thrombosis related to the bare-stent and covered-stent without durable polymers. Polyesters are the family of biodegradable polymers the most widely used thanks to their high biocompatibility and non-toxicity such as PLA (polylactic acid), PGA (polyglycolic acid) and their copolymer PLGA (polylactic-*co*-glycolic acid) which gave promising results [6]. In contrast, their use is still limited because of their metal-adherence proprieties and degradation time issues that affected by various factors such as polymer size and molecular weight or medium pH that influence on the control of drug release kinetics on the first hand. On the other hand, the clinical complications associated to late thrombosis and inflammation observed and the delayed endothelial healing. These studies are still in clinical trial or in research stage remain in need of complete or improve [3].

Therefore, finding the best biodegradable polymeric coating having at the same time good metal-adherence and good mechanical properties required for use as drug eluting-stent, a sufficient biocompatibility, a capacity to release a drug in good time, accelerate re-

endothelialization, minimize the risk of late thrombosis and acute inflammatory reactions is the current challenge of scientific research in cardiovascular biomaterials domain.

In this study, we propose an original polyester derived of poly(malic acid), the poly([*R,S*]-3,3-dimethylmalic acid) derivatives (PDMMLA) to be a promising coating of metallic stents. It can cover the metal stent, improving also its surface chemical properties, following the required mechanical properties, containing a drug and completely degrade after releasing the necessary amount of drug (figure 1).

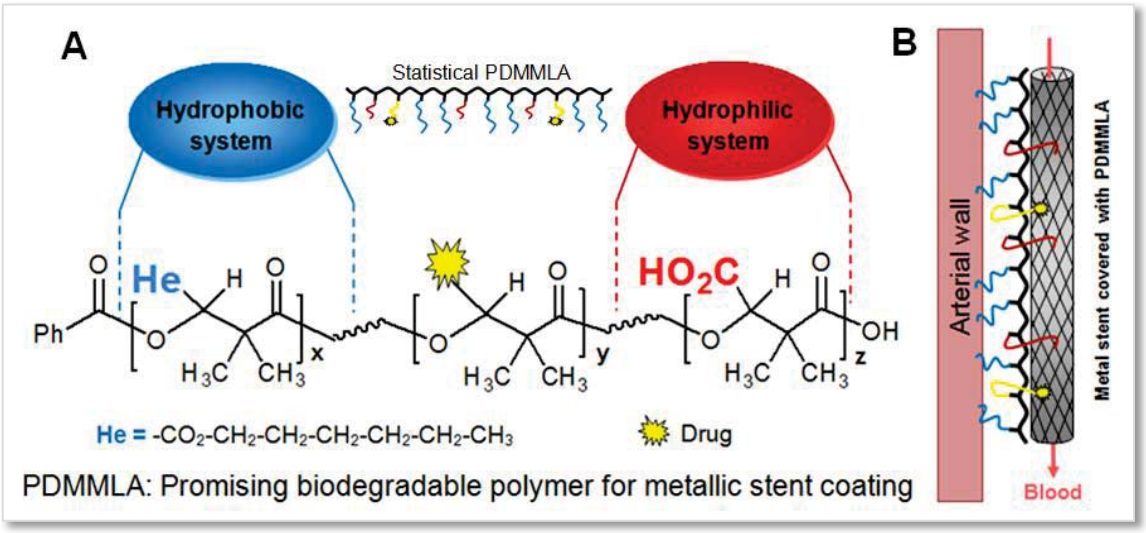


Figure 1. Biodegradable PDMMLA copolymers: (A) chemical structure and (B) promising metallic stent coating.

Indeed, this polymer is chosen for several reasons. Firstly, it belongs to the *poly(malic acid*) (PMLA) family which is known to present good biocompatibility, non-toxicity in vitro and in vivo, non-immunogenic properties and stability in the bloodstream [7, 8, 13-15]. Indeed, in comparison with PLA, PMLA has good affinity to endothelial cells (HUVECs). It was copolymerized with PLA to improve cellular affinity and prevent platelet aggregation [16-19]. Moreover, it is an amphiphilic amorphous synthetic biodegradable polymer, unlike to PLA, it can be chemically modified to provide different chemical groups; this may be adapted to modifying hydrophilic/hydrophobic balance and thus changes its rate of degradation. It may contain a lateral alkyl group or a functional group such as a chemically modified unsaturated bond, or an ester group, which will be transformed into carboxylic acid group for coupling and copolymerization of sophisticated groups and bioactive molecules. Therewith, it can be able to adduce to the same chain in the lateral position a drug to release lastly during its degradation; we hypothesize that the grafting of the drug can be done either during the

synthesis of the monomer, it can be attached to the monomer once synthesized or to the polymer after deprotection [20, 21].

Moreover, besides all these properties, its chemical architecture is predefined to provide biocompatible biomaterials giving natural and non-toxic primary hydrolysis products after their complete degradation. It was reported that, the hydrolysis of amorphous PDMMLA gave the corresponding (*R*,*S*)-3,3-dimethylmalic acid [21]. Indeed, diacid (*R)*-3,3-dimethylmalic acid, the final product of hydrolytic degradation of chiral PDMMLA is a natural and non-toxic product that enters in the biosynthetic pathway of pantothenate. This metabolite present in the synthesis of Coenzyme A gives ketovaline by enzymatic oxidative reaction catalyzed by □□□-dimethyldehydrogenase (EC.1.1.1.84) [22-24] (figure 2). We further consider that this biodegradable polymer is bioassimilable.

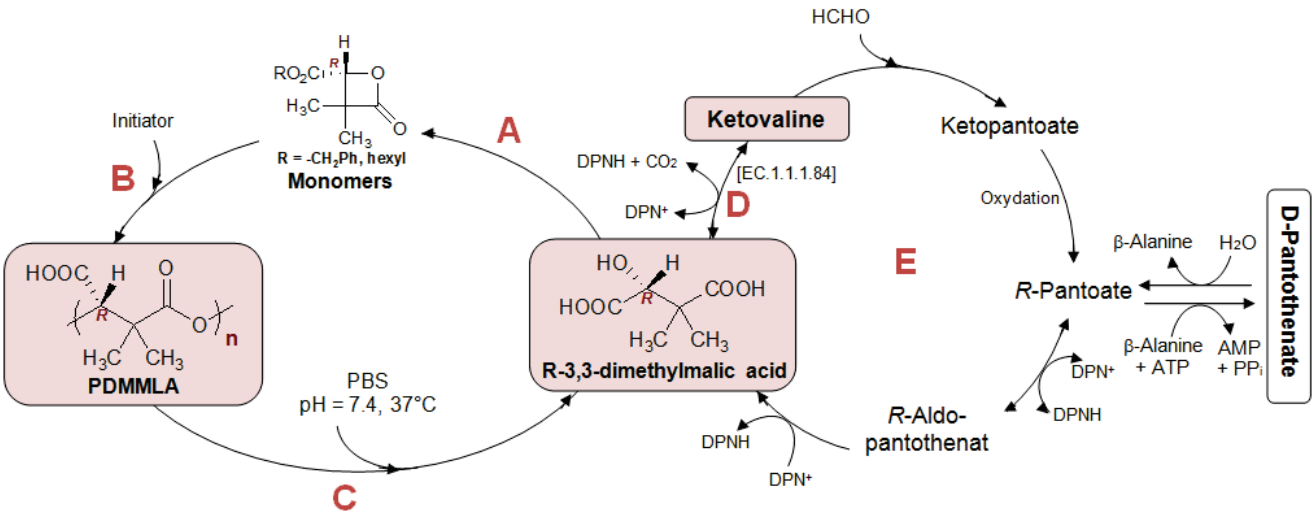


Figure 2. (A) Synthesis of monomers. (B) Synthesis of PDMMLAs with Ring Opening Polymerization (ROP). (C) PDMMLAs hydrolytic degradation to *R*-3,3-dimethylmalic acid. (D) Enzymatic oxidative reaction catalyzed by "EC.1.1.1.84"of *R*-3,3-dimethylmalic acid to give ketovaline. (E) Degradation cycle of pantothenate.

In addition, the physicochemical and mechanical properties of this polymer have attracted our attention to evaluate its behavior for this application. The hydrophilic homopolymer poly([*RS*]-3,3-dimethylmalic acid) (PDMMLAH) is rigid and unyielding having a glass transition temperature (T_g) equal to +67 °C and the one that is hydrophobic, (poly(hexyl [*RS*]-3,3-dimethylmalate) (PDMMLAHe) has a ductile and flexible aspect with a T_g at -15 °C. reference The mixture of these ones with different proportions varies the mechanical and thermal properties including elasticity and rigidity of corresponding copolymers. Therefore, before grafting the drug on the polymer and proceed to the study of its

controlled-release, it is necessary to study these physicochemical and mechanical properties without bioactive molecule. Their rates of *in vitro* degradation and its effects on vascular cells behavior will eventually be studied and is the principal objective of this paper.

Our previous works have demonstrated the synthesis of this polymer [21, 25]. For this work, we chose to synthesize three amphiphilic amorphous statistical copolymers composed of different hydrophilic / hydrophobic proportions of functional groups in their side chains: $PDMMLAH_{30}$-*co*-He_{70}, $PDMMLAH_{20}$-*co*-He_{80} and $PDMMLAH_{10}$-*co*-He_{90}. The carboxylic acid groups (H) were used for their hydrophilic character while the hexylic groups (He) were used for their hydrophobic behavior.

The present work is focused on the evaluation of these synthesized copolymers for the aimed biomedical application against restenosis. A preferred quality of biomaterial film with better thermo-mechanical properties and higher flatness and uniformity are clearly desired. Several techniques were carried out for this aim. Differential scanning calorimetry (DSC) and rheology were employed to identify their thermal and mechanical properties, respectively. To observe the surface topography of the formed copolymer films and thus ascertain that they are smooth, symmetrical and flat, the atomic force microscopy (AFM) was previously used in this study.

Furthermore, in correlation with these analysis, we are finally designed our study with *in vitro* assessment of the biological behavior of different copolymers. These biomaterials were evaluated to the adhesion and proliferation of human endothelial cells (HUVEC). The polymers behavior was studied by cells attachment, cells morphology observation and LDH proliferation assay.

II. Material and methods

II.1. Polymer synthesis and characterizations

Amorphous PLA (M_n = 20 000 g/mol) was purchased from Sigma Aldrich (France). Anhydrous tetrahydrofuran (THF) was distilled on sodium-benzophenone. In all other cases, the commercially available chemicals were purchased from Sigma Aldrich (France) and employed as received. All reactions, with anhydrous organic solvents were performed under nitrogen atmosphere. Synthetic and amorphous PDMMLAs were prepared in anhydrous THF solution by ROP of racemic β-lactones monomers using the previously reported procedure using tetraethylammonium benzoate as initiator [21]**.** The monomers were synthesized

according to the literature procedure as well with different functional groups to bring the hydrophilic (acidic or neutral) and hydrophobic characters for polymers [26]. In this study, 3 statistical copolymers having different functional groups in their side chains were prepared. They were synthesized with different acidic hydrophilic / hydrophobic percentages ($PDMMLAH_{10}$-*co*-He_{90}, $PDMMLAH_{20}$-*co*-He_{80} and $PDMMLAH_{30}$-*co*-He_{70}). The carboxylic acidic (H) and hexylic (He) functions were used, respectively, to vary this balance. The polymers with 10, 20 and 30% of acidic groups were named as 10/90, 20/80 and 30/70, respectively. Theoretical molecular weights of different polymers can be determinate by molar ratio of monomer to initiator [M]/[A]. For copolymers, the initiator was used with 10^{-2} equiv per mol monomer to obtain theoretical molecular weights ranges between 22 000 and 30 000. The different polymers were characterized by *Fourier Transform InfraRed* (FTIR) spectroscopy analysis which showed the ester characteristic band of different polyesters around 1750 cm^{-1} and the disappearance of the lactone band around 1840 cm^{-1} of different β-lactones monomers. FTIR spectra were recorded on AVATAR 370 TF-IR Thermo Nicolet spectrometer using Nicolet OMNI-Sampler ATR Smart Accessory (Ge, DTGS). Absorption bands are given in cm^{-1}. Then, the ^{1}H and ^{13}C NMR spectroscopy was used to confirm the chemical structure of all PDMMLAs and the co-monomers relative contents (10, 20 and 30%) of copolymers. This latter percentage was obtained by ^{1}H NMR using the integration ratio between the peak which corresponds to $-CH_2$-O- hexyl and that corresponds to $-CH_2$-O- benzyl (table 1) [25].

The absolute average molecular weights and molecular weight distributions were determined at room temperature by coupling online a high performance size exclusion chromatograph (HPSEC), a multi-angle laser light scattering detector (MALLS), a viscometer and a differential refractive index (dRI) detector. THF, used as carrier, was filtered through a 0.1 µm filter unit (Millipore, Billerica, USA), carefully degassed (DGU-20A3R Shimadzu, Kyoto, Japan), and eluted at a 0.5 mL/min flow rate (LC10Ai Shimadzu, Kyoto, Japan). 100 µL of a 0.2 µm-filtered sample solution (at about 20 mg/mL) were injected with an automatic injector (SIL-20A HT Shimadzu, Kyoto, Japan). The column packing was a polystyrene-divinylbenzene gel. The MALLS photometer, a miniDawn TREOS from Wyatt Technology Inc. (Santa Barbara, CA, USA) was provided with a fused silica cell and a Ga-As laser (λ = 665.8 nm). The whole collected data: light scattering (LS), dRI were analyzed using the Astra v6.0.6 software package. Molar mass were obtained with the Zimm order 1 method. The concentration of each eluted fraction was determined with dRI (RID10A Shimadzu, Kyoto, Japan) according to the measured values of dn/dc (0.05 mL/g) [27]. For all polymers, high

molecular weights with a very good molar mass distribution value (D) which close to unity was observed. The molecular weight of commercial amorphous PLA was found different than indicated.

II.2. Preparation of polymer films

To obtain polymer films, the PDMMLAs were dissolved in acetone and PLA in chloroform. Firstly, for AFM measurements, the polymer solution was then deposited on glass slides. After the evaporation of solvent at room temperature, glass slides were dried at 37°C overnight in a vacuum oven. Glass is used as a reference sample. Secondly, for cell culture, the polymer solution was coated in glass crystallizers having the same diameter than 24-well to carry out proliferation assays and in glass LabTek for spreading and adhesion tests. After the evaporation of solvent at room temperature, they were placed overnight at 37°C. Then, they were sterilized in the ultraviolet light for 1h prior to cell culture. Before cell seeding, the polymer films were incubated with pretreatment media for 2h.

II.3. Physicochemical and mechanical properties

II.3.1. Atomic Force Microscopy (AFM)

AFM was used to obtain topographic images of surface samples. The AFM machine was a nanoscope 5 (Bruker-Nano) and the cantilever was a Veeco tip silicon probe with aluminum reflex coating (resonant frequency: 300 kHz) and with a constant force of 40N/m. Imaging was performed in the air, at room temperature, and using the tapping mode. Surface morphology and roughness parameters were determined by the AFM software program. The (10 µm x 10 µm) 2D images of topography were obtained with a resolution of 256_256 pixels. Surface roughness and topography parameters (*Ra*, *RMS*, *RSk* and *RKu*) was then evaluated from 10 µm x 10 µm (100 μm^2), 5 µm x 5 µm (25 μm^2) and 2 µm x 2 µm (100 μm^2) images.

II.3.2. Thermal analysis

All glass transition (*T*g) temperatures of different polymers were obtained using Differential Scanning Calorimetry (DSC). It was measured on a SDT Q600 analyzer (TA instrument, Guyancourt, France). In a typical run, polymers were first put in the furnace and heated from -60°C to 200°C by means of a temperature ramp of 10°C/min. This operation was repeated twice. *T*g was determined from the inclination point of the second heating curve.

Thermogravimetric analysis data were obtained with a TGA Q50 at a heating rate of 10°C/min under N_2 atmosphere.

II.3.3. Rheological analysis

Rheological measurements were performed using parallel plate geometry with diameter of 40 mm. The variation of the storage modulus (G'), loss modulus (G") and mechanical damping parameter (tan δ) were measured as a function of frequency at 37 ° C. An oscillatory stress of 1 Pa and a deformation frequency ranged between 0 Hz and 2 (interval including the value of the average heart rate of 1 Hz) were applied to the samples with 5 points per decade, evenly spaced on a logarithmic scale. For each point, the sample was equilibrated for 3 s ("conditioning time") and each value is an average taken, subsequently, over a period of 3s ("sampling time").

II.4 Biological properties

II.4.1. HUVECs cell culture

Cell culture of *Human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC, N° CRL- 1730, ATCC, LGC Molsheim, France) was performed in Endothelial Cell Basal Media 2 (ECBM2, PromoCell, Germany) supplemented with 10% fetal bovine serum, epidermal growth factor (EGF, 5.0 ng/mL), hydrocortisone (0.2 µg/mL), VEGF (0.5 ng/mL), basic fibroblast growth factor (bFGF, 10 ng/mL), insulin like growth factor (R3IGF-1, 20 ng/mL), ascorbic acid (1 µg/mL), heparin (22.5 µg/mL), antibiotics (1% penicillin-streptomycin, from PAA Laboratories, Pasching, Austria). HUVEC cells were seeded using ECBM2 complete media and incubated at 37 °C in 5% CO_2 for 24h to obtain adherent and proliferating cells. Cells were divided two times per week at a sub cultivation ratio of 1:3.

II.4.2. Spreading test of HUVEC cells on polymer films

Spreading of HUVEC was performed on polymer films using 8000 cells/well in coated glass 8-well LabTek in order to analyze changes in individual cell shape and size. After 2h of spreading, the cell media was removed and cells were fixed using PFA 1% and washed by PBS (1X); followed by permeabilization using 0.05% of Triton X- 100 solution (Sigma-Aldrich, France). Cytoskeleton (F-actin) and nucleus were stained subsequently with Alexa Fluor 546 phalloidin (dilution 1/200, Invitrogen, France) and DAPI (dilution 1/1000, Invitrogen, France); and observed with a fluorescence microscope (Zeiss Axiophot, Carl Zeiss

France). Cells were photographed using digital camera fixed on top of the fluorescence microscope (Nikon COOL PIX 8400, Japan). Then the areas (expressed in μm^2) enclosed by each trace were measured using Scion Image software (Scion Corporation) with a minimum of 100 cells counted over 3 different samples for each scaffold type. This was repeated four times on different cell passage on different days (n = 4) occupying the same duration for incubation (2h).

II.4.3. HUVEC cells morphology on polymer films

Cellular morphology of different surface films was visualized using *Phase contrast microscopy* (Zeiss Axiophot, Carl Zeiss France). HUVEC cells were cultured as described in the "cell culture" section. Cells were incubated on the coated glass-crystallizer with polymers for 1 day, 2 days, 3 days, 4 days and 5 days. Cells were photographed using digital camera fixed on top of the microscopy (Nikon COOL PIX 8400, Japan). For the same surface, three different samples were used for each time and repeated three times on different passage number on different days (n = 3) occupying the same duration for incubation.

II.4.4. In vitro HUVECs adhesion

For HUVEC adhesion, after the pretreatment of different polymer surfaces, 3000 cells/well were deposed in polymers-coated glass 16-well LabTek. The positive control was used in the same conditions without any polymer-coated surface. After 10 min of incubation at 37°C and 5% CO_2, culture media was removed and cells were washed twice with PBS (1X). Then, adhered cells were counted manually using *phase contrast microscopy* (Zeiss Axiophot, Carl Zeiss France) in each well and their percentage was normalized to starting cells number. The adhesion test was repeated 3 times (n = 3) in the same conditions.

II.4.5. In vitro monocytes adhesion

The Mono Mac 6 (MM6) human monocytic cell were deposited in suspension in the culture media at a density of 40 000 cells/well (polymers-coated glass 16-well LabTek) after the pretreatment of different polymer surfaces 3000. The positive control was used in the same conditions without any polymer-coated surface. After 10 min of incubation at 37°C and 5% CO_2, culture media was removed and cells were washed twice with PBS (1X). Then, adhered cells were counted manually using *phase contrast microscopy* (Zeiss Axiophot, Carl Zeiss France) in each well. Their percentage was normalized to starting cells number. The adhesion test was repeated 3 times (n = 3) in the same conditions.

II.4.6. In vitro proliferation of HUVEC cells on polymer films

The HUVEC proliferation was determined after 24h, 48h and 72h of incubation after initial cell seeding on the different polymer films with the cell culture media. HUVEC cells were cultured as described in the "cell culture" section. Three samples of each polymer film surface were used for each proliferation time and repeated three times on different passage number on different days (n = 3) occupying the same duration for incubation. The proliferation was determined by enzymatic activity measurement of lactate dehydrogenase [28] in the HUVEC-conditioned medium using a colorimetric LDH assay (Promega).

II.5. Statistical Analysis

All data are expressed as mean ±S.D. (Standard Deviation) unless indicated otherwise and analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA). A difference of $p < 0.05$ was considered significant.

III. Results and discussion

III.1. Physicochemical properties

III.1.1. Atomic Force Microscopy (AFM)

If these polyesters are approved for covering the metallic stents, they will be in direct contact with the blood and cells. It is so important to know their surface properties to better understand the biomaterials / biological environment interactions and the phenomenon of surface wettability, of adhesion and protein adsorption. For that reason, atomic force microscopy analysis (AFM) is used in this study to investigate the topography and roughness of the surface polymers film and to finally verify the possible correlation between the surface morphology and cell behavior.

Figure 3 shows the 3D AFM images of the top surface of the different samples: glass without polymers and the thin films of PLA, 10/90, 20/80 and 30/70 deposited on the glass coverslips from solutions within the same scan areas of 10 µm x10 µm, while presenting the cross-sectional profile as a function of vertical distance for each analyzed AFM surface. Hence, for compare and obtain the detailed view of the investigated samples topography, several AFM parameters were studied in this chapter: root mean squared roughness (*RMS*), skewness (*RSk*) and kurtosis (*RKu*).

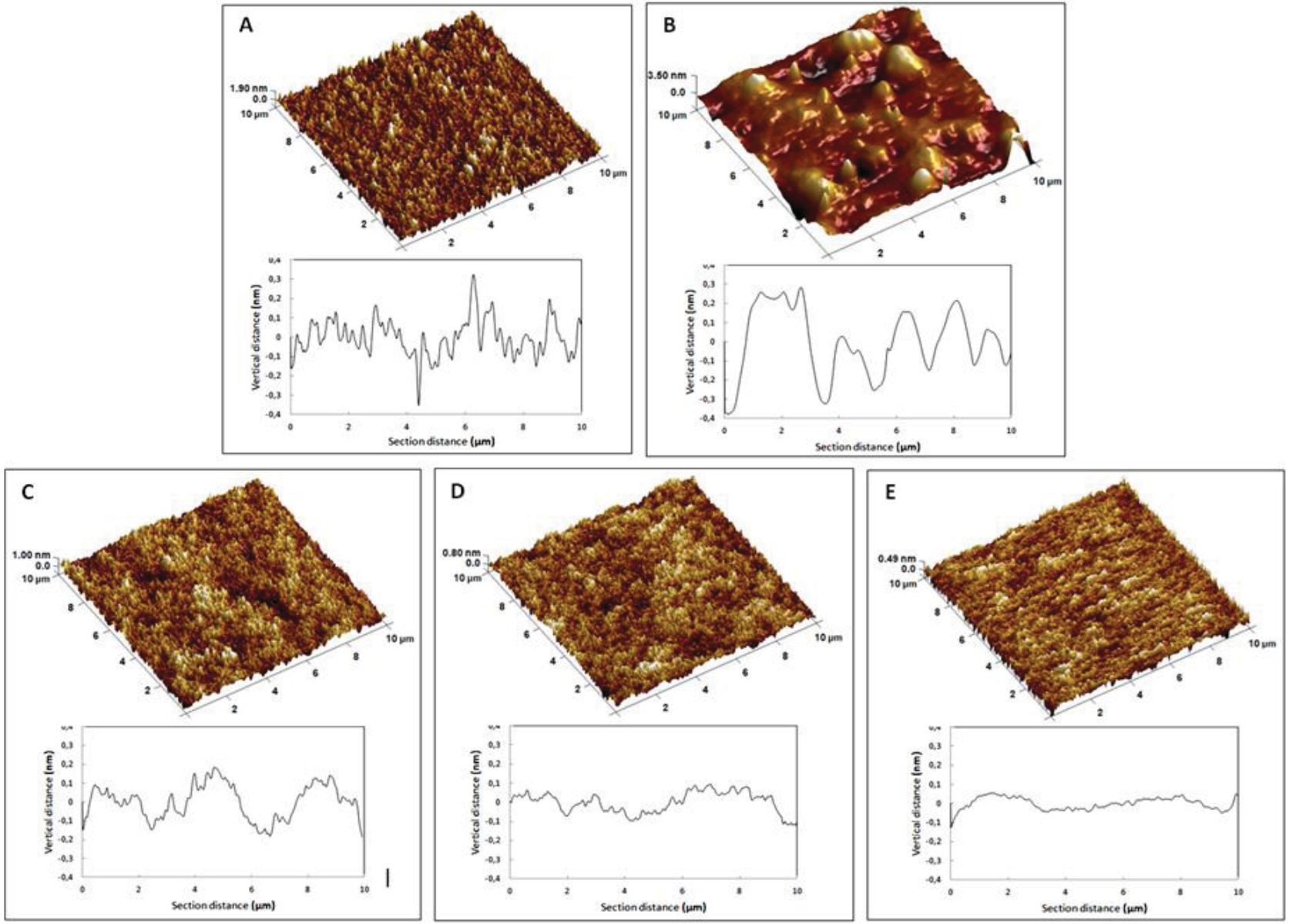


Figure 3. Polymers AFM and Cross-sectional profiles of (A) Glass, (B) PLA, (C) 30/70, (D) 20/80 and (E) 10/90.

a- Height Parameters

This study revealed that the three copolymers roughness is very low and their 3D AFM images show more favorable surface parameters in comparison with those of the bare glass and the PLA. Effectively, *RMS* values representing the standard deviation and the distribution of surface heights are documented in figure 4 (average values) that found to be 0.464 ± 0.008 nm, 0.680 ± 0.127 nm, 0.134 ± 0.003 nm, 0.231 ± 0.011 nm and 0.273 ± 0.019 nm for glass, PLA, 10/90, 20/80 and 30/70, respectively. These values showed that the 10/90 has the smoothest surface with a very low *RMS* value (0.134 ± 0.003 nm) whose average height is only 0.491 ± 0.009 nm. Whereas, the commercial PLA sample has the roughest surface (*RMS* = 0.680 ± 0.127 nm) and the average height is 3.042 ± 0.709 nm, while the average height for glass, 20/80 and 30/70 is intermediate between these two last values: 1.783 ± 0.161, 0.831 ± 0.026 and 0.979 ± 0.037 nm, respectively (figure 4).

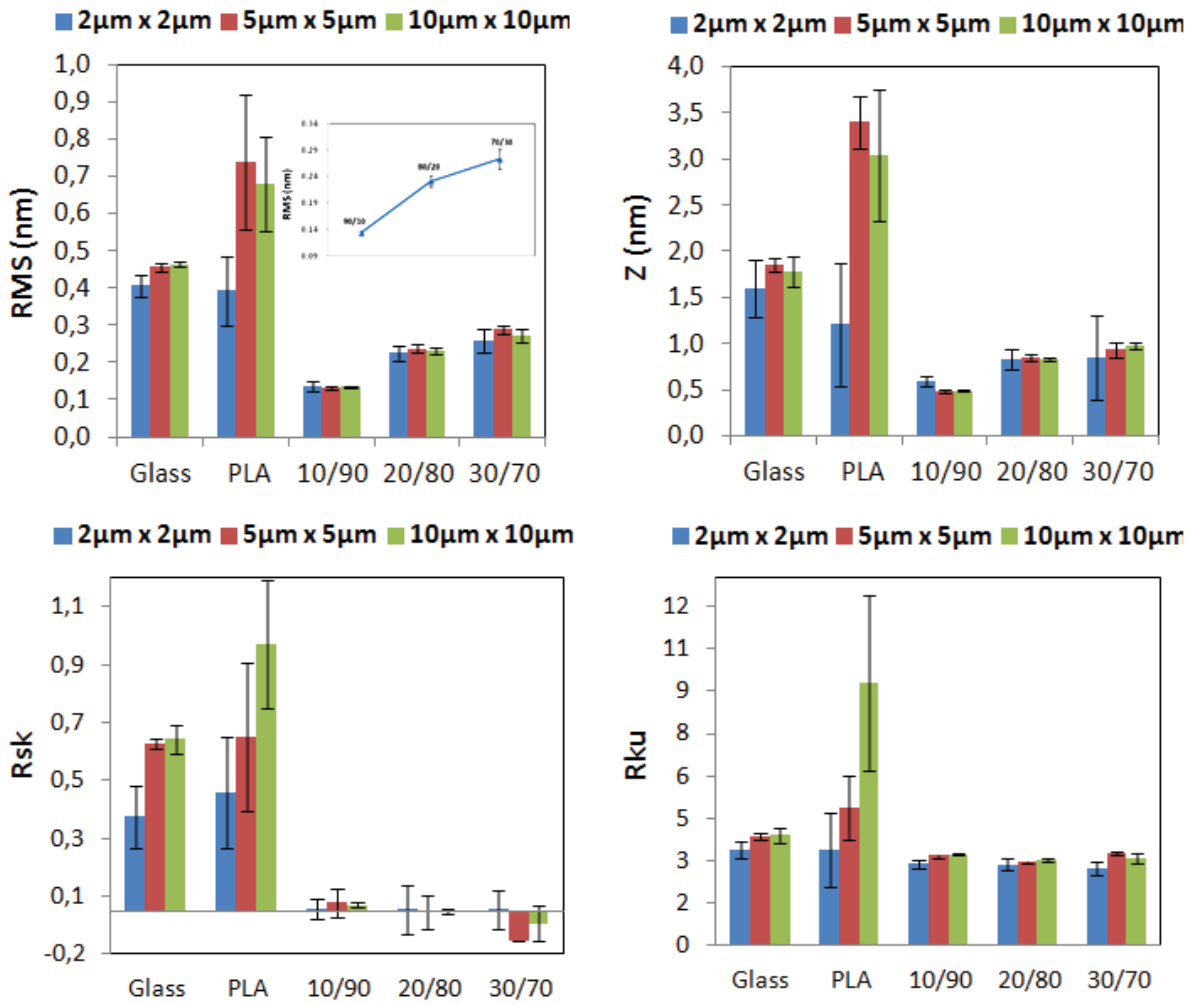


Figure 4. Average values of RMS, Z, Rsk and Rku for all polymers : (A) Glass, (B) PLA, (C) 30/70, (D) 20/80 and (E) 10/90.

Figure 3 showed Cross-sectional profiles as a function of vertical distance that revealed the difference between the five surfaces. This average height profile difference is due to either the difference of surface (glass/polymer), to the difference of the main chain of polymers (PLA/PDMMLA) or to the difference in side-chain composition indicating this time the three copolymers.

The cross-section profiles of the surface structure of polymer films appear not similar to the glass structure. It shows in sequence that the peak intensity increases with the increase of the amount of COOH in the side chain of the three copolymers which is explained by the increase in the surface chemical heterogeneity. The 10/90 sample which has the lowest COOH content (10%) appears almost linear with very small and not-sharp peaks throughout the scan, having very low heights making the smoother surface. On the contrary, 30/70 which has 30% of COOH side-chain, shows the tallest height profile and 20/80 which provides the average content of COOH, presents therefore an average profile of the cross-section. However, the PLA sample shows unusual intense and large peaks. The reason is not clear but in accordance with the literature [25].

RMS values reveal also this significant difference between the samples surfaces. This difference is translated in figure 4 demonstrating that the surfaces had a slightly higher profile after a certain amount of COOH in the copolymers side-chain (figure 3) and *RMS* value was increased with increasing of COOH content. A correlation is also observed for glass and PLA having higher *RMS* values. In fact, these surfaces present low values to very low for copolymers. They remain smooth without exceeding the *RMS* value of 0.1 µm according [26].

b- <u>Functional or Statistical Parameters</u>

RMS characterizes the height of irregularities of profile at different paces but not the form and *finish* of the surface roughness. It is thus not sufficient to fully characterize the finish and the flattening of the materials surface. Indeed, several forms presenting different appearance profile can have very similar *RMS* values but they may have a completely different behavior in friction and wear.

To reinforce the previous conclusion and give more information about the surface of different samples and so characterize the tribological profile in respect of the physiological environment, Skewness (*RSk*) and Kurtosis (*RKu*) are studied in this work.

RSk and *RKu* are parameters used to measure the asymmetry about mean line (surface topography) and the sharpness and the flatness (surface quality), respectively. It is worth to

note that peaks and valley are the reasons for the roughness and that a Gaussian distribution has an asymmetry coefficient equal to zero and a spreading coefficient equal to 3.

When *RSk* is zero, the height distribution is symmetrical. A positive *RSk* value indicate asymmetrical height distribution having more peaks than valleys, while a negative *RSk* value is a sign of a more planar surface and valleys are predominant. The profiles with RSk negative value have better friction behavior and therefore at wear.

When the distribution has a Gaussian amplitude, *RKu* is 3 (Mesokurtic surface). A profile with *RKu* > 3 indicates the presence of more peaks than valleys, while if *RKu* < 3, the surface is flat (Platykurtic surface).

Following this logic, we interpret the results summarized in the above figure 4 The *RSk* average values were found to be positive for glass (0.592 ± 0.050), PLA (0.919 ± 0.220) and 10/90 (0.020 ± 0.010) and negative for 20/80 (-0.002 ± 0.009) and 30/70 (-0.043 ± 0.061). These values are very close to zero for the three copolymers, so that the three films present a symmetrical surface compared to glass and PLA results. The 20/80 and 30/70 are the more planar films with a negative value close to zero.

Besides, *RKu* values presented in figure 4 suggested that all samples gave almost similar average values which are close to 3, except PLA: glass (3.90 ± 0.277), 10/90 (3.226 ± 0.045), 20/80 (3.019 ± 0.045), 30/70 (3.112 ± 0.181) and PLA who has value equal to 9.276 ± 3.086. Therefore, varying the amount of side-chain COOH from 10% (10/90) to and 30% has almost no influence on flattening of copolymers films indicating an intimate homogeneous mixing of the copolymers hydrophobic and hydrophilic compositions. It is observed that RSk and RKu parameters vary simultaneously.

In conclusion, although the three copolymers present significant differences observed between the different results obtained with all parameters studied in this chapter, the appearance of the three copolymers films in 3D AFM images is almost indifferent. One homogenous phase is observed, neither the two heterogeneous side-chains were visible nor a dispersion of both hard and soft deposits on the different surfaces of copolymers, indicating that the three copolymers showed a uniform and smoother profile with a planar and symmetric surface which represent an opportunity to be an innovative and favorable coating candidate for metallic endovascular stents.

In order to prove this homogeneity and uniformity throughout surface of the copolymers film in comparison with PLA film, several scans were made at different places within the

same scan areas for each sample: 10x10 μm^2, 5x5 μm^2 and 2x2 μm^2 followed by a statistical study determining thus the standard deviation on the different parameters for each surface. All histograms previously presented, summarize *RMS*, *RSk* and *RKu* results obtained on these different areas scans where no significant differences in the three groups (10x10 μm^2, 5x5 μm^2 and 2x2 μm^2) for copolymers and glass are observed. This reproducibility of the different results was obtained with very small standard deviations for each parameter. On the contrary, a significant difference was observed between PLA groups for each parameter which reveals the presence of plan and symmetric areas simultaneously with rough and asymmetric regions irregularly dispersed. For example, figure 5 showing 2D AFM images of PLA and 10/90 copolymer confirmed this difference. Note that for the 10/90, whatever the area scan (10x10, 5x5 or 2x2 μm^2), the surface is homogeneous and uniform, unlike the PLA which represented simultaneously very smooth zones (2x2 μm^2) and rough regions (10x10 and 5x5 μm^2) (figure 5).

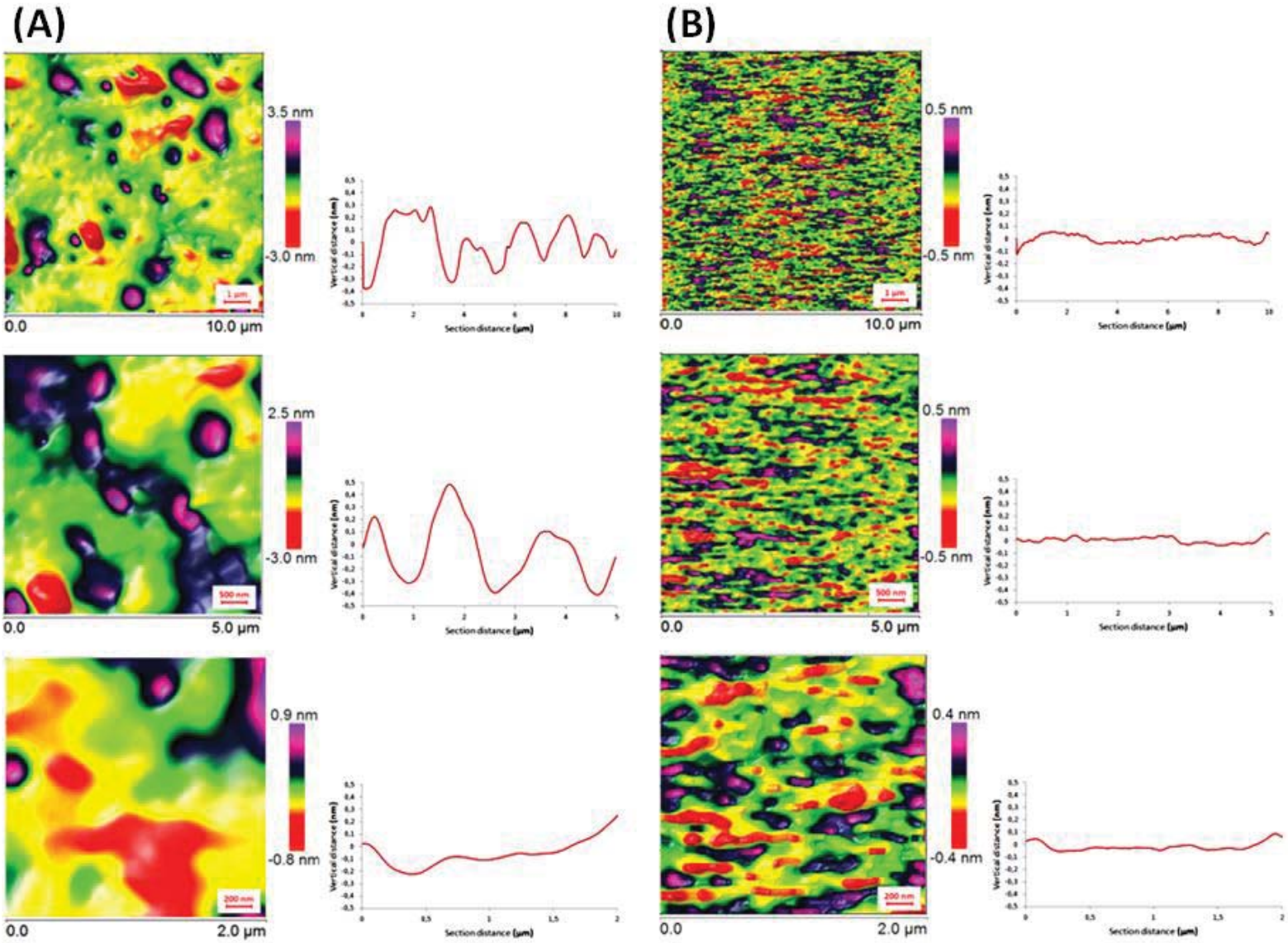


Figure 5. 2D AFM images of (A) PLA and (B) 10/90 in area scan, 10x10, 5x5 and 2x2 µm^2.

III.1.2. Thermal properties

For understand and also explain the change of mechanical properties of the different copolymers with the change of the proportion of homopolymers, the DSC analysis provides values on glass transition temperature (T_g) is likewise evaluate in this work. According to a number of studies in literature, the flexibility of the polymer chains, steric hindrance, intermolecular attractions, forces and and other steric effects are the main effects that influencing on T_g values [27].

As mentioned before, the three copolymers studied here containing the mixture of PDMMLAH and PDMMLAHe having only difference in the side chain, carboxylic acid chain and hexyl alkyl chain, respectively. Characteristically, the cured polymer PDMMLAH has a higher T_g reaches a maximum at +69.9 °C owing to the mobility restriction of the chains. This phenomenon is explained by the large number of hydrogen bonds formed by interchain interactions. Contrarily, the presence of hexyl group in the side chain of PDMMLAHe as a free chain makes the movement of polymer chains as possible and more flexible decreasing the T_g to a low value reaches a minimum at -15°C. In this case the polymer appears as a soft and viscous system which was also apparent from rheological studies discussed later. Interestingly, the mixture of these two homopolymers increases the system flexibility and decrease its viscosity with a decreasing of PDMMLAH content and an increasing of PDMMLAHe content respectively, ameliorating so its T_g value. Accordingly, the elasticity and the rigidity of the copolymers are modified as required, playing on the amount of both homopolymers.

The T_g data obtained based on this logic for each of the three copolymers are shown in representatives DSC traces in figure 6. In addition, any melting or crystallization events are observed, indicating that all of the copolymers are amorphous. All of the materials are statistical confirmed by the single T_g value observed for of each of them. The point of the inflection of DSC scans determined the T_g that is obtained with a significant difference for the three samples. Considering that the T_g in our case varies from -15°C to +69.9°C, the T_g values of the three copolymers are logically found intermediate between these two values: -14.2°C, +8.2°C and +20°C corresponding in the same other to $PDMMLAH_{10}$-*co*-He_{90}, $PDMMLAH_{20}$-*co*-He_{80} and $PDMMLAH_{30}$-*co*-He_{70}. Finally, these different values don't reach the physiological temperature as compared to PLA which has a higher T_g (about 63°C) having thus less ductility and softness.

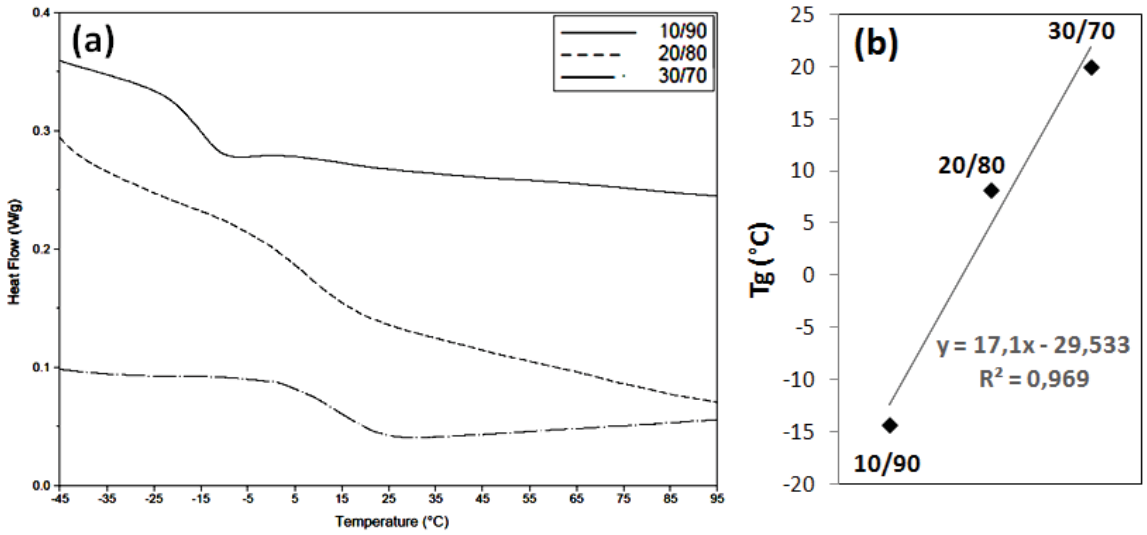


Figure 6. (a) 2nd DSC heating scans for PDMMLAs (10/90, 20/80 and 30/70) and (b) linear relation between polymers compositions and their T_g values.

In addition, in order to better understand the thermal stability of PDMMLA polymers studies in this work, TGA was performed in a range of 0 and 700°C. Figure 7 showed the thermogram curves of different copolymers (10/90, 20/80 and 30/70). They exhibited an initial thermal degradation at about 160°C. However, 5% of their weight loss temperature was obtained at 246, 266 and 230°C, respectively. Their decomposition temperature (T_d) within 5% of weight loss temperature was found, respectively, at 331, 323 and 307°C. Finally, their degradation was essentially observed around 400°C.

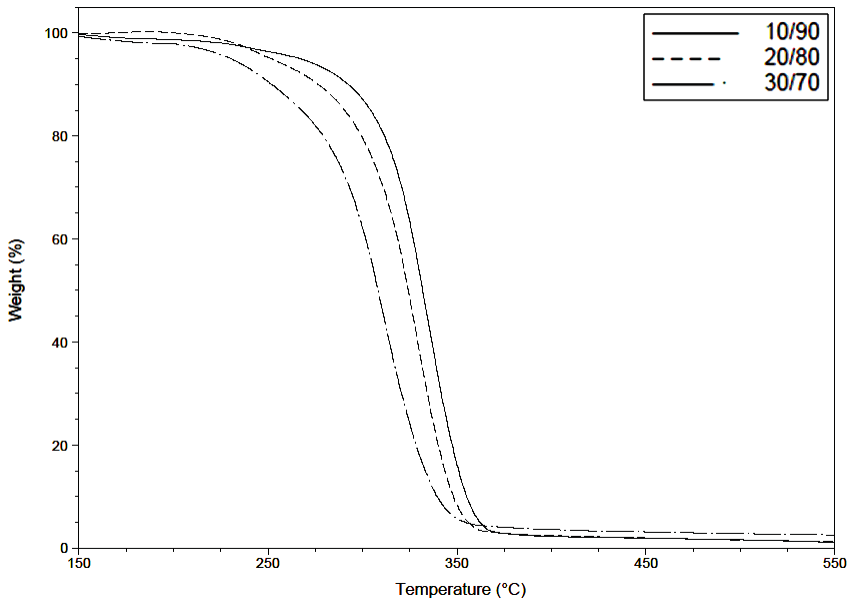


Figure 7. TGA curves for PDMMLAs (10/90, 20/80 and 30/70).

Thus, 10/90 presented the highest T_d whereas 30/70 exhibited the lowest value. 20/80 has a T_d value between those of the author polymers. This indicated the homogenous mixture of the two systems contained in all copolymers. They have also good thermal properties and great stability.

III.1.3. Rheological properties

The rheological study was investigated in order to determinate the viscoelastic properties of the film polymers at 37°C. Figure 8 showed the obtained data of elastic modulus (G'), loss modulus (G") and the mechanical damping parameter (tan δ) of the different samples at a deformation frequency of 1Hz and 37°C. In addition, the effect of the ratio of functional groups (hydrophilic/hydrophobic) on the viscoelastic behavior of PDMMLA copolymers was also studied.

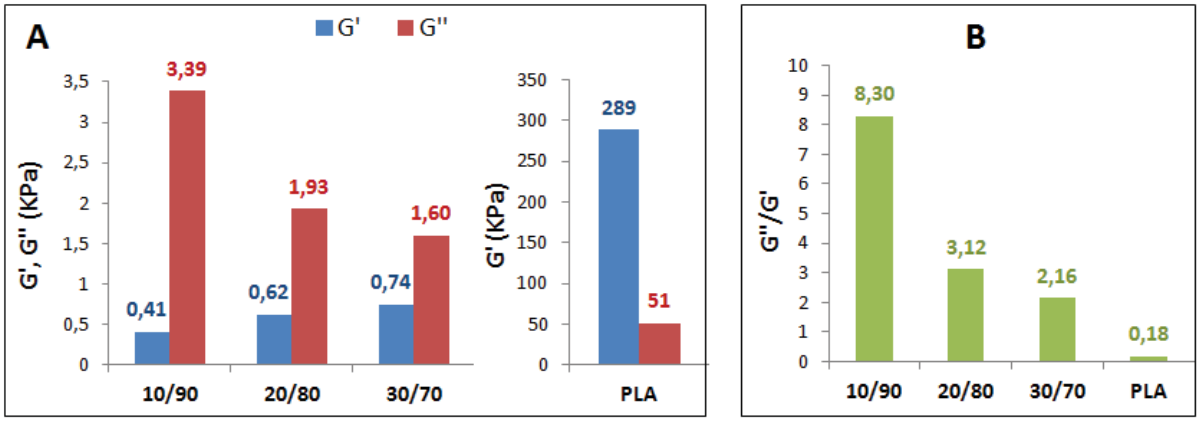


Figure 8. Rheological properties of different PDMMLA polymers (10/90, 20/80 and 30/70) and PLA as a function of their chemical composition carried out at 37°C and 1Hz. (A) storage modulus (G') and loss modulus (G") and (B) mechanical damping parameter (tan δ).

Indeed, it was found that the loss modulus (G") was linearly decreased with the increase of carboxylic acid groups in polymer chains while elastic modulus (G') was slightly increased. Also, the mechanical damping parameter (tan δ) was remarkably decreased with the increase of acidic functions in the chain of the different polymers 10/90 (tan δ = 8.3), 20/80 (tan δ = 3.12) and 30/70 (tan δ = 2.16). Therefore, the percentage of hydrophilic groups in the side chain of polymers affected not only their thermal behavior but also their viscoelastic properties. Herein, it was found that the three polymers have a mixture of viscous and elastic behavior while the viscous character was more predominantly. In contrast, PLA exhibited

very high value (288.53 KPa) of elastic modulus (G') which indicated the stiffness of a viscoelastic material as compared to PDMMLA polymers. Contrary, it has very low loss tangent (tan δ) value (0.18). So, PLA has more elastic character than viscous.

These results are in accord with DSC results which showed that the rigidity of the polymer chains decreased with the decrease of the carboxylic acidic groups. In summary, as a comparison between the PDMMLAs amorphous polymers, 10/90 was the most viscous and 30/70 the most elastic. 20/80 owned the average values of all parameters. This means that they have viscoelastic character and flexible chains which can be modulated with varying hydrophilic/hydrophobic balance whereas PLA has high rigidity and ductility.

III.2. Biocompatibility

III.2.1. Cell attachment conditions

Endothelial cells adhered to the surface and spread in good conditions. In order to determinate the best pretreatment conditions for HUVECs adhesion, their attachment on the surface of each polymer films was carried out after pre-incubation with three culture media containing different fetal calf serum (FCS) percentages (0%, 12% and 100%) for 2 hours. Cell assessment and morphology were observed by phase contrast microscopy during 3 hours after cell seeding on the polymeric surface. Figure 9 showed the photos of 30/70 films in different conditions. It was found that the spreading and adhesion of cells increased with the increase of FCS percentage in the culture media. Indeed, they changed their form from a spherical (black arrows) to a well spread and flat shape (dotted red circle).

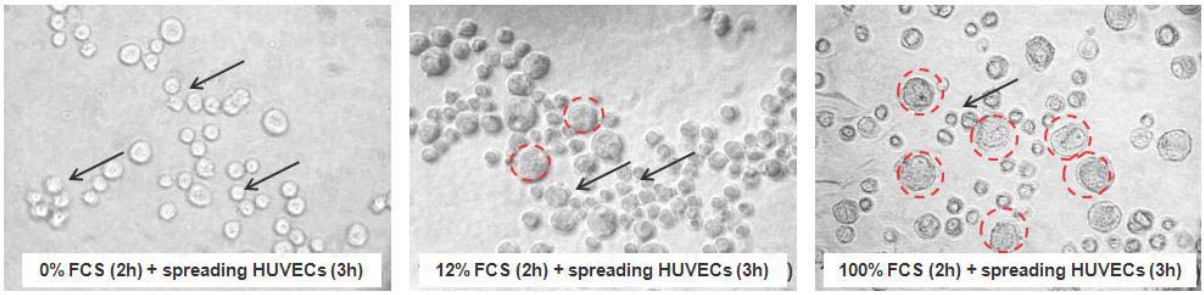


Figure 9. Observation of the HUVEC attachment on 70/90 polymer film by phase-contrast microscopy (x20 objective).

In conclusion, this test was conducted to determine the best biopolymer-based films conditions for the cell culture. The pretreatment of polymer surfaces with 100% FCS during 2h prior to cell culture was chosen for all other assays in this work.

III.2.2. Spreading test of HUVEC cells on polymer films

The cell spreading assay was performed to evaluate, in the presence of different PDMMLA films, the morphology and the change of the cytoskeletal assembly of HUVEC cells. Figure 10 presented the results of cell spreading, morphology and actin cytoskeleton structure of different studied surfaces using phase-contrast microscopy and fluorescence microscopy imaging.

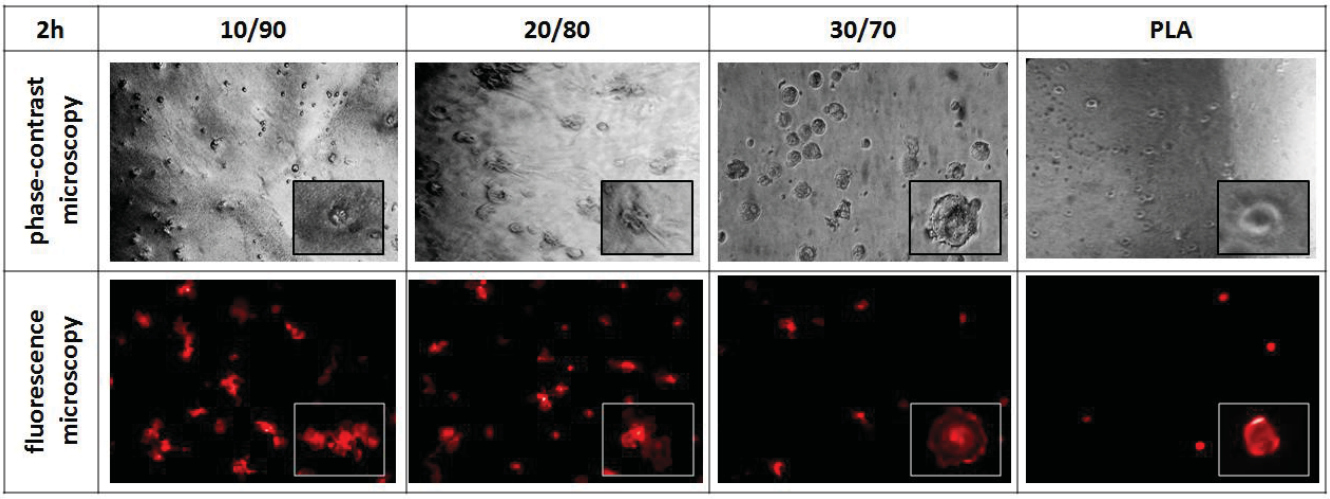


Figure 10. Observation of the HUVEC spreading on 10/90, 20/80 and 30/70 polymer-based films by phase-contrast microscopy (upper panel, x20 objective) and fluorescence microscopy (lower panel, x10 objective).

These results showed that the spreading of HUVECs in the presence of 10/90 polymer was found more pronounced as compared to the other PDMMLA surfaces. It presented the most hydrophobic surface. In the case of PLA, cells had spherical form and they were not spread.

In addition, the area of HUVEC cells was measured. Figure 11 illustrated the histogram of the measurement area as a function of polymer surfaces.

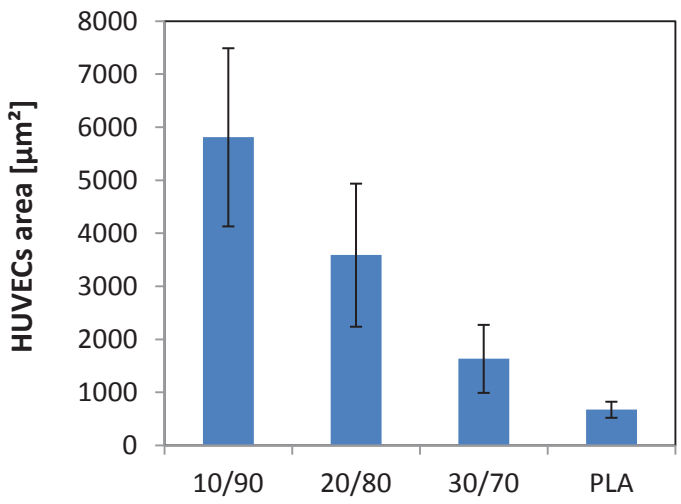


Figure 11. HUVEC area (µm^2) after 3h of cell culture on different polymer (10/90, 20/80, 30/70 and PLA).

These results confirmed those observed in figure 10. The cell spreading decreased with the increase of hydrophilic groups in the PPDMMLAs chains. PLA surface did not permit the optimal cell spreading and lead to the high decrease of cell area.

III.2.3. HUVEC cells morphology on polymer films

Figure 12 showed that the HUVEC cell are well spred on the 70/30 polymers up tu day 5 of cell culture, however the 80/20 and 10/90 did not permit good cell spreading. In addition, in presence of 80/20, HUVEC can not be homogenously distributed on the whole polymer sourface, but they are agregated and formed the small sphere-like 3 dimentinal cell culture from day 3 to 5. In 10/90 culture condition, HUVEC are agregated forming the sphere-like 3 dimentinal cell culture and the polymer monolayer is totally distroyed at day 5.

In conclusion, 30/70 was the more preferred for more favorite surface for HUVECs proliferation.

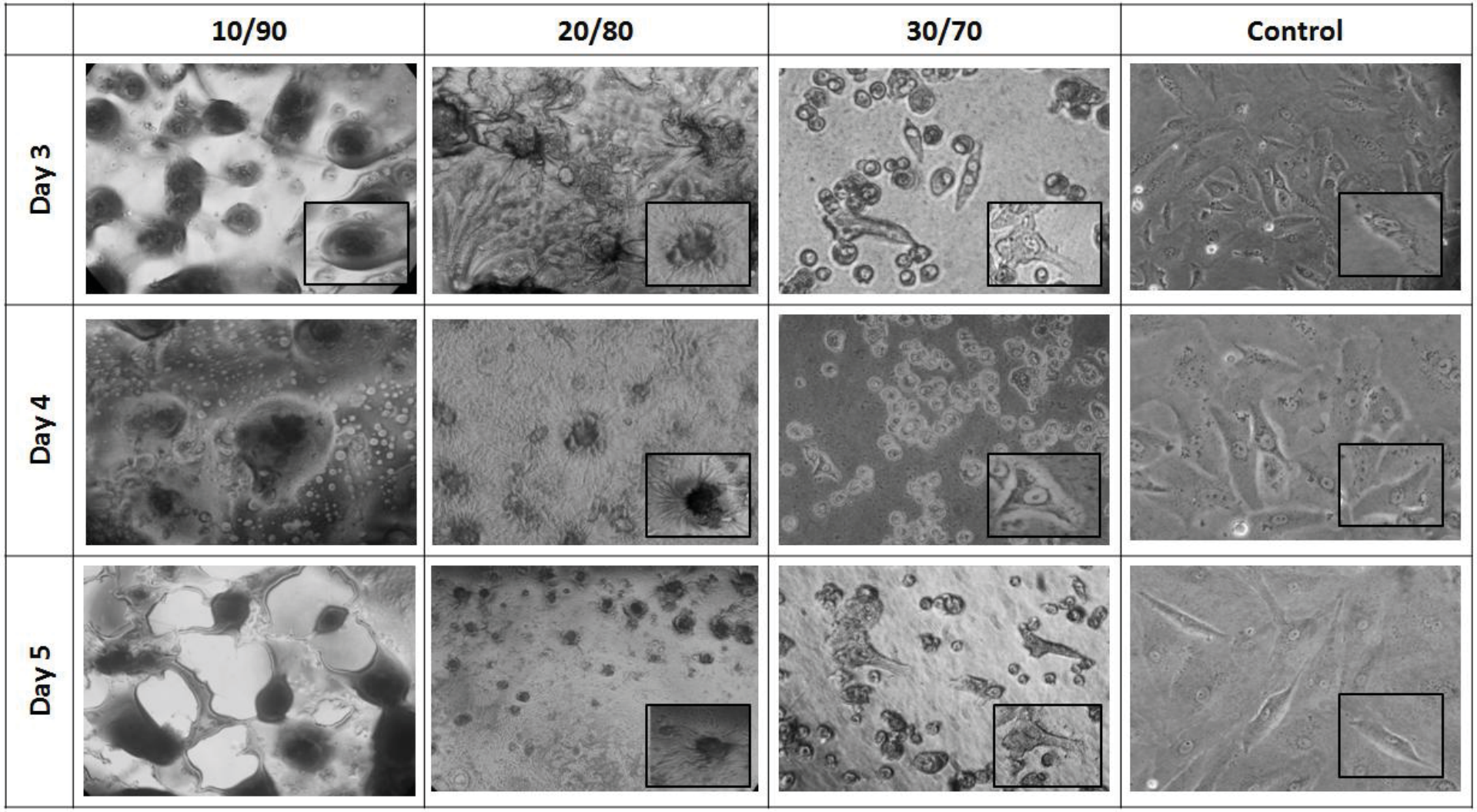


Figure 12. Cell morphology of different polymer surfaces (10/90, 20/80, 30/70) and control by phase-contrast microscopy (x20 objective).

III.2.4. In vitro HUVECs adhesion

In vitro adhesion assay was performed to evaluate the HUVECs attachment for 10 min. Figure 13 gave a comparison between the adherent cells on the different polymer films. Consequently, it was found that the 10/90 coated film was the densest surface which reached almost 50% after only 10 min of incubation and so exceeded the control surface. However, the cell adhesion decreased with the decrease of hydrophilic ratio in the chain PDMMLA polymers. The 20/80 and 30/70 have almost the same percentage of cell adhesion whereas PLA have the smallest percentage. This indicated that 10/90 is the more preferred for the HUVECs adhesion.

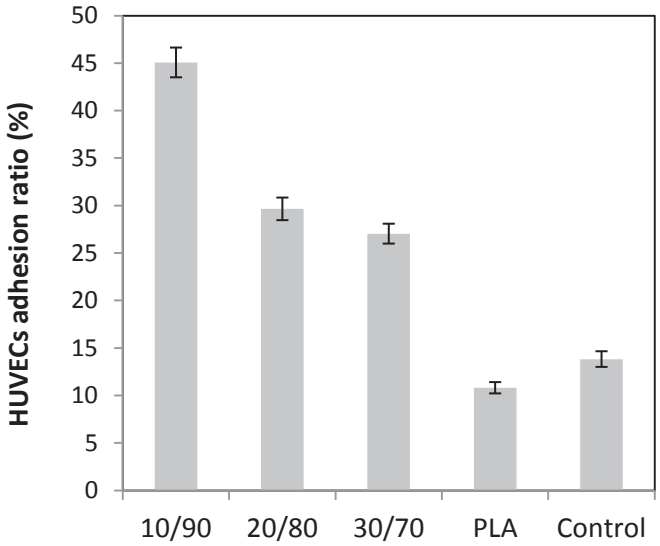


Figure 13. HUVECs adhesion percentage on the polymer films and control (without coated polymer).

III.2.5. In vitro monocytes adhesion

After the stent implantation, the monocytes may be activated at the alteration site. This means that, the polymer stent coating should not favor their adhesion on the recovered stent surface. Thus, the adhesion of monocytes MM6 was investigated in this work within 10 min of incubation. Figure 14 illustrated that the 10/90 is also the densest surface with the PLA while 20/80, 30/70 and control exhibited a lower monocytes adhesion. The 30/70 film was the more suitable surface in this area.

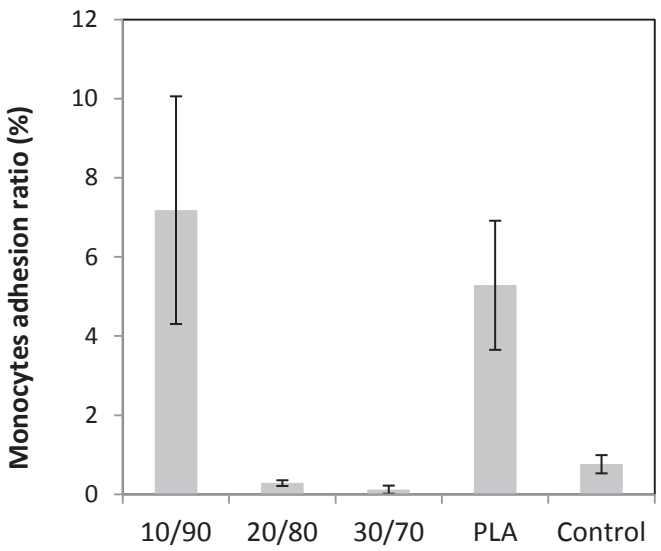


Figure 14. Monoctes adhesion percentage on the polymer films and control (without coated polymer).

III.2.6. In vitro proliferation of HUVECs cells on polymer films

The proliferation assay was performed on the different surface films on 1, 3 and 5 days using LDH test. Analysis of the results of this study are in progress.

IV. Conclusion

In the present paper, we focused on the study of physicochemical properties and biocompatibility of PDMMLAs. Obtained results were compared in each case with those of PLA which is the most used material as polymer stent coating. The PDMMLAs have good thermo-mechanical, rheological and surface properties. They have a viscoelastic behavior which favorite its use in this field contrary to PLA which has thus less ductility and softness. According to the study of their spreading, morphology, behavior, adhesion of HUVEC cells and monocytes, we have found that PDMMLAs own good biological response which can be adjusted with their chemical modification.

References

1. OMS/maladies cardiovasculaires. *Aide mémoire* **Mars 2013**, source: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/fr/index.html.
2. Haidopoulos, M.; Turgeon, S.; Sarra-Bournet, C.; Laroche, G.; Mantovani, D., Development of an optimized electrochemical process for subsequent coating of 316 stainless steel for stent applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2006,** 17, (7), 647-657.
3. Ng, X. W.; Huang, Y.; Liu, K. L.; Lim, S. G.; Chen, H. H.; Burnett, J. C.; Boey, F.; Chiang, Y.; Venkatraman, S. S., In Vitro Evaluation of Cenderitide-Eluting Stent I-An Antirestenosis and Proendothelization Approach. *Journal of pharmaceutical sciences* **2014,** 103, (11), 3631-3640.
4. Wang, Y.; Dong, P.; Li, L.; Li, X.; Wang, H.; Yang, X.; Wang, S.; Li, Z.; Shang, X., Biodegradable Polymer Drug-Eluting Stents Versus Second-Generation Drug-Eluting Stents for Patients With Coronary Artery Disease: An Update Meta-Analysis. *Cardiovascular Drugs and Therapy* **2014,** 28, (4), 379-385.
5. Jaganathan, S. K.; Supriyanto, E.; Murugesan, S.; Balaji, A.; Asokan, M. K., Biomaterials in cardiovascular research: applications and clinical implications. *BioMed research international* **2014,** 2014.
6. Huang, Y.; Ng, H. C. A.; Ng, X. W.; Subbu, V., Drug-eluting biostable and erodible stents. *Journal of Controlled Release* **2014,** 193, 188-201.
7. Ljubimova, J. Y.; Portilla-Arias, J.; Patil, R.; Ding, H.; Inoue, S.; Markman, J. L.; Rekechenetskiy, A.; Konda, B.; Gangalum, P. R.; Chesnokova, A.; Ljubimov, A. V.; Black, K. L.; Holler, E., Toxicity and efficacy evaluation of multiple targeted polymalic acid conjugates for triple-negative breast cancer treatment. *Journal of Drug Targeting* **2013,** 21, (10), 956-967.
8. Ding, H.; Helguera, G.; Rodriguez, J. A.; Markman, J.; Luria-Perez, R.; Gangalum, P.; Portilla-Arias, J.; Inoue, S.; Daniels-Wells, T. R.; Black, K.; Holler, E.; Penichet, M. L.; Ljubimova, J. Y., Polymalic acid nanobioconjugate for simultaneous immunostimulation and inhibition of tumor growth in HER2/neu-positive breast cancer. *Journal Of Controlled Release* **2013,** 171, (3), 322-329.
9. He, B.; Bei, J. Z.; Wang, S. G., Synthesis and characterization of a functionalized biodegradable copolymer: poly((L)-lactide-co-RS-β-malic acid). *Polymer* **2003,** 44, (4), 989-994.
10. He, B.; Bei, J. Z.; Wang, S. G., Morphology and degradation of biodegradable poly(L-lactide-co- β -malic acid). *Polymers For Advanced Technologies* **2003,** 14, (9), 645-652.
11. Lee, B. S.; Vert, M.; Holler, E., Water-soluble Aliphatic Polyesters: Poly (malic acid) s. *Biopolymers Online* **2002**.
12. Gasslmaier, B.; Krell, C. M.; Seebach, D.; Holler, E., Synthetic substrates and inhibitors of β-poly(L-malate)-hydrolase (polymalatase). *European Journal of Biochemistry* **2000,** 267, (16), 5101-5105.
13. Lee, B.-S.; Vert, M.; Holler, E., Water-soluble Aliphatic Polyesters: Poly(malic acid)s. In *Biopolymers Online*, *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA* **2005**.
14. Gasslmaier, B.; Krell, C. M.; Seebach, D.; Holler, E., Synthetic substrates and inhibitors of β-poly(L-malate)-hydrolase (polymalatase). *European Journal of Biochemistry* **2000,** 267, (16), 5101.
15. He, B.; Bei, J.; Wang, S., Morphology and degradation of biodegradable poly(L-lactide-co-β-malic acid). *Polymers for Advanced Technologies* **2003,** 14, (9), 645.

16. Liu, Y.; Wang, W.; Wang, J.; Wang, Y.; Yuan, Z.; Tang, S.; Liu, M.; Tang, H., Blood compatibility evaluation of poly (d, l-lactide-co- β-malic acid) modified with the GRGDS sequence. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2010,** 75, (1), 370-376.
17. Wang, W.; Liu, Y.; Wang, J.; Jia, X.; Wang, L.; Yuan, Z.; Tang, S.; Liu, M.; Tang, H.; Yu, Y., A novel copolymer poly (lactide-co- β-malic acid) with extended carboxyl arms offering better cell affinity and hemacompatibility for blood vessel engineering. *Tissue Engineering Part A* **2008,** 15, (1), 65-73.
18. Qian, J.; Xu, W.; Zhang, W.; Jin, X., Preparation and characterization of biomorphic poly (l-lactide-co- β-malic acid) scaffolds. *Materials Letters* **2014,** 124, 313-317.
19. Mozafari, M.; Gholipourmalekabadi, M.; Chauhan, N. P. S.; Jalali, N.; Asgari, S.; Caicedoa, J. C.; Hamlekhan, A.; Urbanska, A. M., Synthesis and characterization of nanocrystalline forsterite coated poly (l-lactide-co- β-malic acid) scaffolds for bone tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C* **2015,** 50, 117-123.
20. Sarah, L. K.; Vinh, X. T.; Cathrin, K.; Anais, P.-B.; Andrew, P. D., *Synthetic strategies, sustainability and biological applications of malic acid-based polymers*. 2014; Vol. 2, p 107-122.
21. Ouhib, F.; Randriamahefa, S.; Guerin, P.; Barbaud, C., Synthesis of new statistical and block co-polyesters by ROP of alpha,alpha,beta-trisubstituted beta-lactones and their characterizations. *Designed Monomers and Polymers* **2005,** 8, (1), 25-35.
22. Nurmikko, V.; Salo, E.; Hakola, H.; MÃ¤kinen, K.; Snell, E. E., The Bacterial Degradation of Pantothenic Acid. II. Pantothenate Hydrolase*. *Biochemistry* **1966,** 5, (2), 399.
23. Goodhue, C. T.; Snell, E. E., The Bacterial Degradation of Pantothenic Acid. III. Enzymatic Formation of Aldopantoic Acid. *Biochemistry* **1966,** 5, (2), 403-408.
24. Lähdesmäki, M.; Mäntsälä, P., Comparison of D-malate and β,β-dimethylmalate dehydrogenases from Pseudomonas fluorescens UK-1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology* **1980,** 613, (2), 266-274.
25. R. Belibel, T. A., A. Garcia, C. Barbaud and L. Mora, *Journal of Materials Science and Engineering C* **Accepted 02 October 2015.**
26. Barbaud, C.; Abdillah, F.; Faÿ, F.; Guerrouache, M.; Guérin, P., Synthesis of new alpha,alpha,beta-trisubstituted beta-lactones as monomers for hydrolyzable polyesters. *Designed Monomers and Polymers* **2003,** 6, (4), 353.
27. Kohn, F. E.; Vandenberg, J. W. A.; Vanderidder, G.; Feijen, J., The Ring-Opening Polymerization Of D,L-Lactide In The Melt Initiated With Tetraphenyltin. *Journal Of Applied Polymer Science* **1984,** 29, (12), 4265-4277.
28. Gonzalez, W.; Fontaine, V.; Pueyo, M. E.; Laquay, N.; Messika-Zeitoun, D.; Philippe, M.; Arnal, J.-F. o.; Jacob, M.-P.; Michel, J.-B., Molecular Plasticity of Vascular Wall During NG-Nitro-l-Arginine Methyl Ester-Induced Hypertension Modulation of Proinflammatory Signals. *Hypertension* **2000,** 36, (1), 103-109.
29. Davies, M. C.; Shakesheff, K. M.; Shard, A. G.; Domb, A.; Roberts, C. J.; Tendler, S. J. B.; Williams, P. M., Surface analysis of biodegradable polymer blends of poly (sebacic anhydride) and poly (DL-lactic acid). *Macromolecules* **1996,** 29, (6), 2205-2212.
30. Busscher, H. J.; Van Pelt, A. W. J.; De Boer, P.; De Jong, H. P.; Arends, J., The effect of surface roughening of polymers on measured contact angles of liquids. *Colloids and Surfaces* **1984,** 9, (4), 319-331.
31. LeboucherDurand, M. A.; Langlois, V.; Guerin, P., 4-carboxy-2-oxetanone as a new chiral precursor in the preparation of functionalized racemic or optically active poly(malic acid) derivatives. *Polymer Bulletin* **1996,** 36, (1), 35-41.

- **Conclusion de l'article 3**

Cet article a présenté dans un premier temps l'étude de la rugosité et la topographie de la surface des PDMMLAs amorphes en utilisant l'AFM. En effet, tous les polymères avaient une surface lisse, symétrique et aplatie. Ces caractéristiques ont été évalués à partir d'une étude approfondie de plusieurs paramètres tels que les paramètres de la hauteur (*RMS* et *Z*) pour analyser la hauteur maximale observée sur les images 2D et 3D des différentes surfaces et les paramètres statistiques (*Rsk* et *Rku*) pour l'analyse de la qualité de la surface des différents matériaux.

Dans un second temps, l'étude des propriétés thermiques et mécaniques des différents polymères a été effectuée. Par conséquent, ces études ont révélé de bonnes propriétés thermomécaniques des PDMMLAs en vue de leur stabilité thermique évaluée par une étude de TGA et une T_g inférieure à la température corporelle mesurée par DSC, ce qui leur confèrent un bon comportement de flexibilité des chaînes polymères.

Ces propriétés thermomécaniques ont été confrontées par une étude rhéologique à 37°C en imposant une fréquence de 1Hz. Les résultats d'analyse rhéologique ont démontré le caractère viscoélastique des PDMMLAs qui est affecté par la nature chimique des groupements fonctionnels sur la chaîne latérale des polymères. Le caractère des PDMMLAs est majoritairement visqueux en vue de sa valeur du facteur de perte (tan δ) qui est supérieure à 1. Le caractère visqueux diminue considérablement avec l'augmentation des groupements acides carboxyliques dans la chaîne polymère et donc la diminution de leur caractère hydrophobe.

Ces études qui évaluent la nature et la propriété structurale de la surface des films polymères ont été réalisées afin d'évaluer la surface des PDMMLAs avant leur utilisation en tant que revêtement de stents cardiovasculaires. Cette application nécessite tout d'abord de bonnes propriétés de surface afin d'améliorer la réponse cellulaire une fois le stent recouvert et implanté. Cette réponse qui est caractérisée par une force d'attachement, d'adhésion, d'étalement, de migration et de prolifération cellulaires est fortement affectée par les propriétés du biomatériau exposé à sa surface (rugosité, mouillabilité, viscoélasticité, …). Une meilleure ré-endothélialisation est la démarche la plus favorable pour accélérer la réparation artérielle après le traitement de l'artère sténosée.

Dans notre étude, nous avons évalué les PDMMLAs vis-à-vis des cellules endothéliales humaines (HUVECs). Les résultats d'étalement cellulaire ont démontré que le polymère

10/90 représentait le meilleur matériau d'adhésion après 10 min en contact avec les HUVECs. Il permettait ainsi un comportement d'étalement très fort au bout de 2h (test de spreading). Cependant, les cellules sont fortement adhérées dès leur premier contact avec la surface du 10/90. Cette forte adhésion au substrat provoque sa déchirure au fil du temps (résultats de la morphologie et comportement cellulaires). Par ailleurs, le 30/70 est le matériau qui est moins dense au vu de son comportement d'adhésion et le plus favorable en vue de l'étalement et le comportement d'adhérence des HUVECs à sa surface au fil du temps par rapport aux PDMMLAs (20/80 et 10/90).

Le 20/80 est le matériau qui présente des propriétés d'adhésion et d'étalement moyennes. Cela veut dire que, la réponse biologique des PDMMLAs en fonction du temps d'exposition aux HUVECs est influencée par leur nature chimique. Cela est en accord avec les définitions décrites dans la 3ème partie du chapitre I (paragraphe II-4).

Le PLA représente le matériau le moins favorable en comparaison avec les PDMMLAs. Il possède un caractère hydrophobe et rigide et une réponse cellulaire moins bonne. Les cellules exposées au PLA à cour terme sont de forme ronde et moins étalées.

Pour compléter cette étude, il reste à finir l'analyse des résultats de la prolifération des HUVECs sur les différents films polymères, de comparer les résultats obtenus et choisir finalement le matériau approprié pour la suite du projet afin de l'utiliser comme revêtement de stens cardiovasculaires. De plus, l'étude statistique sera effectuée ultérieurement.

ARTICLE 4

(En cours)

Résumé :

Cet article représente l'étude de la dégradation hydrolytique *in vitro* des PDMMLAs amorphes. Il est connu que les polyesters se dégradent dans l'organisme par hydrolyse. L'hydrolyse est une sorte de dégradation caractérisée par la diffusion des molécules d'eau dans les chaînes polymères. Ce processus peut provoquer la décomposition de la structure du polymère par clivage de ses groupements fonctionnels sensibles. Les facteurs qui influencent ce clivage sont généralement la masse molaire, la nature et la stabilité des groupements fonctionnels, l'hydrophobie, le pH, la cristallinité, les enzymes, la température.

Les PDMMLAs ont été élaborés pour une éventuelle utilisation comme revêtement de stent pour le traitement de la resténose. Il a été démontré qu'au-delà d'une période de 6 semaines après l'emplacement d'un stent nu, le risque thrombotique est toujours présent. Pour ces raisons, il est nécessaire que le matériau utilisé pour revêtir le stent soit complètement biodégradé et ses produits de dégradation soient assimilés par l'organisme dans une période inférieure à 6 mois afin de prévenir le risque de thrombose. Le revêtement actuellement recommandé est le polymère biodégradable et biocompatible qui peut libérer un principe actif dans une période de 2 à 6 mois suivant l'implantation du SEM qui représente la période de la réparation artérielle. Comme évoqué dans le premier chapitre, l'inconvénient principal des polymères biodégradables utilisés de nos jours comme revêtement des SEMs est le risque de thrombose tardive induit par ces polymères et/ou par leurs produits de dégradation. Cela est principalement lié à leur hydrophobie élevée.

Ainsi, une étude de dégradation des PDMMLAs et de biocompatibilité de leurs produits de dégradation a été réalisée. Dans le but de comprendre leur comportement de dégradation, plusieurs paramètres ont été étudiés en faisant varier le pH (5, 7,4 et 9), la température (25°C, 37°C et 50°C), la masse molaire (M_{th} ~ 20 000 g/mol et 200 000 g/mol) des polymères étudiés et la présence/absence des enzymes spécifiques ou non spécifiques (estérase et amylase,

respectivement). Pour ce faire, trois homopolymères (0/100, 100/0 et HP-OH) et trois copolymères (10/90, 20/80 et 30/70) ont été étudié :

- *Effet de charge et d'hydrophilie/hydrophobie* : 0/100, 100/0 et HP-OH.
- *Effet d'enzymes* : 0/100, 100/0, HP-OH, 10/90, 20/80 et 30/70.
- *Effet de la masse molaire* : 10/90, 20/80, 30/70.
- *Effet de la température* : 20/80 de masse molaire élevée.
- *Effet du pH* : 30/70 de masse molaire élevée.

La dégradation a été effectuée dans le PBS sur une période de 6 mois.

Poly((R,S)-3,3-dimethylmalic acid) derivatives as a promising cardiovascular metallic stent coating: Biodegradation and biocompatibility of the hydrolysis products in human endothelial cells

R. Belibel[1], N. Marinval[2], H. Hlawaty[2], C. Barbaud*[1]

[1]INSERM U1148, Laboratory for Vascular Translational Science (LVTS), Institut Galilée, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, 99 Avenue Jean-Baptiste Clément, Villetaneuse, F-93430, France.

[2]Inserm U1148, Laboratory for Vascular Translational Science, UFR SMBH, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Groupe Biothérapies et Glycoconjugués, Bobigny, F-93430, France.

*Corresponding author. Tel.:+33(0)149403357. Fax: +33(0)149403083.

E-mail address: barbaud@univ-paris13.fr (C. Barbaud).

Abstract:

In-stent restenosis is currently treated with drug eluting stents based on biodegradable polymers which can deliver a therapeutic agent and be degraded in a few months preventing the risk of thrombosis. Poly([*R,S*]-3,3-dimethylmalic acid) (PDMMLA) is a new and original biodegradable and biocompatible polymer which contains a carboxylic acid functional group in its side chain. This gives it the particularity to be chemically modified and custom-synthesized to meet an adequate degradation time. It was prepared in order to develop new coating exhibiting different groups in its side chain and give natural and non-toxic primary products after a complete degradation. Herein we present the study of hydrolytic degradation of PDMMLAs under physiological conditions for a 6-month period. The most important factors that influence the kinetic degradation of polymers (molecular weight, nature and stability of functional groups, natural biological enzymes, pH and temperature) were studied in order to understand the behavior of PDMMLAs hydrolysis. Since these new biomaterials as promising coating-stent will be in direct contact with the arterial wall, their biocompatibility was evaluated in this study in human vascular endothelial cells which are essential for the repair of the arterial wall to inhibit multiple processes leading to in-stent restenosis.

Keywords:

Biodegradable (poly([*R,S*]-3,3-dimethylmalic acid), biocompatible, hydrolytic degradation, cytotoxicity, human endothelial cells.

I. Introduction

In the last decade, synthetic biodegradable polyesters were widely used in the biomedical field [1-4]. They can be tailored by chemical modification to meet the requirements of some applications unlike natural ones. Indeed, the chemical modification of biomaterial adjusts on the one hand, the mechanical and biological properties of biomaterial and, on the other hand, the grafting of drug and the control of polymer kinetic degradation and drug-release. Among the family of synthetic and biodegradable polymers, we are interested in side-chain-functionalized polymers, especially poly(malic acid) (PMLA) [5, 6]. Therefore, it is the most frequently used synthetic polyester which can be chemically modified through to the presence of acidic function in its side chain. In addition, it is known for its water-solubility, good biocompatibility, non-cytotoxicity, non-immunogenic properties, stability in the bloodstream and human cells affinity [5, 7-12]. A variety of PMLA derivatives were prepared through the synthesis of a large family of monomers (malolactonates) or by copolymerization with other biodegradable polyesters such as poly(L-lactic acid) (PLA), poly(glycolic acid) (PGA) and poly(ε-caprolactone) (PCL). These copolymers have been mainly used in tissue engineering, as drug delivery systems and as vascular prostheses [13].

Currently, biodegradable polyesters-coated stents with these polyesters are the essential cardiovascular implants used in modern medicine to treat the intra-stent restenosis. This pathology is the result of endothelium damage and the proliferation and migration of vascular wall cells, smooth muscle cells (SMCs), after stent implantation. This is also associated with thrombotic risk. Therefore, polymer-coating should initially favor the re-endothelialization, minimize SEM cells migration and avoid the late thrombosis [14, 15]. For this reason, synthetic and functional biodegradable polyesters before mentioned are the promising family which displays high relevance to satisfy the requirements of this cardiovascular application. In contrast, they have not proven themselves. This is mainly associated to their hydrophobicity and their slow degradation rate. Indeed, PLA which is the most used synthetic polymer as a cardiovascular implant, it displays a limited cell response and poor interaction with body tissue and fluids, poor hydrophilicity, slow degradation and poor ductility (higher glass temperature) which requires its copolymerization to improve its properties (PLGA [16, 17], PLMA [10, 11, 18-20],, …).

The development of the appropriate biomaterial which has good mechanical properties, accelerates re-endothelialization, delivers a drug and degrades completely is the challenge of scientific and medical research in the last decade. To this end, poly([*R*,*S*]-3,3-dimethylmalic

acid) (PDMMLA) derivatives which are part of the PMLA family will be prepared for an eventual use as stent-coating. They can be custom-synthesized to meet an adequate degradation time. In addition, its structural design was chosen to give natural and non-toxic primary products after a complete degradation. The hydrolysis of amorphous PDMMLAs gave the corresponding [*R*,*S*]-3,3-dimethylmalic acid (diacid). Indeed, the final product of hydrolytic degradation of chiral PDMMLA ((*R*)-3,3-dimethylmalic acid) is a natural and non-toxic product that enters the biosynthetic pathway of pantothenate. This metabolite present in the synthesis of Coenzyme A gives ketovaline by enzymatic oxidative reaction catalyzed by β,β-dimethyldehydrogenase (EC.1.1.1.84) [21, 22]. (Figure 1). Therefore, it was noted that these polymers are bioassimilable.

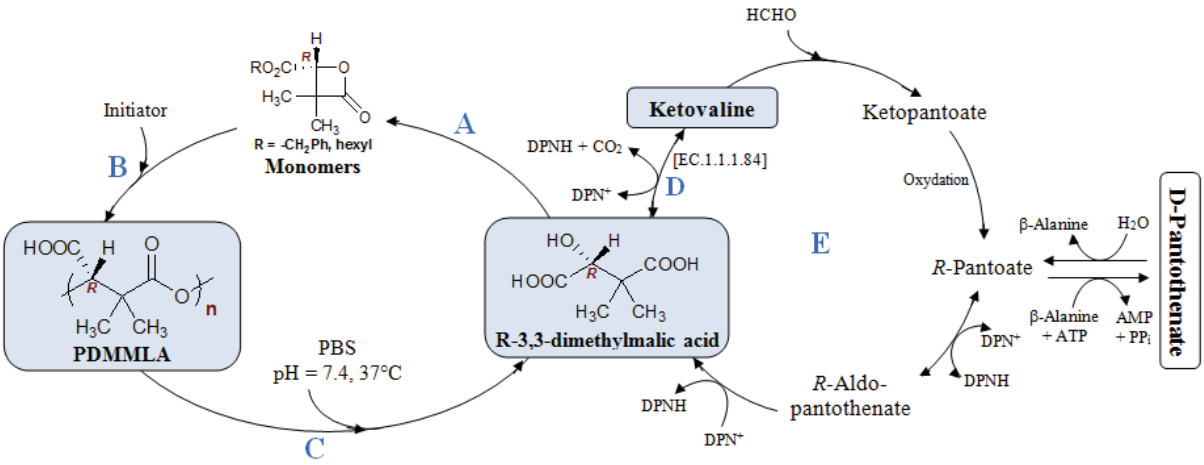


Figure 1. (A) Synthesis of monomers. (B) Synthesis of PDMMLAs with Ring Opening Polymerization (ROP). (C) PDMMLAs hydrolytic degradation to *R*-3,3-dimethylmalic acid. (D) Enzymatic oxidative reaction catalyzed by "EC.1.1.1.84"of *R*-3,3-dimethylmalic acid to give ketovaline. (E) Degradation cycle of pantothenate.

Functional groups in the side-chain of PDMMLA systems are the alcohol group (–OH), carboxylic acid group (–H) and hexylic group (–He), incorporated during the polymer synthesis. The degree of these groups may be adapted to modify hydrophilic/hydrophobic balance and thus changes the degradation rate, solubility and mechanical and biological properties. First, –OH and –COOH groups provide the neutral and the acid hydrophilic character, respectively. They allow also the chemical modification of polymer. Moreover, –OH functions were often used for its opsonization phenomenon, and their excellent blood compatibility and resistance to thrombus formation [23] and carboxylic groups for its favor cell attachment and proliferation. Then, the hexyl group provides hydrophobic character for PDMMLA polymers.

If the systems studied in this work are used as a stent-coating, they will be in contact with the physiological medium. The study of their degradation *in vivo* is a very important point to understand their kinetic of degradation and the controlled release of drugs once grafted. We report in this work their degradation *in vitro* to screen the candidate polyesters. The focus of this article is to understand the degradation way and time of a series of PDMMLA homopolymers and statistical copolymers with different hydrophobic / hydrophilic groups in their side-chain. On the one hand, *in vitro* degradation of these polymers was performed in phosphate buffer under physiological conditions. The effect of pH, temperature, specific enzymes and molecular weight of polymers on the degradation rate was evaluated. These materials will be in direct contact with the artery wall containing endothelial cells that repair and regenerate the treated artery wall and thus accelerate reendothelialization. On the second hand, the biocompatibility of degradation products was investigated on human vascular endothelial cells (HUVEC) using two methods: MTT assay and Live/Dead cytotoxicity assay kit. Finally, the appropriate and best candidate biomaterial was selected.

II. Material and methods

II.1. Polymer synthesis and characterizations

Amorphous PLA (M_n = 20 000 g/mol) was purchased from Sigma Aldrich (France). Anhydrous tetrahydrofuran (THF) was distilled on sodium-benzophenone. In all other cases, the commercially available chemicals were purchased from Sigma Aldrich (France) and employed as received. All reactions, with anhydrous organic solvents were performed under nitrogen atmosphere. Synthetic and amorphous PDMMLAs were prepared in anhydrous THF solution by ROP of racemic β-lactones monomers using the previously reported procedure using tetraethylammonium benzoate as initiator [24, 25]. The monomers were synthesized according to the literature procedure as well with different functional groups to bring the hydrophilic (acidic or neutral) and hydrophobic characters for polymers. In this study, 3 homopolymers and 3 statistical copolymers having different functional groups in their side chains were prepared. The synthetic homopolymers have different characters: acid hydrophilic (PDMMLA-H), neutral hydrophilic (PDMMLA-OH (HP-OH)) and hydrophobic (PDMMLA-He). At the same time, the copolymers were synthesized with different acidic hydrophilic / hydrophobic percentages: PDMMLAH10-co-He90, PDMMLAH20-co-He80 and PDMMLAH30-co-He70. The polymers with 0, 10, 20, 30 and 100% of acidic groups were named as 0/100, 10/90, 20/80, 30/70 and 100/0, respectively. Theoretical molecular weights

of different polymers can be determinate by molar ratio of monomer to initiator [M]/[A]. For all homopolymers and copolymers (0/100, 10/90, 20/80, 30/70, 100/0 and HP-OH), the initiator was used with 10^{-2} equiv per mol monomer to obtain theoretical molecular weights ranges between 22 000 and 30 000 (table 1). Besides, for the three copolymers with high molecular weight ($10/90_{hMw}$, $20/80_{hMw}$ and $30/70_{hMw}$), the initiator was used with 10^{-3} equiv per mol monomer to obtain theoretical molecular weights ranges between 220 000 and 300 000 (table 1).

The different polymers were characterized by FTIR spectroscopy analysis which showed the ester characteristic band of different polyesters around 1750 cm^{-1} and the disappearance of the lactone band around 1840 cm^{-1} of different β-lactones monomers. FTIR spectra were recorded on AVATAR 370 TF-IR Thermo Nicolet spectrometer using Nicolet OMNI-Sampler ATR Smart Accessory (Ge, DTGS). Absorption bands are given in cm^{-1}. Then, the ^{1}H and ^{13}C NMR spectroscopy was used to confirm the chemical structure of all PDMMLAs and the co-monomers relative contents (10, 20 and 30%) of copolymers. This latter percentage was obtained by ^{1}H NMR using the integration ratio between the peak which corresponds to $-CH_2-O-$ hexyl and that corresponds to $-CH_2-O-$ benzyl [26].

Table 1. Characterization of different homopolymers and copolymers.

Polymers		Characterization of polyesters			
		M_{nTh} (g/mol) [(c)]	M_n (g/mol) [(c)]	M_w (g/mol) [(c)]	D [(c)]
Homopolyester	PLA [(a)]	20 000	12 800	13 040	1.018
	0/100	23 400	16 900	16 960	1,003
	100/0	22 800	29 390	30 120	1.024
	HP-OH	29 200	19 950	20 840	1.044
Copolyesters	10/90	22 860	17 950	18 700	1,041
	20/80	22 920	17 100	17 400	1,017
	30/70	22 980	17 510	18 100	1,033
	$10/90_{hMw}$	228 600	148 060	153 800	1,038
	$20/80_{hMw}$	229 200	214 420	231 800	1,081
	$30/70_{hMw}$	229 800	354 460	364 800	1,029
Diacid		228	1 480	1 500	1.006

M_{nTh} = theoretical M_n.
[(a)] Commercial amorphous PLA.
[(b)] Calculated from ^{1}H NMR results.

II.2. In vitro polymers hydrolytic degradation

II.2.1. Polymer films preparation and degradation assay

The degradation assays were conducted on polymers films. Firstly, to obtain polymer films, the PDMMLAs were dissolved in acetone and PLA in chloroform. The polymer solution was then deposited on glass slides pre-weighed ((Objektträger, 10 x 25.53 mm, 0.99 mm thick, MENZEL-GLASER, Braunschweig, Germany). After the evaporation of solvent at room temperature, glass slides were dried at 37°C overnight in a vacuum oven. Secondly, the polymer slides were immersed in the glass vials containing PBS with a polymer concentration of 4 mg/mL (the mass of polymers ranges between 60 and 100 mg). PBS was prepared by mixing Na2HPO4, NaH2PO4, NaOH and HCl with different concentrations that quantified according to the desired PBS-pH in distilled water. The sample vials were sealed in order to avoid the PBS evaporation. The degradation study was carried out for a period of 8 or 24 weeks at different conditions: temperatures (25, 37 and 50°C), pH (5, 7.4 and 9), molecular weight (using polymers having different molecular weight) and enzymes (absence/presence of different enzymes: esterase and α-amylase). Esterase from porcine liver and α-amylase from porcine pancreas (Sigma Aldrich France) were used with a concentration of 1 mg per 0.4 g of polymer [27].

The degraded samples remaining on the glass slides were washed with distilled water, dried in vacuum oven at 37°C and weighed. However, degraded samples contained in PBS were isolated after lyophilization. They were redissolved in THF, dried under vacuum to obtain the degraded products mass. The recovered degradation products were dissolved in THF for the measurement of their molecular weight.

II.2.2. Molecular weights determination

The absolute average molecular weights and molecular weight distributions were determined at room temperature by coupling online a high performance size exclusion chromatograph (HPSEC), a multi-angle laser light scattering detector (MALLS), a viscometer and a differential refractive index (dRI) detector. THF, used as carrier, was filtered through a 0.1 µm filter unit (Millipore, Billerica, USA), carefully degassed (DGU-20A3R Shimadzu, Kyoto, Japan), and eluted at a 0.5 mL/min flow rate (LC10Ai Shimadzu, Kyoto, Japan). 100 µL of a 0.2 µm-filtered sample solution (at about 20 mg/mL) were injected with an automatic injector (SIL-20A HT Shimadzu, Kyoto, Japan). The column packing was a polystyrene-divinylbenzene gel. The MALLS photometer, a miniDawn TREOS from Wyatt Technology

Inc. (Santa Barbara, CA, USA) was provided with a fused silica cell and a Ga-As laser (λ = 665.8 nm). The whole collected data: light scattering (LS), dRI were analyzed using the Astra v6.0.6 software package. Molar mass were obtained with the Zimm order 1 method. The concentration of each eluted fraction was determined with dRI (RID10A Shimadzu, Kyoto, Japan) according to the measured values of dn/dc (0.05 mL/g). [28]. In all cases, molecular weights $M_w(t)$ in degradation time (t) were plotted as a function of $M_w(0)$ which correspond to the molecular weights before degradation assays (M_w (t) / M_w (0)). Therefore, for all polymers, high molecular weights with a very good molar mass distribution value (D) which close to unity was observed. Theoretical molecular weights can be determinate by molar ratio of monomer to initiator [M]/[A]. The molecular weight of commercial amorphous PLA was found different than indicated (Table 1).

II.3. Cytotoxicity of polyesters and degradation products

The degradation products of polymers from four different times were tested for cell viability and cytotoxicity with Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC, N° CRL-1730, ATCC, LGC Molsheim, France) using two methods, MTT assay and Live/Dead cytotoxicity assay kit. HUVEC cells were cultured in Endothelial Cell Basal Media 2 (ECBM2, PromoCell, Germany) supplemented with 10% fetal bovine serum, epidermal growth factor (EGF, 5.0 ng/mL), hydrocortisone (0.2 µg/mL), VEGF (0.5 ng/mL), basic fibroblast growth factor (bFGF, 10 ng/mL), insulin like growth factor (R3IGF-1, 20 ng/mL), ascorbic acid (1 µg/mL), heparin (22.5 µg/mL), antibiotics (1% penicillin-streptomycin, from PAA Laboratories, Pasching, Austria). HUVEC cells were seeded using ECBM2 complete media and incubated at 37 °C in 5% CO_2 for 24 h to obtain adherent and proliferating cells. Cells were divided two times per week at a sub cultivation ratio of 1:3.

For MTT assay, HUVEC cells were seeded at a density of 10 000 cells/well on a 96 well tissue culture plate. Then, the cells were washed with the PBS (1x) and treated with 100 µL of polyester degradation products for 24 h, 48 h and 72 h. Controls were incubated with ECBM2 complete media for 24 h, 48 h and 72 h. At the end of the treatment, the cells were washed with PBS (1x) and MTT assay was performed: where MTT dye ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), Daco, France)) reduces only metabolically active cells to insoluble purple formazan dye crystals. The intensity of the purple formazan was measured directly in the wells at 595 nm using microplate reader. In addition, as a negative control, 100 µL of dimethylsulfoxide (DMSO) was added to controls-

wells. Each experiment was performed in triplets for each concentration of every sample and repeated three times on different passage number on different days (n = 3) occupying the same duration for incubation. The average of all of the experiments has been shown as cell-viability percentage in comparison with the control experiment, while gold untreated controls were considered as 100% viable.

For Live/Dead test, HUVEC cells were seeded at a density of 8 000 cells/well of a 6 well glass LabTek culture plate. 24h later, the cells were incubated with 100 µL of polyester degradation products for 24 h. Controls were incubated with ECBM2 complete media, as described before. At the end of each exposure, cell culture media was aspirated and the Live/Dead stain added. HUVEC cells were incubated at 37°C for 2h. Cells were photographed using digital camera fixed on top of the fluorescence microscope (Nikon COOL PIX 8400, Japan). Then the number of the living and dead cells were counted from the images (pseudo-colored cells) with 30 cells counted for each sample. Two different samples for each product of degradation type were used. This was repeated three times on different cell passage on different days occupying the same duration for incubation (48h and 72h).

II.4. Statistical analysis

All data are expressed as mean ± standard deviation (SD) unless indicated otherwise and analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA). In all cases, the degree of significance is indicated when appropriate (*$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$).

III. Results and discussion

III.1. Change of the molecular weight

III.1.1. Degradation of homopolymers: Effect of load and nature of functional side chain and biological enzymes

Effect of load and nature of functional side chain

In the first hand, the hydrolysis behavior of PDMMLA homopolymers was investigated to studying the effect of the functional groups in the side chain of PDMMLA polymers on the kinetic of their degradation. The homopolymer 100/0 has a hydrophilic character. It contained only repeating unit negatively charged (−COO-) in aqueous medium at neutral pH. As a comparison, the homopolymer HP-OH has a neutral hydrophilic character, it contained uncharged functional groups (−OH). Moreover, homopolymer 0/100 has a hydrophobic

character and uncharged side chain groups (hexyl). The molecular weight loss measurements were performed over time in PBS at 37°C in pH 7.4. The initial molecular weight (M_w (0)) of all tested homopolymers was listed in table 1. Figure 2 showed the molecular weight versus time of PLA, 0/100, 100/0 and HP-OH.

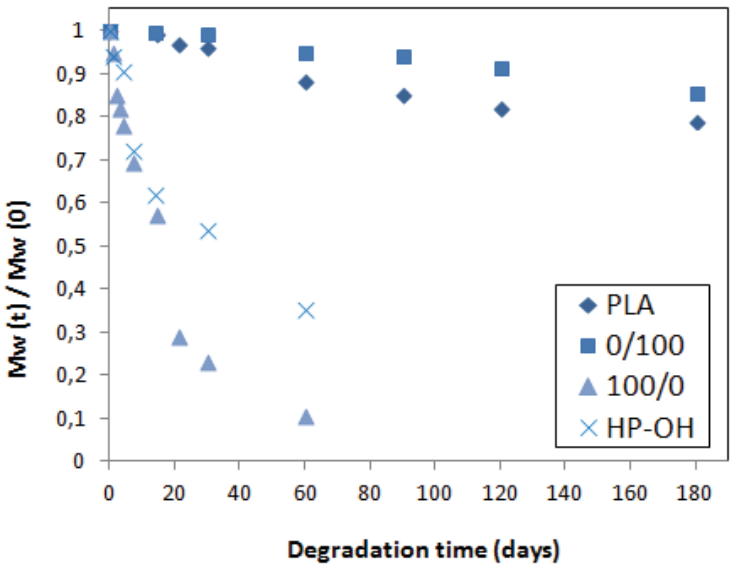


Figure 2. Molecular weight loss data for homopolymers (PLA, 0/100, 100/0 and HP-OH) in PBS at pH 7.4 and 37°C.

PLA was slowly degraded over time. Homopolymer 0/100 has a slower degradation rate owing to the hexylic side chain which is highly hydrophobic. The weight loss of PLA and 0/100 after 6 months was 21 and 15%, respectively. However, the hydrophilic homopolymer 100/0 has the most rapid rate of degradation. 31 % of molecular weight was quickly lost in the first week. After, the weight loss rate was slowly increased with time. It was, 43, 77 and 90% within the 2nd, 4th and 8th weeks, respectively. In comparison, it was found that the neutral hydrophilic homopolymer HP-OH has a slower weight loss rate (figure 2). It has a rapid degradation rate in the first week which was slowed with the degradation time. The weight loss was 28, 38, 46 and 65% within the 1st, 2nd, 4th and 6th months, respectively (figure 2).

Thus, the degradation time of all PDMMLA homopolyesters were affected with the nature of the side chain of PDMMLA. It was now that the hydrolysis process begins with the penetration of water into the polymer chains, followed by cleavage of ester functions and dissolution of degradation products. In the case of the homopolymer 0/100 which is water-insoluble, the diffusion of water within the polymer structure was hard due to the presence of the hydrophobic hexylic side chain. On the contrary, the carboxylic acidic and the alcohol groups facilitated the diffusion of water molecules through their chains with their hydrophilic

character and water-solubility of degradation products. In contrast, carboxylic acidic and alcohol groups facilitated the diffusion of water molecules through the polymer chains (100/0 and HP-OH, respectively) by their hydrophilic character and water-solubility of degradation products. 100/0 has negatively charged groups at pH 7.4 which accelerated the hydrolytic degradation in comparison with HP-OH.

Effect of enzymes

To evaluate the effect of enzymes as a biological catalyst on the degradation rate of PDMMLAs, two enzymes were selected: esterase as a specific-enzyme which biologically hydrolyzes the carboxylic ester group, and α-amylase as a non-specific enzyme [27, 29].

In figure 3 were displayed the weight loss profiles for PLA and different PDMMLA homopolymers hydrolysis in the absence or presence of these enzymes. The results showed that both selected enzymes have different abilities to hydrolyze various polymers. Indeed, all data proved that faster hydrolysis rate was observed in presence of esterase than that in presence of α-amylase.

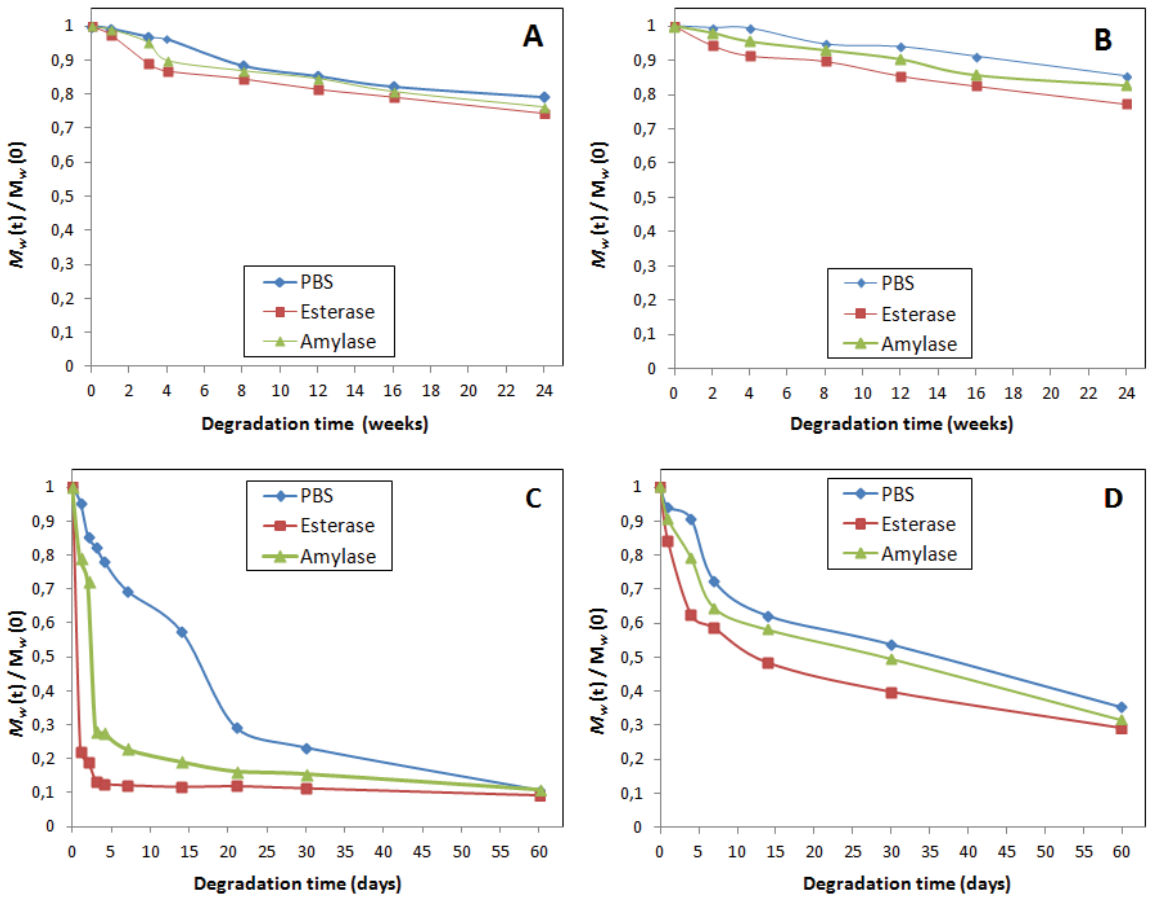


Figure 3. *In vitro* degradation of (A) PLA, (B) 0/100, (C) 100/0 and (D) HP-OH at pH 7.4 and 37°C in the absence or presence of enzymes (esterase and α-amylase).

For PLA (figure 3-A) and 0/100 ((figure 3-B), a slightly larger difference of degradation profiles in the presence of enzymes was observed. The weight loss of PLA after 6 months in the presence of esterase and α-amylase was 26 and 24 %, respectively. For 0/100 in the same hydrolysis time, it was obtained with 33 and 18% in the presence of esterase and α-amylase, respectively.

For 100/0 (figure 3-C), a different powerful effect of enzymes was observed. The polymer lost very quickly the maximum of its weight in the first day in the presence of esterase (weight loss 78%). Then, the hydrolysis rate increased slowly until a plateau value which was reached at the 4th day (weight loss 88%). The same profile was observed in the presence of α-amylase but with a less degradation rate. There was a 90% of weight loss after 6 days of esterase treatment, whereas the same results (90%) were reached after two months of incubation with α-amylase or control condition without any enzymatic activity.

The same behavior was observed with HP-OH sample (figure 3-D). After two months, HP-OH hydrolysis was not total. The weight loss without enzyme, in the presence of esterase and α-amylase were 65%, 71% and 69%, respectively.

Summary, in the presence of esterase, PDMMLA homopolymers can be degraded faster than the other conditions (in the presence or absence of α-amylase). Therefore, selected esterase was involved in the ester bond hydrolysis of the studied homopolymers.

In addition to their degradation rate, the behavior of hydrolysis homopolymer was also studied. Because of the presence of the functional group in the side chains of PDMMLA polymers comparing with other aliphatic polyesters such as PLA [30], their degradation behavior may be different. This deference can be observed by the slow degradation of the polymer chains indicated by an increase of the retention time with a presence of a single peak, or with the presence of others picks with a smaller molecular weight.

Figure 4 presented the SEC-chromatograms as a function of retention time for different homopolymers before degradation (PLA, 0/100, 100/0 and HP-OH) and correspondent curves of two different hydrolysis times for each material degraded in presence of esterase (close to physiological conditions).

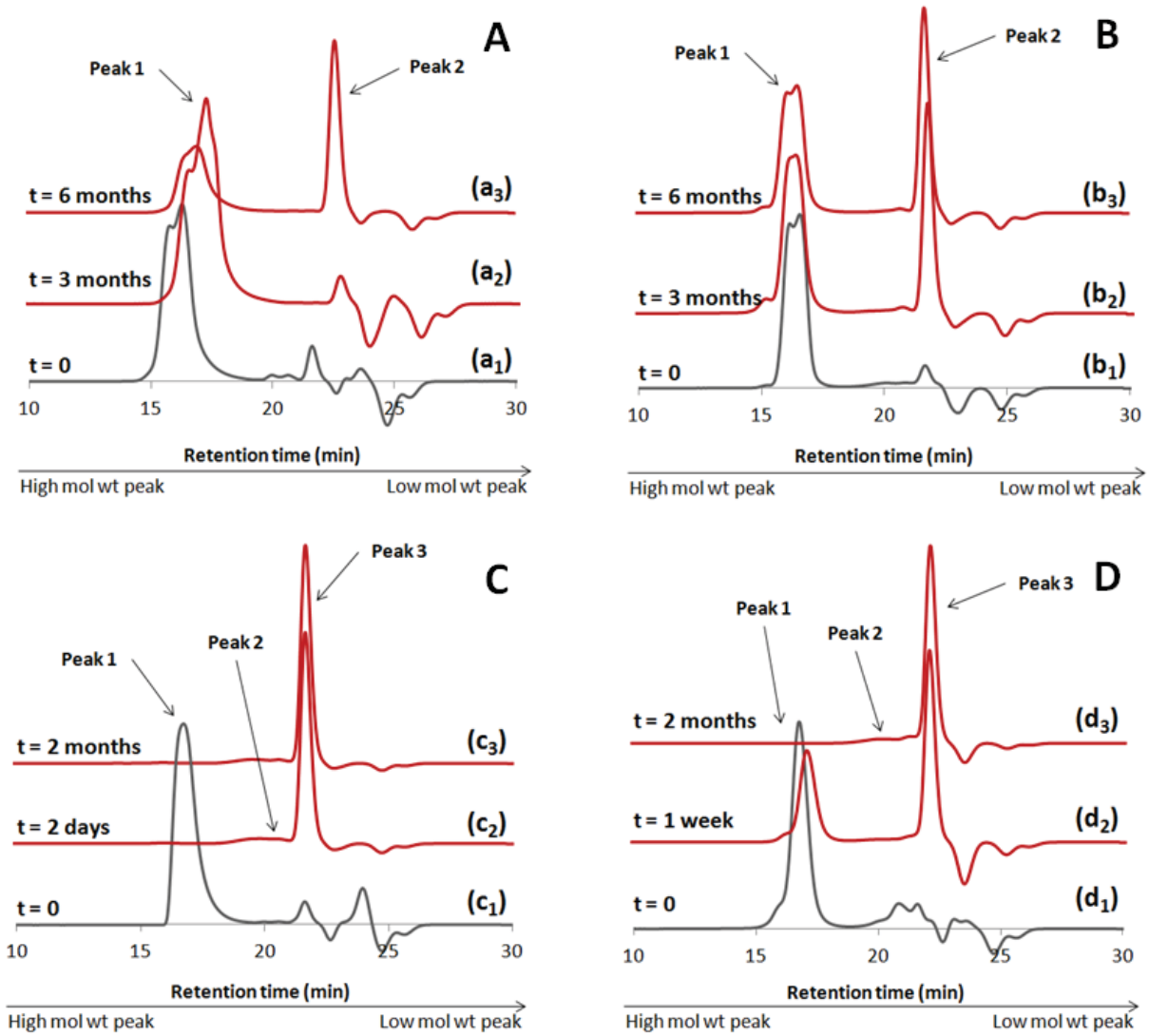


Figure 4. SEC-chromatograms of undegraded and degraded homopolymers : (A) PLA, (B) 0/100, (C) 100/0 and (D) HP-OH. *(pH 7.4 and 37°C in the presence of esterase.*

"(a_1) undegraded PLA, (a_2) degraded PLA within 3 months, (a_3) degraded PLA within 6 months, (b_1) undegraded 0/100, (b_2) degraded 0/100 within 3 months, (b_3) degraded 0/100 within 6 months, (c_1) undegraded 100/0, (c_2) degraded 100/0 within 3 months, (c_3) degraded 100/0 within 6 months, (d_1) undegraded HP-OH, (d_2) degraded HP-OH within 3 months, (d_3) degraded HP-OH within 6 months

These results showed that all PDMMLA homopolymers was hydrolyzed with the formation of a second peak corresponding to small molecular weight and indicateding a mixed degradation type in bulk and surface corrosion while the PLA degradation was rather in bulk. The ratio of this second peak increased with the decrease of the ratio of the first peak over time.

Figure 5 illustrated the percentage of different peaks formed as a function of degradation time for all studied homopolymers. The PLA hydrolysis was indicated by a slight increase of the retention time with only one peak corresponding to the initial peak (t = 0) until the last degradation time (t = 6 months) where the appearance of a second peak was observed (figure 4A and 5A). Contrary, for 0/100, the degradation rate was obtained slower than PLA but the formation of a second and third peak was observed in the second week with a small percentage which slightly increased with time (figure 4B and 5B).

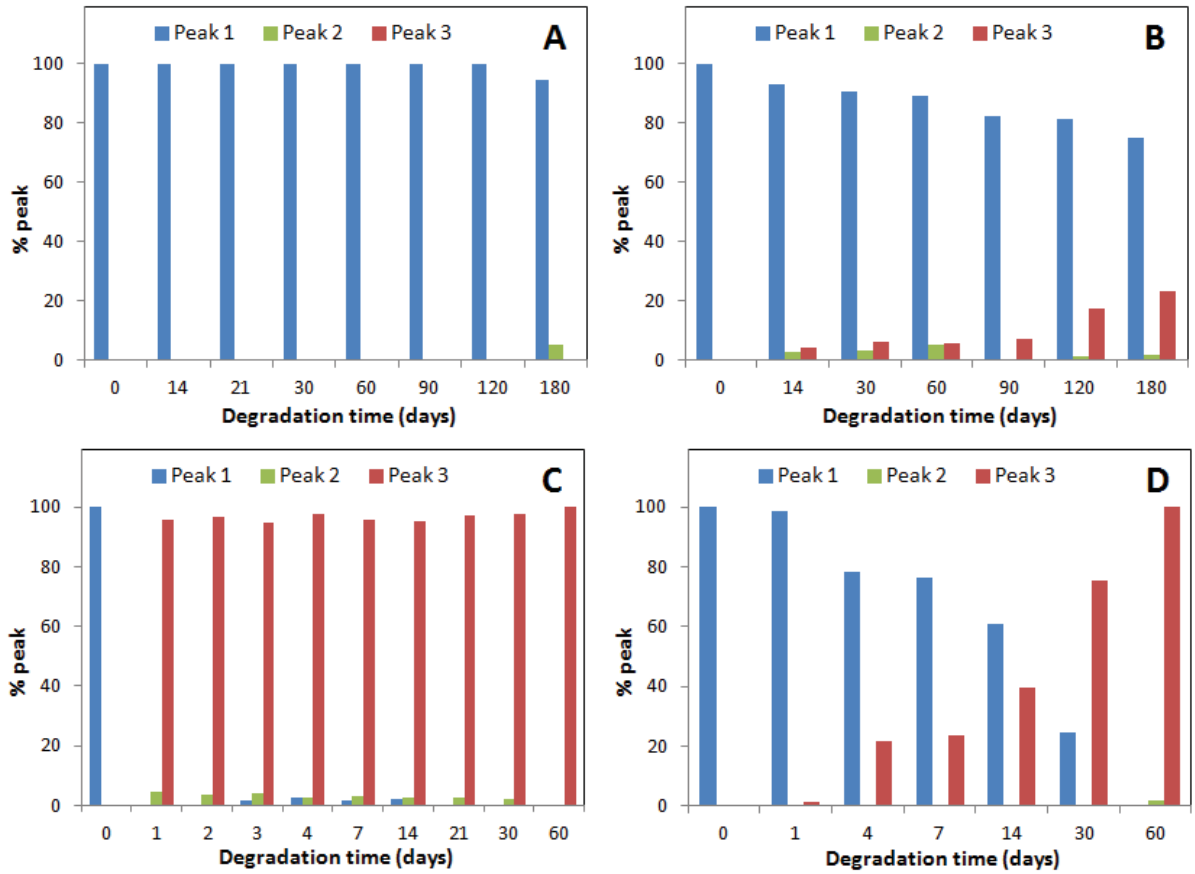


Figure 5. Homopolymers fragmentation with the formation of several peaks possessing different molecular weight (A) PLA, (B) 0/100, (C) 100/0 and (D) HP-OH *(pH 7.4 and 37°C in the presence of esterase).*

In addition, for 100/0 and HP-OH, the degradation behavior is different; it was indicated by the decrease of the molecular weight of the initial peak and the formation of a second peak in the same time. For 100/0, the formation of the peak corresponding to the smallest molecular weight (peak 3 with M_w ~ 4000 g/mol) was observed from the first day with high percentage (figure 4C and 5C). For HP-OH, the formation of this peak was increased less

rapidly (figure 4D and 5D). This was explained by the more rapid degradation in surface of polymer accelerating their corrosion surface.

Consequently, with the last study (profile and rate) of the degradation of the different homopolymers (effect of side-chain, charge and hydrophily/hydrophoby), it can be concluded that the side chain of PDMMLAs polymers plays an important role to estimate the degradation rate. The presence of hexyl group slowed sharply the degradation time whereas a hydrophilic side chain accelerates the degradation rate. Moreover, the presence of a negative charge permitted the total degradation of the homopolymer in only a few days compared with a neutral hydrophilic group (OH) in the studied conditions (pH 7.4 and 37°C). This can be explained by the rapid degradation in surface of material (surface erosion)

III.1.2. Degradation of copolymers: Effect of hydrophilic/hydrophobic ratio and enzymes

In the second part of this work, three copolymers (10/90, 20/80 and 30/70) were synthesized in order to study their hydrolysis rate in a six-month period. These copolymers have carboxylic acid groups for their hydrophilic character (10, 20 and 30%) and hexylic groups for their hydrophobic character (90, 80 and 70%). The initial molecular weight (M_w (0)) of all tested copolymers was presented in table 1.

Figure 5 presented the he molecular weight loss curves of different copolymers. In the first, the degradation study was carried out in PBS at 37°C in pH 7.4. . As for the study presented before for the homopolymers degradation, the effect of enzymes (esterase and α-amylase) on the copolymers was performed. In a logical order, the loss of molecular weight increased with the increase of carboxylic acid groups. 10/90 copolymer has a predominantly hydrophobic character. Its degradation rate is slightly faster than 0/100 (figure 6A). It lost its weight with 20, 31 and 25% after 6 months of incubation without enzyme or in the presence of esterase and α-amylase, respectively. The addition of 10% of carboxylic acid groups (20/80) increased the weight loss to 36, 59 and 43% after 6 months (respectively conditions in the same order) (figure 6B). For the more hydrophilic copolymer with 30% of hydrophilic groups, hydrolytic rate was very fast with a weight loss of 62, 86 and 69% after 6 months (respectively conditions in the same order) (figure 6C).

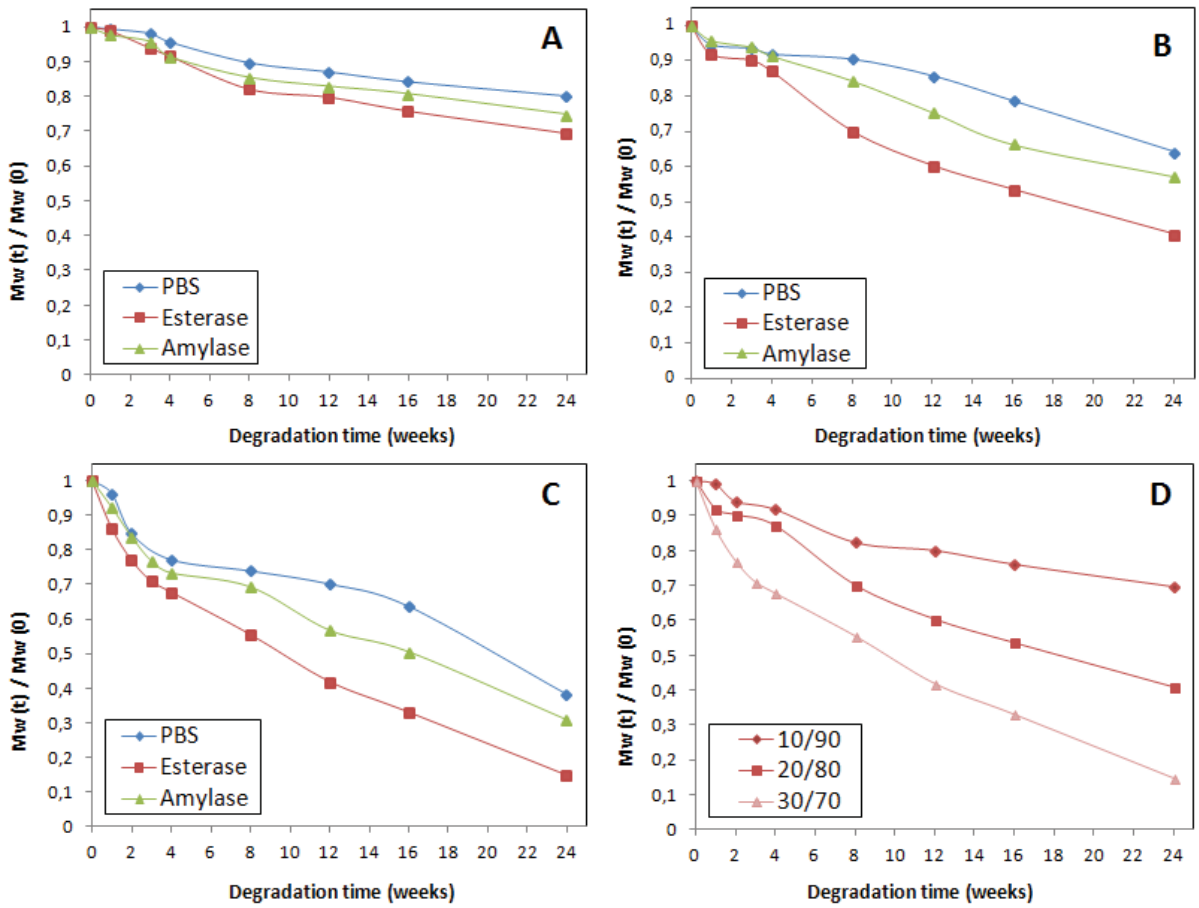


Figure 6. Weight loss of (A) 10/90, (B) 20/80, (C) 30/70 at pH 7.4 and 37°C in the absence/presence of esterase and amylase and (D) weight loss comparaison of copolymers at pH 7.4 and 37°C in the presence of esterase as a function of incubation time.

As PBS degradation (without enzymes), α-amylase and esterase activities follow the same format as homopolymers. In the all cases (PBS, esterase and α-amylase), elution profile indicated two major peaks. This result suggested the fragmentation of the inside and the outside of polymer's structure. Figures 6D and 7 showed, respectively, the comparison of kinetics polymers hydrolysis in the presence of esterase and the elusion profiles of 30/70 copolymer and its degradation products over time in the absence/presence of esterase.

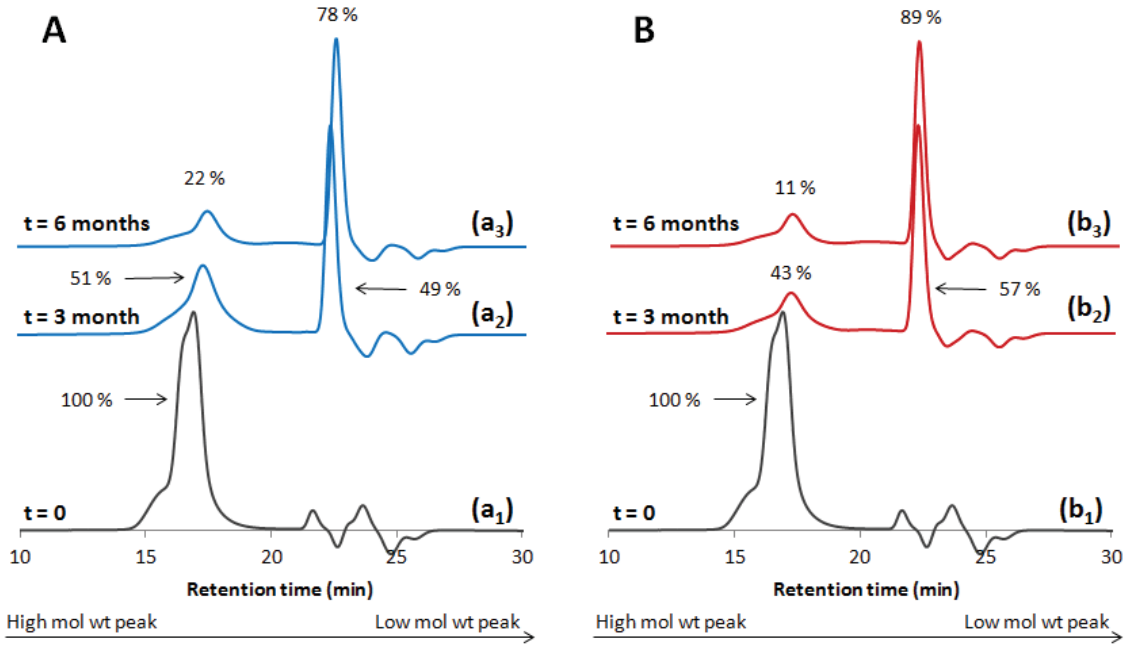


Figure 7. SEC-chromatograms of undegraded and degraded 30/70 copolymer (A) in the absence of enzymes and (B) in the presence of esterase at pH 7.4 and 37°C.

"*(a_1 and b_1) undegraded 30/70, (a_2 and b_2) degraded 30/70 within 1 month and (a_3 and b_3) degraded 30/70 within 6 months.*

III.1.3. Degradation of high molecular weight (hM_w) copolymers: Effect of hydrophilic/hydrophobic ratio, enzymes, pH and temperature

On the other hand, three copolymers having the same ratio of hydrophilic/hydrophobic groups than the above mentioned copolymers but different molecular weights were prepared ($10/90_{hMw}$, $20/80_{hMw}$ and $30/70_{hMw}$). This is in the order to study the effect of molecular weight, enzymes, pH and temperature on the degradation nature and rate of the different copolymers.

Effect of molecular weight

To evaluate the effect of molecular weight, three systems were preaped with the same ratio of hydrophilic/hydrophobic groups with two different initial molecular weight (Mth ~ 23 000 g / mol and 230 000 g / mol). The hydrolysis study was carried out in PBS at pH 7.4 and 37°C. The molecular weights results were presenter in table 1.

Figure 8A showed the weight loss of 3 copolymers having high molecular weights as a function of degradation time. In a logical order, the degradation was faster with the material contained the highest ratio of hydrophilic side chain ($30/70_{hMw}$), then a medium degradation

rate was observed with the material having the medium ratio of –COOH groups ($20/80_{hMw}$), and with that having the lowest ratio of –COOH ($10/90_{hMw}$), the degradation slowed further.

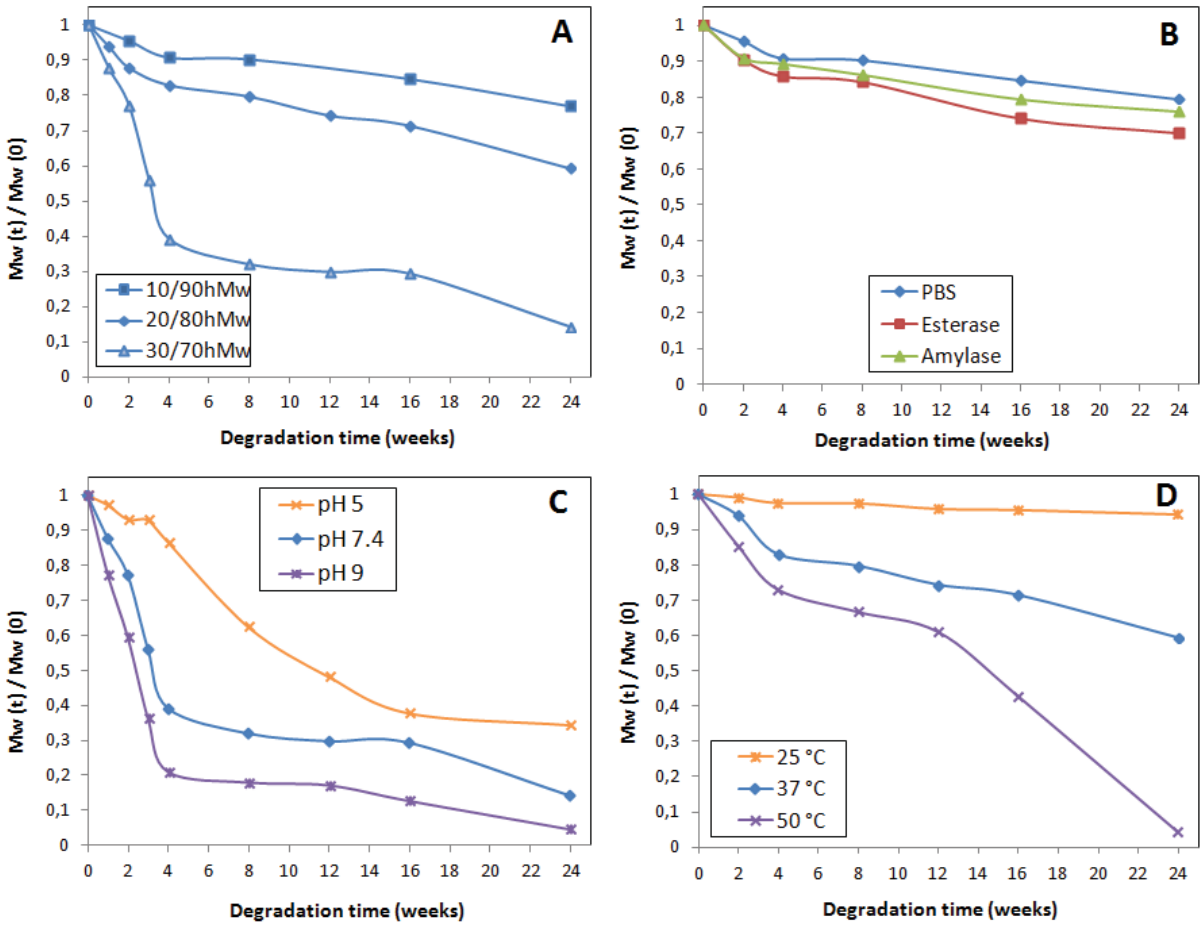


Figure 8. Molecular weight loss of hM_w copolymers: (A) hydrolysis in physiological conditions, (B) effect of enzymes on hM_w copolymers, (C) effect of pH and (D) effect of temperature.

In addition, it is important to compare the rate of degradation of the material having (hM_w) and that having the lowest ones (lM_w). The comparaison was illustrated in figure 9. Indeed, it was found that, the polymer having hMw and only 10% of –COOH ($10/90_{hMw}$), had similar degradation profile as compared to 10/90 with lM_w. It was slightly faster degraded by a linear greater weight loss than 10/90 over time (~3.5%).

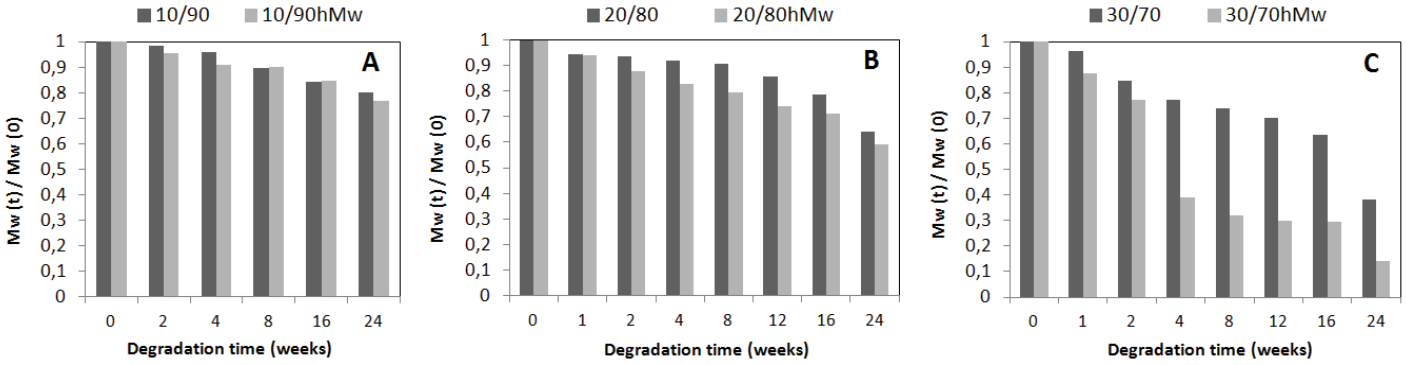


Figure 9. Effect of molecular weight on weight loss and degradation rate and profile of hMw copolymers: (A) 10/90 and $10/90_{hMw}$, (B) 20/80 and $20/80_{hMw}$ and (C) 30/70 and $30/70_{hMw}$.

When 10% of acidic groups were added to the side chain of the copolymer ($20/80_{hMw}$), it hydrolyzed with a double speed as compared to $10/90_{hMw}$ and a linear greater weight loss as compared to its lM_w counterpart (~93%). Moreover, when the amount of acid is increased by another 10% ($30/70_{hMw}$), the copolymer lost its weight very quickly in the first month and then slowed after. As compared to 30/70, the weight loss was greater up to 62 and 76% at the 4th and 6th months, respectively. In this degradation time, $30/70_{hMw}$ had an equivalent molecular weight to the initial molecular weight of 30/70.

The present analysis of the behavior of degraded materials is very important because it gived an idea of the cleavage under physiological conditions of copolymer chains which have different molecular weights. This suggered that in the presence of such systems (PDMMLA copolymers) having an average molecular weight (M_{th} ~ 23 000), the weight loss was found linear with R^2 = 0.96, 0.95 and 0.93 for 10/90, 20/80 and 30/70, respectively.

On the other hand, with hM_w (M_{th} ~ 230 000), the linearity was decreased with the increase of acids percentage. R^2 = 0.94 and 0.93 were obtained for 10/90 and 20/80, which indicates linearity of degradation despite the slight weight loss. In contrast, with 30% of acid groups, the weight loss was not linear (R^2 = 0.69). This can be interesting for the selection of such type of materials which having different molecular weight and hydrophilic / hydrophobic balance, and thus different hydrolysis profiles.

In conclusion, in the presence of high molecular weight, degradation behavior of the three copolymers ($10/90_{hMw}$, $20/80_{hMw}$ and $30/70_{hMw}$) was not the same. The polymer can quickly hydrolyze losing its maximum weight in the first weeks for dividing into shorter chains. In addition, the degradation rate is similar to that on polymer with lower molecular weight (10/90, 20/80 and 30/70).

Effect of enzymes on hM_w copolymers degradation:

To confirm precedent results obtaind with low molecular weight (lMw) copolymers (10/90, 20/80 and 30/70) on the hydrolysis of high polymer chains, the hydrolysis of hMw copolymer $10/90_{hMw}$ was performed at pH 7.4 and 37°C in the absence or presence of esterase and α-amylase. They were hydrolyzed with the same logic in the absence or presence of both enzymes (figure 8B).

Effect of pH

To evaluate the film polymers degradation, another parameter was studied on the $30/70_{hMw}$ films with varing pH of hydrolysis medium. 3 different solutions of PBS having different pH: 5, 7.4 and 9 were used (figure 8C).

PDMMLA copolymers have carboxylic acid groups in their side chain which are capable of undergoing protonation/deprotonation depending on the environmental pH. At pH 5, copolymer has the slower degradation rate with a weight loss of only 66% as compared to 86% at pH 7.4 in the 6th month. This effect was explained by the unionization of acidic groups at low pH, they are sufficiently protonated at pH 5, noted "*the acid inhibitory effects*". At pH 9 [31], the opposite behavior was observed. Indeed, 100% of weight loss was observed in the sixth month. This was explained by the rapid degradation of film surfaces of copolymer which have in this time deprotonated groups ($-COO^-$). Hydrolytic rate of copolymer increased with the increase of medium pH. Thus the hydrolytic degradation of PDMMLA copolymers was pH-sensitive. This result is in according with literature studies on the polyesters degradation such as PLA and PLGA [32, 33].

Herein, we could conclude that in low pH, the hydrolysis has a bulk profile (diffusion of water molecules into polymer) in contrast of that in high pH which has an erosion-surface profile (degradation rate of polymer was faster than diffusion of water molecules). Moreover, at pH 7.4, hydrolysis has a mixed profile "bulk and surface erosion". This was confirmed with the SEC-chromatograms as a function of time hydrolysis showed in figure 10A. For slower degradation rate (pH 5), one peak was observed (figure 10A (a_2)) with a fraction of 99% indicated a bulk degradation whereas only one lM_w peak was observed in the case of faster degradation (pH 9) with a fraction of 52% which indicated the corrosion-surface degradation

(figure 10A (a_4)). A mixture of several peaks was observed in the case of pH 7.4 which indicated the mixed degradation profile in bulk and corrosion surface (figure 10A (a_3)).

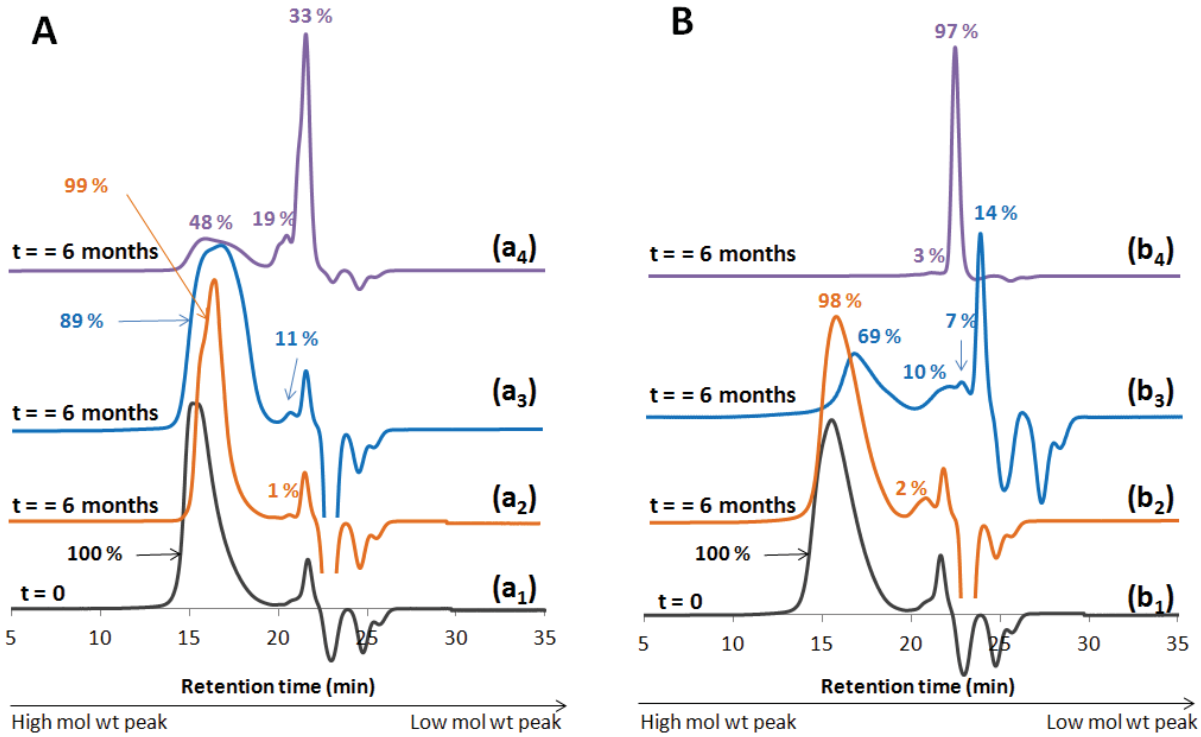


Figure 10. Elution profiles of $30/70_{hMw}$ (A) and (B) $20/80_{hMw}$ within 6 months.

"(a_1 and b_1) undegraded copolymers, (a_2 and b_2) degraded copolymers at pH 5 and 25°C, respectively, (a_3 and b_3) degraded copolymers at pH 7.4 and 37°C, respectively and (a_4 and b_4) degraded copolymers at pH 9 and 50°C, respectively.

Effect of temperature:

To evaluate the effect of temperature onx the degradation of PDMMLAs copolymers, the hydrolysis of $20/80_{hMw}$ copolymer was carried out in PBS at pH 7.4 at 3 different temperatures: 25, 37 and 50°C. Figure 8D showed the hydrolysis profiles at different temperature. The results showed that, the weight loss at 25°C was very small over hydrolysis time; only 6% was observed as compared to 41% at 37°C within 6 months. When the temperature was also increased by 13°C (at 50°C), the copolymer was completely degraded.

We concluded that PDMMLA copolymers degradation was temperature-depended. Their degradation time was accelerated with the increase of temperature. These results could be explained by the hydrophilic/hydrophobic balance of copolymer which exhibited 20% hydrophilic groups in their side chains. This balance arranges in specific interactions between

hydrophilic and hydrophobic functions at a critical temperature. With a change of this temperature, the arrangement between these groups changes again which can change the interaction of material with aqueous environment and so accelerate/decrease its degradation.

Figure 10B showed the elution profiles of undegraded $20/80_{hMw}$ (b_1) and degradation products in the 6th month at 25°C (b_2), 37°C (b_3) and 50°C (b_4). They have different profiles of degradation which formed only at 50°C a peak corresponded to lMw with a fraction of 97% in the end of degradation study (faster degradation rate). For both other films, this peak was not observed (slower degradation rate).

In summary, PDMMLAs having hydrophilic loaded side chain at pH 7.4 were degraded faster than those wearing a neutral hydrophilic side chain. A side chain which contained hexyl groups slowed degradation. In addition, the presence of a charged hydrophilic moiety allows degradation of the polymer faster than a neutral hydrophilic group. Moreover, high pH and temperature accelerated the degradation rate of PDMMLAs due to the deprotonation of carboxylic acid functions at pH 9 and the strong interaction of the polymer chains with in high temperature with the aqueous medium. In these cases, the surface of the degradation rate is higher than the rate of penetration of water within the polymer structure which caused surface erosion until a complete degradation. Additionally, the esterase is a biological enzyme that specifically hydrolyzes the ester functions in a physiological medium. Therefore, PDMMLAs degradation in the presence of esterase is significantly accelerated with all polymer types (homopolymers and copolymers with hMw and lMw).

This study was performed in the order to choose the copolymer appropriate to cover metallic stent. The rapidly degraded copolymer in conditions close to physiological environment (pH 7.4, 37°C and in the presence of esterase as specific biological enzyme) was 30/70. It degraded with weight loss of 15% within 6 months. The aim of this study was to performed the most interestion polymer which can be chosen as the coating stent material for an eventual custom designing of polymer with a therapeutic agent. For a final choice, these results will be compared with those of the physicochemical and biological properties of the surface (data not shown) of copolymer films studied in this work.

III.2 Cytotoxicity of polyesters and degradation products

PDMMLAs polymers were synthesized for eventual use as coating drug-eluting stents. Therefore, they will be in direct contact with blood and cells of vascular wall. They can bring a drug to a controlled and sustained release thanks to carboxylic acid functionalisable groups

in their side chains. One of the possible cytotoxicity of biomaterials is the diffusion of toxic degradation products in the biological medium. The cytotoxicity study on degradation products of PDMMLAs platform before bringing the drug is required. In this work, the viability of the degradation products over several months of different studied biomaterials was performed *in vitro* on human endothelial vein cells HUVECs.

The degradation products of 100/0 from 1 day and 1, 4 and 8 weeks were tested, while those of HP-OH were from 2 days and 2, 4 and 8 weeks. For 30/70 the degradation products were 1, 4, 12 and 24 weeks. For PLA, 10/90 and 20/80, the tested degradations products were from 2, 4, 12 and 24 weeks. Because the non-functionalized PDMMLA (100/0) is converted into diacid which is the final degradation product (figure 1), the viability of diacid was also conducted in the same conditions as the other samples. Also, this water-soluble product is a synthesis precursor of PDMMLA polymers (figure 1).

Consequently, figure 11 showed the viability test using MTT assay after HUVEC incubation in presence of the degradation products of PLA and PDMMLAs (100/0, HP-OH, 10/90, 20/80 and 30/70) and diacid. For all samples the proliferation cells was comparable to control which has 100% viability.

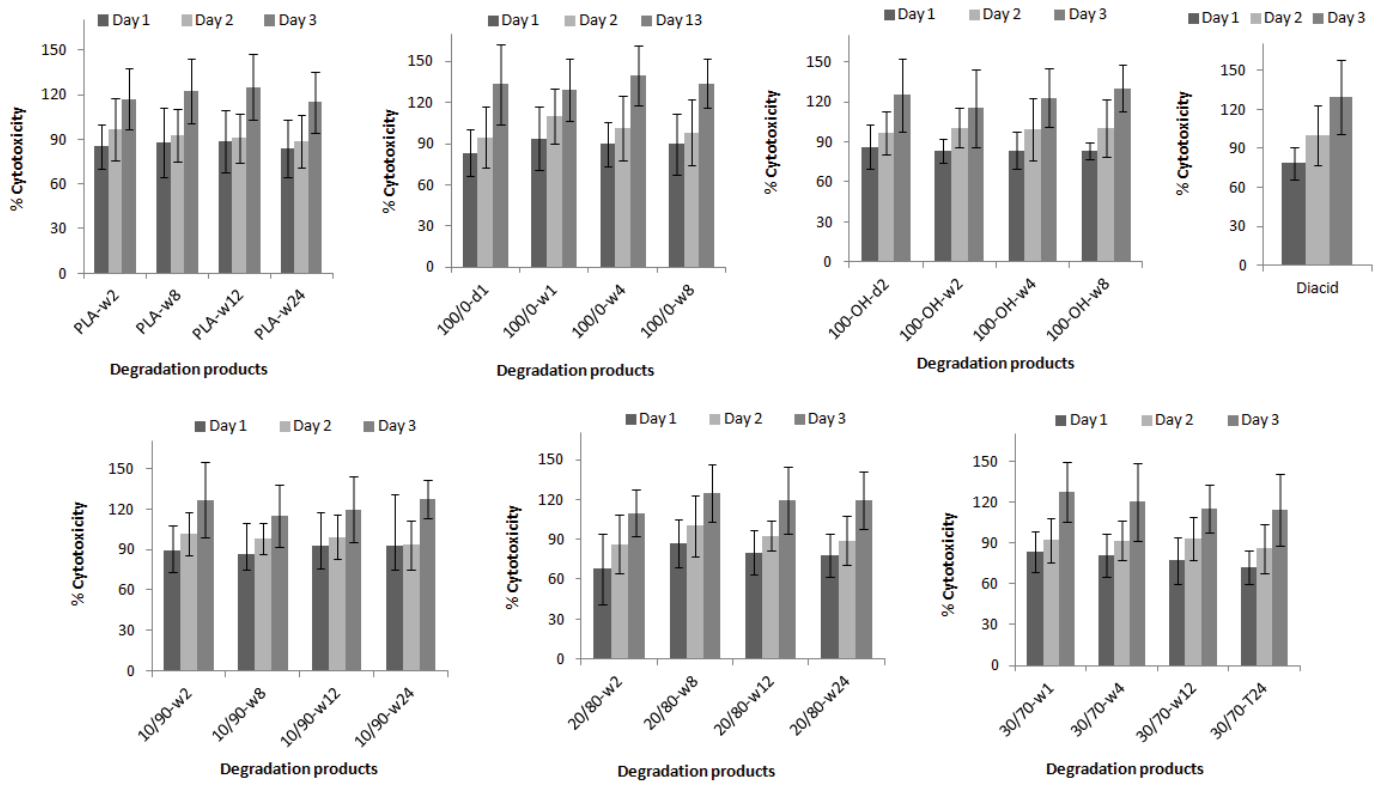


Figure 11. Cytotoxicity of PLA and PDMMLAs degradation products measured by MTT test. (*"d" indicated "day" and "w" indicated "week"*)

In addition, figure 12 showed the viability results with Live/Dead test. For all samples, the percentage of non-viable cells was slightly increased by about 10% between the 2nd and 3rd days of incubation which is comparable to control.

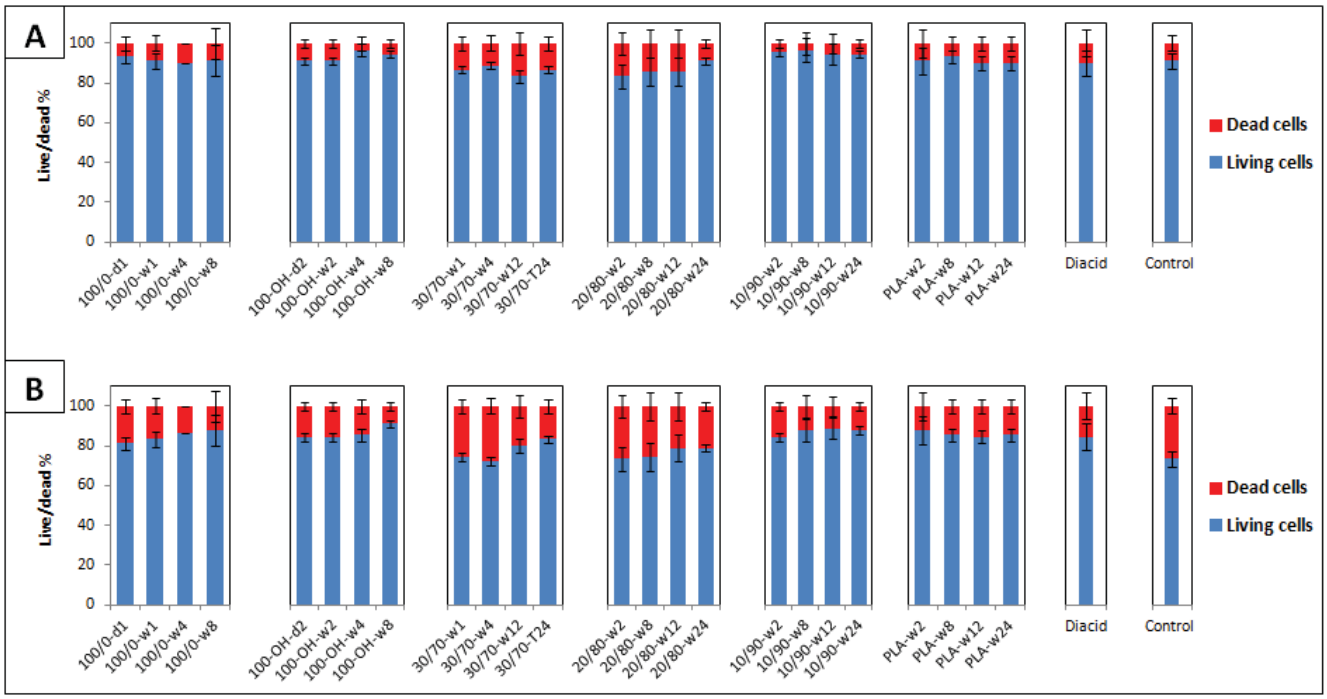


Figure 12. Cytotoxicity of PLA and PDMMLAs degradation products measured by Live and Dead test obtained after (A) 48h and (B) 72h of incubation with different polymer degradation products (*"d" indicated "day" and "w" indicated "week"*).

In summary, the cells viability tests MTT and Live/Dead were revealed that the products of long-term degradation of PDMMLA polymers were non-cytotoxic.

IV. Conclusion

The aim of the present study was to comprehensively evaluate the *in vitro* hydrolytic degradation of series of amorphous biodegradable and biocompatible polyesters (PDMMLAs). Three homopolymers and three copolymers were analyzed for this study. The homopolymers have been investigated to understand the PDMMLAs degradation behavior under physiological conditions while the copolymers for their eventual use as a coating cardiovascular stent for the treatment of restenosis.

Firstly, several factors which are known to influence the rate of degradation were studied. All polymers showed the dependence of weight loss and rate and profile of hydrolysis

with chemical nature and charge of functional groups of polymers, hydrophilic/hydrophobic balance, molecular weight, pH, temperature and biological enzymes. We can conclude that the presence of specific enzymes, high pH and temperature (pH 9 and 50°C) and with low molecular weight of polymers accelerated significantly the degradation rate with the corrosion surface degradation type. Otherwise, at low pH and temperature (pH 5 and 25°C), the degradation speed is slow indicating a bulk degradation type while under physiological conditions (pH 7.4 and 37°C) PDMMLAs degraded with a mixed profile.

Secondly, *in vitro* cytotoxicity study of the degradation products was performed in HUVECs cells. Taken together, all studied polymers exhibited a biocompatible response (without any cytotoxicity) which gives them a great potential for the promising use in cardiovascular field.

All these results, have allowed to choose the best material for possible drug grafting. The copolymer 30/70 was rapidly degraded comparing to 20/80 and 10/90. It was degraded within the 6th month, the recommended period for the degradation of the stent-coating after the drug release for the treatment of intra-stent restenosis. Also, the hydrolysis properties of PDMMLAs confer a particular quality compared to other polyesters described in the literature and used as stent-coating, particularly PLA. The interest in PDMMLA as promising coating-stent is even more important that the PLA with a hydrophobic character and slow degradation rate that can reach two years [34, 35]. Therefore, PDMMLA 30/70 represents the best biodegradable polyester as a promising drug-platform for the coating of metallic stents.

References

1. Tian, H. Y.; Tang, Z. H.; Zhuang, X. L.; Chen, X. S.; Jing, X. B., Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. *Progress in Polymer Science* **2011,** 37, (2), 237-280.
2. Fu, K.; Pack, D. W.; Klibanov, A. M.; Langer, R., Visual evidence of acidic environment within degrading poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres. *Pharmaceutical Research* **2000,** 17, (1), 100-106.
3. De Santis, R.; Russo, A.; Gloria, A.; D'Amora, U.; Russo, T.; Panseri, S.; Sandri, M.; Tampieri, A.; Marcacci, M.; Dediu, V. A.; Wilde, C. J.; Ambrosio, L., Towards the Design of 3D Fiber-Deposited Poly(epsilon-caprolactone)/Iron-Doped Hydroxyapatite Nanocomposite Magnetic Scaffolds for Bone Regeneration. *Journal Of Biomedical Nanotechnology* **2015,** 11, (7), 1236-1246.
4. Huang, Z. W.; Laurent, V.; Chetouani, G.; Ljubimov, J. Y.; Holler, E.; Benvegnu, T.; Loyer, P.; Cammas-Marion, S., New functional degradable and bio-compatible nanoparticles based on poly(malic acid) derivatives for site-specific anti-cancer drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **2012,** 423, (1), 84-92.

5. Liu, Y.; Wang, W.; Wang, J.; Yuan, Z.; Tang, S.; Liu, M.; Tang, H., HUVEC cell affinity evaluation and integrin-mediated mechanism study on PHSRN-modified polymer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2011,** 84, (1), 6-12.
6. Wang, J.; Ni, C.; Zhang, Y.; Zhang, M.; Li, W.; Yao, B.; Zhang, L., Preparation and pH controlled release of polyelectrolyte complex of poly (L-malic acid-co-D, L-lactic acid) and chitosan. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2014,** 115, 275-279.
7. Ljubimova, J. Y.; Portilla-Arias, J.; Patil, R.; Ding, H.; Inoue, S.; Markman, J. L.; Rekechenetskiy, A.; Konda, B.; Gangalum, P. R.; Chesnokova, A.; Ljubimov, A. V.; Black, K. L.; Holler, E., Toxicity and efficacy evaluation of multiple targeted polymalic acid conjugates for triple-negative breast cancer treatment. *Journal of Drug Targeting* **2013,** 21, (10), 956-967.
8. Ding, H.; Helguera, G.; Rodriguez, J. A.; Markman, J.; Luria-Perez, R.; Gangalum, P.; Portilla-Arias, J.; Inoue, S.; Daniels-Wells, T. R.; Black, K.; Holler, E.; Penichet, M. L.; Ljubimova, J. Y., Polymalic acid nanobioconjugate for simultaneous immunostimulation and inhibition of tumor growth in HER2/neu-positive breast cancer. *Journal of Controlled Release* **2013,** 171, (3), 322-329.
9. Lee, B. S.; Vert, M.; Holler, E., Water-soluble Aliphatic Polyesters: Poly(malic acid)s. *Biopolymers Online* **2002**.
10. Liu, Y.; Wang, W.; Wang, J.; Wang, Y.; Yuan, Z.; Tang, S.; Liu, M.; Tang, H., Blood compatibility evaluation of poly(d,l-lactide-co-β-malic acid) modified with the GRGDS sequence. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2010,** 75, (1), 370.
11. Wang, L.; Jia, X.; Chen, Y.; Che, Y.; Yuan, Z., Synthesis, degradability, and cell affinity of poly (DL-lactide-co-RS-hydroxyethyl-β-malolactonate). *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2008,** 87A, (2), 459-469.
12. Mozafari, M.; Gholipourmalekabadi, M.; Chauhan, N. P. S.; Jalali, N.; Asgari, S.; Caicedoa, J. C.; Hamlekhan, A.; Urbanska, A. M., Synthesis and characterization of nanocrystalline forsterite coated poly (l-lactide-co-β-malic acid) scaffolds for bone tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C* **2015,** 50, 117-123.
13. Coulembier, O.; Degée, P.; Hedrick, J. L.; Dubois, P., From controlled ring-opening polymerization to biodegradable aliphatic polyester: especially poly (β-malic acid) derivatives. *Progress in Polymer Science* **2006,** 31, (8), 723-747.
14. Haidopoulos, M.; Turgeon, S.; Sarra-Bournet, C.; Laroche, G.; Mantovani, D., Development of an optimized electrochemical process for subsequent coating of 316 stainless steel for stent applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2006,** 17, (7), 647-657.
15. Ng, X. W.; Huang, Y.; Liu, K. L.; Lim, S. G.; Chen, H. H.; Burnett, J. C.; Boey, F.; Chiang, Y.; Venkatraman, S. S., In vitro evaluation of cenderitide-eluting stent I -an antirestenosis and proendothelization approach. *Journal of pharmaceutical sciences* **2014,** 103, (11), 3631-3640.
16. McDonald, P.; Lyons, J.; Geever, L.; Higginbotham, C., In vitro degradation and drug release from polymer blends based on poly(dl-lactide), poly(l-lactide-glycolide) and poly(ε-caprolactone). *Journal of Materials Science* **2009,** 45, (5), 1284-1292.
17. Schmitz-Hertzberg, S.-T.; Mak, W. C.; Lai, K. K.; Teller, C.; Bier, F. F., Multifactorial design of poly(d,l-lactic-co-glycolic acid) capsules with various release properties for differently sized filling agents. *Journal of Applied Polymer Science* **2013,** 130, (6), 4219.
18. Qian, J.; Xu, W.; Zhang, W.; Jin, X., Preparation and characterization of biomorphic poly(l-lactide-co-β-malic acid) scaffolds. *Materials Letters* **2014,** 124, (0), 313.

19. Lai, K. L.; He, B.; Gu, Z. W., Preparation and cell compatibility of functionalized biodegradable poly(DL-lactide-co-RS-β-malic acid). *Chinese Journal of Polymer Science* **2008,** 26, (2), 177-186.
20. Zhang, Y.; Ni, C.; Shi, G.; Wang, J.; Zhang, M.; Li, W., The polyion complex nano-prodrug of doxorubicin (DOX) with poly(lactic acid-co-malic acid)-block-polyethylene glycol: preparation and drug controlled release. *Medicinal Chemistry Research* **2015,** 24, (3), 1189-1195.
21. Goodhue, C. T.; Snell, E. E., The Bacterial Degradation of Pantothenic Acid. III. Enzymatic Formation of Aldopantoic Acid. *Biochemistry* **1966,** 5, (2), 403.
22. Nurmikko, V.; Salo, E.; Hakola, H.; MÃ¤kinen, K.; Snell, E. E., The Bacterial Degradation of Pantothenic Acid. II. Pantothenate Hydrolase*. *Biochemistry* **1966,** 5, (2), 399.
23. Ikada, Y.; Iwata, H.; Horii, F.; Matsunaga, T.; Taniguchi, M.; Suzuki, M.; Taki, W.; Yamagata, S.; Yonekawa, Y.; Handa, H., Blood compatibility of hydrophilic polymers. *Journal of biomedical materials research* **1981,** 15, (5), 697-718.
24. Ouhib, F.; Randriamahefa, S.; Guerin, P.; Barbaud, C., Synthesis of new statistical and block co-polyesters by ROP of α,α,β-trisubstituted β-lactones and their characterizations. *Designed Monomers And Polymers* **2005,** 8, (1), 25-35.
25. Barbaud, C.; Faÿ, F.; Abdillah, F.; Randriamahefa, S.; Guérin, P., Synthesis of New Homopolyester and Copolyesters by Anionic Ring-opening Polymerization of α,α′,β-Trisubstituted β-Lactones. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2004,** 205, (2), 199.
26. R. Belibel, T. A., A. Garcia, C. Barbaud and L. Mora, *Journal of Materials Science and Engineering C* **Accepted 02 October 2015.**
27. Reed, A. M.; Gilding, D. K., Biodegradable polymers for use in surgery—poly(ethylene oxide) poly(ethylene terephthalate) (PEO/PET) copolymers: 1. *Polymer* **1981,** 22, (4), 499-504.
28. Kohn, F. E.; Vandenberg, J. W. A.; Vanderidder, G.; Feijen, J., The Ring-Opening Polymerization Of D,L-Lactide In The Melt Initiated With Tetraphenyltin. *Journal of Applied Polymer Science* **1984,** 29, (12), 4265-4277.
29. Ross, M. K.; Crow, J. A., Human carboxylesterases and their role in xenobiotic and endobiotic metabolism. *Journal of biochemical and molecular toxicology* **2007,** 21, (4), 187-196.
30. Qiao, Y.; Duan, X.; Fan, L.; Li, W.; Wu, H.; Wang, Y., Synthesis of controlled molecular weight poly (β-malic acid) and conjugation with HCPT as a polymeric drug carrier. *Journal of Polymer Research C7 - 397* **2014,** 21, (4), 1-9.
31. Unger, F.; Wittmar, M.; Morell, F.; Kissel, T., Branched polyesters based on poly[vinyl-3-(dialkylamino)alkylcarbamate-co-vinyl acetate-co-vinyl alcohol]-graft-poly(d,l-lactide-co-glycolide): Effects of polymer structure on in vitro degradation behaviour. *Biomaterials* **2008,** 29, (13), 2007.
32. van Nostrum, C. F.; Veldhuis, T. F. J.; Bos, G. W.; Hennink, W. E., Hydrolytic degradation of oligo(lactic acid): a kinetic and mechanistic study. *Polymer* **2004,** 45, (20), 6779.
33. Li, S.; Garreau, H.; Vert, M., Structure-property relationships in the case of the degradation of massive poly (α-hydroxy acids) in aqueous media. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **1990,** 1, (4), 198-206.
34. Nazre, A. t.; Lin, S., Theoretical strength comparison of bioabsorbable (PLLA) plates and conventional stainless steel and titanium plates used in internal fracture fixation. In *Clinical and Laboratory Performance of Bone Plates*, ASTM International: 1994.
35. Leng, J.; Lau, A. K.-t., *Multifunctional polymer nanocomposites*. CRC press: 2010.

➢ Conclusion de l'article 4

La dégradation *in vitro* des PDMMLAs a été présentée dans cet article dans les conditions physiologiques (PBS à pH 7,4 et 37°C). Plusieurs facteurs ont été étudiés afin de comprendre le comportement et le mode de dégradation de ces derniers. Nous avons démontré que la dégradation (perte de masse molaire, vitesse et profil d'hydrolyse) des PDMMLAs a été influencée par plusieurs facteurs tels que la nature chimique et la charge des groupements fonctionnels latéraux, l'équilibre hydrophile / hydrophobe, la masse molaire, le pH, la température et l'activité enzymatique.

Il a été démontré que l'utilisation des polymères ayant une masse molaire moyenne, la présence d'enzymes spécifiques, le pH et la température élevés ont considérablement accéléré la vitesse de dégradation. En effet, les PDMMLAs ayant une chaîne latérale hydrophile chargée à un pH physiologique ont été dégradés plus rapidement que ceux qui portent une chaîne latérale hydrophile neutre. Or, une chaîne latérale contenant des groupements hexyliques a ralenti leur dégradation. Donc, la présence d'un fragment hydrophile chargé permettra la dégradation rapide du polymère plus que celle d'un groupement hydrophile neutre.

En outre, en présence d'une masse molaire élevée, le comportement de dégradation des copolymères n'a pas été le même que celui des polymères ayant une masse molaire 10 fois moins élevée. Initialement, le polymère de masse molaire élevée peut être rapidement hydrolysé avec une perte maximale de sa masse molaire dans les premières semaines d'hydrolyse. Ensuite, la vitesse de dégradation a diminué.

Par ailleurs, en raison de la déprotonation des fonctions acides carboxyliques à pH 9 et de la forte interaction entre les chaînes polymères et le milieu aqueux à une température élevée, les polymères se sont dégradés selon un mécanisme de dégradation par corrosion de surface au lieu d'une dégradation en masse. Dans ces cas, la vitesse de dégradation de la surface des films polymères est plus élevée que celle de la pénétration d'eau à l'intérieur de la structure du polymère. Cela, a provoqué l'érosion au niveau de la surface du film polymère jusqu'à sa complète dégradation. En revanche, à pH 5 et à 25°C, la vitesse de dégradation était lente ce qui indique un type de dégradation en masse. Donc, dans des conditions physiologiques à un pH 7,4 et à 37°C, les PDMMLAs se dégradaient suivant un mécanisme mixte.

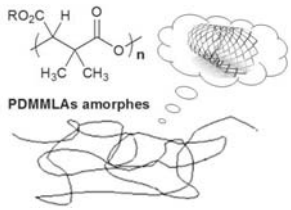
De plus, l'estérase qui est une enzyme biologique qui hydrolyse spécifiquement les fonctions esters a accéléré la dégradation des polymères d'une façon significative en comparant à l'α-amylase qui est une enzyme non-spécifique et à la dégradation en absence d'enzymes.

En parallèle, une étude de la viabilité cellulaire vis-à-vis des HUVECs a été réalisée sur les produits de dégradation selon deux techniques MTT et Live/Dead. Les résultats obtenus ont démontré leur non cytotoxicité. L'étude statistique sur ces résultats sera effectuée ultérieurement.

Enfin, ces études nous ont permis de choisir comme première approche le meilleur matériau pour la poursuite du projet c'est le 30/70 de masse molaire moyenne. Il est donc essentiel de corréler les résultats des études de la physicochimie de la surface à ceux de la réponse biologique des PDMMLAs pour confirmer ce choix. Afin d'accélérer la dégradation, la synthèse des copolymères du PDMMLA avec de petites masses molaires est possible si nécessaire.

En résumé de ce qui a été exposé dans ce 2ème chapitre, les études effectuées sur les PDMMLAs amorphes ont visé l'évaluation de leurs propriétés physicochimiques de la surface et de leur réponse biologique. Ces études ont démontré le potentiel de ces polyesters pour les utiliser en tant que revêtement de stents cardiovasculaires.

Objectif 1

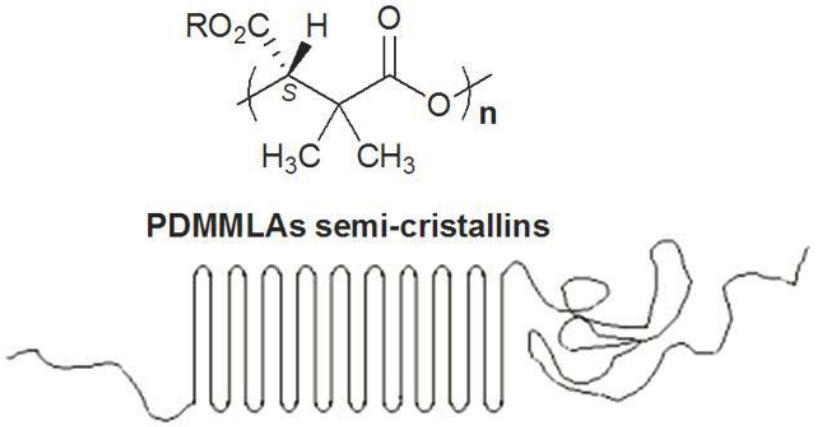


Chapitre III : PDMMLAs semi-cristallins

OBJECTIF 2

Le design et l'architecture macromoléculaires et les propriétés physicochimiques des stéréopolymères constituent un domaine de recherche très intéressant. Ce chapitre expose le deuxième objectif de ce travail de thèse qui consiste à la mise en ouvre de nouveaux stéréopolyesters qui comportent sur leur chaîne macromoléculaire un ou deux centres stéréogènes. La synthèse et la caractérisation de ces stéréopolyesters nécessitent la synthèse des monomères optiquement actifs. Ce chapitre comporte trois parties :

- **1ère partie** : synthèse et caractérisation de nouvelles β-lactones comme monomères chiraux (article 5) ;
- **2ème partie** : synthèse et caractérisation de nouveaux polyesters isotactiques comportant sur leur chaîne principale un seul centre stéréogène ;
- **3ème partie** : synthèse d'un nouveau stéréo-homopolymère qui comporte deux centres stéréogènes sur sa chaîne macromoléculaire (ditacticité).



➢ Introduction

Afin d'enrichir le domaine biomédical et le domaine de la chimie des polymères, le développement de nouveaux stéréopolymères est primordial. Au cours de ce travail de thèse et en parallèle de toutes les études précédemment décrites, nous avons synthétisé une série de stéréopolyesters dérivés du poly(β-acide 3,3-diméthylmalique) comportant un seul ou deux centres stéréogènes sur leur unité de répétions des polymères (simple tacticité et ditacticité, respectivement). Avant de présenter les résultats obtenus au cours de cette étude, nous introduisons les différentes définitions rencontrées dans le domaine de la stéréochimie des polymères qui représente le lien créé d'une manière artistique entre les chimistes organiciens et les polyméristes.

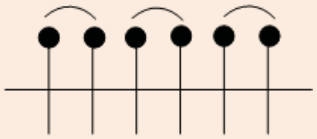
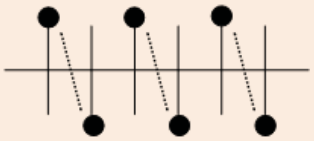
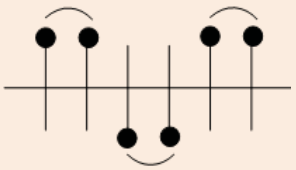
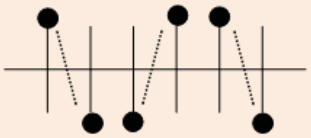
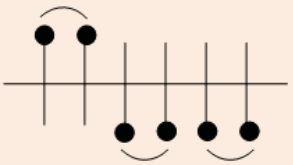
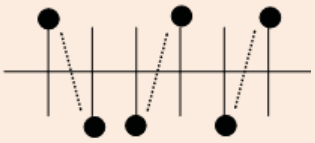
Une chaîne macromoléculaire à structure régulière est caractérisée par une seule unité configurationnelle de répétition en un seul arrangement séquentiel « tacticité ». Les polymères stéréoréguliers sont requis pour être cristallins contrairement aux amorphes ayant une structure de chaîne désordonnée. Ces derniers ont tendance à être plus souples que les polymères stéréoréguliers et semi-cristallins en raison de la disposition aléatoire de leurs chaînes dans une structure irrégulière. La détermination de la conformation des polymères est nécessaire pour l'étude des relations structure-propriété. Elle est accordée à quelques définitions des polymères selon leur structure et le nombre de centres stéréogènes par unité de répétition. Les structures configurationnelles possibles dans le cas d'une simple tacticité (un seul centre stéréogène) sont : isotactique, syndiotactique et atactique. Les définitions et les structures correspondantes sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau III-1. Stéréopolymères comportant un seul centre stéréogène.

Stéréopolymère		Définition	structure	Triades
Tacticité	**Isotactique (mm)**	Un seul type d'unité de répétition configurationnelle du polymère dans un seul arrangement séquentiel	A A A	-[*R*]-[*R*]-[*R*]- ou -[*S*]-[*S*]-[*S*]-
	Syndiotactique (rr)	Deux types d'unité de répétition configurationnelle (monomères) du polymère dans un arrangement séquentiel alterné.	A B A	-[*R*]-[*S*]-[*R*]- ou -[*S*]-[*R*]-[*S*]-
	Atactique (mr ou rm)	Deux types d'unité de répétition configurationnelle (monomères) du polymère dans un arrangement séquentiel aléatoire.	A B B	-[*R*]-[*R*]-[*S*]- ou -[*R*]-[*S*]-[*S*]- ou -[*S*]-[*R*]-[*R*]- ou -[*S*]-[*S*]-[*R*]-

Dans le cas d'une ditacticité (deux centres stéréogènes), les structures possibles sont : diisotactique, érythrodiisotactique, thréodiisotactique, disyndiotactique, érythrodisyndiotactique et thréodisyndiotactique. Les différentes structures correspondantes sont présentées dont le tableau suivant :

Tableau III-2. Stéréopolymères comportant deux centres stéréogènes. *Pour les triades, la couleur rouge et bleue correspondent respectivement à la 1ère et la 2ème unité de répétition configurationnelle.* [h]

Stéréopolymère			Structure	Triades
Ditacticité	**Diisotactique**	**Erythrodiisotactique (mmmmm)**		-[*RR*]-[*RR*]-[*RR*]- ou -[*SS*]-[*SS*]-[*SS*]-
		Thréodiisotactique (rrrrr)		-[*RS*]-[*RS*]-[*RS*]- ou -[*SR*]-[*SR*]-[*SR*]-
	Disyndiotactique	**Erythrodisyndiotactique (mrmrm)**		-[*RR*]-[*SS*]-[*RR*]- ou -[*SS*]-[*RR*]-[*SS*]-
		Thréodisyndiotactique (rmrmr)		-[*RS*]-[*SR*]-[*RS*]- ou -[*SR*]-[*RS*]-[*SR*]-
	Diatactique	**Erythrodiatactique (mrmmm)**		-[*RR*]-[*SS*]-[*SS*]- ou -[*SS*]-[*RR*]-[*RR*]-
		Thréodiatactique (rmrrr)		-[*RS*]-[*SR*]-[*SR*]- ou -[*SR*]-[*RS*]-[*RS*]-

[h] **Copolymers, Microstructure, and Stereoregularity,** *Chapter Five, Copolymers, Microstructure, and Steroeregularity, Version of 1/11/05*

En plus d'une triade, l'arrangement configurationnel et la tacticité des chaînes polymères peuvent être étudiés à l'aide d'une diade. Dans ce cas, deux nomenclatures sont possibles : « méso (m) » et « racémo (r) » (figure III-1).

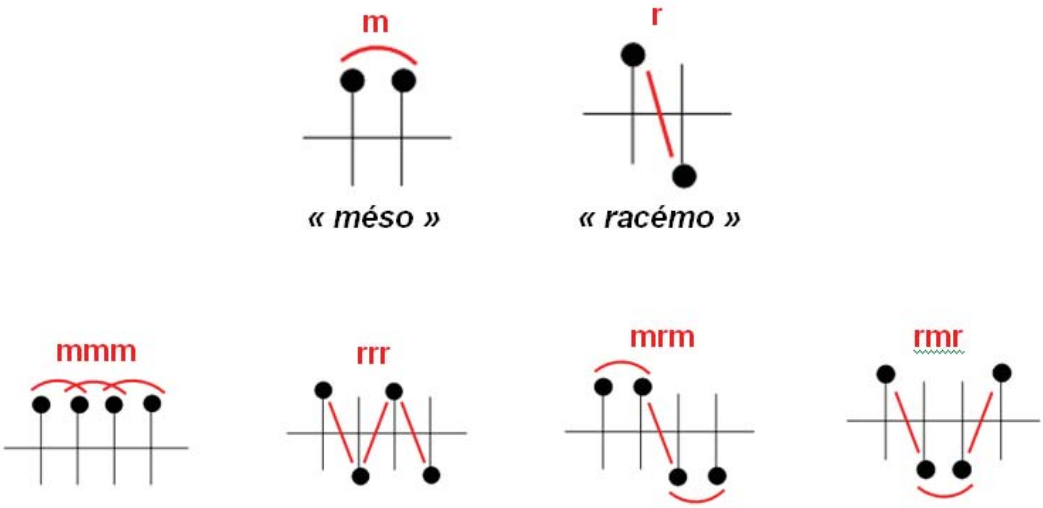


Figure III-1. La représentation d'une diade « méso » et « racémo ».[h]

En effet, sur la base de cette représentation, les nomenclatures isotactique, syndiotactique et atactique d'une triade sont respectivement : mm, rr et mr (ou rm) (tableau III-1). Dans le cas d'une ditacticité, les nomenclatures correspondantes sont présentées dans le tableau III-2 (diisotactique (mmmmm ou rrrrr), disyndiotactique (mrmrm ou rmrmr) et diatactique (mrmmm ou rmrrr).

➢ ***Détermination des structures configurationnelles par RMN ^{13}C***

Pour caractériser l'activité optique et l'isomérie géométrique des polymères, la RMN ^{13}C a largement été utilisée dans la littérature. La fréquence de la résonance magnétique d'un proton « H » est affectée par la structure configurationnelle relative de l'unité de répétition avec ses deux voisines. Ces trois unités de répétition forment une *triade* dont la position centrale est occupée par le proton « H ».[h]

Pour un polymère contenant trois types de triades (isotactique, syndiotactique et atactique), trois signaux principaux pour chacun des groupes de protons non équivalents peuvent être observés. L'intensité des pics est proportionnelle au pourcentage de chaque triade. Le déplacement chimique des trois triades est présenté dans la figure III-2 qui montre que la triade isotactique est la plus déblindée.[h]

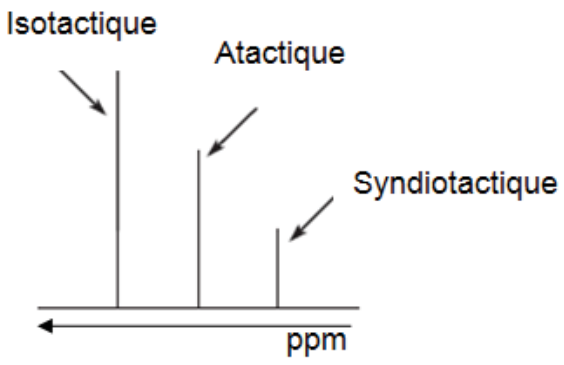


Figure III-2. Représentation schématique de trois triades correspondent à un stéréopolymère comportant un seul centre stéréogène analysé par RMN ^{13}C. [h]

Dans le cas d'un stéréopolymère possédant deux centres stéréogènes (ditacticité), l'identification des déplacements chimiques des triades est plus compliquée. La figure III-3 présente l'attribution des différentes représentations à base d'une dyade réalisée sur le polypropylène qui a été caractérisé par RMN ^{13}C par M. D. Bruce *et al*.[h, i]

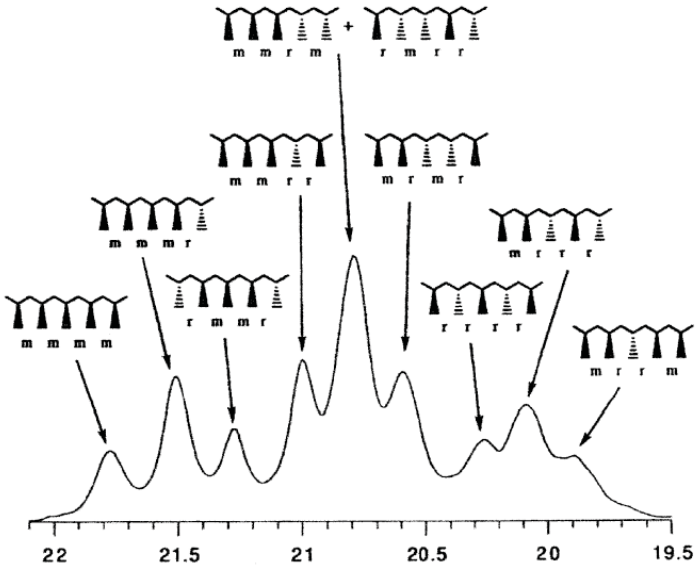


Figure III-3. RMN ^{13}C du polypropylène. [h]

Donc, l'ordre des triades de la plus déblindée à la plus blindée est respectivement : mmmm, mmmr, rmmr, mmrr, (mmrm et rmrr), mrmr, rrrr, mrrr et mrrm.

Cette étude bibliographique nous permettra de caractériser la stéréochimie des polymères chiraux étudiés dans ce chapitre

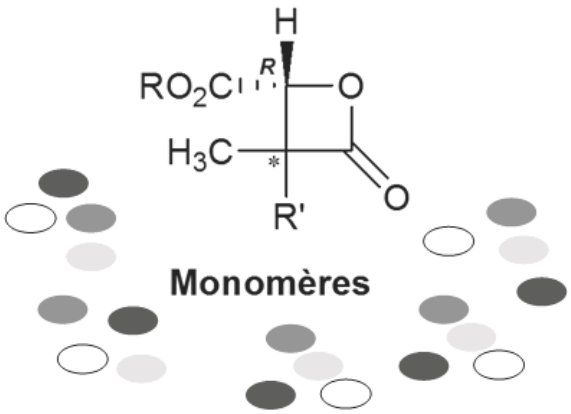
[i] Bruce, M. D.; Waymouth, R. M., Statistical Analysis and Simulation of Pentad Distributions of Stereoblock Polypropylenes. *Macromolecules* **1998,** 31, (9), 2707.

Chapitre III : PDMMLAs semi-cristallins

OBJECTIF 2

1ère partie :

Synthèse et caractérisation des monomères chiraux



ARTICLE 5

(Publié)

« Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry »

Résumé :

Dans le but de préparer une série des nouveaux stéréopolyesters dérivés du poly(β-acide 3,3-diméthylmalique) (PDMMLs semi-cristallins), diverses β-lactones optiquement actives ((4*R*)-alkyloxycarbonyl-3,3-dialkyl-2-oxétanones) ont été synthétisées comme monomères dans ce travail pour la première fois. Ces lactones chirales ont été préparées à partir du *L*-(*S*) -acide malique commercial en six étapes : estérification, dialkylation, hydrolyse basique, monoestérification et lactonisation. Lors de l'étape de dialkylation, deux groupements méthyle et allyle ont été introduits. Ils permettent respectivement d'apporter le caractère hydrophobe ou la fonctionnalisation des polymères. Ainsi, l'étape d'hydrolyse donne le diacide correspondant qui réagit avec différents alcools pour donner une grande variété de monoesters. Les groupements fonctionnels introduits lors de cette étape permettent d'ajuster le caractère hydrophile/hydrophobe des polymères une fois synthétisés. Enfin, la synthèse des monomères est achevée par une lactonisation réalisée selon la réaction de Mitsunobu. Cette réaction consiste à activer la fonction alcool des monoesters accompagnée d'une inversion de configuration du carbone asymétrique. Quatre différentes lactones ont été synthétisées et caractérisées par IR, RMN, $[\alpha]_D$. elles sont obtenues avec un excès énantiomérique de 100%. L'énantiopureté a été confirmée soit par RMN ^{1}H soit par la synthèse d'un homopolymère isotactique et semi-cristallin correspondant. Les différentes lactones ont été choisies pour leurs groupements fontionnels :

- le groupement allyle qui apporte un deuxième centre de chiralité à la structure macromoléculaire et qui permettra la modification chimique des polymères.
- le groupement benzylique qui donne après déprotection par hydrogénolyse un groupement acide carboxylique apportant le caractère hydrophile chargé aux polymères.
- le groupement benzyloxypropylique qui fournit après déprotection par hydrogénolyse un groupement alcool donnant le caractère hydrophile neutre aux polymères.
- le groupement ester hexylique qui est utilisé pour son caractère hydrophobe.

Synthesis of New Optically Active α,α',β-Trisubstituted-β-Lactones as Monomers for Stereoregular Biopolyesters

Rima Belibel, Christel Barbaud*

INSERM U1148, Laboratory for Vascular Translational Science (LVTS), Institut Galilée, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, 99 Avenue Jean-Baptiste Clément, Villetaneuse, F-93430, France.

*Corresponding author. Tel.:+33(0)149403357. Fax: +33(0)149403083.

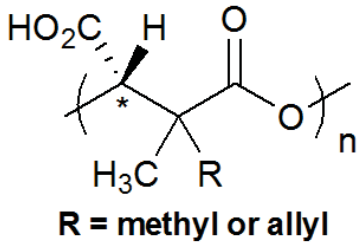
E-mail address: barbaud@univ-paris13.fr (C. Barbaud).

ABSTRACT

Various optically active (4*R*)-alkyloxycarbonyl-3,3-dialkyl-2-oxetanones as monomers were synthesized from L-(*S*)-malic acid in six steps in order to prepare a new family of stereopolyesters for biomedical applications. The synthesis began with an esterification followed of a dialkylation in the aim to introduce hydrophobic groups as methyl or reactive group as allyl. Then, a saponification has permitted to obtain the corresponding diacids which have reacted with appropriate alcohols to furnish different monoesters. The last and most important step was the activation of hydroxyl group of monoesters with the asymmetric carbon configuration inversion according to the Mitsunobu reaction. Thus, this reaction has provided lactones from monoesters with 100% enantiomeric excess which was confirmed by ^{1}H NMR and by the synthesis of corresponding isotactic and semi-crystalline homopolyesters.

KEYWORDS: Chirality, diacid, monoesters, α,α',β-trisubstituted-β-lactones, isotactic homopolyester.

Graphical abstract



For temporary therapeutic applications, it will be innovative to use biodegradable and bioassimilable stereopolymers. In our study, stereopolyesters derived from malic acid may be synthesized by anionic polymerization from new optically active α,α',β-trisubstituted-β-lactones as monomers. Therefore, this paper describes in detail the total synthesis and characterization of a series of design lactones and one isotactic homopolyester.

I. Introduction

The development of new and design monomers for biomedical and therapeutic application is innovative in the field of research in organic chemistry. Indeed, a large family of α,α',β-trisubstituted-β-lactones has been prepared from racemic diethyloxalpropionate to furnish synthetic racemic and amorphous polyesters.[1,2] These biodegradable and bioassimilable polymeric materials can be used in temporary therapeutic applications as drug delivery systems.[3,4] At present, the possibility of taking advantage of chirality to modify and adjust physical and mechanical properties of polymers and copolymers derived from poly((*R*,*S*)-3-alkyl-3-methylmalic acid) (PAMMLA) is essential if we regard the fact that these biopolyesters were used for different biomedical applications (Figure 1).[5]

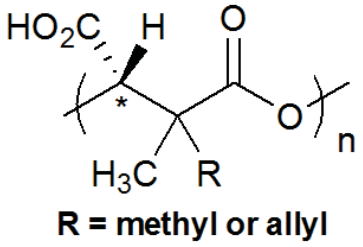
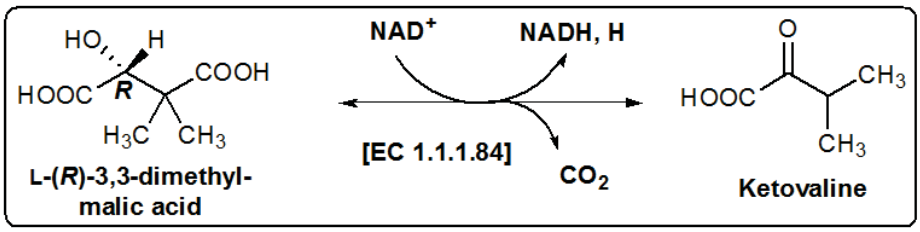


Figure 1. Structure of poly((*R*,*S*)-3-alkyl-3-methylmalic acid) (PAMMLA).

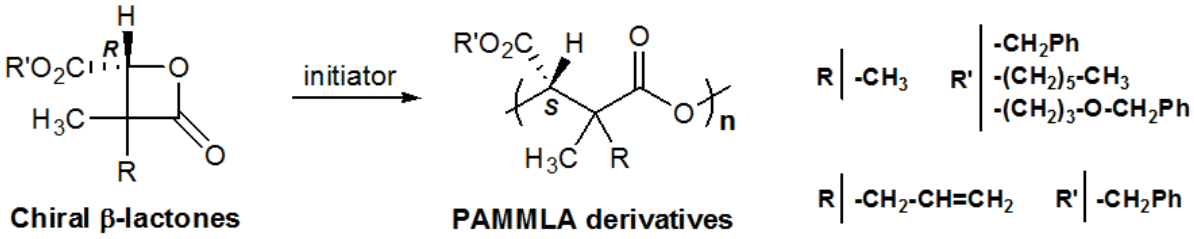
Indeed, the hydrolysis of atactic poly((*R*,*S*)-3,3-dimethylmalic acid) (R = methyl) gave the corresponding (*R*,*S*)-3,3-dimethylmalic acid.[6,7] Moreover, in the literature the chiral diacid L-(*R*)-3,3-dimethylmalic acid is a natural and non-toxic compound involved in the biosynthesis of pantothenate that is used in the synthesis of Coenzyme A catalyzed by the enzyme β,β-dimethyldehydrogenase (EC.1.1.1.84) to give ketovaline (Scheme 1).[7]



Scheme 1. Biosynthesis of ketovaline by β,β-dimethyldehydrogenase (EC.1.1.1.84).

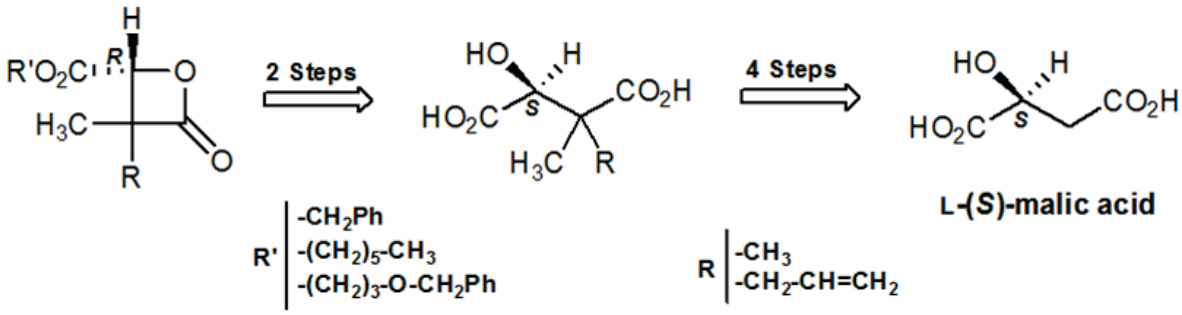
The enantiomeric composition and distribution of stereogenic centers in polymer chains affect properties of the resulting polymers such as the morphology or the rate of the

degradation.[8] Anionic ring-opening polymerization of chiral α,α',β-trisubstituted-β-lactones leads to semi crystalline poly((*S*)-3-alkyl-3-methylmalic acid) derivatives (Scheme 2).



Scheme 2. Anionic ring-opening polymerization of chiral α,α',β-trisubstituted-β-lactones.

In this report, we are investigating the synthesis of various chiral α,α',β-trisubstituted-β-lactones. These can be easily prepared in two steps from diacid, synthesized from commercial L-(*S*)-malic acid in four stages (Scheme 3).



Scheme 3. Retrosynthetic pathway.

Worthy of interest, the R group will be either methyl or allyl group and the R' group will be either benzyl, benzyloxypropyl or hexyl group. The role of R and R' is well defined: it allows (i) chemical modifications and the possibility to build bioactive or targeting molecules on the skeleton of the polyester in the case of benzyl, benzyloxypropyl or allyl group, (ii) an adjustment of the hydrophilic/hydrophobic balance in the case of methyl or hexyl group compare to poly(malic acid) derivatives. Finally, we report also on the homopolymerization of the benzylic lactone by anionic ring-opening polymerization that led to a stereoregular and semi-crystalline homopolymer with only isotactic sequences.

II. Experimental

General Methods. All optical rotation $[\alpha]_D$ (°) data were determined using Biot's law: $\alpha = [\alpha]_D \ell c$. The observed optical rotation α is measured. The specific optical rotations of different products were taken at the intervals 21-25 °C and 0.5-1.3 mg/mL in acetone, by using Bellingham and Stanley Ltd ADP410 High Accuracy polarimeter (units for $[\alpha]$, c and ℓ, usually $deg.cm^3.g^{-1}.dm^{-1}$, $g.cm^{-3}$ and dm, respectively and $\ell = 1\ dm$). The absolute average molecular weights and molecular weight distributions were determined at room temperature by coupling online a high performance size exclusion chromatograph (HPSEC), a multi-angle laser light scattering detector (MALLS), a viscometer and a differential refractive index (dRI) detector. Acetone, used as carrier, was filtered through a 0.1 µm filter unit (Millipore, Billerica, USA), carefully degassed (DGU-20A3R Shimadzu, Kyoto, Japan), and eluted at a 0.5 mL/min flow rate (LC10Ai Shimadzu, Kyoto, Japan). 100 µL of a 0.2 µm-filtered sample solution (at about 20 mg/mL) were injected with an automatic injector (SIL-20A HT Shimadzu, Kyoto, Japan). The column packing was a polystyrene-divinylbenzene gel. The MALLS photometer, a miniDawn TREOS from Wyatt Technology Inc. (Santa Barbara, CA, USA) was provided with a fused silica cell and a Ga-As laser (λ = 665.8 nm). The whole collected data: light scattering (LS), dRI were analyzed using the Astra v6.0.6 software package. Molar mass were obtained with the Zimm order 1 method. The concentration of each eluted fraction was determined with dRI (RID10A Shimadzu, Kyoto, Japan) according to the measured values of dn/dc (0.097 mL/g).[9] Melting temperature (*T*m) and glass transition temperature (*T*g) of homopolymer were obtained using Differential Scanning Calorimetry (DSC). DSC was measured on a SDT Q600 analyzer (TA instrument, Villeurbanne, France). In a typical run, polymer was first putted in the furnace and heated from room temperature to 200°C by means of a temperature ramp of 10°C/min. This operation was repeated twice. *T*g was determined from the inclination point of the second heating curve while mp was taken from the maximum of the endothermic peak in the first heating run. Melting points of solid compounds mp (°C) were determined with a WME Kofler apparatus. The TLC were revealed with the UV wavelength (254 nm) and with a solution which consists on: the absolute EtOH (93 mL), the p-anisaldehyde (2.5 mL), the concentrated H_2SO_4 (3.5 mL) and the acetic acid (1 mL). Flash chromatography was performed with silica gel (C-C 35-70 µm, 60 Å). ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on BRUKER AM-400 MHz spectrometer using CD_3COCD_3 as solvent and with the residual solvent signals as internal standard unless otherwise indicated. Chemical shifts were given in ppm (δ) and coupling constants in Hz. The following

abbreviations are used to describe the peak pattern: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet) and m (multiplet). FTIR spectra were recorded on AVATAR 370 TF-IR Thermo Nicolet spectrometer using Nicolet OMNI-Sampler ATR Smart Accessory (Ge, DTGS). Adsorption bands are given in cm^{-1}. Anhydrous THF was distilled on sodium-benzophenone. In all other cases, the commercially available reagent-grade solvents were employed without purification. All reactions, with anhydrous organic solvents were performed under nitrogen atmosphere. All the glass apparatus were kept one night in a drying-oven at 100°C. Elemental analyses were performed by the National Center for Scientific Research, Villeurbanne, France.

Monomers synthesis

(*S*)-Diethyl malate 1. A solution of 20.0 g (149 mmol) of L-(*S*)-malic acid dissolved in 100 mL of absolute ethanol and 6.8 mL of concentrated hydrochloric acid (HCl) was stirred at reflux for 4 h. The solvent was evaporated under vacuum, and the residue was purified by distillation (bp = 83°C, 1mm Hg),[10] to give 27.3 g of the product **1** as a colorless oil in 96% yield. R_f 0.39 (SiO_2, AcOEt/cyclohexane, 1:3). $[\alpha]^{22}_D$: -16.3 (c = 1.1, acetone), lit.[11] $[\alpha]^{22}_D$: -15.6 (c = 5.3, acetone). ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 1.23 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH_3), 1.25 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH_3), 2.67 (dd, 1H, *J* = 6.9, *J* =15.8 Hz, CH_2), 2.78 (dd, 1H, *J* = 4.8 Hz, *J* = 15.8 Hz, CH_2), 4.11 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, CH_2), 4.17 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, CH_2), 4.18 (dd, 1H, *J* = 7.1 Hz, CH). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 14.07 (2 x CH_3), 39.52 (CH_2), 60.61, 61.22 (2 x $\underline{C}H_2$–CH_3), 67.99 (CH), 170.44, 173.31 (2 x C=O).

General alkylation procedure. Firstly, at 0° under nitrogen atmosphere, a solution of n-BuLi (n-BuLi) (1.6 M in hexanes, 14.6 equiv) was added dropwise to a stirring solution of diisopropylamine (2.3 equiv) in anhydrous THF (200 mL for 1 mol of n-BuLi) in the order to generate *in situ* the lithium diisopropylamide. Next, After 30 min the reaction mixture was cooled to -78°C and the dissolved compound (1 equiv) in anhydrous THF was added dropwise for 10 min. After stirring at -78°C for 1h then 30 min at -30°C, a solution of methyl iodide or allyl bromide (2 equiv) in anhydrous THF was added dropwise under nitrogen atmosphere. The reaction mixture was stirred at -78°C and followed by TLC. After 2h, this reaction was quenched by addition of solid ammonium chloride (NH_4Cl), diluted with AcOEt and acidified with HCl 2M until pH = 1-2. The reaction mixture was poured into a separatory funnel containing 100 mL of water and 200 mL of AcOEt. Organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with 3 x 80 mL AcOEt. The combined organic phases were

washed with brine, dried over sodium sulfate (Na_2SO_4) and filtered. The residue of evaporation was purified by flash chromatography on silica gel using AcOEt/cyclohexane, 1:3 as eluent. All values of alkylation products R_f were obtained from elution system AcOEt/cyclohexane, 1:3.

(2*S*)-diethyl-3-methylmalate 2. *Alkylation procedure :* n-BuLi (103.7 mL, 1.1 mol, 1.6M), diisopropylamine (24.5 mL, 173 mmol) in 225 mL of anhydrous THF, compound **1** (15.03 g, 79 mmol) in 15 mL of anhydrous THF and methyl iodide (2 equiv, 9.7 mL, 157 mmol) in 10 mL of anhydrous THF. The product **2** was obtained as light yellow oil (11.8 g) after purification in 73% yield. R_f 0.48. $[\alpha]^{22}_D$: -20.1 (c = 1.19, acetone). ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 1.17 (d, 3H, *J* = 7.1 Hz, C<u>H</u>$_3$-CH), 1.20 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, C<u>H</u>$_3$-CH$_2$), 1.25 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, C<u>H</u>$_3$-CH$_2$), 2.92, 2.93 (qd, 1H, *J* = 4.0 Hz, C<u>H</u>-CH$_3$), 4.09 (m, 4H, 2 x C<u>H</u>$_2$-CH$_3$), 4.29 (dd, 1H, *J* = 4 Hz, C<u>H</u>-OH). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 14.12 (2 x <u>C</u>H$_3$–CH$_2$), 14.16 (CH$_3$), 43.97 (<u>C</u>H-CH$_3$), 60.64, 61.29 (2 x <u>C</u>H$_2$–CH$_3$), 73.06 (CH-OH), 172.80, 173.08 (2 x C=O).

(2*S*)-diethyl-3,3-dimethylmalate 3. *Alkylation procedure:* n-BuLi (93.2 mL, 0.99 mol, 1.6M), diisopropylamine (21.8 mL, 155 mmol) in 200 mL of anhydrous THF, compound **2** (14.45 g, 70.7 mmol) in 15 mL of anhydrous THF and methyl iodide (2.2 equiv, 9.4 mL, 152 mmol) in 10 mL of anhydrous THF. The product **3** is purified to get 12 g (yield 78%) as yellow oil. R_f 0.59. $[\alpha]^{22}_D$: +8.89 (c = 1.23, acetone). ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 1.12, 1.21 (2s, 6H, 2 x CH$_3$), 1.23 (t, 6H, *J* = 7.0 Hz, 2 x C<u>H</u>$_3$-CH$_2$), 4.11 (q, 2H, *J* = 7.0 Hz, C<u>H</u>$_2$-CH$_3$), 4.17 (q, 2H, *J* = 7.0 Hz, C<u>H</u>$_2$-CH$_3$), 4.35 (d, 1H, CH). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 14.07 et 14.12 (2 x <u>C</u>H$_3$-CH$_2$), 19.90, 22.05 (2 x CH$_3$), 46.86 (C), 60.70, 61.33 (<u>C</u>H$_2$-CH$_3$), 75.57 (CH), 172.86, 175.31 (2 x C=O).

(2*S*)-diethyl-3-allylmalate 7. *Alkylation procedure:* n-BuLi (77 mL, 816 mmol, 1.6M), diisopropylamine (18 mL, 128 mmol) in 160 mL of anhydrous THF, compound **1** (10.6 g, 55.9 mmol) in 10 mL of anhydrous THF and allyl bromide (2 equiv, 10.5 mL, 122 mmol) in 7 mL of anhydrous THF. The product **7** (8.87 g) was obtained after purification in 69% yield as a colorless oil. R_f 0.50. $[\alpha]^{22}_D$: -11 (c = 1.40, acetone). ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 1.19 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, C<u>H</u>$_3$-CH$_2$), 1.25 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, C<u>H</u>$_3$-CH$_2$), 2.34 (ddd, 1H, *J* = 7.3 Hz, *J* = 8.0 Hz, *J* = 13.3 Hz, C<u>H</u>$_2$-CH), 2.50 (ddd, 1H, *J* = 6.6 Hz, *J* = 7.3 Hz, *J* = 13.3 Hz, C<u>H</u>$_2$-CH), 2.90 (ddd, 1H, *J* = 4.0 Hz, *J* = 7.3 Hz, *J* = 7.3 Hz, C<u>H</u>-CH$_2$), 4.03-4.29 (m, 5H, 2 x C<u>H</u>$_2$-CH$_3$, C<u>H</u>-OH), 5.04 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz, *J* = 10.0 Hz, CH=C<u>H</u>$_2$), 5.10 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz, *J* = 17.0 Hz, CH=C<u>H</u>$_2$), 5.83 (dddd, 1H, *J* = 6.6 Hz, *J* = 8.0 Hz, *J* = 10.0 Hz, *J* = 17.0

Hz; C<u>H</u>=CH_2). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 14.21, 14.24 (4 x <u>C</u>H_3-CH_2), 32.55 (2 x <u>C</u>H_2-CH), 49.1, 49.6 (2 x <u>C</u>H-CH_2), 60.8, 61.4 (4 x <u>C</u>H_2-CH_3), 71.2, 71.5 (2 x CH-OH), 116.9, 117.3 (2 x <u>C</u>H_2=CH), 136.23, 136.26 (2 x <u>C</u>H=CH_2), 171.8, 172.1, 173.0, 173.3 (4 x C=O. Anal. calcd for $C_{11}H_{17}O_5$: C, 57.38; H, 7.88. Found: C, 57.13; H, 8.23.

(2*S*)-diethyl-3-allyl-3-methylmalate 8. *Alkylation procedure:* **first method.** n-BuLi (23.3 mL, 247 mmol, 1.6M), diisopropylamine (5.5 mL, 39 mmol) in 50 mL of anhydrous THF, product **2** (14.45 g, 16.9 mmol) in 5 mL of anhydrous THF and the allyl bromide (2.2 equiv, 3.3 mL, 37 mmol) in 3 mL of anhydrous THF. After purification, the product **8** was obtained (1.5 g, yield 45%) as colorless oil. **Second method.** Under identical conditions, n-BuLi (25.4 mL, 269 mmol, 1.6M), diisopropylamine (6.0 mL, 42.5 mmol) in 50 mL of anhydrous THF, compound **7** (4.25 g, 18.5 mmol) in 5 mL of anhydrous THF and methyl iodide (2.2 equiv, 2.4 mL, 38.8 mmol) in 3 mL of anhydrous THF. After purification, the product **8** was obtained (2.8 g, yield 62%) as colorless oil. R_f 0.60. $[\alpha]^{22}_D$: +8.48 (c = 0.76, acetone). ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 1.14 (s, 3H, CH_3), 1.23 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, C<u>H</u>$_3$-CH_2), 1.25 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, C<u>H</u>$_3$-CH_2), 2.28 (dd, 1H, *J* = 8.0 Hz, *J* = 13.6 Hz, C<u>H</u>$_2$-CH), 2.50 (dd, 1H, *J* = 6.8 Hz, *J* = 13.6 Hz, C<u>H</u>$_2$-CH), 4.07-4.20 (m, 5H, 2 x C<u>H</u>$_2$-CH_3, C<u>H</u>-OH), 5.04 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz, *J* = 10.0 Hz, C<u>H</u>$_2$=CH), 5.10 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz, *J* = 17.0 Hz, C<u>H</u>$_2$=CH), 5.75 (dddd, 1H, *J* = 6.6 Hz, *J* = 8.0 Hz, *J* = 10.0 Hz, *J* = 17.0 Hz; C<u>H</u>=CH_2). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 14.5 (2 x <u>C</u>H_3-CH_2), 17.6 (CH_3), 40.1 (<u>C</u>H_2-CH), 50.9 (C-CH_3), 61.1, 61.7 (2 x <u>C</u>H_2-CH_3), 76.1 (<u>C</u>H-OH), 118.6 (<u>C</u>H_2=CH), 134.7 (<u>C</u>H=CH_2), 172.9, 174.3 (2 x C=O). Anal. calcd for $C_{12}H_{20}O_5$: C, 59.00; H, 8.25. Found: C, 58.96; H, 8.56.

General saponification procedure. Diacids were prepared by saponification of diesters described before. A mixture of dialkylated diester (1 equiv), and potassium carbonate (6 equiv) in distilled water was first refluxed for 1h then cooled to room temperature and extracted with AcOEt. The aqueous phase was acidified with HCl 6M until pH = 2, evaporated to dryness under vacuum to give a white salt containing the diacid and KCl. Diacid was recovered in AcOEt and concentrated under vacuum. Chloroform was added to precipitate diacid which then filtered to give a white crystalline solid.

(2*S*)-3,3-dimethylmalic acid 4. *Saponification procedure:* Diacid **4** was obtained from the compound **3** (280 mg, 1.28 mmol) and potassium carbonate (1 g, 8 mmol) in 6 mL of distilled water as a white solid (163 mg) in 77% yield. mp = 94-96°C. $[\alpha]^{22}_D$: +5.09 (c = 1.08, acetone). ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 1.20 (s, 3H, CH_3), 1.24 (s, 3H, CH_3),

4.41 (s, 1H, CH). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 19.97, 21.14 (2 x CH_3), 45.88 (C), 74.78 (CH), 173.23, 176.27 (2 x C=O).

(2*S*)-3-allyl-3-methylmalic acid 9. *Saponification procedure:* Diacid **9** was obtained from the compound **8** (1.02 g, 7.25 mmol) and potassium carbonate (3.5 g, 25.0 mmol) in 30 mL of distilled water as a white solid (587.8 mg) in 75% yield. mp = 123-125°C. $[\alpha]^{22}_D$: +23.8 (c = 1.5, acetone). ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 1.14 (s, 3H, CH_3), 2.37 (dd, 1H, *J* = 8.0 Hz, *J* = 13.6 Hz, C$\underline{H}_2$-CH), 2.53 (dd, 1H, *J* = 6.8 Hz, *J* = 13.6 Hz, C$\underline{H}_2$-CH), 4.36 (s, 1H, C$\underline{H}$-OH), 5.02-5.09 (m, 2H, C$\underline{H}_2$=CH), 5.72-5.91 (m, 1H, C$\underline{H}$=CH_2). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 16.5 (CH_3), 39.5 ($\underline{C}H_2$-CH), 49.7 ($\underline{C}$-CH_3), 74.8 ($\underline{C}$H-OH), 117.7 ($\underline{C}H_2$=CH), 133.95 ($\underline{C}$H=CH_2), 173.2, 175.1 (2 x C=O). Anal. calcd for $C_8H_{12}O_5$: C, 51.06; H, 6.43. Found: C, 60.31; H, 6.49.

General monoesterification procedure. At first, diacid was placed in a round-bottomed flask and cooled in an ice bath. Then, trifluoroacetic anhydride (TFAA) (3.3 equiv) was added dropwise at 0°C under nitrogen atmosphere. The white mixture was stirred 30 min at 0°C and 2h30 at room temperature. TFAA in excess and formed trifluoroacetic acid (TFA) were evaporated under vacuum at room temperature. Under nitrogen atmosphere, the desired alcohol (1 equiv) was added to the intermediate cyclic anhydride obtained. The mixture was stirred overnight at room temperature. The resulting yellow solution was dissolved in AcOEt and the organic layer was washed three times with saturated $NaHCO_3$ solution. The combined organic layers were adjusted to pH = 2 with HCl 6M solution and subsequently extracted by AcOEt. The organic layers were also collected, dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated under vacuum. The corresponding monoester was at last purified by flash chromatography on silica gel (AcOEt/cyclohexane, 3:7) then used in the reaction of lactonisation. All values of monoesterification products R_f were given from elution system AcOEt/cyclohexane, 3:7).

3-Benzyloxycarbonyl-2,2-dimethyl-(3*S*)-hydroxypropanoic acid 5a. *Monoesterification procedure:* The mixture of the diacid **4** (380.7 mg, 2.35 mmol), TFAA (1 mL, 7 mmol) and benzyl alcohol (243 µL, 2.35 mmol) has furnished after purification the monoester **5a** (478.5 mg, yield 81%) as a pure white solid. R_f 0.30. mp = 93-95°C. $[\alpha]^{22}_D$: -6.05 (c = 0.99, acetone). ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 1.16 (s, 3H, CH_3), 1.22 (s, 3H, CH_3), 4.46 (s, 1H, C$\underline{H}$-OH), 5.18 (s, 2H, *J*= 3.0 Hz, C$\underline{H}_2$-Ph), 7.37 (m, 5H, Ph). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 20.66, 21.74 (2 x CH_3), 46.64 (C), 67.01 ($\underline{C}H_2$-Ph), 75.89 ($\underline{C}$H-OH), 128.82, 128.88, 129.01 (Ph), 172.85, 176.62 (2 x C=O). Anal. calcd for $C_{13}H_{16}O_5$: C, 61.90; H, 6.39. Found: C, 62.06; H, 6.69.

3-Hexyloxycarbonyl-2,2-dimethyl-(3*S*)-hydroxypropanoic acid 5b. *Monoesterification procedure:* The mixture of the diacid **4** (356 mg, 2.2 mmol), TFAA (1 mL, 7 mmol) and hexyl alcohol (273 µL, 2.2 mmol) gave after purification the monoester **5b** (297.8 mg, yield 55%) as a yellow oil. R_f 0.48. $[\alpha]^{22}_D$: +2.27 (c = 1.1, acetone). ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 0.88 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, C<u>H</u>$_3$-CH$_2$), 1.16 (s, 3H, CH$_3$), 1.22 (s, 3H, CH$_3$), 1.25 (m, 6H, 3 x CH$_2$), 1.62 (m, 2H, C<u>H</u>$_2$-CH$_2$-O), 4.10 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz, CH$_2$-O), 4.39 (s, 1H, C<u>H</u>-OH). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 13.88 (<u>C</u>H$_3$-CH$_2$), 20.41, 21.70 (2 x CH$_3$), 22.77 (2 x CH$_2$), 25.86 (CH$_2$), 31.73 (CH$_2$), 46.44 (C), 65.35 (CH$_2$-O), 75.64 (<u>C</u>H-OH), 172.93, 176.57 (2 x C=O). Anal. calcd for $C_{12}H_{22}O_5$: C, 58.52; H, 9.00. Found: C, 57.18; H, 8.26.

3-(3'-Benzyloxypropyl)oxycarbonyl-2,2-dimethyl-(3*S*)-hydroxypropanoic acid 5c. *Monoesterification procedure:* The mixture of the diacid **4** (374.5 mg, 2.31 mmol), TFAA (1.5 mL, 10 mmol) and 3-benzyloxy-1-propanol (365 µL, 2.31 mmol) has furnished after purification the monoester **5c** (527.7 mg, yield 74%) as a colorless oil. R_f 0.41. $[\alpha]^{22}_D$: +6.2 (c = 0.5, acetone). ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 1.18 (s, 3H, CH$_3$), 1.24 (s, 3H, CH$_3$), 1.94 (tt, 2H, *J* = 6 Hz, CH$_2$), 3.58 (t, 2H, *J* = 6 Hz, CH$_2$-O), 4.26 (t, 2H, *J* = 6 Hz, CH$_2$-CO$_2$), 4.39 (s, 1H, CH-OH), 4.50 (s, 2H, C<u>H</u>$_2$Ph), 7.28 (m, 5H, Ph). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 20.98 (CH$_3$), 22.30 (CH$_3$), 33.92 (CH$_2$), 46.97 (C), 63.19 (<u>C</u>H$_2$-CO$_2$), 67.39 (CH$_2$-O), 73.45 (<u>C</u>H$_2$Ph), 76.28 (CH-OH), 128.24, 128.39, 129.14 139.95 (Ph), 173.39, 177.15 (2 x C=O). Anal. calcd for $C_{16}H_{22}O_5$: C, 61.92; H, 7.15. Found: C, 60.39; H, 7.27.

3-Benzyloxycarbonyl-2-allyl-2-methyl-(3*S*)-hydroxypropanoic acid 10. *Monoesterification procedure:* The mixture of the diacid **9** (251 mg, 1.3 mmol), TFAA (1 mL, 7 mmol) and benzyl alcohol (394 µL, 1.3 mmol) has furnished after purification the monoester **10** (290 mg, yield 80%) as a colorless oil. R_f 0.32. $[\alpha]^{22}_D$: +35.8 (c = 0.6, acetone). ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 1.12 (s, 3H, CH$_3$), 2.27 (dd, 1H, *J* = 8.0 Hz, *J* = 13.6 Hz, C<u>H</u>$_2$-CH), 2.51 (dd, 1H, *J* = 6.8 Hz, *J* = 13.6 Hz, C<u>H</u>$_2$-CH), 4.42 (s, 1H, C<u>H</u>-OH), 5.00-5.02 (m, 1H, C<u>H</u>$_2$=CH), 5.03-5.05 (m, 1H, C<u>H</u>$_2$=CH), 5.20 (d, 2H, *J* = 1.2 Hz, C<u>H</u>$_2$-Ph), 5.70 (dddd, 1H, *J* = 6.6 Hz, *J* = 8.0 Hz, *J* = 10.0 Hz, *J* = 17.0 Hz; C<u>H</u>=CH$_2$), 7.40 (m, 5H, Ph). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 17.3 (CH$_3$), 40.27 (<u>C</u>H$_2$-CH), 50.5 (<u>C</u>-CH$_3$), 67.02 (<u>C</u>H$_2$-Ph), 76.1 (<u>C</u>H-OH), 118.5 (<u>C</u>H$_2$=CH), 128.9, 129.1, 129.2 (Ph), 134.6 (<u>C</u>H=CH$_2$), 172.7, 175.4 (2 x C=O). Anal. calcd for $C_{15}H_{18}O_5$: C, 64.74; H, 6.52. Found: C, 65.36; H, 7.22.

General lactonisation procedure. Under nitrogen atmosphere, the dry monoester and PPh_3 (1 equiv) were dissolved in anhydrous THF. A solution of DIAD (1 equiv) in anhydrous THF (10 mL for 2 mmol of monoester) was added dropwise at 0°C under nitrogen atmosphere. The mixture was stirred 1 h at 0°C then 1h30 at room temperature. The reaction was followed by TLC. The solvent THF was evaporated under vacuum and the formed $Ph_3P{=}O$ was precipitated in cold diethyl ether. After precipitate's filtration and evaporation of Et_2O, the residue was purified by flash chromatography on silica gel using AcOEt/cyclohexane as eluent to give different final lactones as transparent oil that conserved at 0°C under N_2. The lactones R_f was obtained using the same column eluting system.

(4*R*)-Benzyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone 6a. *Lactonisation procedure:* The reaction of monoester **5a** (989 mg, 3.9 mmol) with PPh_3 (1.03 g, 3.9 mmol) in THF (14 mL) and DIAD (772 µL, 3.92 mmol) in THF (2 mL) has furnished after purification (AcOEt/cyclohexane, 2:8) the lactone **6a** (807 mg, yield 88%). R_f 0.40. $[\alpha]^{22}_D$: -19.6 (c = 1.07, acetone). FTIR (neat, cm^{-1}) 1756 (C=O ester), 1834 (C=O lactone). ^1H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 1.17 (s, 3H, CH_3), 1.51 (s, 3H, CH_3), 4.96 (s, 1H, CH-O), 5.29 (s, 2H, $C\underline{H}_2$-Ph), 7.41 (m, 5H, Ph). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 17.49, 21.60 (2 x CH_3), 58.21 (C), 67.59 ($\underline{C}H_2$-Ph), 77.42 (CH-O), 129.14, 129.17, 129.36 (Ph), 167.86, 173.51 (2 x C=O). Anal. calcd for $C_{13}H_{14}O_4$: C, 66.66; H, 6.02. Found: C, 66.41; H, 6.10.

(4*R*)-Hexyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone 6b. *Lactonisation procedure:* The reaction of monoester **5b** (1.96 g, 7.97 mmol), with PPh_3 (2.1 g, 7.97 mmol) in THF (27 mL) and DIAD (1.57 mL, 7.97 mmol) in THF (2 mL) has furnished after purification (AcOEt/cyclohexane, 1:9), the lactone **6b** (1.27 g, yield 70%). R_f 0.42. $[\alpha]^{22}_D$: -26.6 (c = 0.6, acetone). FTIR (neat, cm^{-1}) 1756 (C=O ester), 1839 (C=O lactone). ^1H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 0.90 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, $C\underline{H}_3$-CH_2), 1.25 (s, 3H, CH_3), 1.34 (m, 6H, 3 x CH_2), 1.53 (s, 3H, CH_3), 1.69 (m, 2H, $C\underline{H}_2$-CH_2-O), 4.23 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz, CH_2-O), 4.89 (s, 1H, $C\underline{H}$-OH). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 14.42 ($\underline{C}H_3$-CH_2), 18.02, 22.06 (2 x CH_3), 23.33, 26.35 (2 x CH_2), 29.40 (CH_2), 32.25 (CH_2), 58.41 (CH_2-O), 66.45 ($\underline{C}$-C=O), 77.93 ($\underline{C}$H), 168.35, 173.97 (2 x C=O). Anal. calcd for $C_{12}H_{20}O_4$: C, 63.14; H, 8.83. Found: C, 62.86; H, 8.61.

(4*R*)-(3'-Benzyloxypropyl)carbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone 6c. *Lactonisation procedure:* The reaction of monoester **5c** (390 mg, 1.26 mmol) with PPh_3 (330.5 mg, 1.26 mmol) in THF (10 mL) and DIAD (250 µL) in THF (2 mL) has furnished after purification (AcOEt/cyclohexane, 2:8), the lactone **6c** (290 mg, yield 78%). R_f 0.35. $[\alpha]^{22}_D$: -15.2 (c =

1.34, acetone). FTIR (neat, cm^{-1}) 1756 (C=O ester), 1830 (C=O lactone). ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 1.23 (s, 3H, CH_3), 1.50 (s, 3H, CH_3), 1.99 (tt, 2H, *J* = 6 Hz, CH_2), 3.59 (t, 2H, *J* = 6 Hz, CH_2-O), 4.36 (t, 2H, *J* = 6 Hz, CH_2-CO_2), 4.51 (s, 2H, C$\underline{H}_2$-Ph), 4.84 (s, 1H, C$\underline{H}$-OH), 7.28 (m, 5H, Ph). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 18.18 (CH_3), 22.23 (CH_3), 30.08 (CH_2), 58.61 (C-3), 64.01 (CO_2CH_2), 67.43 (CH_2O), 73.69 (CH_2Ph), 78.14 (CH-O), 128.52, 128.64, 129.38, 140.06 (Ph), 168.45, 174.07 (2 x C=O). Anal. calcd for $C_{16}H_{20}O_5$: C, 65.74; H, 6.90. Found: C, 65.46; H, 7.13.

(4*R*)-Benzyloxycarbonyl-3-allyl-3-methyl-2-oxetanone 11. *Lactonisation procedure:* The reaction of monoester **5d** (187 mg, 0.72 mmol) with PPh_3 (189 mg, 0.72 mmol) in THF (10 mL) and DIAD (141 µL, 0.72 mmol) in THF (0.5 mL) has furnished after purification (AcOEt/cyclohexane, 2:8) the lactone **6d** (160 mg, 84% yield). R_f 0.43. $[\alpha]^{22}_D$: -20 (c = 0.56, acetone). FTIR (neat, cm^{-1}) 1746 (C=O ester), 1845 (C=O lactone). ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 1.50 (s, 3H, CH_3), 2.33 (ddt, 1H, *J* = 1.2 Hz, *J* = 8.0 Hz, *J* = 13.6 Hz, C$\underline{H}_2$-CH), 2.42 (ddt, 1H, *J* = 1.4 Hz, *J* = 6.8 Hz, *J* = 13.6 Hz, C$\underline{H}_2$-CH), 4.98 (s, 1H, C$\underline{H}$-OH), 5.07-5.09 (m, 1H, C$\underline{H}_2$=CH), 5.11-5.13 (m, 1H, C$\underline{H}_2$=CH), 5.27 (q, 2H, *J* = 12.1 Hz, C$\underline{H}_2$-Ph), 5.70 (dddd, 1H, *J* = 6.6 Hz, *J* = 8.0 Hz, *J* = 10.0 Hz, *J* = 17.0 Hz; C$\underline{H}$=CH_2), 7.40 (m, 5H, Ph).^{3}C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 19.59 (CH_3), 36.68 ($\underline{C}H_2$-CH), 61.35 ($\underline{C}$-CH_3), 68.01 ($\underline{C}H_2$-Ph), 77.34 ($\underline{C}$H-OH), 120.11 ($\underline{C}H_2$=CH), 129.53, 129.7, 132.28 (Ph), 136.29 ($\underline{C}$H=CH_2), 168.08 (2 x C=O). Anal. calcd for $C_{15}H_{16}O_4$: C, 69.22; H, 6.20. Found: C, 70.69; H, 6.72.

Homopolymerization: synthesis of poly(benzyl (S)-3,3-dimethylmalate) (PDMMLABz).

PDMMLABz was synthesized by anionic ring-opening polymerization of corresponding lactone **6a** in the presence of tetraethylammonium benzoate (10^{-2} equiv per mol monomer) as initiator.

Preparation of the initiator: 41.5 mg of tetraethylammonium benzoate $\mathbf{C_6H_5COO^-\ {}^+N(Et)_4}$ (628.10^{-2} mmol, M = 251 g/mol) were put into absolute ethanol freshly distilled on sodium (1.04 mL) to obtain a concentration of 0.159 mol/L.

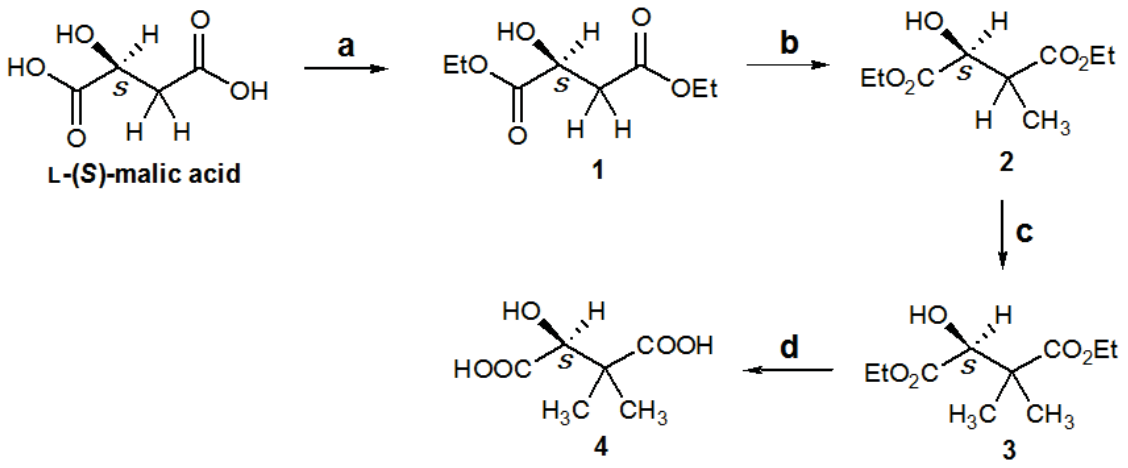
The initiator solution (10^{-2} equiv, 6.28 µmol, 40 µL) was then placed in the polymerization flask under nitrogen atmosphere. The ethanol was eliminated under vacuum at room temperature for 1h. The vacuum was broken under inert atmosphere and the initiator was kept under nitrogen atmosphere. The monomer **6a** (147 mg, 628 µmol) was also kept under N_2

stream for 1h, dissolved in 5 mL of anhydrous THF and then transferred under N_2 in the polymerization flask containing the initiator. The polymerization was conducted at room temperature for 24 hours and was followed by FTIR spectroscopy analysis, which showed the disappearance of the β-lactone band at 1834 cm^{-1} (100 % conversion). The homopolymer was dissolved in acetone, neutralized with one drop of acetic acid, purified by precipitation into absolute ethanol, separated and tried under vacuum. (m = 126 mg). $[\alpha]^{22}_{D}$: -16.6° (c 0.6, acetone). *T*g = +41.5°C and *T*m = 124.3°C. SEC (HPSEC-MALLS-dRI, acetone): M_n = 96 070 g/mol. M_w = 110 400 g/mol. D = 1.15. FTIR (neat, cm^{-1}) 1756 (C=O ester). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 1.09 (m, 3H, CH_3), 1.17 (m, 3H, CH_3), 5.05 (m, 2H, CH_2), 5.28 (m, 1H, CH), 7.25 (m, 5H, Ph). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 20.46 and 22.23 (2 x CH_3), 45.33 (C), 67.46 (CH_2-O), 76.08 (CH), 128.61, 128.75, 134.96 (Ph), 167.47, 173.07 (2 x C=O).

III. Results and discussion

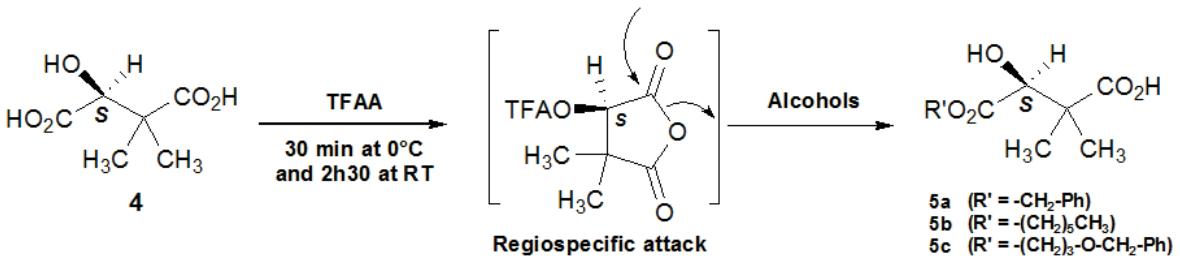
In a first time, the synthesis of (4*R*)-benzyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone **6a** from (2*S*)-3,3-dimethylmalic acid **4** is the most investigated in this report.

The synthesis of (2*S*)-3,3-dimethylmalic acid **4** started with an esterification in acid conditions of L-(*S*)-malic acid to furnish, after purification by vacuum distillation, chiral (*S*)-diethyl malate **1** in excellent yield (96%).[12] Then, a first methylation, performed with prepared *in situ* lithium diisopropylamide (LDA) at -78°C in presence of 2 equivalents of methyl iodide, has given chiral (2*S*)-diethyl-3-methylmalate **2** in a good yield (73%) which can be methylated again in the same conditions to obtain (2*S*)-diethyl-3,3-diméthylmalate **3** after purification by chromatography on silica gel (78% yield).[13] Then, this optically active compound **3** was saponified at reflux to obtain, after purification by precipitation in chloroform, diacid **4** with a good yield (77%) (Scheme 4).[14,15] The ^{1}H NMR spectra of **4** confirmed the complete saponification, which has shown the disappearance of peaks corresponding to ethyl ester groups.



Scheme 4. Preparation of (2*S*)-3,3-dimethylmalic acid **4**. *Reagents and conditions*: (a) EtOH, HCl, 4h, reflux, 96%, (b) 1) LDA, THF, -78°C, 2) CH_3I, -78°C, 73%, (c) 1) LDA, THF, -78°C, 2) CH_3I, -78°C, 78%, (d) K_2CO_3, H_2O, 1h, reflux, 77%.

After, from this diacid **4**, the strategy to prepare these new chiral lactones is based on the synthetic way for racemic α,α',β-trisubstituted-β-lactones, already described.[1,2] The (2*S*)-benzyl-3,3-dimethylmalolactonate **6a** represented in scheme 6 is the first optically active lactone we have synthesized. The diacid **4** prepared above was treated by 3.3 equivalents of trifluoroacetic anhydride (TFAA) to provide the non-isolated intermediate cyclic anhydride represented in scheme 5. After evaporation of TFAA in excess and formed trifluoroacetic acid (TFA) under vacuum at room temperature, the treatment of this intermediate compound with 1 equivalent of benzyl alcohol has led to β-hydroxyacid having very good regiospecificity.[2,16] The presence of triflate group (OTFA) which is very electro-attractive oriented exclusively the attack of different alcohols on the neighboring carbonyl function which was therefore the most deficient in electrons. Thus, this benzylic monoester, namely 3-benzyloxycarbonyl-2,2-dimethyl-(3*S*)-hydroxypropanoic acid **5a**, was obtained with 81% yield (Scheme 5, Table 1). This stage defines the hydrophobic or hydrophilic nature of the repeating unit of the desired polymer by the choice of the different alcohols. Indeed, the carbon aliphatic chain of hexyl group will give a very hydrophobic character to the polymer. The benzyl and benzyloxy groups will provide the acid and neutral hydrophilic character of the polymer, respectively after hydrogenolysis.



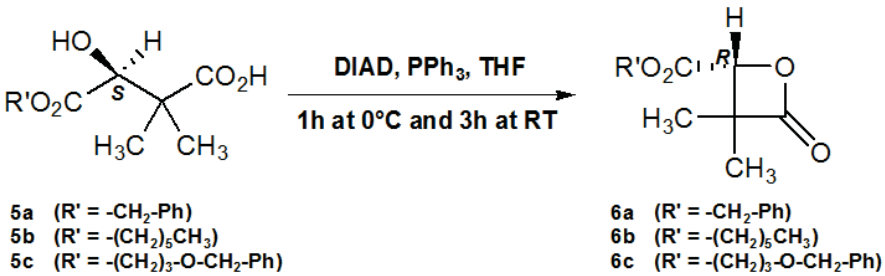
Scheme 5. Synthesis of 3-alkyloxycarbonyl-2,2-dimethyl-(3*S*)-hydroxypropanoic acid.

Table 1. Monoesterifications results.

Monoesters	Alcohols	R`	Yield[a] (%)	$[\alpha]^{22}_{D}$ (°)
5a	$PhCH_2OH$	$-CH_2Ph$	81	-6.05
5b	$CH_3(CH_2)_5OH$	$-(CH_2)_5CH_3$	55	+2.27
5c	$PhCH_2O(CH_2)_3OH$	$-(CH_2)_3-O-CH_2Ph$	74	+6.20
10	$PhCH_2OH$	$-CH_2Ph$	80	+35.80

[a] Isolated after purification by flash chromatography on silica gel.

For the lactonisation, β-lactones were prepared by the activation of either the carboxyl or hydroxyl groups of monoesters. Thus, α,α,β-trisubstituted-β-lactones were synthesized by reaction with diisopropylazodicarboxylate (DIAD) and triphenylphosphine (TPP) according to the Mitsunobu reaction.[17,18] In this reaction, the lactones were obtained via hydroxyl group activation with inversion of configuration of asymmetric carbon atom according to the mechanism, already described on the racemic lactones.[2] Thereby, the benzylic monoester **5a** was treated with TPP (1 equiv) and DIAD (1 equiv) in anhydrous tetrahydrofuran (THF) as solvent at 0°C for thirty minutes and at room temperature for one hour. Then, the lactone was purified by chromatography on silica gel to give **6a** in 88% yield (Scheme 6, Table 2).



Scheme 6. Preparation of (4*R*)-alkyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone.

Table 2. Lactonisations results.

Lactones	Yield[a] (%)	$[\alpha]^{22}_{D}$ (°)	e.e[b] (%)	IR (cm^{-1})	Global yield (%)
6a	88	-19.6	100	1756 ; 1834	30
6b	70	-26.6	100	1756 ; 1839	16
6c	78	-15.2	100	1756 ; 1830	24
11	84	-20.0	100	1746 ; 1845	21

[a] Isolated after purification by flash chromatography on silica gel. [b] Confirmed by ^{1}H NMR and by synthesis of corresponding isotactic homopolymer for lactone **6a**.

Simultaneously, in the aim to supply other physicochemical properties at the polymer, several optically active α,α,β-trisubstituted-β-lactones were prepared from L-(*S*)-malic acid according the same procedure as lactone **6a**: (4*R*)-hexyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone **6b**, (4*R*)-(3-benzyloxypropyl)carbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone **6c**. Therefore, the chiral lactones **6b** and **6c** were synthesized from diacid **4** with hexyl alcohol or 3-benzyloxy-1-propanol respectively in two steps. Firstly, monoesters 3-hexyloxycarbonyl-2,2-dimethyl-(3*S*)-hydroxypropanoic acid **5b** and 3-(3'-benzyloxypropyl)oxycarbonyl-2,2-dimethyl-(3*S*)-hydroxypropanoic acid **5c** were prepared. The following step, the corresponding lactones **6b** and **6c** were obtained with good yield after purification (Schemes 5, 6). The results are summarized in tables 1 and 2.

^{1}H NMR analysis of the different lactones **6a**, **6b** and **6c** displayed two singlets (a' and b') corresponding to two methyl groups at about 1 ppm. They are distant of around 0.35 ppm due to the formation of the lactone cycle which prevented their free rotation. Indeed the difference of the two singlets (a and b) corresponding to monoesters was almost zero (about 0.04 ppm) (Figure 2).

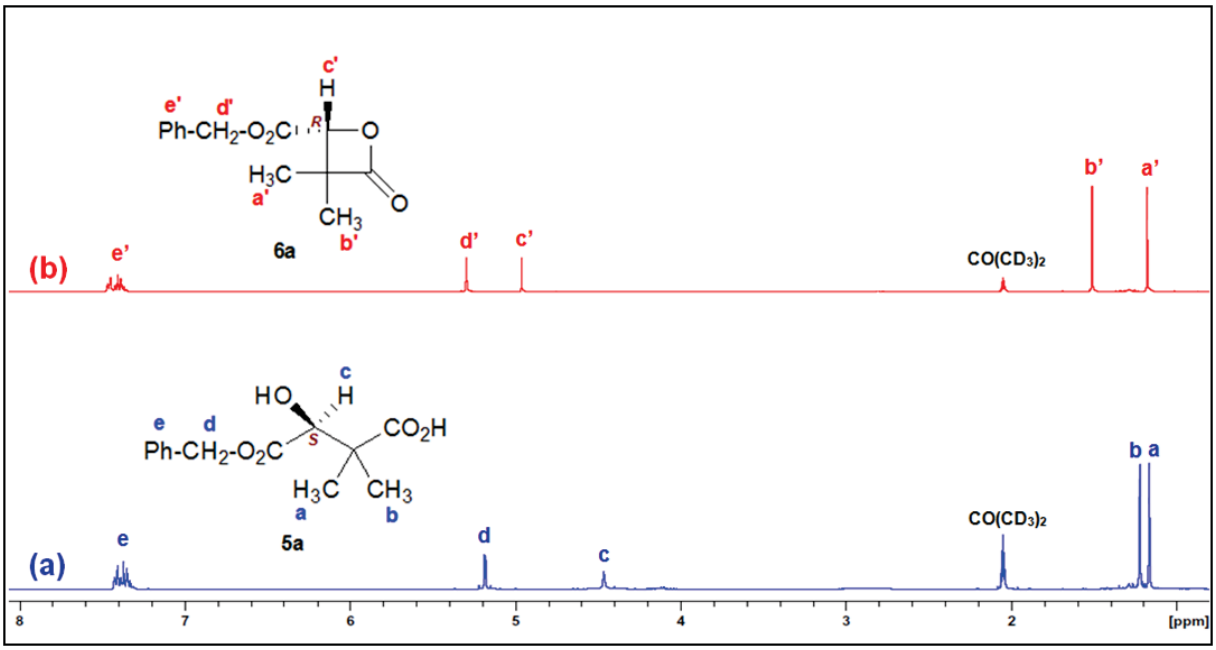
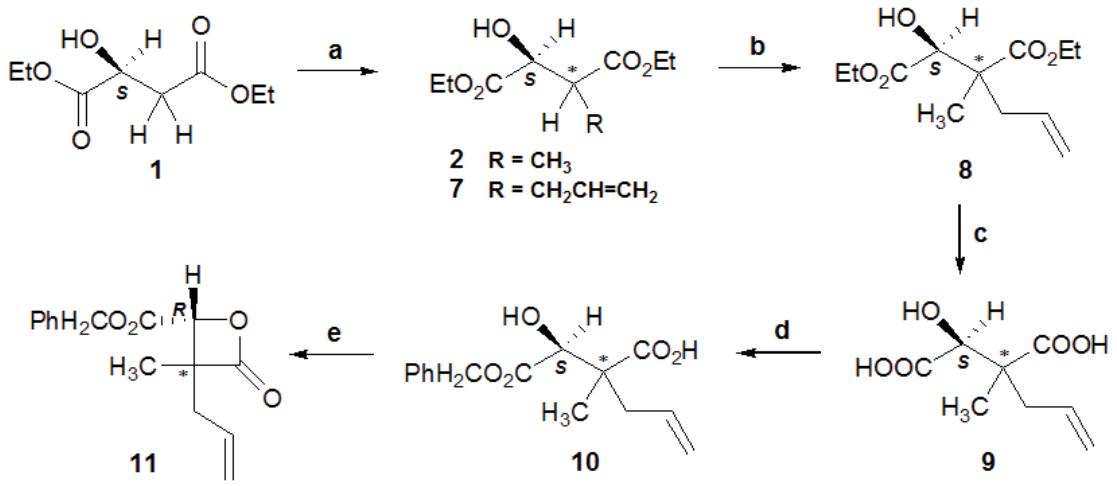


Figure 2. ^{1}H NMR spectra of (a) monoester **5a** and (b) corresponding lactone **6a**.

In a second time, the synthesis of one other new lactone **11**, containing two chiral-centers and except two diastereoisomers (*RR* and *RS*): ((3*R*,4*R*)-4-benzyloxycarbonyl-3-allyl-3-methyl-2-oxetanone and (3*R*,4*S*)-4-benzyloxycarbonyl-3-allyl-3-methyl-2-oxetanone)), was carried out using (2*S*)-3-allyl-3-methylmalic acid **9** and benzyl alcohol. The diacid **9** was obtained with 75% yield after saponification from (2*S*)-diethyl-3-allyl-3-methylmalate **8** which can be achieved from two different products: (i) from (2*S*)-diethyl-3-methylmalate **2**, performed with lithium diisopropylamide (LDA) at -78°C in presence of 2.2 equivalents of allyl bromide (45% yield), (ii) from (2*S*)-diethyl-3-allylmalate **7** in presence of methyl iodide in the same conditions (62% yield). (2*S*)-diethyl-3-allylmalate **7** was prepared by a methylation of **1** in presence of 2 equivalents of allyl bromide (69% yield). The two methods of preparation of **9** gave good yield after purification by chromatography (Scheme 7).



Scheme 7. Synthesis of (4*R*)-benzyloxycarbonyl-3-allyl-3-methyl-2-oxetanone **11**. *Reagents and conditions*: (a) 1) LDA, THF, -78°C, 2) CH_3I, -78°C, 73% or CH_2=CH-CH_2-Br, -78°C, 69%, (b) 1) LDA, THF, -78°C, 2) CH_3I, -78°C, 45% or CH_2=CH-CH_2-Br, -78°C, 62% 78%, (c) K_2CO_3, H_2O, 5h, reflux, 75%, (d) TFAA, $PhCH_2OH$, 30 min at 0°C and 2h30 at RT, 80%, (e) DIAD, PPh_3, THF, 84%.

Then, monoester 3-benzyloxycarbonyl-2-allyl-2-methyl-(3*S*)-hydroxypropanoic acid **10** and the corresponding lactone (4*R*)-benzyloxycarbonyl-3-allyl-3-methyl-2-oxetanone **11** were successively obtained as describe for other lactones (Scheme 7, Tables 1, 2). FTIR spectroscopy showed two bands at about 1750 cm^{-1} and 1850 cm^{-1} that are attributed to the ester and lactone functions, respectively for each β-lactone **6a**, **6b**, **6c** and **11** (Figure 3).

The presence of allyl group will chemically modify the corresponding homopolymer.

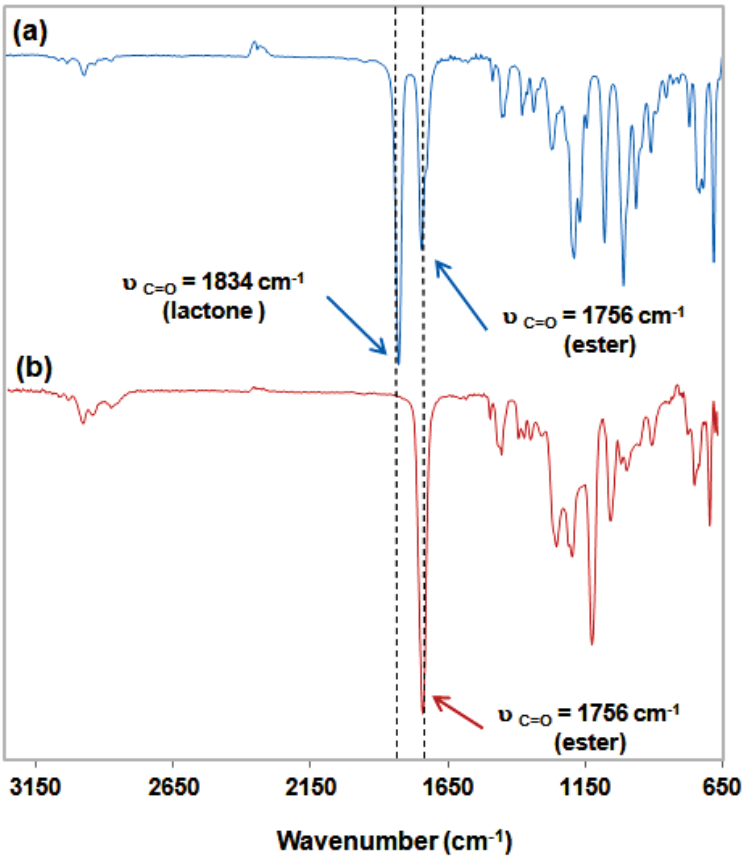


Figure 3. FTIR spectra of (a) chiral lactone **5a** and (b) chiral homopolymer PDMMLABz.

Specifically, we have first utilized the ^{1}H NMR spectroscopy to confirm the enantiomeric purity of these new optically active lactones. For this reason, we have compared ^{1}H spectral data of lactone **11** with this corresponding racemic lactone. Thus, we have decided to synthesize a molecule containing a crude mixture of four stereoisomers lactones ((3*R*,4*R*)-4-benzyloxycarbonyl-3-allyl-3-methyl-2-oxetanone; (3*R*,4*S*)-4-benzyloxycarbonyl-3-allyl-3-methyl-2-oxetanone; (3*S*,4*S*)-4-benzyloxycarbonyl-3-allyl-3-methyl-2-oxetanone; (3*S*,4*R*)-4-benzyloxycarbonyl-3-allyl-3-methyl-2-oxetanone) which was prepared from the starting racemic diethyloxalpropionate using procedure reported in literature.[2] The relative configurations in diastereoisomeric pairs *RR* and *RS*, and *SS* and *SR* were assigned based on ^{1}H NMR spectral data. In parallel, enantiomeric excess of diastereoisomeric pairs 3*R,*4*R* and 3*S,*4*R* of lactone **11** was also estimated based on ^{1}H NMR spectral data. In the case of lactone **11**, ^{1}H NMR spectrum showed a single resonance at 1.50 ppm (methyl group), while for two diastereoisomeric pairs 3*R,*4*R* and 3*S,*4*R*, and 3*S,*4*S* and 3*R,*4*S* we observed the appearance of the two signals at 1.17 and 1.50 ppm with a 40:60 ratio indicating that the enantiomeric

excess of our lactone **11** was 100%. Signals at 2.38 and 2.58 ppm (CH_2 allyl group), and 5.70 and 5.83 ppm (CH allyl group) gave the similar information (Figure 4).

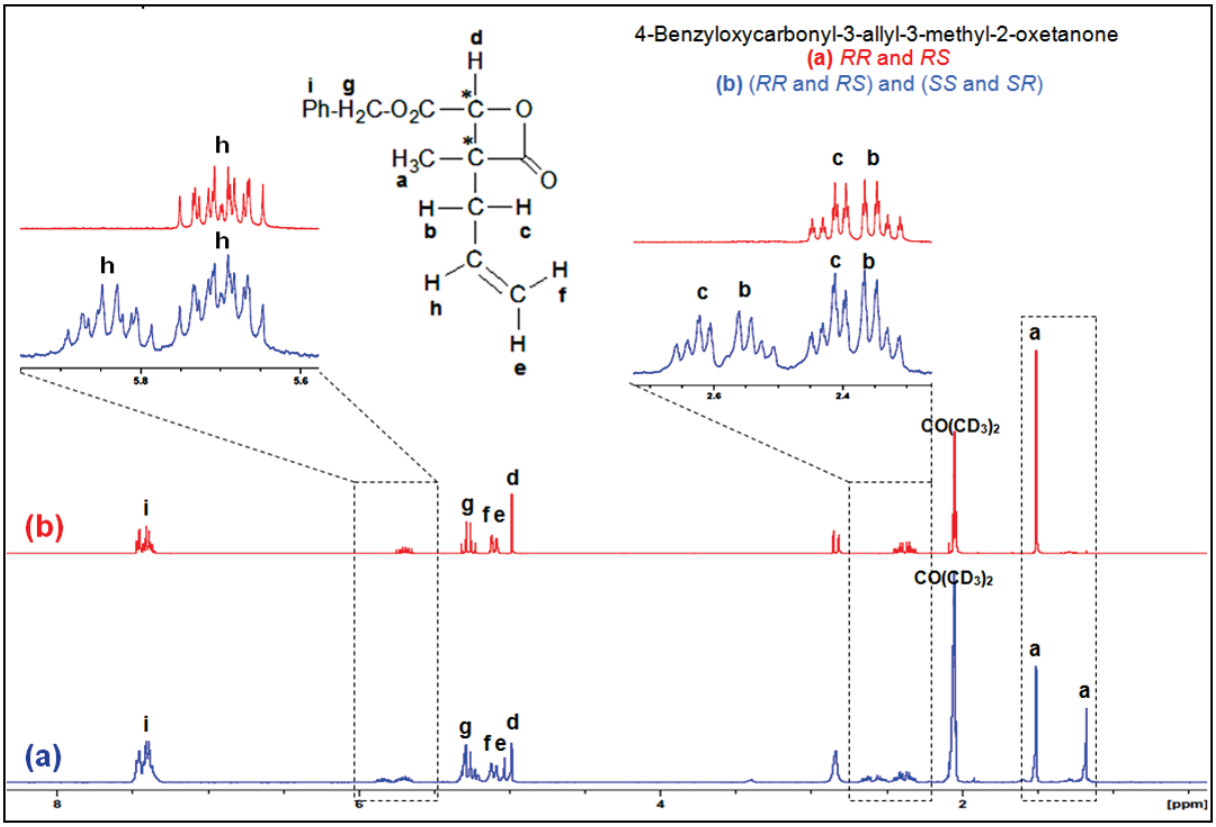
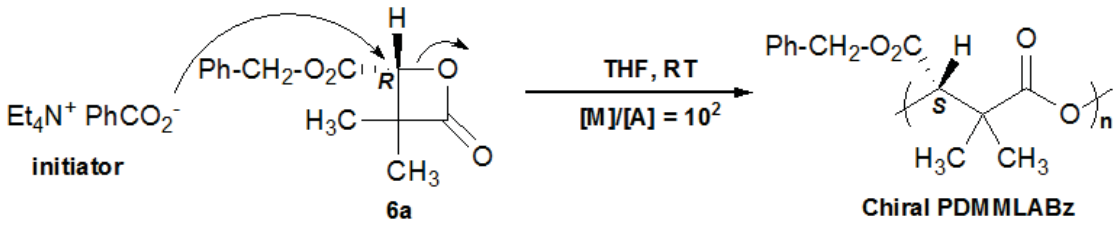


Figure 4. ^{1}H NMR spectra of (a) achiral lactone 4-benzyloxycarbonyl-3-allyl-3-methyl-2-oxetanone and (b) chiral lactone (4*R*)-benzyloxycarbonyl-3-allyl-3-methyl-2-oxetanone **11**.

Finally, four chiral lactones with *R* absolute configuration were successfully obtained with a global yield which can vary between 15% and 30% (Table 2). Interestingly, the preparation of their corresponding isotactic homopolyesters will be performed by anionic ring-opening polymerization of corresponding monomers lactones and led to 100% isotactic and semi crystalline polymers with the presence of only (*S*)-repeating units in the polymer skeleton. These results would confirm also the 100% enantiomeric excess of the different synthesized lactones.

Therefore, a first approach for the development of these polymers was the synthesis of the chiral benzylic homopolymer PDMMLABz from the corresponding chiral lactone **6a** as described in the experimental section using tetraethylammonium benzoate as initiator with 100% conversion (Scheme 8).[19] Homopolymer was characterized by ^{1}H- and ^{13}C NMR, differential scanning calorimetry (DSC) and size-exclusion chromatography (SEC). Signals at

5.29 and 7.41 ppm on ^{1}H NMR spectrum confirmed the presence of benzyl group. ^{13}C NMR spectroscopy was used to identify the stereoregularity of the homopolyester.[19] The carbonyl peak around 167 ppm is a particularly sensitive and effective signal which provides the stereo information. In case of observation of three peaks, the racemic polymer is present, indicating atactic fragments in the polymer chain corresponding to isotactic, syndiotactic and atactic triads. If only a single peak is visible, it can be identified as chiral polymer, representing syndiotactic or isotactic polymer.[20-23]



Scheme 8. Synthesis of stereoregular homopolyester PDMMLABz.

As mentioned in figure 5, PDMMLABz showed only one fine peak due to the exclusive iso-sequence corresponding to isotactic triad (SSS) at 167.47 ppm which has been assigned by comparison with amorphous PDMMLABz that showed one triplet corresponding to syndiotactic triad (SRS and RSR) at 167.34 ppm, atactic triad (RRS and SSR) at 167.40 ppm and isotactic triad (SSS and RRR) at 167.47 ppm (Figure 6).[19]

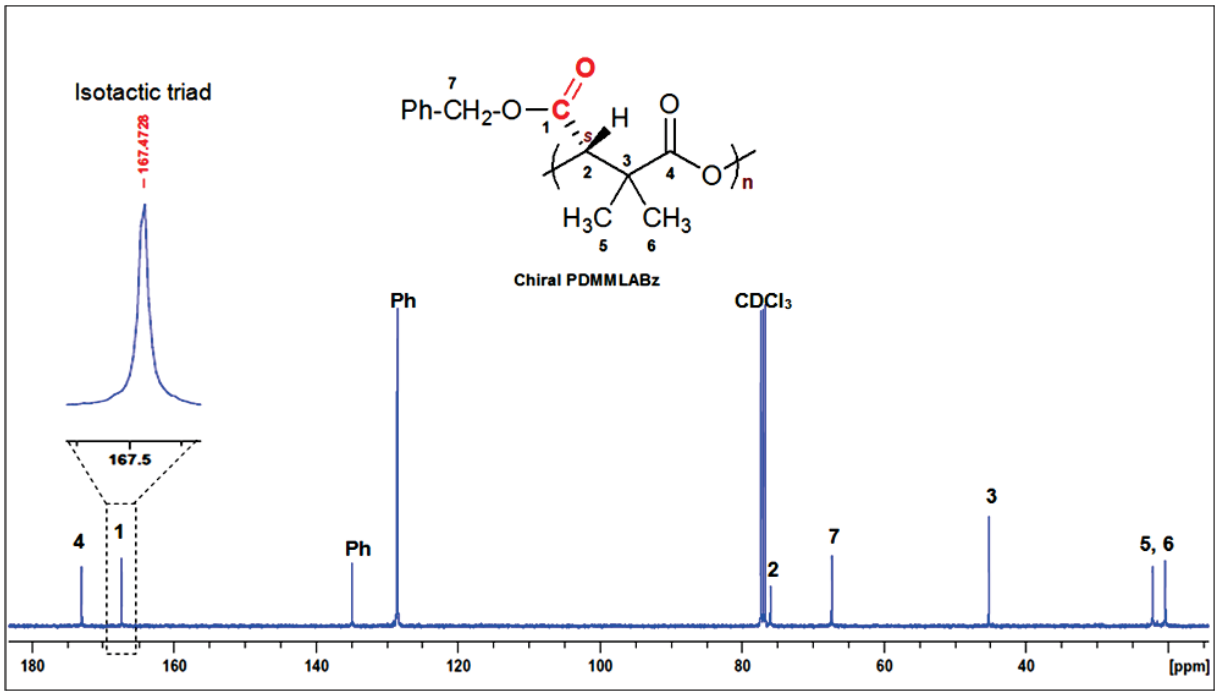


Figure 5. ^{13}C NMR spectra for chiral PDMMLABz.

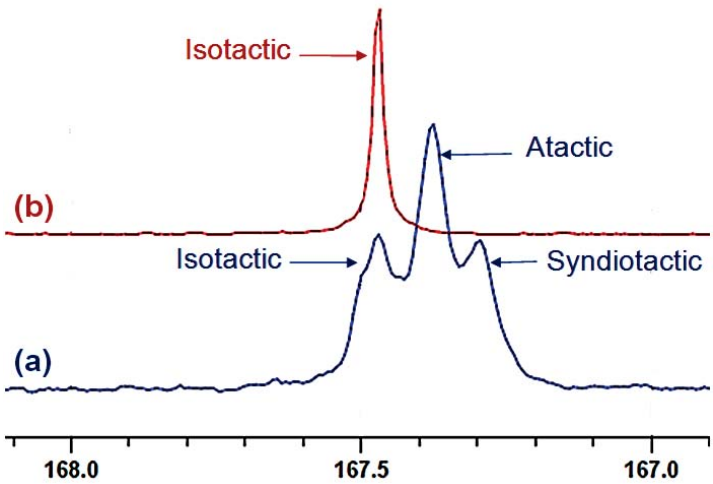


Figure 6. ^{13}C NMR spectra of C=O signals of lateral ester groups of (a) atactic PDMMLABz and (b) isotactic PDMMLABz.

This isotacticity was confirmed by DSC, which showed a melting temperature *T*m = 124.3°C. DSC analysis data provided also a glass transition temperature *T*g = 41.5°C from a second heating cycle at a heating rate of 10 °C /min. This high *T*g value explain the rigidity of aromatic group in the lateral chain of benzylic homopolymer, which causes over restriction for rotating the substituent along the polymer backbone (Figure 7).

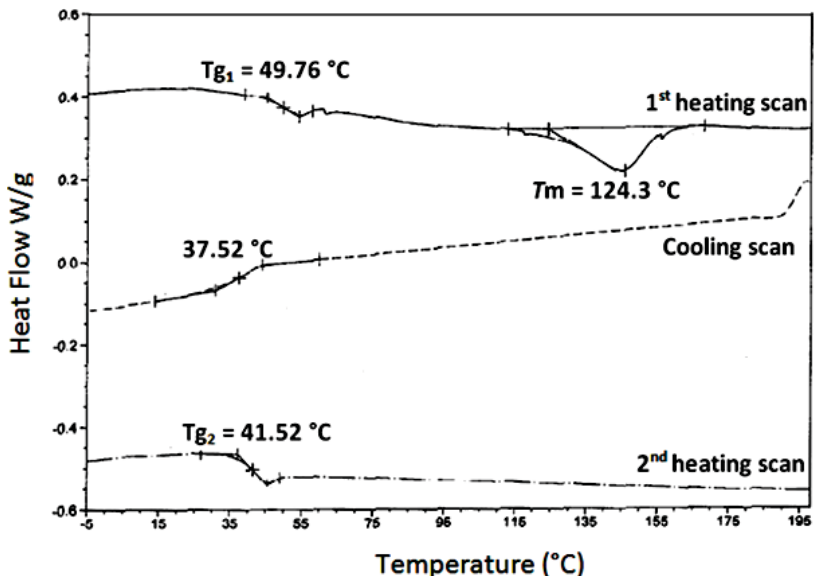


Figure 7. 1st and 2nd DSC heating and 1st DSC cooling scans for chiral PDMMLABz.

Theoretical molecular weights can be determinate by molar ratio of monomer to initiator [M]/[A]. The amorphous and non-stereoregular homopolyester PDMMLABz

provided a molecular weight that was well correlated with theoretical values indicating the control of the polymerization (Table 3). Indeed, for chiral stereoregular homopolyester PDMMLABz, a high molecular weight (twice fold higher than expected value) with a very good molar mass distribution value (D = 1.15) was observed (Figure 7, Table 3). Contrary to amorphous PDMMLABz, isotactic macromolecular chains organize themselves in crystalline zones which are not isolated, and that explains the high molecular weight value. This observation is consistent with the less solubility of polymer in acetone over time.

Table 3. Characterization of chiral and racemic homopolymers PDMMLABz.

Polymer	M_{nTh} (g/mol)	M_n (g/mol)[a]	M_w (g/mol)[a]	D[a]	*T*g (°C)[b]	*T*m (°C)[b]	$[\alpha]^{22}_D$ (°)
Chiral PDMMLABz	23 400	96 070	110 400	1.15	41.5	124.3	-16.6
Racemic PDMMLABz[c]	23 400	27 840	29 760	1.07	39.1	-	-

M_{nTh} = theoretical M_n.
[a] HPSEC-MALLS-dRI in acetone, 0.5 min.
[b] Determined by DSC in the 2nd heating.
[c] Synthesized and characterized in the same conditions that chiral PDMMLABz.

IV. Conclusion

In summary, we have successfully synthesized four new monomers that presented different groups: benzylic, benzyloxypropylic and hexylic goup exhibiting in their main-chain, either two methyl groups or methyl and allyl groups with 100% purity. The polymerization of the benzylic lactone provided the corresponding isotactic and semi-crystalline homopolyester with high reactivity and high molecular weight. Accordingly, this study presents an interesting and promising way to enrich the chemistry / biology field by the preparation of a large number of optically active α,α',β-trisubstituted-β-lactones with 100% enantiomeric excess and therefore their corresponding chiral homopolyesters or statistical and block copolyesters adapted according to the biomedical application.

References

1. C. Barbaud; M. Guerrouache; P. Guérin, *Tetrahedron Letters,* **2002**, *43*, 9513.
2. C. Barbaud; F. Abdillah; F. Faÿ; M. Guerrouache; P. Guérin, *Designed Monomers and Polymers,* **2003**, *6*, 353.
3. H.Y. Tian; Z.H. Tang; X.L. Zhuang; X.S. Chen; X.B. Jing, *Progress In Polymer Science,* **2011**, *37*, 237.
4. K. Fu; D.W. Pack; A.M. Klibanov; R. Langer, *Pharmaceutical Research,* **2000**, *17*, 100.
5. M. Vert; P. Guérin, *Biomaterials Degradation, M.A. Barbosa Editor, Elsevier Science Publishers Amsterdam Oxford New York Tokio,* **1991**, 35.
6. C. Barbaud; F. Faÿ; F. Abdillah; S. Randriamahefa; P. Guérin, *Macromolecular Chemistry and Physics,* **2004**, *205*, 199.
7. C.T. Goodhue; E.E. Snell, *Biochemistry,* **1966**, *5*, 403.
8. M. Vert; S.M. Li; G. Spenlehauer; P. Guerin, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine,* **1992**, *3*, 432.
9. F.E. Kohn; J.W.A. Vandenberg; G. Vanderidder; J. Feijen, *Journal Of Applied Polymer Science,* **1984**, *29*, 4265.
10. H. Adkins; H.R. Billica, *Journal of the American Chemical Society,* **1948**, *70*, 3121.
11. M. Friedkin; A.L. Lehninger, *Journal of Biological Chemistry,* **1947**, *169*, 183.
12. S.G. Cohen; Z. Neuwirth; S.Y. Weinstein, *Journal of the American Chemical Society,* **1966**, *88*, 5306.
13. P. Dowd; S.-C. Choi; F. Duah; C. Kaufman, *Tetrahedron,* **1988**, *44*, 2137.
14. P. Coutrot; C. Grison; R. Sauvetre, *Journal of Organometallic Chemistry,* **1987**, *332*, 1.
15. W. Grell; H. Machleidt, *Justus Liebigs Annalen der Chemie,* **1966**, *699*, 53.
16. M.J. Miller; J.S. Bajwa; P.G. Mattingly; K. Peterson, *The Journal of Organic Chemistry,* **1982**, *47*, 4928.
17. O. Mitsunobu, *Synthesis,* **1981**, *1981*, 1.
18. J. Mulzer; G. Brüntrup; A. Chucholowski, *Angewandte Chemie International Edition in English,* **1979**, *18*, 622.
19. F. Ouhib; S. Randriamahefa; P. Guerin; C. Barbaud, *Designed Monomers And Polymers,* **2005**, *8*, 25.
20. J.E. Kemnitzer; S.P. McCarthy; R.A. Gross, *Macromolecules,* **1993**, *26*, 1221.
21. Y. Hori; T. Hagiwara, *International Journal Of Biological Macromolecules,* **1999**, *25*, 237.
22. M. Arcana; O. Giani-Beaune; F. Schue; W. Amass; A. Amass, *Polymer International,* **2000**, *49*, 1348.
23. M. Allmendinger; R. Eberhardt; G.A. Luinstra; B. Rieger, *Macromolecular Chemistry And Physics,* **2003**, *204*, 564.

➢ Conclusion de l'article 5

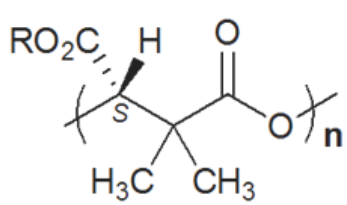
Dans cet article, la synthèse et la caractérisation d'une série de β-lactones ont été effectuées avec succès. Leur énantiopureté a été confirmée par RMN ^{1}H. Ces lactones seront utilisées pour la synthèse des nouveaux stéréopolyesters présentés dans l'article 6 ci-après.

Chapitre III : PDMMLAs semi-cristallins

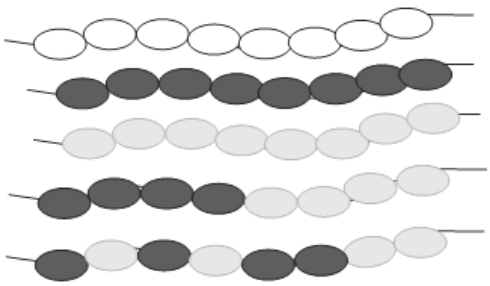
OBJECTIF 2

2ème partie :

Synthèse et caractérisation des polymères isotactiques



PDMMLAs semi-cristallins



ARTICLE 6

(Sous presse)

« Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry »

Résumé :

Après avoir préparé les monomères chiraux présentés dans l'article 5, la synthèse d'une nouvelle famille de polyesters isotactiques dérivés du poly(acide [S]-3,3-dimethylmalique) « PDMMLAs stéréoréguliers » a été réalisée dans le présent article. Ces polyesters portant des groupements fonctionnels dans leur chaîne latérale ont été préparés par POC de ces β-lactone optiquement actives. Trois homopolymères, un copolymère statistique et un copolymère à bloc ont été synthétisés et caractérisés. Les deux copolymères comportent sur leur chaîne latérale 50% de fonctions hexyliques hydrophobes et 50% de groupements benzyliques qui donneront des fonctions hydrophiles acides après déprotection.

La synthèse de ces stéréopolyesters a été choisie pour deux raisons : le métabolisme et la stéréochimie. Tout d'abord, la synthèse de ces nouveaux polyesters a été adaptée pour fournir des polyesters biodégradables, biocompatibles et bioassimilables par l'organisme. Le produit de dégradation de ces derniers pourra rentrer dans le cycle métabolique du pentothénate. De plus, l'unité de répitition de ces polymères comporte un centre stéréogène qui fournit une organisation macromoléculaire semi-cristalline. Leur stéréorégularité a été confirmée par RMN ^{13}C et par DSC. En effet, la présence d'une structure 100% isotactique observée pour tous les polymères synthétisés en comparant les résultats obtenus avec ceux des polymères ayant la même structure chimique mais de chaînes désordonnées (atactique) « PDMMLAs non stéréoréguliers ». Certains de ces stéréopolyesters possédent des températures de fusion confirmant leur semi-cristallinité.

Enfin, en plus de la caractérisation de ces stéréopolyesters par FTIR, RMN et SEC, une étude des propriétés thermomécaniques (TGA et DSC) a été réalisée tout en comparant les résultats obtenus avec ceux des PDMMLAs amorphes et atactiques.

Synthesis and characterizations of new isotactic homopolyesters, statistical and block copolyesters derived of poly((*S*)-3,3-dimethylmalic acid) via the lactone route

Rima Belibel[1], Imadeddine Azzouz[2], Christel Barbaud[1]*

[1] INSERM U1148, Laboratory for Vascular Translational Science (LVTS), Institut Galilée, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, 99 Avenue Jean-Baptiste Clément, Villetaneuse, F-93430, France.

[2] Laboratory ESYCOM EA2552, Université Paris-Est Marne la Vallée (UPEM), ESIEE Paris, 2 Boulevard Blaise Pascal, Noisy-le-Grand, F-93162, France.

*Corresponding author. Tel.:+33(0)149403357. Fax: +33(0)149403083.

E-mail address: barbaud@univ-paris13.fr (C. Barbaud).

Abstract

This paper presents the synthesis of a new family of synthetic isotactic polyesters derived from poly(malic acid), the poly((*S*)-3,3-dimethylmalic acid) (PDMMLA). These polyesters are prepared via the lactone route bearing functionalized groups in its main or side chain. The aim of this work is twofold: metabolism and stereochemistry. First, the synthesis of these new polyesters is chosen to provide biodegradable polyesters biocompatible and bioassimilable by the human body. Next, the molecular chain of this family contains a stereogenic center to provide 100% isotactic homopolymers and copolymers (statistical and block). Finally, these polymers have been characterized by several analytical techniques: FTIR, ^{1}H and ^{13}C NMR, SEC, DSC and TGA. The greatest importance will be given to the ^{13}C NMR and DSC to principally confirm the stereoregularity and cristallinity of these stereopolyesters.

KEYWORDS: Poly((*S*)-3,3-dimethylmalic acid), functionalized and amphiphilic polyesters, stereoregularity, isotacticity.

I. Introduction

To complement and satisfy the broad field of biomedical requirements, it was important to develop new and designed synthetic polymers with a wide range of chemical, physical and mechanical properties. Stereoregular polymers for chiral recognition are only at its beginning. In synthetic stereopolymers, chirality leads to supramolecular structures and make easier the creation of highly crystalline materials. Indeed, the presence of chiral centers in the polymer repeating unit play a key-role to control the polymers configurational and conformational structure and hence their morphology, solubility and biodegradability.[1,2]

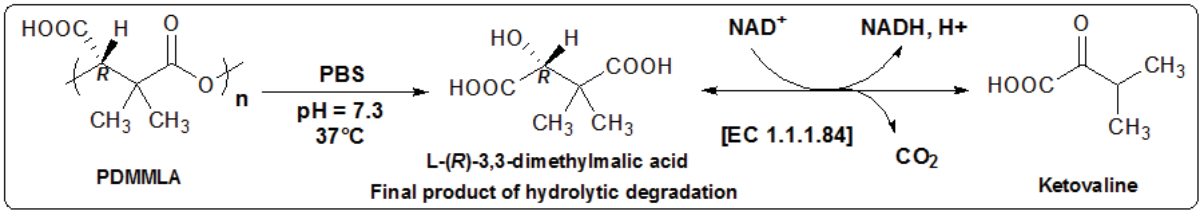
Although these chiral polymers like poly(lactic acid) (PLA) or polyhydroxyalkanoates (PHA) have been commonly used in the biomedical domain as biomaterials, surgical implants, medical devices and drug delivery systems. They exhibit many advantages in comparison to achiral polymers.[3,4] In addition to these properties, PLA and PHA can be prepared by chemical or biological synthesis routes, respectively, with the presence of only (*R*)-repeating units in the skeleton for PHA and (*R*) or (S)-repeating units for PLA with a biodegradable architecture.[5,6]

Among this class of polymers, poly(malic acid) includes a chiral center in the macromolecular repeating unit and a reactive group in the side chain. Unlike the above mentioned polymers, this parent polyester can undergo several chemical modifications. Many reactions are conceivable; it can hold an alkyl pendant group, lateral functional groups as an unsaturated bond or an ester function which will be chemically modified. The ester function can be transformed to carboxylic acid group for coupling with bioactive molecules, hydrophilic oligomers, targeting protein, macromolecular drugs[7,8] In addition, they can have more sophisticated groups such as menthyl, adamantyl, cholesteryl, and lactic acid oligomers.[9-11]

This functionalized polyester can be prepared according different routes starting from racemic or optically active malic acid[12] or aspartic acid[13] by chemical or biological synthesis routes. Optically active stereocopolymers of malic acid are accessible starting from L or D-aspartic acid enantiomers[14] or L or D-malic acid enantiomers[13] as chiral precursors. Our interest in this area prompted us to present, in this paper, the chemical preparation of a new family of synthetic isotactic poly((*S*)-3,3-dimethylmalic acid) starting from L-(*S*)-malic acid.

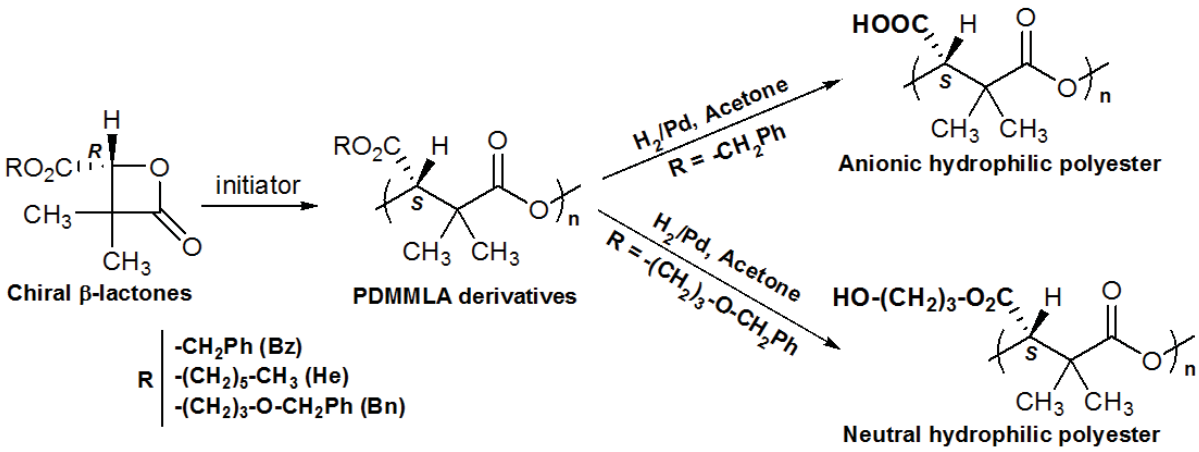
The two driving forces in this work are chirality and metabolism. This new degradable polymer was selected for its primary degradation product, to make compatible polymers with

the living species during using time until their complete degradation.[15] Indeed, as mentioned earlier that it is possible to take the advantage of chiral center to control the polymer structure and therefore their properties. It is also possible to start from biomolecules related to malic acid. The chiral diacid (*R)*-3,3-dimethylmalic acid coming from the hydrolytic degradation of isotactic poly((*R*)-3,3-dimethylmalic acid) is a natural and non-toxic compound that is present in the biosynthesis of pantothenate. This molecule appears in the synthesis of Coenzyme A catalyzed by the enzyme β,β-dimethyldehydrogenase (EC.1.1.1.84) to give ketovaline (Scheme 1).[16] Moreover, in the literature, the hydrolysis of atactic poly((*R*,*S*)-3,3-dimethylmalic acid) gave the corresponding (*R*,*S*)-3,3-dimethylmalic acid.[16,17]



Scheme 1. Biosynthesis of ketovaline by β,β-dimethyldehydrogenase (EC.1.1.1.84).

Anionic ring-opening polymerization of chiral α,α,β-trisubstituted-β-lactones leads to a large family of semi-crystalline and isotactic poly((*R*)-3,3-dimethylmalic acid) derivatives having lateral functional group with high molecular weight (Scheme 2). .



Scheme 2. Anionic ring-opening polymerization of chiral α,α,β-trisubstituted-β-lactones and envisaged catalytic hydrogenolysis of benzylic and benzyloxypropylic groups of PDMMLAs.

The ultimate step of the monomer synthesis is a ring closure, leading to various chiral α,α,β-trisubstituted-β-lactones without any racemization. These lactones are easily prepared in two steps from diacid, synthesized from commercial L-(*S*)-malic acid in four stages.[18]

Moreover, the R group will be benzyl (Bz), benzyloxypropyl (Bn) or hexyl (He) group. These groups have been selected for two properties: chemical modifications and adjustment of the hydrophilic/hydrophobic balance of polyesters. Indeed, benzylic and benzyloxypropylic groups are used for their protective role. After a catalytic hydrogenolysis in presence of palladium on charcoal on the polyester, it's possible to obtain respectively carboxylic acid and alcohol functions (Scheme 2).

However, these ionic and non-charged polyesters will be used one hand for their hydrophilic properties and other hand for allowing chemical modifications and reacting with bioactive or targeting molecules.[7,8,19] The hexylic group is interesting for its hydrophobic properties which give access to a wide variety of amphiphilic statistical and block copolymers.

The main objective of this study is the synthesis and the characterization of these new stereoregular polyesters. Thanks to several characterization methods such as Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), proton (^{1}H NMR) and carbon (^{13}C NMR) nuclear magnetic resonance spectroscopy and size-exclusion chromatography (SEC), polymerization reactions and polymers chemical structure were confirmed. ^{13}C NMR is widely used to establish stereoregularity of new synthesized polymers. Thereafter, differential scanning calorimetry (DSC), and thermogravimetric analysis (TGA) are utilized to confirm their semi-crystallinity and study their thermal properties.

II. Experimental

II.1. General details. All optical rotation $[\alpha]_D$ (°) data were determined using Biot's law: $\alpha = [\alpha]_D\ \ell c$. The observed optical rotation α is measured. The specific optical rotations of different products were taken at the intervals 21-25 °C and 0.6-1.3 mg/mL in acetone, by using Bellingham and Stanley Ltd ADP410 High Accuracy polarimeter (units for $[\alpha]$, c and ℓ, usually $deg.cm^3.g^{-1}.dm^{-1}$, $g.cm^{-3}$ and dm, respectively and $\ell = 1\ dm$). The absolute average molecular weights and molecular weight distributions were determined at room temperature by coupling online a high performance size exclusion chromatograph (HPSEC), a multi-angle

laser light scattering detector (MALLS), a viscometer and a differential refractive index (dRI) detector. Acetone, used as carrier, was filtered through a 0.1 µm filter unit (Millipore, Billerica, USA), carefully degassed (DGU-20A3R Shimadzu, Kyoto, Japan), and eluted at a 0.5 mL/min flow rate (LC10Ai Shimadzu, Kyoto, Japan). 100 µL of a 0.2 µm-filtered sample solution (at about 20 mg/mL) were injected with an automatic injector (SIL-20A HT Shimadzu, Kyoto, Japan). The column packing was a polystyrene-divinylbenzene gel. The MALLS photometer, a miniDawn TREOS from Wyatt Technology Inc. (Santa Barbara, CA, USA) was provided with a fused silica cell and a Ga-As laser (λ = 665.8 nm). The whole collected data: light scattering (LS), dRI were analyzed using the Astra v6.0.6 software package. Molar mass were obtained with the Zimm order 1 method. The concentration of each eluted fraction was determined with dRI (RID10A Shimadzu, Kyoto, Japan) according to the measured values of dn/dc (0.097 mL/g in acetone and 0.05 mL/g in THF).[20] All melting (T_m), crystallization (T_c) and glass transition (T_g) temperatures of different polymers were obtained using Differential Scanning Calorimetry DSC Q2000. In a typical run, polymers were first putted in the furnace and heated from -60°C to 200°C by means of a temperature ramp of 10°C/min. This operation was repeated twice. T_g was determined from the inclination point of the second heating curve while *Tm* and T_c were takenfrom the maximum of the endothermic peak in the first heating run. Thermogravimetric analysis data were obtained with a TGA Q50 at a heating rate of 10°C/min under N_2 atmosphere. ^{1}H and ^{13}C NMR spectra were recorded on BRUKER AM-400 MHz spectrometer using $CDCl_3$ as solvent and with the residual solvent signals as internal standard unless otherwise indicated. Chemical shifts were given in ppm (δ) and coupling constants in Hz. The following abbreviations are used to describe the peak pattern: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet) and m (multiplet). IR spectra were recorded on AVATAR 370 TF-IR Thermo Nicolet spectrometer using Nicolet OMNI-Sampler ATR Smart Accessory (Ge, DTGS). Adsorption bands are given in cm^{-1}. Anhydrous THF was distilled on sodium-benzophenone. Absolute EtOH was employed without purification for the polymers precipitation and distilled over sodium for the preparation of the initiator solutions. All polymerization reactions were performed in anhydrous THF under nitrogen atmosphere. All the glass apparatus were kept one night in a drying-oven at 100°C.

II.2. Polymers preparation. Homopolymers and copolymers were synthesized by anionic ring-opening polymerization of corresponding monomers lactones in the presence of tetraethylammonium benzoate (10^{-2} equiv per mol monomer) as initiator.

II.2.1. Initiator preparation. Tetraethylammonium benzoate $\mathbf{C_6H_5COO^-\ ^+N(Et)_4}$ (40 mg, M = 251 g/mol) were put into 0.5 mL of absolute ethanol freshly distilled to obtain a concentration of 80 g/L.

II.2.2. Homopolymers synthesis.

General procedure. The initiator solution was placed in the polymerization flask under nitrogen atmosphere. The ethanol was eliminated under vacuum at room temperature for 1h. The vacuum was broken under inert atmosphere and the initiator was kept under nitrogen atmosphere. The β-lactone monomer was kept under N_2 stream in anhydrous THF (2mL for 0.4 mmol of monomer) for 1h and then transferred under N_2 in the polymerization flask containing the initiator. The polymerization was conducted overnight at room temperature. The homopolymerization was followed by FTIR spectroscopy analysis, which showed the disappearance of the β-lactone band at 1850 cm^{-1} (100 % conversion). The homopolymer was dissolved in acetone, neutralized with a drop of acetic acid, purified by precipitation into absolute ethanol, separated and dried under vacuum.

Poly(benzyl (S)-3,3-dimethylmalate) (PDMMLABz) P1. Homopolymer **P1** was synthesized from the monomer β-lactone (4*R*)-benzyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone (278 mg, 1.18 mmol) in the presence of tetraethylammonium benzoate (10^{-2} equiv, 11.86 µmol, 148 µL) as initiator. (m = 275 mg). $[\alpha]^{22}_D$: -16.6° (c 0.6, acetone). *T*g = +41.5°C and *T*m = 124.3°C. SEC (HPSEC-MALLS-dRI, THF): M_n = 176 500 g/mol. M_w = 177 900 g/mol. D = 1.008. FTIR (neat, cm^{-1}) 1756 (C=O ester). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 1.09 (m, 3H, CH_3), 1.17 (m, 3H, CH_3), 5.05 (m, 2H, CH_2), 5.28 (m, 1H, CH), 7.25 (m, 5H, Ph). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 20.46 and 22.23 (2 x CH_3), 45.33 (C), 67.46 (CH_2-O), 76.08 (CH), 128.61, 128.75 and 134.96 (Ph), 167.47 and 173.07 (2 x C=O).

Poly(hexyl (S)-3,3-dimethylmalate) (PDMMLAHe) P2. Homopolymer **P2** was synthesized from the monomer β-lactone (4*R*)-hexyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone (122 mg, 533 µmol) in the presence of tetraethylammonium benzoate (10^{-2} equiv, 5.33 µmol, 67 µL) as initiator. (m = 120 mg). $[\alpha]^{22}_D$: -47.3° (c 0.8, acetone). *T*g = -9.1°C and *T*m = 158.2°C. SEC (HPSEC-MALLS-dRI, THF): M_n = 111 200 g/mol. M_w = 111 700 g/mol. D = 1.004. FTIR (neat, cm^{-1}) 1756 (C=O ester). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 0.86 (m, 3H, $C\underline{H}_3$-CH_2), 1.26 (m, 9H, CH_3, 3 x CH_2), 1.40 (m, 3H, CH_3), 1.59 (m, 2H, CH_2), 4.10 (m, 2H, CH_2-O), 5.38 (m, 1H, CH). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 14.05 ($\underline{C}H_3$-CH_2), 19.89 (CH_3),

22.58 ($\underline{C}H_2$-CH_3) 23.00 (CH_3), 25.42, 28.50 and 31.39 (3 x CH_2), 45.42 (C), 65.94 (CH_2-O), 76.07 (CH), 167.70 and 173.10 (2 x C=O).

Poly(benzyloxypropyl (S)-3,3-dimethylmalate) (PDMMLABn) P3. Homopolymer **P3** was synthesized from the monomer β-lactone (4*R*)-(3'-benzyloxypropyl)carbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone (297 mg, 1.01 mmol) in the presence of tetraethylammonium benzoate (10^{-2} equiv, 10.16 µmol, 127 µL) as initiator. (m = 290 mg). $[\alpha]^{22}_D$: +12.8° (c 0.8, acetone). *T*g = +0.3°C and *T*c = 170.9°C. SEC (HPSEC-MALLS-dRI, THF): M_n = 68 500 g/mol. M_w = 70 900 g/mol. D = 1.035. FTIR (neat, cm^{-1}) 1756 (C=O ester). ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 1.23 (s, 3H, CH_3), 1.36 (s, 3H, CH_3), 1.89 (tt, 2H, *J* = 6 Hz, CH_2), 3.49 (t, 2H, *J* = 6 Hz, CH_2-O), 4.26 (t, 2H, *J* = 6 Hz, CH_2-CO_2), 4.47 (s, 2H, $C\underline{H}_2$-Ph), 5.33 (s, 1H, $C\underline{H}$-OH), 7.29 (m, 5H, Ph). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 29.03 (CH_3), 31.08 (CH_3), 45.39 (CH_2), 63.28 (C), 66.45 ($CO_2\underline{C}H_2$), 73.14 (CH_2O), 76.17 (CH_2Ph), 77.36 (CH-O), 127.75, 127.94, 128.52, 129.71, 138.34 (Ph), 167.60, 173.17 (2 x C=O).

Poly(benzyloxypropyl (R,S)-3,3-dimethylmalate) (PDMMLABn') P3'. Homopolymer **P3'** was synthesized from the monomer β-lactone *(R,S)*-(3'-benzyloxypropyl)carbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone (518 mg, 1.77 mmol) in the presence of tetraethylammonium benzoate (10^{-2} equiv, 17.7 µmol, 222 µL) as initiator. (m = 512 mg). *T*g = -9.0°C. SEC (HPSEC-MALLS-dRI, THF): M_n = 25 425 g/mol. M_w = 25 757 g/mol. D = 1.013. FTIR (neat, cm^{-1}) 1746. ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 1.24 (m, 6H, 2 x CH_3), 1.93 (m, 2H, CH_2), 3.54 (m, 2H, CH_2-O), 4.27 (s, 2H, CH_2-CO_2), 4.49 (s, 2H, $C\underline{H}_2$-Ph), 5.39 (m, 1H, CH), 7.28 (m, 5H, Ph). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 28.94 (2 x CH_3), 45.24 (CH_2), 62.97, 63.11 (C), 66.44 ($CO_2\underline{C}H_2$), 73.05 (CH_2O), 76.15, 76.35 (CH_2Ph), 77.35 (CH-O), 127.84, 128.23, 129.05, 129.80, 138.27 (Ph), 167.49, 167.54, 167.60 (C=O), 173.02, 173.09, 173.17 (C=O).

II.2.3. Statistical copolymer synthesis.

Poly(benzyl (S)-3,3-dimethylmalate-co-hexyl (S)-3,3-dimethylmalate) (PDMMLABz$_{50}$-co-He$_{50}$) P4. Statistical copolymer **P4** was synthesized from monomers (4*R*)-benzyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone (104 mg, 444 µmol) and (4*R*)-hexyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone (101.5 mg, 444 µmol,) in the presence of tetraethylammonium benzoate as initiator. The initiator solution was placed in the polymerization flask under nitrogen atmosphere (10^{-2} equiv, 8.89 µmol, 112 µL). The ethanol

was eliminated under vacuum at room temperature for 1h. The vacuum was broken under inert atmosphere and the initiator was kept under nitrogen atmosphere. The mixture of the two lactones in anhydrous THF (5 mL) was kept under N_2 stream for 1h and then transferred under N_2 in the polymerization flask containing the initiator. The polymerization was conducted overnight at room temperature and followed by FTIR spectroscopy analysis, which showed the disappearance of the β-lactone band at 1850 cm^{-1} (100 % conversion). Statistical copolymer **P4** was dissolved in acetone, neutralized with a drop of acetic acid, purified by precipitation into absolute ethanol, separated and dried under vacuum. (m = 229 mg). $[\alpha]^{22}_{D}$: -3.9° (c 1.3, acetone). *T*g = +12.2°C. SEC (HPSEC-MALLS-dRI, THF): M_n = 233 300 g/mol. M_w = 252 700 g/mol. D = 1.083. FTIR (neat, cm^{-1}) 1750 ester. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 0.86 (m, 3H, $C\underline{H}_3$-CH_2), 1.16 (m, 18H, 4 x CH_3, 3 x CH_2), 1.57 (m, 2H, CH_2), 4.06 (m, 2H, CH_2-$C\underline{H}_2$-O), 5.09 (m, 2H, Ph-$C\underline{H}_2$-O), 5.27 (m, 2H, 2 x CH), 7.28 (m, 5H, Ph). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 14.05 ($\underline{C}H_3$-CH_2), 19.48 and 20.21 (2 x CH_3), 22.56 ($\underline{C}H_2$-CH_3), 25.41 (CH_2), 25.54 (CH_3), 28.46, 31.01 and 31.37 (3 x CH_2), 45.34 (2 x C), 65.88 (CH_2-$\underline{C}H_2$-O), 67.48 (Ph-$\underline{C}H_2$-O), 76.06 (2 x CH), 128.59, 128.74 and 134.94 (Ph), 167.49, 167.63 and 173.05 (4 x C=O).

II.2.4. Block copolymer synthesis.

Poly(benzyl (S)-3,3-dimethylmalate-b-hexyl (S)-3,3-dimethylmalate) (PDMMLABz$_{50}$-b-He$_{50}$) P5. Block copolymer **P5** was synthesized from monomers (4*R*)-benzyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone and (4*R*)-hexyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone in the presence of tetraethylammonium benzoate as initiator. The initiator solution was placed in the polymerization flask under nitrogen atmosphere (10^{-2} equiv, 13.4 µmol, 168 µL). The ethanol was eliminated under vacuum at room temperature for 1h. The vacuum was broken under inert atmosphere and the initiator was kept under nitrogen atmosphere. A solution of (4*R*)-benzyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone (157 mg, 670 µmol) in anhydrous THF (3 mL) was transferred under N_2 in the polymerization flask containing the initiator. The polymerization was conducted overnight at room temperature. A sample of the solution was analyzed by FTIR spectroscopy to control the total conversion of the first β-lactone. A solution of (4*R*)-hexyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone (153 mg, 670 µmol) in anhydrous THF (0.4 mL) was added to the precedent solution and the polymerization was conducted overnight at room temperature and followed by FTIR spectroscopy analysis, which showed the disappearance of the second lactone band at 1834 cm^{-1} (100 % conversion). The polymerization was stopped by neutralization with a drop of acetic acid. The solution was

poured dropwise in absolute ethanol to precipitate the block copolymer **P5**. It was then separated and dried under vacuum. (m = 301 mg). $[\alpha]^{22}_{D}$: -22.7° (c 0.9, acetone). Tg_1 = -3.3°C, Tg_2 = +49.2°C and Tm = 131.8°C. SEC (HPSEC-MALLS-dRI, THF): M_n = 164 100 g/mol. M_w = 168 300 g/mol. D = 1.025. FTIR (neat, cm^{-1}) 1756 ester. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 0.86 (m, 3H, $C\underline{H}_3$-CH_2), 1.27 (m, 18 H, 4 x CH_3, 3 x CH_2), 1.59 (m, 2H, CH_2), 4.05 (m, 2H, -CH_2-$C\underline{H}_2$-O), 5.05 (m, 2H, Ph-$C\underline{H}_2$-O), 5.28 (m, 1H, CH), 5.39 (m, 1H, CH), 7.27 (m, 5H, Ph). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 14.05 ($\underline{C}H_3$-CH_2), 19.87 and 20.44 and 22.26 (3 x CH_3), 22.58 ($\underline{C}H_2$-CH_3), 23.02 (CH_3), 25.42 (CH_3), 28.50, 31.03 and 31.39 (3 x CH_2), 45.34 and 45.42 (2 x C), 65.95 (CH_2-$\underline{C}H_2$-O), 67.46 (Ph-$\underline{C}H_2$-O), 76.07 (2 x CH), 128.60, 128.74 and 134.97 (Ph), 167.47, 167.70, 173.07 and 173.10 (4 x C=O).

III. Results and discussion

On one hand, chiral poly((*S*)-3,3-methylmalic acid) derivatives (chiral PDMMLAs: **P1**, **P2**, **P3**, **P4**, **P5**) were prepared from corresponding chiral α,α,β-trisubstituted-β-lactones. To highlight the formation of the various chiral monomers α,α,β-trisubstituted, a very convenient route in six steps that was described in a previous work was remade.[18]

Three chiral β-lactones were prepared for this aim: (4*R*)-benzyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone (benzylic lactone), (4*R*)-hexyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone (hexylic lactone) and (4*R*)-(3'-benzyloxypropyl)carbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone (benzyloxypropylic lactone). The ^{1}H NMR of these lactones was consistent with their structures. FTIR spectra showed two bands at 1756 cm^{-1} and 1834 cm^{-1} that are attributed to the ester and lactone functions, respectively for each β-lactone. The chiral benzylic, hexylic and benzyloxypropylic lactones contain one stereogenic center with only *R* stereochemical configuration. The chiral center of the main chain of homopolymers and copolymers preparing with these lactones have only *S* stereochemical configuration.

With these new chiral *β*-lactones in hand, the polymerization of these stereoregular homopolyesters and copolyesters was carried out as described in the experimental section by living anionic ring-opening polymerization of corresponding monomers using tetraethylammonium benzoate (10^{-2} equiv per mol monomer) as initiator.[18] Each polymer is characterized by ^{1}H and ^{13}C NMR, Size-Exclusion Chromatography (SEC) and Differential Scanning Calorimetry (DSC). For all polymers, the conversion is complete after

approximately 24h confirmed with the disappearance of the lactone band at 1834 cm^{-1} in FTIR spectroscopy analysis (Fig. 1).

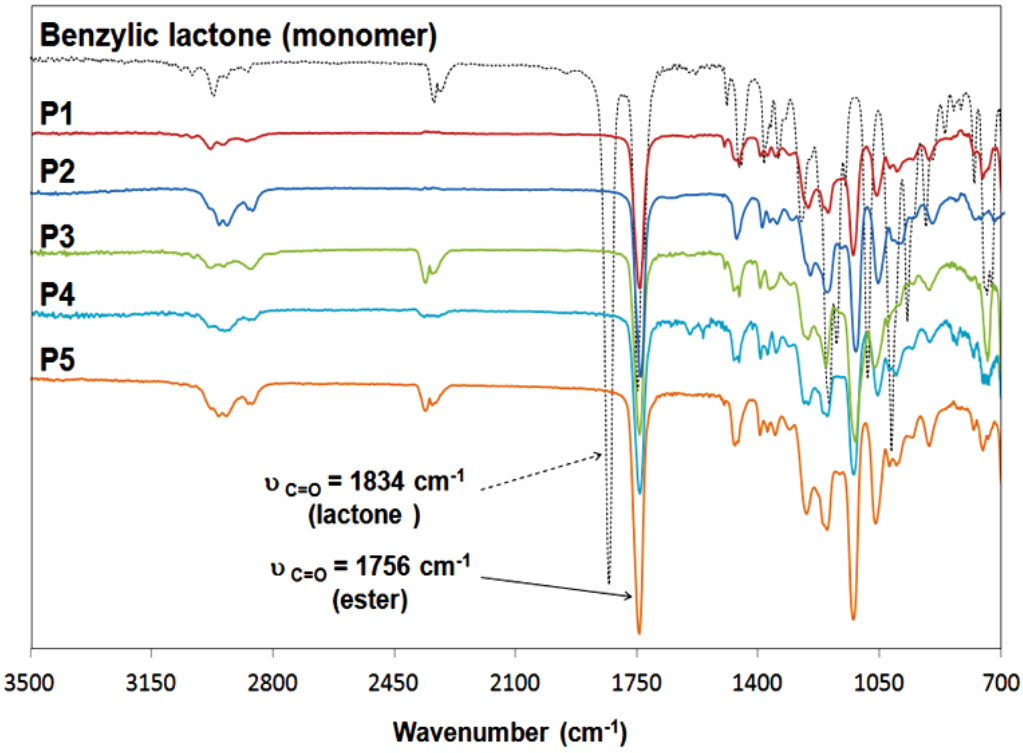


Figure 1. FTIR spectra of chiral benzylic lactone and different chiral PDMMLAs.

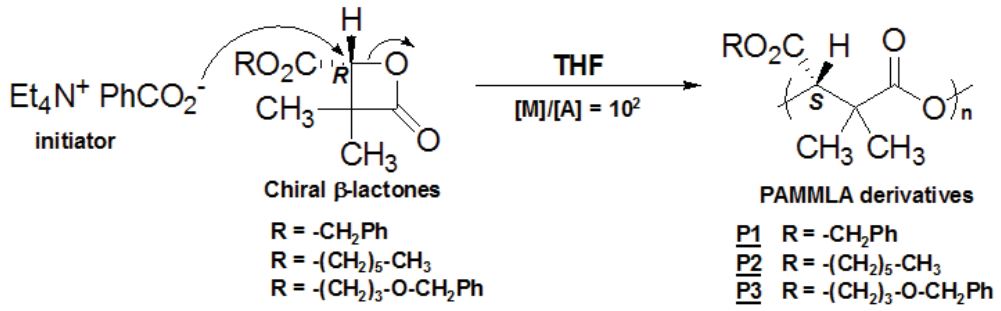
After dissolution in acetone and precipitation in ethanol, high molecular weights with a very good molar mass distribution value (D) witch close to unity were observed. Theoretical molecular weights can be determinate by molar ratio of monomer to initiator [M]/[A] (Table 1).

Table 1. Characterization of chiral and racemic homopolymers and copolymers.

Polymer			**M_{nTh} (g/mol)**	**M_n (g/mol)[a]**	**M_w (g/mol)[a]**	**D [a]**	**T_g (°C)[b]**	**T_m (°C)[b]**	**T_c (°C)[b]**	**$[\alpha]^{22}_D$ (°)**
Chiral PDMMLA	**Homopolymers**	**P1**	23 400	176 500	177 900	1.008	+41.5	124.3	-	-16.6
		P2	22 800	111 200	111 700	1.004	-9.1	158.2	-	-47.3
		P3	29 200	68 500	70 900	1.035	+0.3	-	170.9	+12.8
	Statistical copolymer	**P4**	23 010	233 300	252 700	1.083	+12.2	-	-	-3.9
	Block copolymer	**P5**	23 010	164 100	168 300	1.025	-3.3, +49.2	131.8	-	-22.7
Racemic PDMMLA	**Homopolymers**	**P1'**	23 400	27 840	29 760	1.068	+39.1	-	-	-
		P2'	22 800	19 789	21 283	1.075	-14.2	-	-	-
		P3'	29 200	25 425	25 757	1.013	-9.0	-	-	-
	Statistical copolymer	**P4'**	23 010	23 244	27 811	1.196	+19.3	-	-	-
	Block copolymer	**P5'**	23 010	19 543	31 105	1.591	-0.1, +44.2	-	-	-

M_{nTh} = theoretical M_n.
[a] HPSEC-MALLS-dRI in acetone for racemic PDMMLAs and in THF for chiral PDMMLAs, 0.5 min.
[b] Determined by DSC, T_m and T_c in the first heating and T_g in the 2nd heating.

Initially, stereoregular homopolymers **P1** (PDMMLA-Bz), **P2** (PDMMLA-He) and **P3** (PDMMLA-Bn) are prepared from the corresponding chiral benzylic, hexylic, and benzyloxypropylic lactones, respectively (Scheme 3).



Scheme 3. Synthesis of stereoregular homopolyesters.

Chemical shifts at 5.28 and 7.20 ppm in ^{1}H NMR analysis were assigned to the $-CH_2$ benzylic group of **P1** (Fig. 2a) and those at 0.86, 1.26, 1.59 and 4.10 ppm were attributed to hexylic group of **P2** (Fig. 2b).

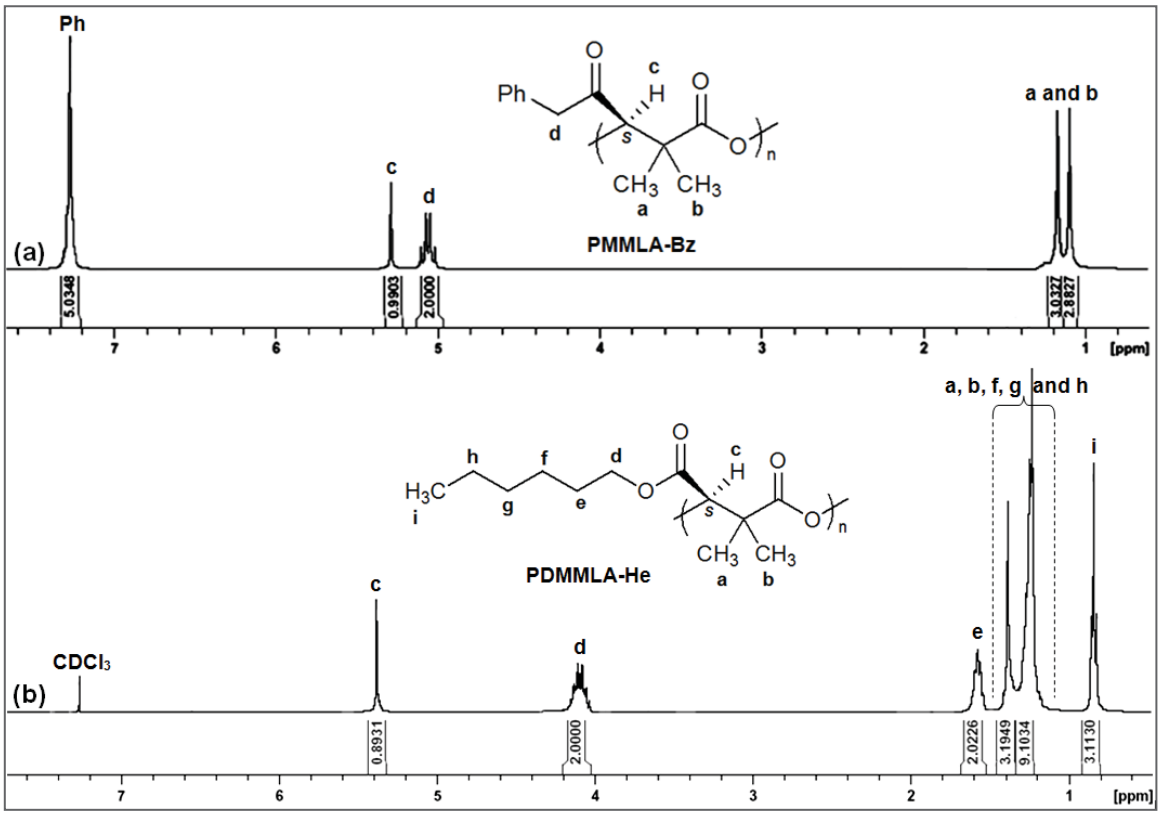


Figure 2. ^{1}H NMR spectra of chiral homopolymers (a) PDMMLA-Bz **P1** and (b) PDMMLA-He **P2**.

Figure 3 showed also ^{1}H NMR signals at 1.89, 3.49, 4.26, 4.47 and 7.29 ppm that indicated the presence of benzyloxypropylic group of **P3** (Fig.3a).

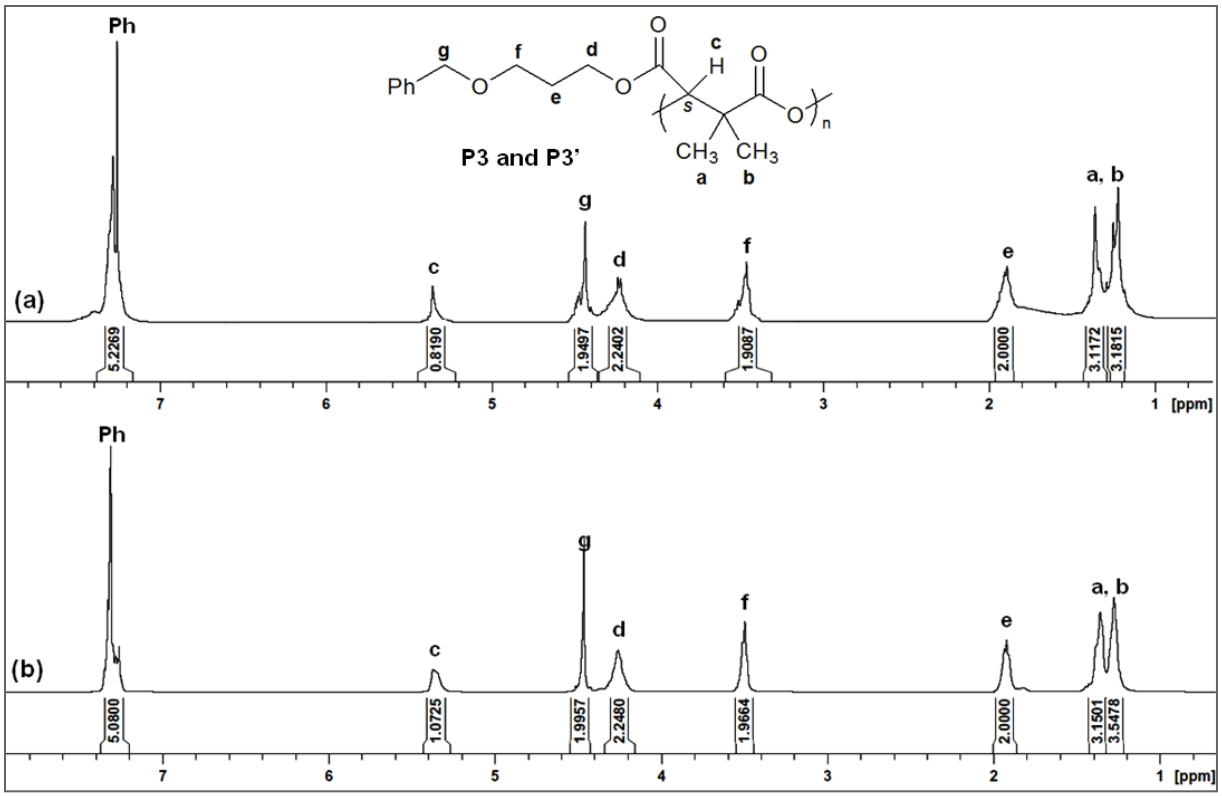
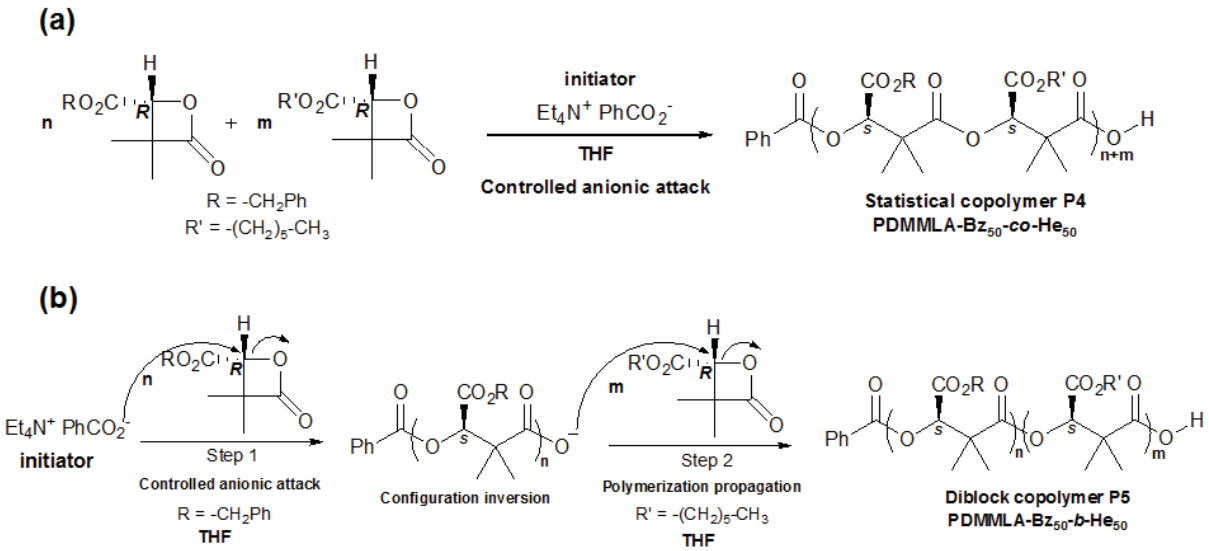


Figure 3. ^{1}H NMR spectra of (a) chiral homopolymer PDMMLA-Bn **P3** and (b) racemic homopolymer PDMMLA-Bn' **P3'.**

Then, statistical and block copolyesters were prepared from two different lactones: benzylic and hexylic lactones for obtained **P4** (Scheme 4a) and **P5** (Scheme 4b), respectively. They were purified by precipitation in ethanol.



Scheme 4. Synthesis of stereoregular (a) statistical copolyester **P4** and (b) block copolyester **P5**.

Thus, the presence, in the lateral chain of benzylic and hexylic ester groups in the ratio 50:50 was confirmed by ^{1}H NMR comparing the peak integrals assigned to the different co-monomers. Indeed, the integration ratio of peak at 4.10 ppm corresponding to -CH_2-O- hexyl is equivalent to that the -CH_2-O- benzyl at 5.20 ppm. Therefore, the proportion of the benzylic and the hexylic units in the copolymers was the same to that of the lactones monomers feed (Fig. 4). The absence of benzoate end group signal in ^{1}H NMR is explained by the polyesters high molecular weight.

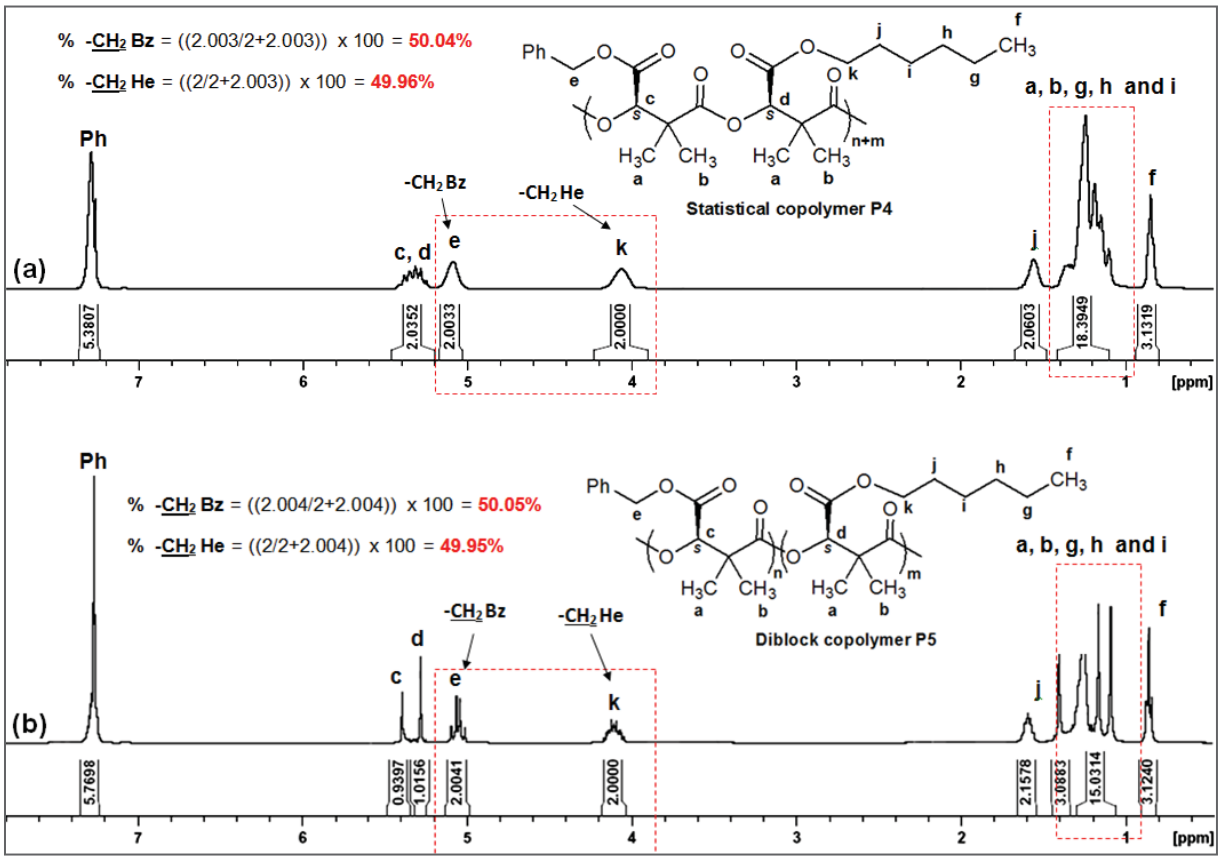


Figure 4. ^{1}H NMR spectra of chiral copolymers (a) statistical PDMMLA **P4** and (b) block PDMMLA **P5**.

On the other hand, racemic poly((*R*,*S*)-3,3-dimethylmalic acid) (racemic PDMMLAs: **P1'**, **P2'**, **P3'**, **P4'** and **P5'**) were synthesized from corresponding racemic α,α,β-trisubstituted-β-lactones. The synthesis and the characterization of **P1'**, **P2'**, **P4'** and **P5'** were previously demonstrated in the literature [21] whereas the homopolymer **P3'** has been made for the first time in this paper. The synthesis details are described above in the experimental section. In order to do so, three racemic β-lactones were prepared: benzylic, hexylic, and benzyloxypropylic (named 4-benzyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone, 4-

hexyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone and 4-(3'-benzyloxypropyl)carbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone, respectively). Indeed, the P3' structure was confirmed by ^{1}H NMR. Signals at 1.93, 3.54, 4.27 and 4.49 and 7.20 ppm indicated the presence of benzyloxypropylic group of **P3'** (Fig. 3b). This family of racemic PDMMLAs was synthesized in this paper for comparison raison, to confirm the stereoregularity of stereoregular corresponding PDMMLAs. Table 1 showed their characterization information's.

- *Regioregularity*

α,*α*,*β*-trisubsituted *β*-lactones bear two methyl groups in the *α*-position. The absence of hydrogen atom in the *α*-position avoids transfer by H abstraction and therefore side reactions.[22,23]

- *Stereoregularity*

Numerous reports appear in the literature where ^{13}C NMR spectroscopy was used to identify the stereoregularity of the polyester.[25-27] The carbonyl peak around 167 ppm is a particularly sensitive and effective signal which provides the stereo information.[28-30]

In case of observation of three peaks, the racemic polymer is present, indicating atactic fragments in the polymer chain corresponding to isotactic, syndiotactic and heterotactic triads. The ratio of the signals indicates the ratio of atactic and isotactic or syndiotactic fragments in the polymer chain. If only a single peak is visible, it can be identified as chiral polymer, representing syndiotactic or isotactic polymer.[31]

The above synthetic methodology of stereoregular PDMMLA was quite convenient and efficient. Thus, obtaining racemic and chiral PDMMLAs in hand and comparing carbonyl peak around 167 ppm corresponding to stereopolymers with data obtained from a series of racemic triads, we were able to confirm the isotacticity of stereoregular PDMMLA and accurately attribute the isotactic or syndiotactic sequence peaks for racemic PDMMLAs. To this end, figure 5 represents ^{13}C NMR spectra of different stereoregular PDMMLAs.

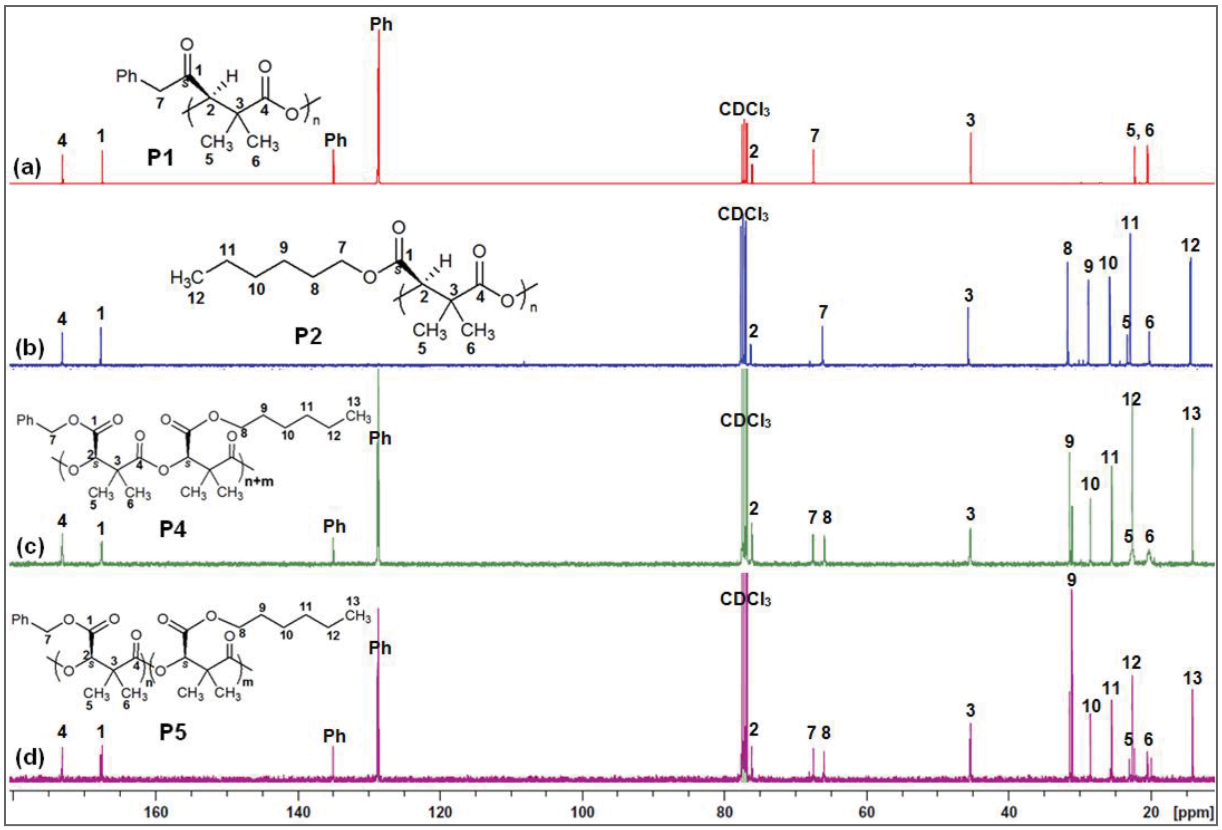


Figure 5. ^{13}C NMR spectra of chiral homopolymers (a) PDMMLABz **P1** and (b) PDMMLAHe **P2**, chiral statistical copolymer (c) PDMMLABz$_{50}$-*co*-He$_{50}$ **P4** and chiral block copolymer (d) PDMMLABz$_{50}$-*b*-He$_{50}$ **P5**.

However, the carbonyl peak around 167 ppm for PDMMLA polymers showed one triplet corresponding to isotactic (i), syndiotactic (s) and atactic triads (a) in the case of homopolymers. In the case of copolymer, only one triplet corresponding to the two units which are undifferentiated (statistical copolymer) and two well-defined triplets corresponding to the two units that presented exactly the same chemical shifts of the two homopolymers (block copolymer) (Fig. 6a).[21] As mentioned in figure 6b, all stereoregular PDMMLAs showed only one fine peak due to the exclusive iso-sequence [32] corresponding to isotactic triad (i) which has been assigned by comparison with corresponding atactic PDMMLAs presented in figure 5c. Indeed, the chemical shift of the two homopolymers is slightly different. The isotactic triad of hexylic homopolymer **P2** (167.70 ppm) is the most deshielded as isotactic triad of benzylic homopolymer **P1** (167.47 ppm) that is exactly what has been observed with corresponding atactic homopolymers **P2'** and **P1'** (Fig. 6).

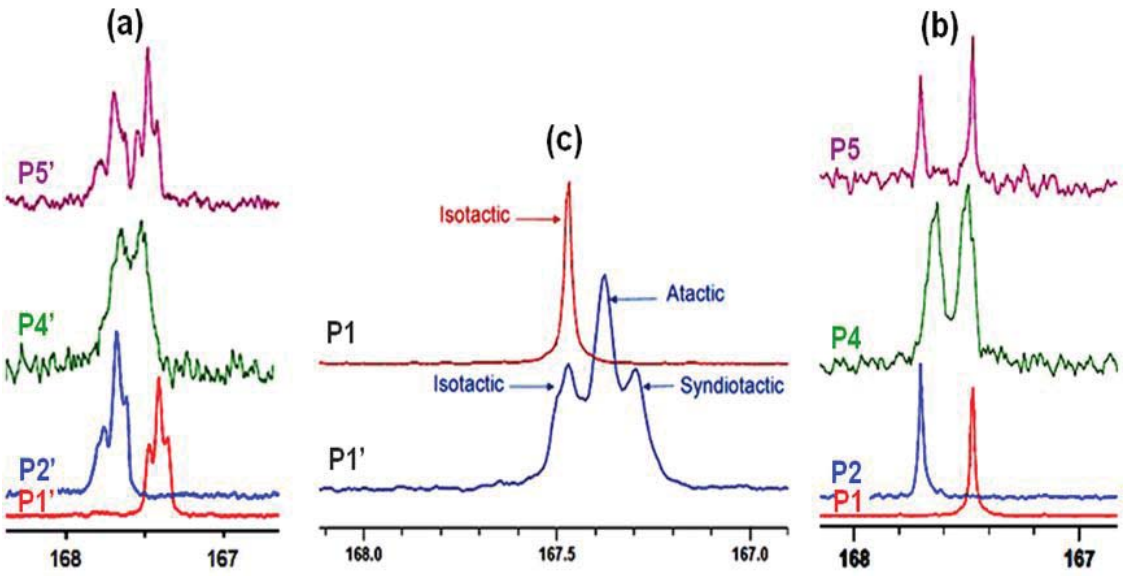


Figure 6. ^{13}C NMR spectra of C=O signals of lateral ester groups of (a) atactic PDMMLAs (**P1'**, **P2'**, **P4'** and **P5'**), (b) isotactic PDMMLAs (**P1**, **P2**, **P4** and **P5**) and (c) atactic PDMMLA-Bz **P1'** and isotactic PDMMLA-Bz **P1** showing the distribution of the three triads.

Furthermore, for statistical chiral copolymer **P4**, we observe the presence of two *peaks* which were *not really* distinct (167.49 and 167.63 ppm) because of their distribution in the polymer structure in a random manner. However, chiral block copolyester **P5** presents two well-defined peaks (167.47 and 167.70 ppm) having the same chemical shifts of isotactic homopolymers triads **P1** and **P2**. There are also the same results observed with the corresponding atactic homopolymers **P4'** and **P5'** (Fig. 6).

Figure 7 showed ^{13}C NMR spectra of chiral and racemic benzyloxypropylic homopolymers (PDMMLA-Bn **P3** (Fig. 7a) and PDMMLA-Bn' **P3'** (Fig.7b), respectively). Homopolymer **P3** afforded only one singlet which can be evidently assigned to isotactic triad by comparison with corresponding atactic PDMMLA-Bn' **P3'** which also presents the three triads (isotactic (i), syndiotactic (s) and atactic (a)).

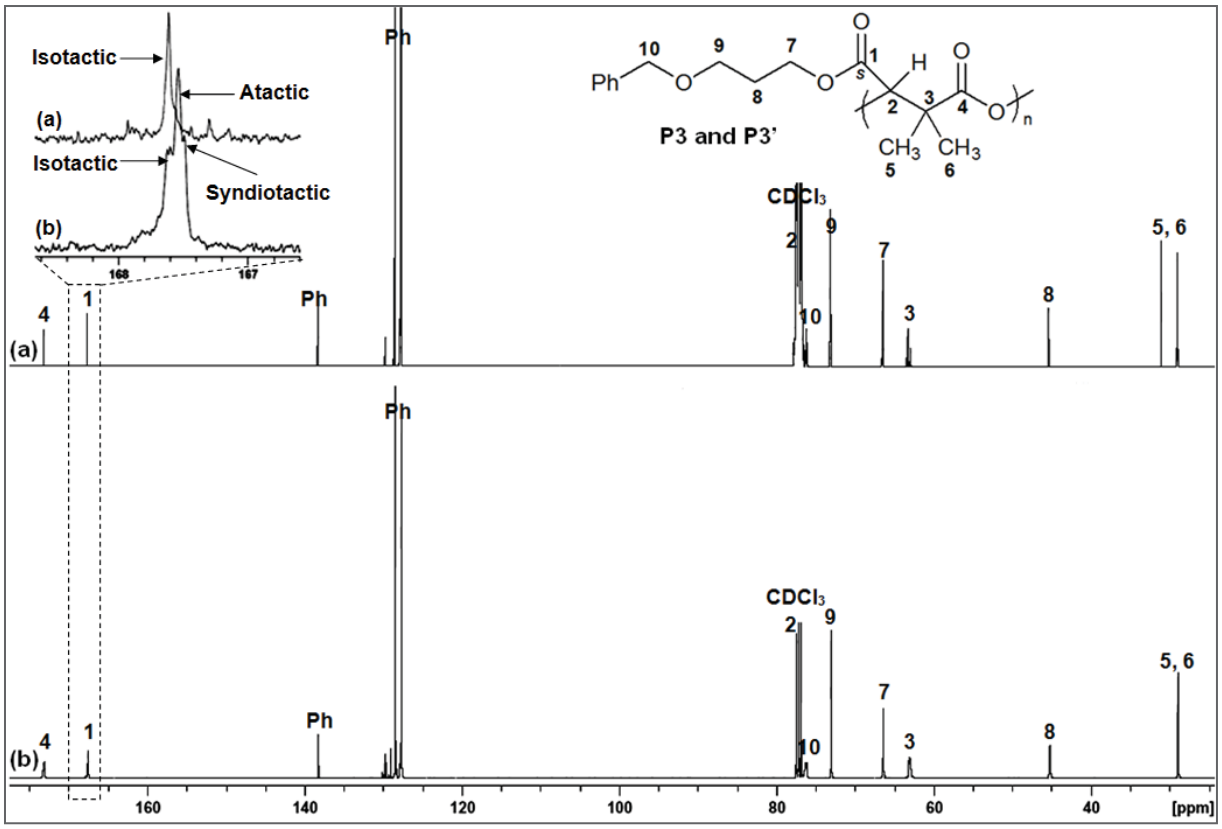


Figure 7. ^{13}C NMR spectra of homopolymers (a) isotactic PDMMLA-Bn **P3** and (b) racemic PDMMLA-Bn' **P3'.**

These different data allowed to confirm in one hand the structure and isotacticity of chiral homopolyesters (**P1**, **P2** and **P3)**, statistical and block copolymers (**P4** and **P5**, respectively) obtained by anionic ring opening polymerization of optically active *α,α,β*-trisubstituted *β*-lactones. Secondly, these data also settled the question of when the synthesis of atactic PDMMLA from racemic *α,α,β*-trisubstituted *β*-lactones, a mixture of isotactic, syndiotactic and atactic sequences in polymer chain is rather observed. We can now accurately attribute the different triads sequence peaks of atactic PDMLLAs. Table 2 showed different triad pourcentages of all atactic and chiral PDMMLAs homopolymers. It showed that all chiral homopolymers are 100% isotactic and that atactic triad of all atactic PDMMLAs homopolymers is mainly formed (Table 2).

Table 2. Attribution of the different triads sequence peaks of different PDMMLAs.

	Polymers	Chiral PDMMLAs			Racemic PDMMLAs		
		P1	**P2**	**P3**	**P1'**	**P2'**	**P3'**
Triads	Isotactic (%) [a]	100	100	100	25	27	32
	Atactic (%) [a]	/	/	/	53	54	50
	Syndiotactic (%) [a]	/	/	/	22	19	18

[a] Determined by ^{13}C NMR.

This relative narrowness of the resonance peaks of chiral PDMMLAs is in favor of the presence of only one stereo-sequence of monomer units. This result confirms also the formation of optically active *β*-lactones presented in another paper with 100% enantiomeric excess. It is already known from the literature that "*ring-opening polymerization of poly[(R) or (S)-benzyl β-malate] with configuration inversion of the asymmetric carbon C-CO_2R of the β-lactone without any racemization of this carbon and with the formation of a carboxylate growing chain end*"[33] proves the absolute configuration (*S*) of asymmetric carbon of isotactic polyesters as mentioned before.

- *Molecular Weights*

Absolute molecular weights were measured by size-exclusion chromatography in THF coupled with tri-angle laser-light scattering. Theoretical molecular weights can be determinate by molar ratio of monomer to initiator [M]/[A]. In the case of all stereoregular PDMMLAs, all values were found at least twice fold higher than expected values with a very good molar mass distribution value obtained between 1.004 and 1.083 for all chiral PDMMLAs (Table 1, Fig. 8). This observation is consistent with the less solubility of polymer in acetone over time in contrary to amorphous PDMMLAs. Indeed, the chiral macromolecules organize themselves in crystalline zones and are not isolated, which explains the high molecular weight values. In the same time, the amorphous and non-stereoregular corresponding PDMMLAs provided a molecular weight that was well correlated with theoretical values indicating the control of the polymerization (Table 1, Fig. 8).

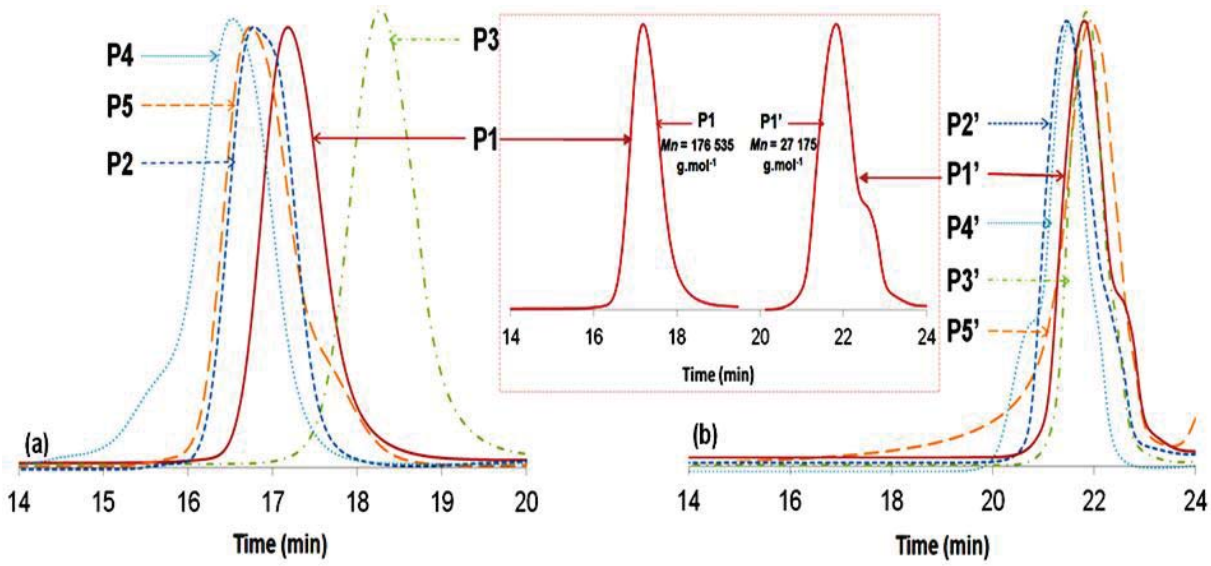


Figure 8. SEC curves of (a) chiral PDMMLAs (**P1**, **P2**, **P3**, **P4** and **P5**) and (b) racemic PDMMLAs (**P1'**, **P2'**, **P3'**, **P4'** and **P5'**).

Thermal properties: semi-crystallinity (T_m), crystallization temperature (T_c), glass-transition temperature (T_g) and decomposition temperature (T_d).

The semi-crystalline PDMMLA structures were confirmed by DSC which shows a melting temperature $\boldsymbol{T_m}$ observed on all semi-crystalline polyesters. Unlike the two homopolymers **P1** and **P2** and the block copolymer **P5** that are semi-crystalline (T_{mP1} = 124.3°C,[18] T_{mP2} = 158.2°C and T_{mP5} = 131.8°C), statistical copolymer 50:50 **P4** is semi-crystalline but hasn't a $\boldsymbol{T_m}$. This is due to the presence of a second component, in the copolymer structure, randomly mixed preventing its stereoregularity.[34] Besides, isotactic homopolymer **P3** has a crystallization temperature $\boldsymbol{T_c}$ (Tc_{P3} = 170.9°C) (Table 1, Fig. 9).

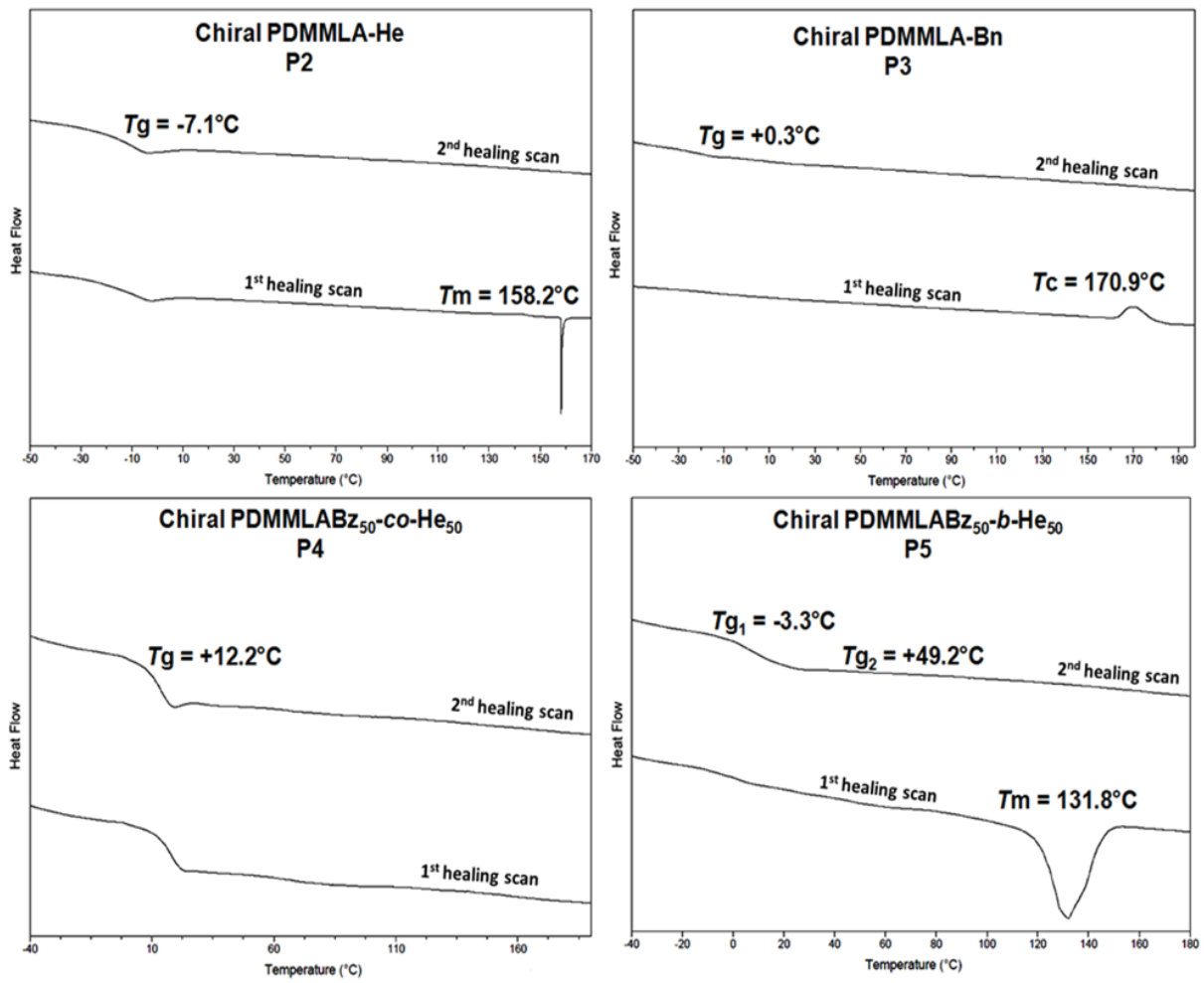


Figure 9. 1st and 2nd DSC heating scans for chiral PDMMLAs (**P2**, **P3**, **P4** and **P5**).

In addition, DSC analysis data provided other information, glass transition temperature (T_g). In the case of chiral homopolyesters, the high T_g value for chiral **P1** (41.5°C) [18] explain the rigidity of aromatic group in the lateral chain of benzylic homopolymer, which causes over restriction for rotating the substituent along the polymer backbone. On the other hand, owing to flexibility, **P2** shows the lower T_g value (-7.1°C) consequent to a very decrease in rigidity of polymer sourced from hexylic ester group. Furthermore, it has been illustrated in table 1 and figure 10 that diblock copolymer **P5** exhibits two T_g values (-3.3°C and +49.2°C) corresponding to hexylic and benzylic units, respectively. However, statistical copolymer **P4** (50:50) presents only one logical T_g value (+12.2°C) distributed between the two T_g values of **P1** and **P2** for a mixture with 50:50 molar ratio of homopolymers. In addition, T_g values of **P1** and **P2** for a mixture with 50:50 molar ratio of homopolymers. In addition, *T*g values of semi-

crystalline and amorphous benzyloxypropylic homopolymers **P3** and **P3'** were +0.3 and -9.0°C, respectively Fig. 9 and 10a).

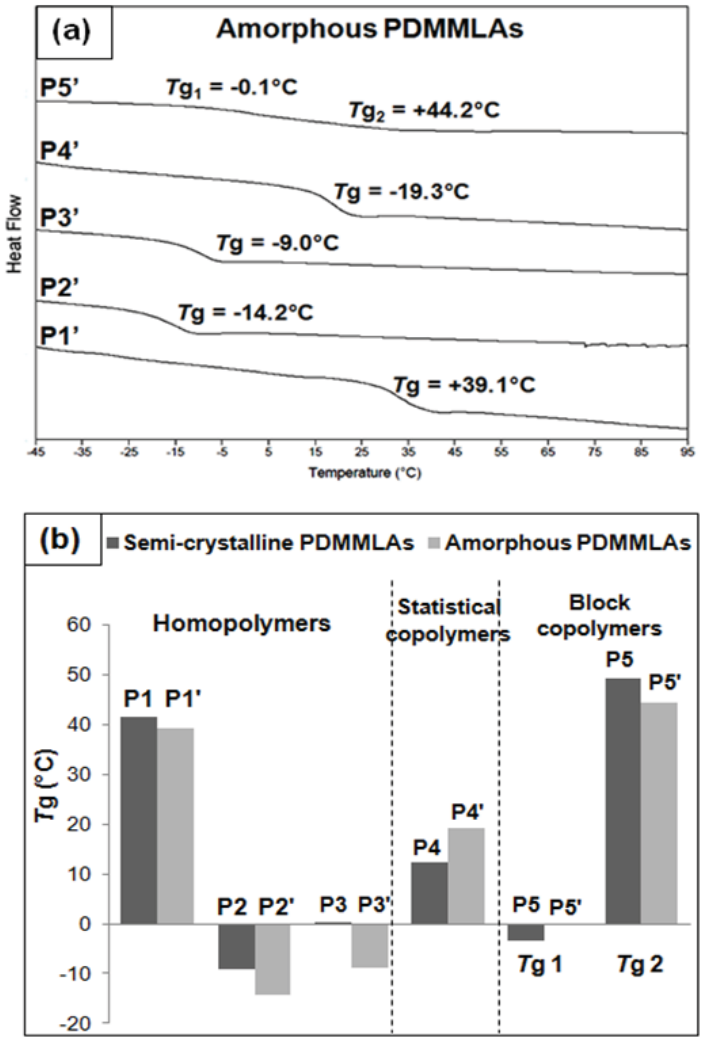


Figure 10. (a) 2nd DSC heating scans for racemic PDMMLAs (**P1'**, **P2'**, **P3'**, **P4'** and **P5'**) and (b) comparison of T_g values for all chiral PDMMLAs and corresponding racemic PDMMLAs.

Figure 10a shows T_g values of all synthesized amorphous PDMMLAs. Besides the effect of structure and rigidity of the polymers chains, T_g is affected by their stereochemistry. Indeed, it was observed that all T_g values of amorphous PDMMLAs were lower than corresponding semi-crystalline PDMMLAs and T_g increases with higher stereochemistry (Table1, Fig. 10b).

To further study the thermal stability of these polymers and ensure their use at a temperature range without any degradation, the thermogravimetric analysis (TGA) was

effected for determinate the weight loss of different PDMMLAs. TGA was performed under N_2 atmosphere at a heating rate of 10°C/min from room temperature to 700°C. The thermogram curves of the different PDMMLA homopolymers and statistical copolymer were compared (Fig. 11) and their weight loss temperatures of 5, 50, 95 and 100% were showed in Table 3.

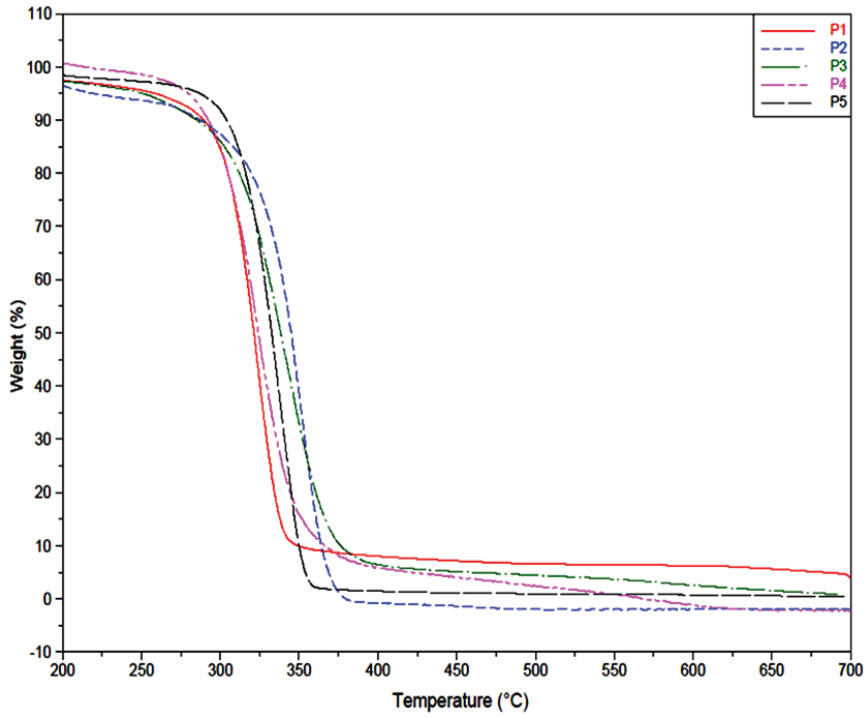


Figure 11. TGA curves of all chiral homopolymers.

Table 3. Thermal stability of chiral homopolymers and copolymers.

T_d (°C) [a]					
Weight loss (%)		**5**	**50**	**95**	**100**
Polymers	**P1**	258	321	682	> 700
	P2	219	344	368	379
	P3	250	338	460	≈700
	P4	279	324	421	568
	P5	286	332	354	510

[a] Decomposition temperature (T_d) occurs via TGA.

All studied polymers had homogenous degradation curve (Fig. 11). The aromatic group in the lateral chain of homopolymers **P1** and **P3** lead to degradation in high temperature and especially in the case of benzylic homopolymer **P1** which is more rigid and less hydrophobic. It contains less carbon number in its side chain in comparison with **P3** (Table 3). At weight loss of 5%, T_d of **P1** and **P3** were almost identical (258 and 250°C, respectively). Therefore, decomposition temperature (T_d) decreased with increasing of carbon number. Indeed, hexylic homopolymer **P2** which contain in its lateral chain a group of a linear chain of six carbons had the very low T_d values over the degradation. This phenomenon can be attributed to the flexibility of this hexylic group. However, T_d was sharply increased above 300°C for all these polymers indicating the beginning of their decomposition. **P1** presented the highest value of T_d and a very slight weight loss. Indeed, it decomposed completely at T_d above to 700°C whereas **P2** had the lowest value and lost total weight at 379°C. T_d of **P3** was between those of **P1** and **P2** and lost almost total weight at 700°C.

In addition, figure 11 depicted the TGA curve of statistical PDMMLA **P4** (50:50) and block copolymer PDMMLA **P5** (50:50). Their thermal stability was found between those of the corresponding homopolymers **P1** and **P2** apart at initial T_d which was slightly higher. Thus, at a weight loss of 100%, T_d value of **P4** and **P5** (568 and 510°C, respectively) was an almost average between the two corresponding homopolymers values (calculated: 536°C). This indicated also that the two components were ideally mixed in these copolymer systems (Fig. 11).

Finally, these results show show that T_m, T_g and T_d values (at weight loss of 50%) of **P1**, **P2** and their copolymers **P4** and **P5** presented linearity as a function on their compositions (R^2 = 0.906, 0.991 and 0.999, respectively) which confirmed the ideal mixing of the copolymer system (Fig. 12).

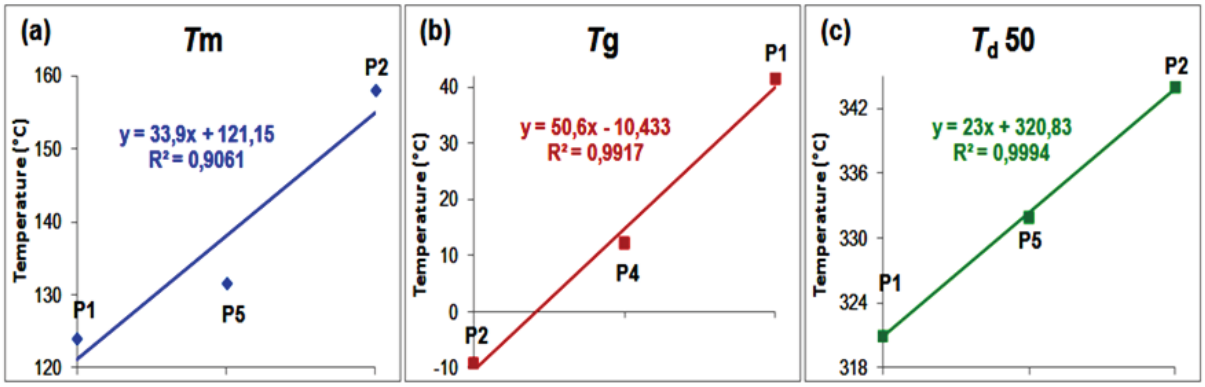


Figure 12. Linear relation between "polymers compositions (homopolymers (**P1** and **P2**) and their copolymers 50:50 (**P4** and **P5**)" and "(a) T_m, (b) T_g and (c) T_d at weight loss of 50%".

These polymers present a high thermal stability. Therefore, the present study showed that thermo-mechanical properties such as crystallinity, melting point or stereo-polymers rigidity/flexibility of these materials depend on their structure design and stereochemistry. These properties can be easily adjusted by varying the ratio of monomers also choose the statistical or block copolymerization,[35-38] underline the above results.

IV. Conclusion

A series of poly((*S*)-3,3-dimethylmalic acid) derivatives was successfully synthesized and characterized in this work. These custom synthetic polymers are at the same time stereoregular, biodegradable, bioassimilable and bearing functionalized groups, for adjusting their hydrophilic/hydrophobic balance. 100% isotactic homopolymers, statistical and block copolymers were obtained from the corresponding chiral α,α,β-trisubstituted β-lactones containing one stereogenic center. ^{13}C NMR spectroscopy has been used mainly to study their tacticity and thus confirm their stereoregularity and DSC for their crystallinity. However, with furthering the use of synthetic polymers in the biomaterial field, this family of stereopolyesters has great potential in many biomedical applications such as drug delivery systems.

References

1. M. Vert; S.M. Li; G. Spenlehauer; P. Guerin, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine,* **1992**, *3*, 432.
2. M.F. Gonzalez; R.A. Ruseckaite; T.R. Cuadrado, *Journal of Applied Polymer Science,* **1999**, *71*, 1223.
3. B. Kessler; B. Witholt, *Macromolecular Symposia,* **1998**, *130*, 245.
4. D. Wang; D.R. Robinson; G.S. Kwon; J. Samuel, *Journal of Controlled Release,* **1999**, *57*, 9.
5. W.J. Page, *Canadian Journal Of Microbiology,* **1995**, *41*, 1.
6. P. Törmälä; T. Pohjonen; P. Rokkanen, *Macromolecular Symposia,* **1997**, *123*, 123.
7. M.A. LeboucherDurand; V. Langlois; P. Guerin, *Polymer Bulletin,* **1996**, *36*, 35.
8. S. Cammas; M.M. Bear; L. Moine; R. Escalup; G. Ponchel; K. Kataoka; P. Guerin, *International Journal Of Biological Macromolecules,* **1999**, *25*, 273.
9. S. Cammas-Marion; P. Guerin, *Macromolecular Symposia,* **2000**, *153*, 167.
10. L. Moine; C. Amiel; W. Brown; P. Guerin, *Polymer International,* **2001**, *50*, 663.
11. R. Bizzarri; F. Chiellini; R. Solaro; E. Chiellini; S. Cammas-Marion; P. Guerin, *Macromolecules,* **2002**, *35*, 1215.
12. S. Cammas-Marion; P. Guerin, *Designed Monomers And Polymers,* **2000**, *3*, 77.
13. S. Cammas; I. Renard; K. Boutault; P. Guerin, *Tetrahedron-Asymmetry,* **1993**, *4*, 1925.
14. P. Guerin; M. Vert; C. Braud; R.W. Lenz, *Polymer Bulletin,* **1985**, *14*, 187.
15. M. Vert; P. Guerin, *Biofutur,* **1992**, 52.
16. C.T. Goodhue; E.E. Snell, *Biochemistry,* **1966**, *5*, 403.
17. C. Barbaud; F. Faÿ; F. Abdillah; S. Randriamahefa; P. Guérin, *Macromolecular Chemistry and Physics,* **2004**, *205*, 199.
18. R. Belibel; C. Barbaud, *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry*, **Accepted 22 May 2015.**
19. C. Barbaud; S. Cammas-Marion; P. Guerin, *Polymer Bulletin,* **1999**, *43*, 297.
20. F.E. Kohn; J.W.A. Vandenberg; G. Vanderidder; J. Feijen, *Journal Of Applied Polymer Science,* **1984**, *29*, 4265.
21. F. Ouhib; S. Randriamahefa; P. Guerin; C. Barbaud, *Designed Monomers And Polymers,* **2005**, *8*, 25.
22. C. Barbaud; F. Abdillah; F. Faÿ; M. Guerrouache; P. Guérin, *Designed Monomers And Polymers,* **2003**, *6*, 353.
23. C. Mabille; M. Masure; P. Hemery; P. Guerin, *Polymer Bulletin,* **1998**, *40*, 381.
24. M. Iida; S. Hayase; T. Araki, *Macromolecules,* **1978**, *11*, 490.

25. R.A. Gross; Y. Zhang; G. Konrad; R.W. Lenz, *Macromolecules,* **1988**, *21*, 2657.

26. S. Bloembergen; D.A. Holden; T.L. Bluhm; G.K. Hamer; R.H. Marchessault, *Macromolecules,* **1989**, *22*, 1656.

27. A. Leborgne; N. Spassky, *Polymer,* **1989**, *30*, 2312.

28. J.E. Kemnitzer; S.P. McCarthy; R.A. Gross, *Macromolecules,* **1993**, *26*, 1221.

29. M. Arcana; O. Giani-Beaune; F. Schue; W. Amass; A. Amass, *Polymer International,* **2000**, *49*, 1348.

30. Y. Hori; T. Hagiwara, *International Journal Of Biological Macromolecules,* **1999**, *25*, 237.

31. M. Allmendinger; R. Eberhardt; G.A. Luinstra; B. Rieger, *Macromolecular Chemistry and Physics,* **2003**, *204*, 564.

32. K. Boutault; S. Cammas; F. Huet; P. Guerin, *Macromolecules,* **1995**, *28*, 3516.

33. P. Guerin; J. Francillette; C. Braud; M. Vert, *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Symposia,* **1986**, *6*, 305.

34. J. C. Middleton; A. J. Tipton, *Biomaterials,* **2000**, *21*, 2335.

35. M. Trollsas; J.L. Hedrick, *Journal of The American Chemical Society,* **1998**, *120*, 4644.

36. M. Trollsas; H. Claesson; B. Atthoff; J.L. Hedrick, *Angewandte Chemie-International Edition,* **1998**, *37*, 3132.

37. M. Trollsas; J.L. Hedrick; D. Mecerreyes; P. Dubois; R. Jerome; H. Ihre; A. Hult, *Macromolecules,* **1998**, *31*, 2756.

38. M. Trollsas; M.A. Kelly; H. Claesson; R. Siemens; J.L. Hedrick, *Macromolecules,* **1999**, *32*, 4917.

➢ Conclusion de l'article 6

Cet article a décrit la synthèse et la caractérisation de nouveaux PDMMLAs chiraux. Ces polyesters portaient sur leurs chaînes macromoléculaires des groupements fonctionnels choisis pour apporter les caractères hydrophiles et hydrophobes aux polymères. La synthèse sur mesure de ces polymères a été effectuée avec succès selon une ROP des β-lactones chirales par un mécanisme anionique vivant pour obtenir des homopolymères, des copolymères statistiques et des copolymères à bloc. En plus de leur diversité, les PDMMLAs chiraux présentent une stéréorégularité élevée. L'isotacticité de tous les polymères synthétisés a été confirmée par RMN ^{13}C et la semi-cristallinité par la température de fusion mesurée par DSC. Une comparaison de leurs propriétés physicochimiques a été réalisée avec leurs analogues amorphes.

L'étude de RX a été également effectuée pour confirmer la semi-cristallinité de ces polymères. Les résultats obtenus n'ont pas été décrits dans cet article. En effet, la figure III-4 montre la comparaison des profils obtenus par diffraction des rayons-X (RX) des homopolymères benzyliques semi-cristallin P1 et amorphe P1' (figure III-4-A), des copolymères statistiques semi-cristallin P4 et amorphe P4' (figure III-4-B) et des copolymères à bloc semi-cristallin P4 et amorphe P4' (figure III-4-C). La présence des pics bien définis sur les profiles des polymères chiraux P1, P4 et P6 a confirmé leur semi-cristallinité.

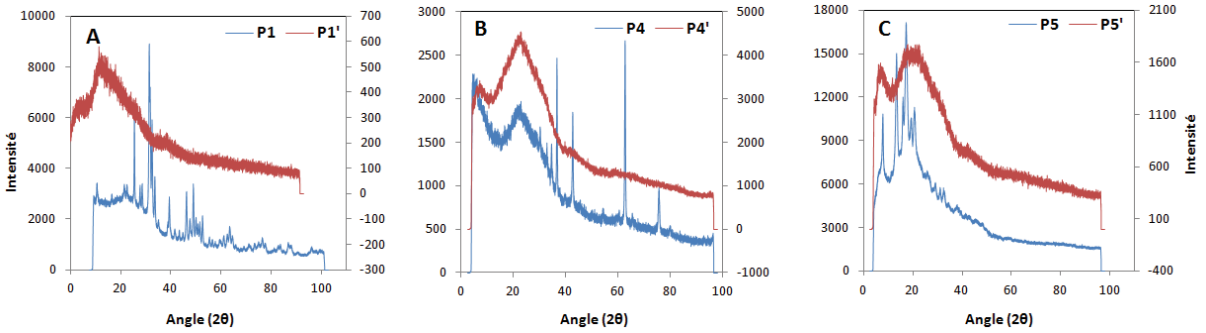


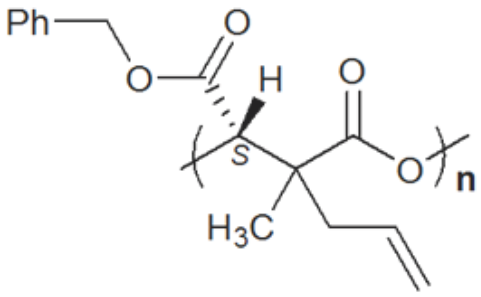
Figure III-4. Comparaison des profils de diffraction des RX observés des PDMMLAs semi-cristallins et amorphes (A) P1 et P1', (B) P4 et P4' et (C) P5 et P5'. Les profils bleus correspondent aux PDMMLAs semi-cristallins et ceux en rouge aux PDMMLAs amorphes.

Chapitre III : PDMMLAs semi-cristallins

OBJECTIF 2

3ème partie :

Autres résultats



PAIMMLA semi-cristallin

Après avoir mis en place des homopolymères et des copolymères 100% isotactiques comportant un seul centre stéréogène sur leur unité de répétition, l'intérêt s'est porté, dans cette partie, sur des polymères ayant une ditacticité grâce aux deux centres stéréogènes sur leur unité de répétition. La synthèse et la caractérisation du stéréo-homopolymère poly(acide [*S*]-3-allyl-3-méthylmalique) (PAlMMLA) comportant deux groupements méthyle et allyle sur sa chaîne principale seront présentées dans cette partie. Ce polymère qui portera ~~ainsi~~ un groupement fonctionnel benzylique permettra après déprotection par hydrogénolyse catalytique la fonctionnalisation du polymère et/ou la modification de ses propriétés de surface (mouillabilité, balance hydrophile/hydrophobe, …) (schéma III.1a). La fonction allyle permettra ainsi la modification chimique des polymères.

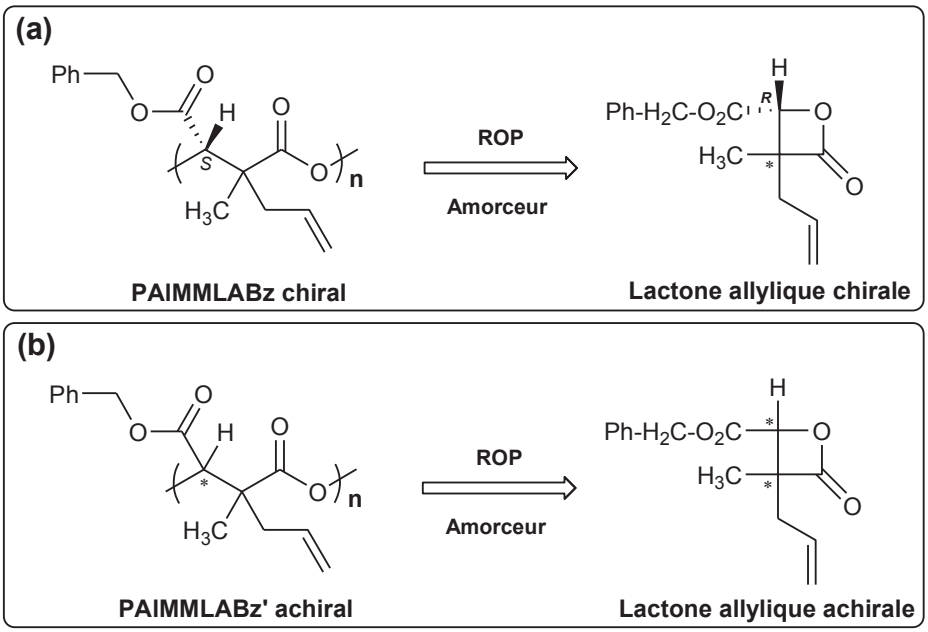


Schéma III-1. Rétrosynthèse des homopolymères PAlMMLAs allyliques (a) chiral et (b) achiral

Pour cela, une nouvelle lactone monomère chirale qui contient deux centres stéréogènes a été synthétisée (lactone allylique chirale). Cette lactone est un mélange de seulement deux diastéréoisomères (*RR* et *RS*) ((3*R*,4*R*)-4-benzyloxycarbonyl-3-allyl-3-méthyl-2-oxétanone et (3*R*,4*S*)-4-benzyloxycarbonyl-3-allyl-3-méthyl-2-oxétanone)). Par ailleurs, la lactone achirale correspondante (lactone allylique achirale) contient les quatre stéréoisomères (*RR, SS*, *RS* et *SR*) ((3*R*,4*R*)-4-benzyloxycarbonyl-3-allyl-3-méthyl-2-oxétanone ; (3*R*,4*S*)-4-benzyloxycarbonyl-3-allyl-3-méthyl-2-oxétanone ; (3*S*,4*S*)-4-benzyloxycarbonyl-3-allyl-3-méthyl-2-oxétanone ; (3*S*,4*R*)-4-benzyloxycarbonyl-3-allyl-3-méthyl-2-oxétanone) sera synthétisée et caractérisée.

Afin de caractériser la stéréochimie du stéréopolymère, la synthèse de la lactone allylique achirale et de l'homopolymère amorphe correspondant, le poly([*R*,*S*]-3-allyl-3-méthylmalate de benzyle) (PAlMMLABz') est nécessaire (schéma III.1b). La synthèse et la caractérisation des deux lactones allyliques sont présentées aussi dans l'article 5 qui a mis en œuvre la confirmation de l'énantiopureté du monomère chiral.

I- Synthèse des deux homopolymères PAMMLABz et PAMMLABz'

Les deux homopolymères allyliques chiral et achiral ont été synthétisés pour la première fois dans ce travail. Leur polymérisation a été effectuée de la même manière et dans les mêmes conditions que le PDMMLABz chiral et le PDMMLABz' achiral, respectivement. Ces conditions sont présentées à la fois dans ce chapitre, dans l'article 6 et dans la 1ère partie du chapitre 2).

Tout d'abord, selon l'article 6, le PAlMMLABz chiral a été synthétisé par ROP de la lactone benzylique (*R*)-benzyloxycarbonyl-3-allyl-3-méthyl-2-oxetanone chirale en présence du benzoate de tétraéthylammonium (Et_4N^+ $PhCO_2^-$) comme amorceur (figure III.4a). La polymérisation a été suivie par IR par la disparition progressive de la bande lactone à 1845 cm^{-1}. La polymérisation a été stoppée par l'ajout d'une goutte d'acide acétique. Les polymères obtenus ont été purifié par précipitation dans l'éthanol puis caractérisée par différentes techniques. De même, selon la 1ère partie du chapitre 2, le PAlMMLABz achiral a été synthétisé par ROP de la lactone benzylique achirale (*R,S*)-benzyloxycarbonyl-3-allyl-3-méthyl-2-oxetanone en présence du Et_4N^+ $PhCO_2^-$ comme amorceur (figure III.4b).

II- Caractérisations chimique et physicochimique des PAlMMLAs

Les PAlMMAs ont été caractérisés par différentes techniques : IR, RMN ^1H et ^{13}C, SEC, DSC et TGA. De plus, la RMN ^{13}C est particulièrement utilisée pour l'étude de la tacticité des homopolymères synthétisés.

II-1- Caractérisation de la structure chimique par RMN 1H

La structure chimique des deux homopolymères a été confirmée par RMN ^1H. La figure III.5a et b présente les deux spectres RMN ^1H des PAlMMLABz et PAlMMLABz', respectivement.

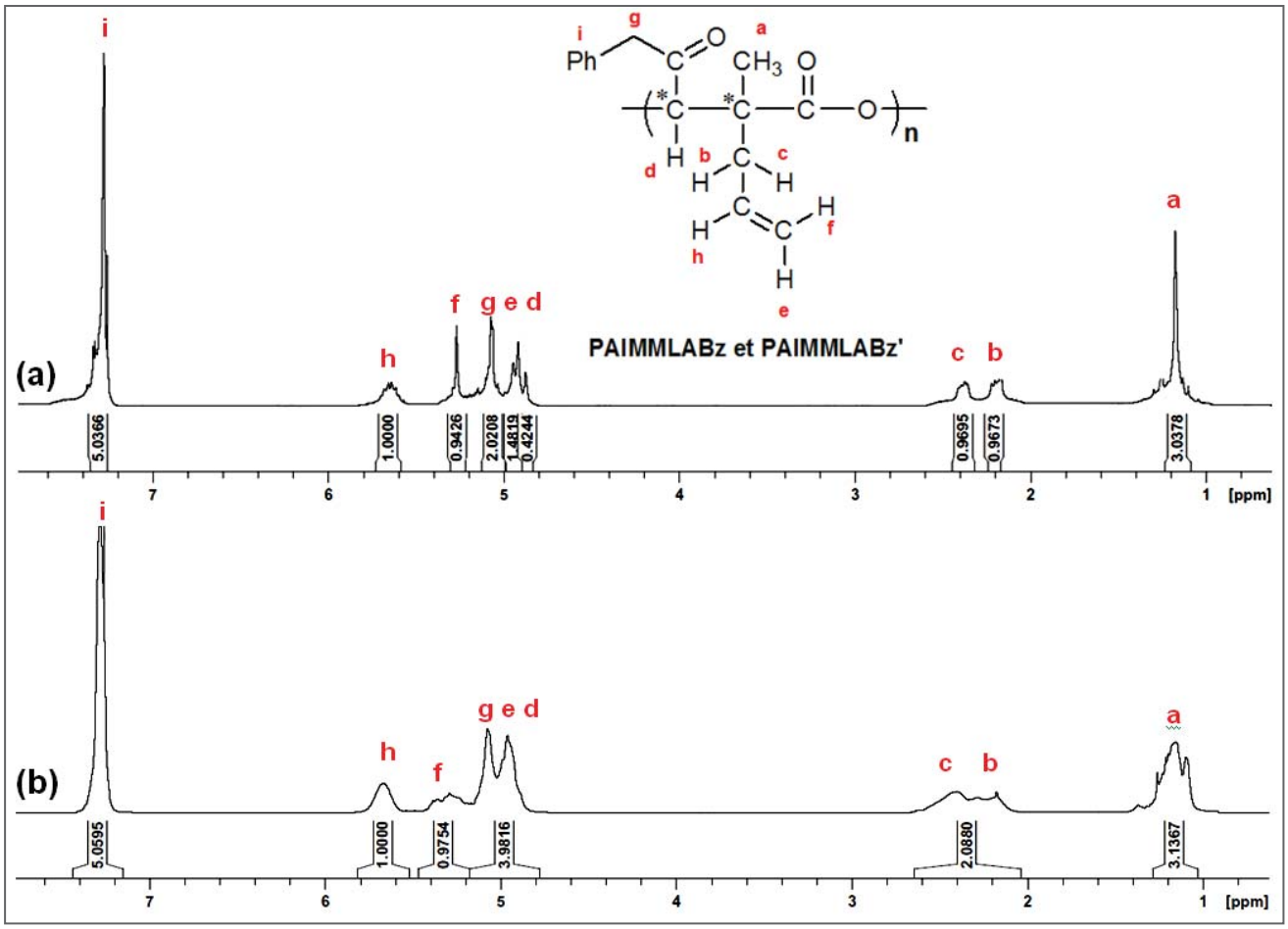


Figure III-5. Spectres RMN ^{1}H des (a) PAlMMLABz et (b) PAlMMLABz'.

En effet, la présence d'un pic à 5,27 et 7,32 ppm a confirmé la présence du groupement benzylique latéral. Ainsi, la présence du groupement allyle a été confirmée par les signaux caractéristiques aux protons allyliques à 2,19, 2,38, 4,92, 5,06 et 5,64 ppm.

II-2- Caractérisation de la stéréochimie par RMN ^{13}C

La figure III-6a et b représente les spectres RMN ^{13}C des deux homopolymères allyliques chiral et achiral, respectivement.

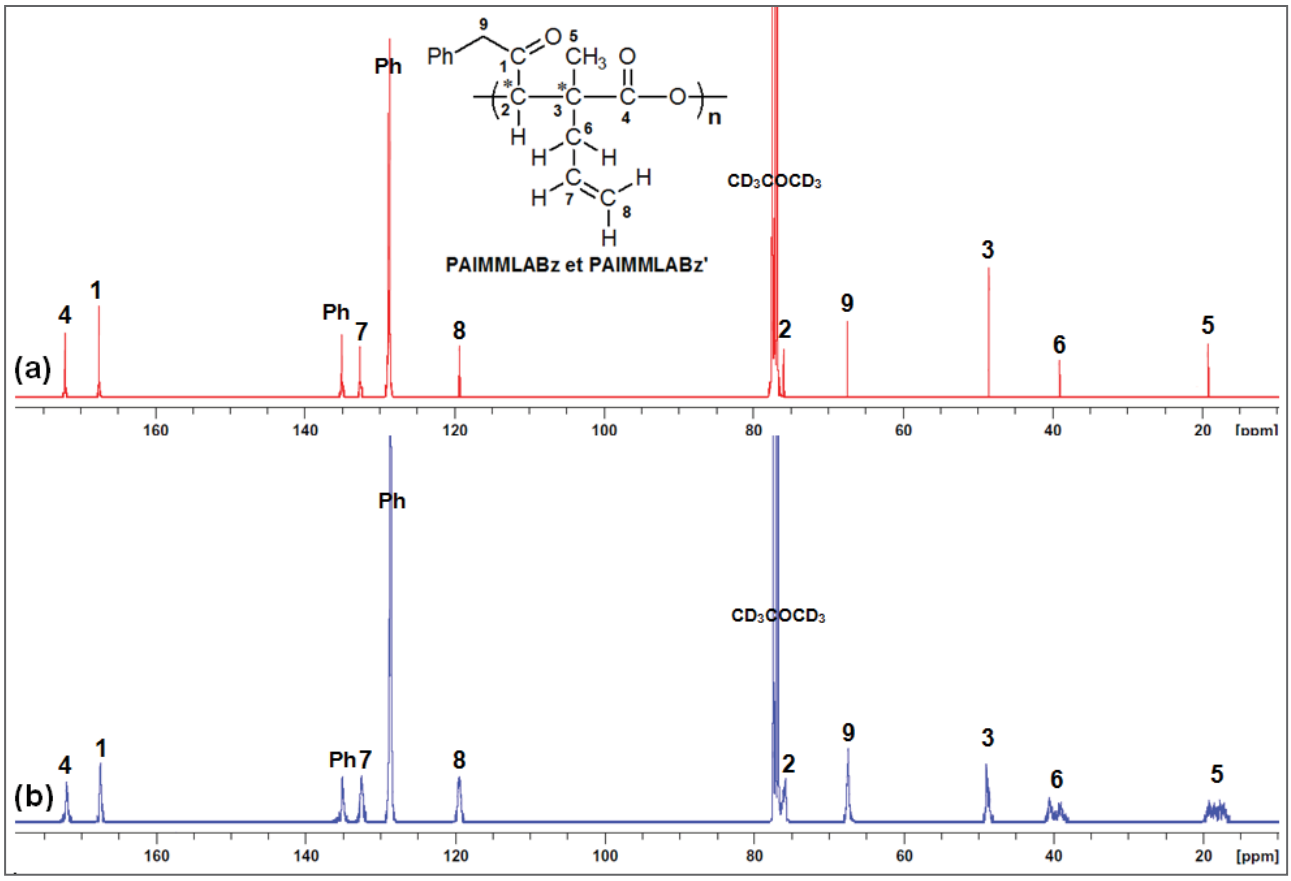


Figure III-6. Spectres RMN ^{13}C des (a) PAlMMLABz et (b) PAlMMLABz'.

La RMN ^{13}C a été largement utilisée dans la littérature pour caractériser la stéréochimie des polymères. Dans l'article 6 présenté dans ce chapitre, nous avons confirmé l'isotacticité des PDMMLAs chiraux en se basant sur les résultats obtenus par cette technique. En effet, la comparaison des déplacements chimiques correspondant aux C=O des groupements esters latéraux des PDMMLAs semi-cristallins et amorphes nous a permis d'attribuer trois triades (isotactique, syndiotactique et atactique). Cela a été observé sur tous les PDMMLAs chiraux possédant un seul centre de chiralité sur leur chaîne macromoléculaire et étudiés dans ce travail.

Comme décrit dans l'introduction de ce 3ème chapitre, les polymères comportant deux centres de chiralité peuvent avoir six différentes triades : érythrodiisotactique, thréodiisotactique, érythrodisyndiotactique, thréodisyndiotactique, érythrodiatactique et thréodiatactique. Par conséquent, l'attribution des différents pics du signal correspondant au C=O latéral de chaque homopolymère a été réalisée en se basant sur l'étude bibliographique présentée dans l'introduction de ce chapitre. La figure III-7 représente la superposition de ces

deux signaux. L'homopolymère chiral contient un pic majoritaire avec 81,2% et deux pics minoritaires avec le même pourcentage (9,4%) dont un est le plus déblindé et l'autre ~~est~~ le plus blindé.

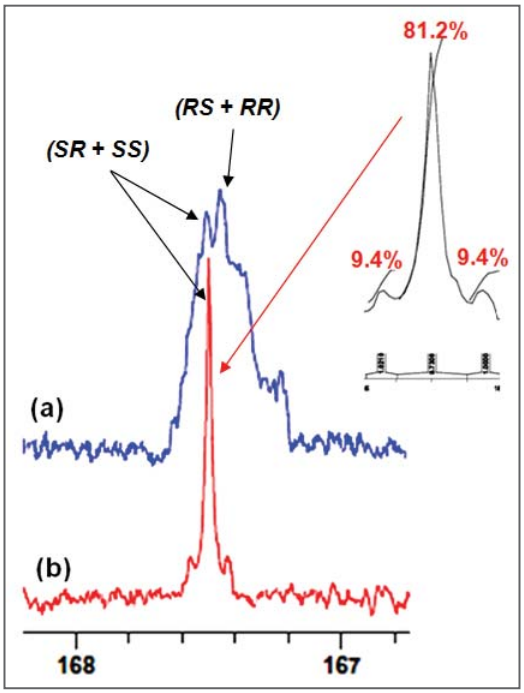


Figure III-7. RMN ^{13}C des signaux correspondant au C=O du groupement ester latéral de (a) PAlMMLABz' achiral et (b) PAlMMLABz chiral.

Ainsi, l'homopolymère achiral contient deux pics majoritaires et un mélange d'autres pics inséparables. Le pic majoritaire du PAlMMLABz chiral (*SR* + *SS*) est le plus déblindé. Ce résultat est en accord avec celui obtenu avec les lactones benzyliques chirale (*RR* + *RS*) et achirale ((*RS* + *RR*) et (*SR* + *SS*)) présenté dans ce chapitre dans l'article 5 (figure III-8). En effet, l'ouverture de cette lactone a été faite selon un mécanisme SN_2 avec une inversion de configuration (article 5) Le couple obtenu possédant deux unités de répétition est le plus déblindé (*SR* + *SS)*.

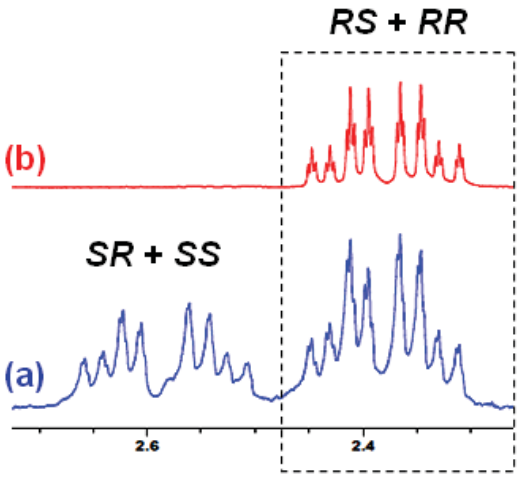


Figure III-8. RMN ^{1}H des protons allyliques (b et c « article 5 ») des lactones allyliques (a) chirale (*RS* + *RR*) et (b) achirale ((*RS* + *RR*) et (*SR* + *SS*)).

Le PAlMMLABz' achiral est synthétisé à partir de la lactone benzylique achirale contenant quatre stéréoisomères (*SS, SR, RR* et *RS*). Il est donc sous forme d'un mélange de quatre unités de répétition (*RS*, *RR, SR et SS*) et contient tous les types des triades susmentionnées (ditacticité).

En revanche, le PAlMMLABz chiral a été synthétisé à partir de la lactone benzylique chirale ne contenant que deux diastéréoisomères (*RR* et *RS)*. Dans ce cas, il ne comporte que deux unités de répétition (*SR* et *SS*). Donc, il ne contiendra pas toutes les triades susmentionnées.

Le tableau III-3 représente les différentes possibilités des triades que les deux homopolymères peuvent avoir. L'homopolymère PAlMMLABz' est un mélange de 11 types de triades (*mmmm, rrrr, mrmr, rmrm, mrmm, rmrr, mmrr, mmmr, rmmr, mrrr* et *mrrm*). En outre, l'homopolymère PAlMMLABz ne comporte que 3 types de triades (*mmmm, rrrr et mmrr*) qui correspondent, respectivement aux triades érythrodiisotactique, thréodiisotactique et le mélange des deux.

Tableau III-3. Les différentes triades possibles pour PAlMMLABz' et PAlMMLABz

Stéréopolymères possibles		ppm[j]	PAlMMLABz'	PAlMMLABz
Diisotactique	*RR- RR- RR* mmmm « érythro »	**1**	*Oui*	*Non*
	RS- RS- RS rrrr « thréo »	**7**	*Oui*	*Non*
	SS- SS- SS *mmmm* « érythro »	**1**	*Oui*	*Oui*
	SR- SR- SR *rrrr* « thréo »	**7**	*Oui*	*Oui*
Disyndiotactique	*RR- SS- RR* *mrmr* « érythro »	**-**	*Oui*	*Non*
	RS- SR- RS *rmrm* « thréo »	**6**	*Oui*	*Non*
Diatactique	*RR- SS- SS* *mrmm* « érythro »	**-**	*Oui*	*Non*
	RS- SR- SR *rmrr* « thréo »	**5**	*Oui*	*Non*
Mélange de triades	*RR- RS- RR* *mmrr*	**4**	*Oui*	*Non*
	RR- RS- RS *mmrr*	**4**	*Oui*	*Non*
	SS- SR- SS *mmrr*	**4**	*Oui*	*Oui*
	SS- SR- SR *mmrr*	**4**	*Oui*	*Oui*
	RR- RS- SS *mmrr*	**4**	*Oui*	*Non*
	RR- RS- SR *mmrm*	**5**	*Oui*	*Non*
	RR- RR- SS *mmmr*	**2**	*Oui*	*Non*
	RS- SS- RR *rmmr*	**3**	*Oui*	*Non*
	RR- SR- SR *mrrr*	**8**	*Oui*	*Non*
	RR- SR- RR *mrrm*	**9**	*Oui*	*Non*

[j] L'orde décroissant du déplacement chimique des différentes triades selon la litérature (introduction du chapitre 3). Le numéro (1) correspond au déplacement chimique de la triade la plus déblindée.

Nous pouvons donc attribuer les pics des signaux C=O présentés dans la figure III-7 aux triades correspondantes (figure III-9).

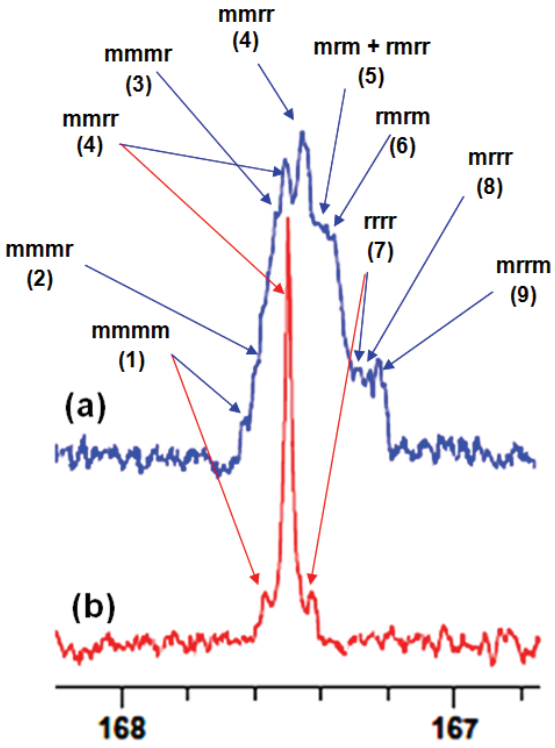


Figure III-9. Attribution des différentes triades correspondantes (a) PAlMMLABz' achiral et (b) PAlMMLABz chiral.

II-3- Caractérisation physicochimique par DSC et TGA

La figure suivante représente les courbes DSC enregistrées au 1er et 2ème chauffage pour les deux homopolymères. Le PAlMMLABz possède une T_g à 19,7°C inférieur à celle du PDMMLABz chiral en raison de la présence des groupements allyles. Ainsi, le PAlMMLABz' chiral possède une T_g de 19,5°C légèrement inférieure à celle du PAlMMALBz.

Contrairement à l'homopolymère achiral, l'homopolymère chiral possède une T_m de 92,5°C ce qui confirme sa semi-cristallinité (figure III-10).

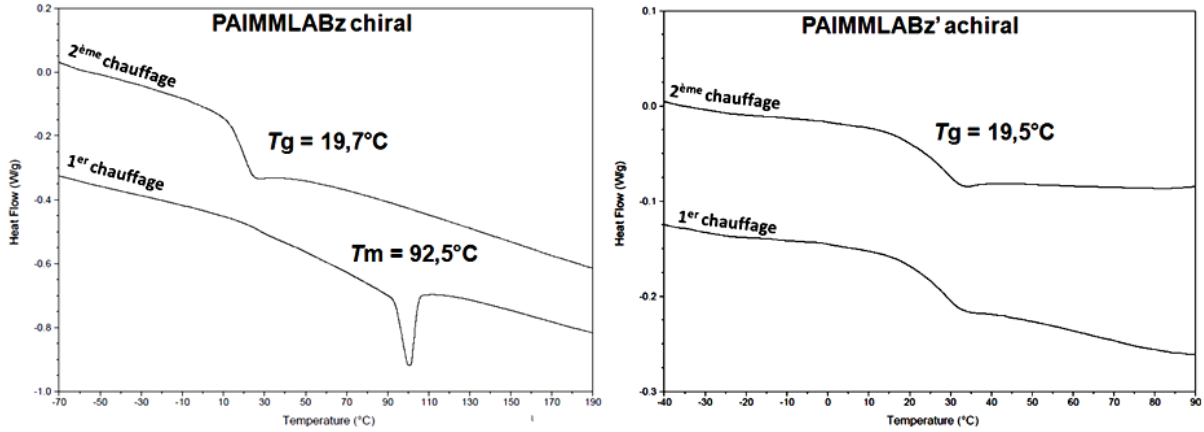


Figure III-10. Courbes DSC des deux homopolymères PAlMMLABz chiral et PAlMMLABz' achiral.

De plus, la stabilité thermique de ces deux polymères a été étudiée par TGA. Cette technique consiste à déterminer la décomposition thermique des matériaux. Elle a été réalisée dans les mêmes conditions que les PDMMLAs chiraux (article 5). Les deux courbes TGA ont été présentées dans la figure III-11. En effet, les deux polymères possèdent une courbe de dégradation homogène. Les T_d du PAlMMLABz à une perte de masse de 5, 50 et 100% sont, respectivement, 247, 342 et 628°C et celles du PAlMMLABz' sont, respectivement, 278, 323 et 535°C. L'homopolymère chiral possède une T_d supérieure à celle de l'homopolymère amorphe en raison de la stéréorégularité des chaînes polymères du PAlMMLABz.

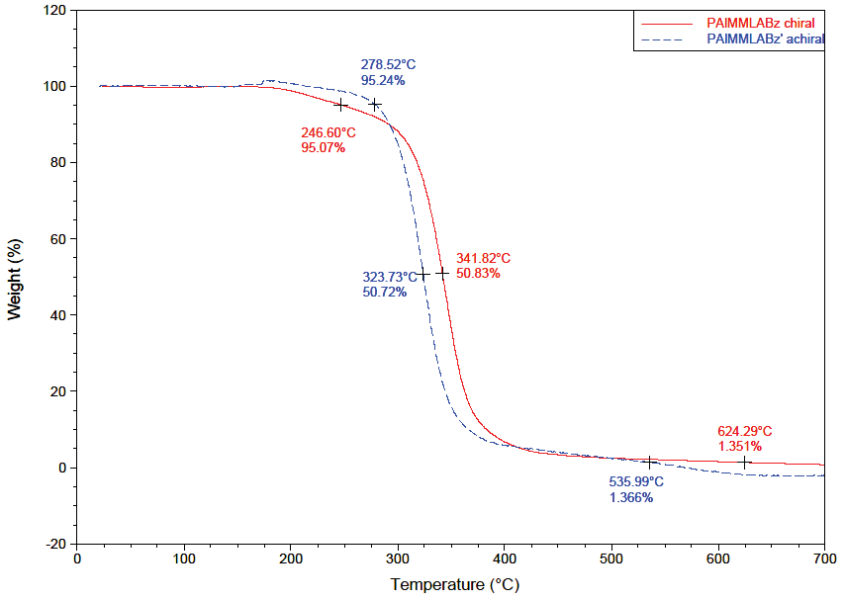


Figure III-11. Courbes TGA des deux homopolymères PAlMMLABz chiral et PAlMMLABz' achiral.

III- Partie expérimentale

Poly(acide [S]-3-allyl-3-méthylmalique) (PAlMMLABz chiral)

Selon le protocole de synthèse présenté dans l'article 6, le PAlMMLABz chiral a été synthétisé par ROP de type anionique de la lactone benzylique chirale (114 mg, 437 µmol) en présence du benzoate de tétraéthylammonium (Et_4N^+ $PhCO_2^-$) comme amorceur (10^{-2} équiv, 4,37 µmol). Après purification de la lactone sur colonne chromatographique, 107 mg de l'homopolymère ont été obtenus sous forme d'un liquide transparent. T_g = +19,7°C et T_m = 92,5°C. SEC (HPSEC-MALLS-dRI, THF) : M_n = 111 400 g/mol. M_w = 114 700 g/mol. D = 1,029. FTIR (cm^{-1}) 1746. ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 1,17 (s, 3H, CH_3), 2,20 (m, 1H, C<u>H</u>$_2$-CH), 2,38 (m, 1H, C<u>H</u>$_2$-CH), 4,87 (m, 1H, C<u>H</u>-OH), 4,93 (m, 1H, C<u>H</u>$_2$=CH), 5,06 (m, 2H, , C<u>H</u>$_2$-Ph), 5,27(m, 1H, C<u>H</u>$_2$=CH), 5,64 (m, 1H, C<u>H</u>=CH$_2$), 7,32 (m, 5H, Ph).^{3}C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 19,18 (CH_3), 39,05 (<u>C</u>H$_2$-CH), 48,50 (<u>C</u>-CH$_3$), 67,46 (<u>C</u>H$_2$-Ph), 75,94 (<u>C</u>H-OH), 119,30 (<u>C</u>H$_2$=CH), 128,64, 128,86, 128,77, 128,86, 135,07 (Ph), 132,62 (<u>C</u>H=CH$_2$), 167,427, 167,50, 167,56 (C=O), 172,00, 172,07, 172,13 (C=O).

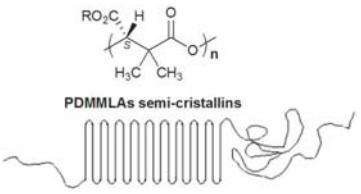
Poly(acide [R,S]-3-allyl-3-méthylmalique) (PAlMMLABz' achiral) :

Selon le protocole de synthèse présenté dans la 1ère partie du chapitre 2, le PAlMMLABz' achiral a été synthétisé par ROP de type anionique de la lactone benzylique achirale (313 mg, 1,20 mmol) en présence du benzoate de tétraéthylammonium (Et_4N^+ $PhCO_2^-$) comme amorceur (10^{-2} équiv, 12 µmol). (m = 305 mg). *T*g = +19,5°C. SEC (HPSEC-MALLS-dRI, THF): M_n = 111 400 g/mol. M_w = 114 700 g/mol. D = 1.029. FTIR (neat, cm^{-1}) 1746. ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 1,09 (s, 3H, CH_3), 2,17 (m, 1H, C<u>H</u>$_2$-CH), 2,32 (m, 1H, C<u>H</u>$_2$-CH), 4,96 (m, 1H, C<u>H</u>-OH), 5,07 (m, 1H, C<u>H</u>$_2$=CH), 5,18 (m, 2H, , C<u>H</u>$_2$-Ph), 5,34(m, 1H, C<u>H</u>$_2$=CH), 5,66 (m, 1H, C<u>H</u>=CH$_2$), 7,28 (m, 5H, Ph). ^{3}C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 18,12 (CH_3), 39,76 (<u>C</u>H$_2$-CH), 48,78 (<u>C</u>-CH$_3$), 67,44 (<u>C</u>H$_2$-Ph), 75,79 (<u>C</u>H-OH), 119,47 (<u>C</u>H$_2$=CH), 128,64, 128,78, 128,85, 135,06 (Ph), 132,81 (<u>C</u>H=CH$_2$), 167,22-167,58 (C=O), 172,00 (C=O).

En conclusion,

dans le but d'élargir le domaine de la stéréochimie des polymères, la synthèse et la caractérisation de nouveaux polyesters biodégradables et bioassimilables de stéréochimie contrôlée ont été mises en évidence dans ce 3ème chapitre. L'étude de leur stéréochimie, la confirmation de leur isotacticité et leur semi-cristallinité ainsi que l'étude de leurs propriétés thermomécaniques ont été effectuées.

Objectif 2



CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Conclusion générale et perspectives

Puisque les stents actifs à élution médicamenteuse (SEMs) qui existent aujourd'hui n'ont pas fait leurs preuves, la recherche d'un nouveau système est l'objectif de plusieurs comités de recherche ces dernières années. La plupart des SEMs disponibles actuellement utilisent une matrice polymère pour, à la fois, le revêtement du métal et la libération des médicaments. Bien que ces polymères aient apporté des avantages, certains effets indésirables ont eu lieu. Par conséquent, un nombre croissant d'études dans le domaine des biomatériaux s'est focalisé sur l'élaboration d'un nouveau polymère biodégradable, biocompatible et bioassimilable. Ce sont les propriétés intrinsèques des polyesters aliphatiques biodégradables qui sont largement utilisés comme systèmes de libération contrôlée de principes actifs. En outre, un polyester qui a, en plus de ces propriétés, la capacité d'être chimiquement modifiable et fonctionnalisable est un défi à réaliser. Cela a représenté le principal objectif de ce travail de thèse.

Le polyester qui a été choisi pour cette étude présente la particularité d'être modulable, c'est le poly(acide 3,3-diméthylmalique) (PDMMLA). Afin d'évaluer le potentiel de ce polymère, l'étude a été portée sur la conception d'une série d'homopolymères et de copolymères. Les films de ces derniers ont permis de générer respectivement des surfaces lisses homogènes chimiquement ou d'une hétérogénéité contrôlée et bien définie. La nature et les caractéristiques de la surface du biomatériau peuvent être ajustées en choisissant des groupements de caractères différents. Pour ce fait, le groupement acide carboxylique a été choisi pour son caractère hydrophile et le groupement hexyle pour son caractère hydrophobe.

Après l'élaboration des polymères et la caractérisation de leur composition chimique, nous avons étudié les propriétés physicochimiques de leur surface notamment la mouillabilité, la topographie et la rugosité de la surface, l'énergie de surface et ses composantes. L'étude réalisée a établi dans quelle mesure ces propriétés de surface et la réponse biologique vis-à-vis des cellules endothéliales humaines (HUVECs) sont favorisées en fonction de la proportion des groupements hydrophiles portés sur la surface des copolymères. Trois homopolymères (surfaces homogènes) et trois copolymères amphiphiles (surfaces hétérogènes) ont été envisagés. Les homopolymères représentent les deux extrêmes de la propriété hydrophile/hydrophobe : une surface qui ne porte que des groupements hexyles hydrophobes (0/100) et deux surfaces 100% hydrophiles de caractère neutre (HP-OH) et chargé (100/0).

Les copolymères ont la même composition chimique mais des pourcentages hydrophile/hydrophobe différents : les trois surfaces contiennent 10, 20 et 30% de groupements acides (10/90, 20/80 et 30/70, respectivement). Le PLA a été choisi comme surface de référence car il représente le matériau d'actualité le plus utilisé comme revêtement de stent. Pour avoir un point de comparaison, le tableau suivant résume les forces (+) et les faiblesses (-) des PDMMLAs et du PLA du point de vue de l'analyse des différentes démarches effectuées dans ce travail :

Tableau 1. Etude comparative des propriétés chimiques, physicochimiques et biologiques des PDMMLAs et du PLA étudiés dans ce travail. *Points forts (+) et points faibles (-).*

		PDMMLAs			**PLA**
		10/90	**20/80**	**30/70**	
Fonctionnalisation de la surface		+			-
Mouillabilité		-	+	++	-
Energie de surface		+	+	+	+
Topographie et rugosité		+++	++	+	-
Propriétés thermomécaniques		+	+	+	-
Rhéologie		-	+	+	-
Réponse biologique	Attachement	+++	++	+	-
	Adhérence	-	+	++	-
	Adhésion des HUVECs	+++	++	+	-
	Adhésion des monocytes	-	+	++	-
Etude de dégradation	Temps de dégradation	-	+	++	-
	Cytotoxicité des produits de dégradation	+	+	+	+

La 1ère démarche a permis d'établir l'étude de la rugosité et de la morphologie de la surface des PDMMLAs. Les interactions implant – milieu biologique sont fortement influencées par la rugosité et la topographie de la surface d'implant. Une surface asymétrique non homogène de rugosité importante peut orienter l'étalement et la migration cellulaires comme elle peut induire la corrosion de la surface du biomatériau. Nous avons démontré dans notre travail que les PDMMLAs présentent une surface lisse et plane avec une rugosité négligeable. Cela peut améliorer ainsi les propriétés topographiques de la surface du stent métallique qui a généralement une forte rugosité. Par conséquent, ce résultat est très

encourageant pour la suite du projet car le seul paramètre qui influencerait les propriétés de surface des PDMMLAs est donc l'hétérogénéité et la composition chimiques. La surface du PLA qui a été préparée de la même manière est plus rugueuse.

La 2ème démarche a reposé sur la caractérisation de la mouillabilité de la surface des différents polymères. Puisque l'hétérogénéité de la surface d'un biomatériau entraine une modification de ses propriétés de mouillage, l'étude de la mouillabilité des PDMMLAs a pris une part importante dans ce travail. Elle a été adoptée par deux méthodes différentes, la détermination de l'angle de contact en statique par la goutte posée et en dynamique par la tensiométrie. La goutte d'eau qui identifie l'inhomogénéité de la surface à l'équilibre avec une résolution spatiale, nous a permis de corréler les valeurs des angles de contact des différents matériaux étudiés avec le pourcentage des groupements acides (%A) de la chaîne polymère. Il a été démontré que la valeur des angles de contact diminuait avec l'augmentation du %A des PDMMLAs.

Ainsi, la tensiométrie, qui est une technique sensible et automatisée, est complémentaire à la goutte posée. Elle nous a apporté, par les mesures des angles de contact à l'avancée/retrait et l'hystérèse, des informations sur la mobilité des chaînes polymères et leurs groupements fonctionnels. Par conséquent, une corrélation linéaire de la quantité des groupements acides et des différents paramètres de mouillage a été obtenue. Ces phénomènes de la mobilité moléculaire des chaînes polymères est un paramètre très important pour comprendre les phénomènes de l'adsorption des protéines et de l'adhésion cellulaire.

Donc, les PDMMLAs possèdent de bonnes propriétés de mouillage qui peuvent être ajustées par une simple fonctionnalisation des groupements acide ou alcool latéraux. C'est un autre point encourageant pour contourner l'hydrophobie du PLA qui nécessite sa copolymérisation avec d'autres polymères afin de pouvoir le modifier chimiquement et/ou moduler ses propriétés de mouillage.

La 3ème démarche est basée sur l'étude de l'énergie de surface et de ses composantes. L'énergie de surface est le facteur le plus important dans l'attachement et l'étalement cellulaires. Il a été démontré dans la littérature que les CEs possèdent une meilleure adhérence sur des surfaces de faibles énergies de surface. Dans notre étude, les copolymères PDMMLAs possèdent des énergies de surface faibles. De plus, nous avons démontré que les groupements fonctionnels alcool et chargé qui ont, respectivement, un caractère hydrophile neutre et acide possèdent différentes valeurs d'angles de contact.

Ce résultat est très encourageant pour la poursuite de l'étude et la caractérisation des PDMMLs comme biomatériaux.

La 4ème démarche a étudié les propriétés thermomécaniques des polymères. Comme décrit dans le premier chapitre, un polymère utilisé pour revêtir le stent métallique doit posséder, en plus de ses bonnes propriétés de surface, de bonnes propriétés thermomécaniques. La T_g, la TGA et la rhéologie sont les trois paramètres étudiés dans notre travail.

Puisque la T_g affecte la mobilité/rigidité de la chaîne polymère, le comportement mécanique (viscoélastique) des polymères est fortement dépendant de la valeur de la T_g. La manière dont le revêtement se comporte à la température ambiante atmosphérique peut varier sensiblement de sa performance *in vivo*, ou il doit résister à un environnement salin et corrosif à 37°C. Il sera ainsi en interactions directes avec le fluide corporel, les tissus, les biomolécules et les cellules. A cette température, les polymères ayant une T_g supérieure sont dans leur état vitreux et ceux avec une T_g inférieure seront dans un état caoutchouteux. Il est donc recommandé d'utiliser un revêtement polymère possédant une T_g inférieure à la température du corps et donc une bonne flexibilité des chaînes polymères qui peuvent suivre le déploiement du stent sans provoquer sa défaillance.

Dans notre étude, nous avons démontré que les PDMMLAs possèdent une T_g inferieure à la température corporelle contrairement au PLA qui a une T_g supérieure avec une ductilité et une souplesse faibles. Par ailleurs, les premiers résultats obtenus sur l'étude des propriétés rhéologiques des PDMMLAs amorphes ont démontré le caractère viscoélastique des PDMMLAs. Ce caractère est influencé par la composition chimique des polymères. En effet, il est majoritairement plus visqueux qu'élastique. Ainsi, le caractère visqueux a diminué avec l'augmentation du %A dans les chaînes polymères. En revanche, le PLA qui possède une rigidité élevée de ses chaînes est majoritairement plus élastique que visqueux. Il a donc des propriétés thermomécaniques et rhéologiques moins favorables. Ces résultats sont particulièrement importants pour notre étude. Ils favorisent ainsi l'étude des PDMMLAs en tant que revêtement de stents cardiovasculaires. De plus, la TGA a démontré que les PDMMLAs possédaient un bonne stabilité thermique, ce qui élargit son domaine d'utilisation.

La 5ème démarche a reposé sur l'étude de la réponse biologique des PDMMLAs *in vitro*. Après la validation des propriétés physicochimiques de ces polymères, l'adhésion, l'étalement, l'attachement, le comportement et la prolifération cellulaires ont été étudiés vis-à-vis des CEs humaines (HUVECs). L'adhésion des monocytes a également été effectuée. Il a été démontré que la réponse biologique est, comme la physicochimie de la surface, influencée par la composition chimique de la surface des polymères. La présence d'une différence de seulement 10% du %A a permis d'induire une réponse biologique significative. En premier lieu, l'intérêt s'est porté sur la qualité d'adhésion des HUVECs. Rien qu'on observant leur comportement, nous avons pu distinguer les différents phénomènes des surfaces des polymères vis-à-vis de ces cellules. Le premier contact des cellules / polymère a démontré qu'elles s'adhéraient fortement à la surface la plus hydrophobe. Pour le comportement des cellules au fil du temps, nous avons pu constater que les cellules fortement attachées à la surface ont du mal à se détacher afin de poursuivre leur processus de migration et de prolifération. Le résultat est le déchirement du film par le cytosquelette qui est très riche. Cette hypothèse est en accord avec les définitions rapportées dans le paragraphe II-4 de la 3ème partie du chapitre 1. L'augmentation du %A favorise plus l'adhérence des cellules au fil du temps.

L'étude de prolifération cellulaire sur les films polymères a été effectuée sur une période d'une semaine. L'analyse des résultats obtenus est en cours. Dans l'attente de ces résultats, le choix final du matériau approprié pour l'application visée sera effectué.

Cette étude a démontré que les films PDMMLA sont hémocompatibles et non cytotoxiques. Ils présentent une force d'adhésion vis-à-vis des HUVECs et des monocytes qui proportionnelle au %A des polymères. Il faudrait donc ajuster la balance hydrophile / hydrophobe de ces matériaux pour moduler leurs propriétés biologiques. Les cellules sont faiblement adhérentes sur la surface du PLA qui favorise d'une façon significative l'adhésion des monocytes. Ces premiers résultats sur l'étude de la biocompatibilité des PDMMLAs sont très encourageants pour suggérer de poursuivre les démarches d'évaluation de ces matériaux pour une éventuelle application comme SEM.

La 6ème démarche est l'étude de la dégradation *in vitro* des PDMMLAs dans le but de choisir le polymère approprié pour le revêtement de stent. Nous avons cherché à évaluer la dégradation des différents PDMMLAs *in vitro* dans les conditions physiologiques. En outre, nous avons fait varier les conditions d'hydrolyse de ces matériaux notamment la température,

le pH et la présence d'enzymes spécifiques ou non pour mieux comprendre le comportement d'hydrolyse, interpréter les résultats obtenus et mieux se rapprocher des conditions de dégradation *in vivo* (enzymes).

En se basant sur la définition des phénomènes d'hydrolyse présentée dans le paragraphe-II-2-3 de la 3ème partie du chapitre 1, nous avons confirmé que les PDMMLAs se dégradaient dans les conditions physiologiques (pH 7.4, 37°C) selon un mécanisme d'hydrolyse en masse accopagnée d'une érosion de la surface. Le phénomène de dégradation des PDMMLAs à masse molaire élevée diffère de celui des PDMMLAs possédant une masse molaire 10 fois moins élevée. Ainsi, nous avons aussi démontré que les groupements fonctionnels acides carboxyliques des chaînes polymères jouent un rôle important dans la détermination de leurs taux de dégradation. Par conséquent, la vitesse de dégradation des PDMMLAs varie linéairement avec le %A. Le 30/70 est le copolymère qui possède le temps de dégradation le plus rapide en comparant aux 20/80 et 10/90. Il se décompose en petites masses molaires avec un pourcentage de 85% au bout de 6 mois. Ces résultats permettront de choisir le meilleur matériau pour un éventuel greffage d'un principe actif. La technique et les paramètres de dégradation mis en place dans ce travail sont une première approche pour envisager la libération contrôlée de ce principe actif dans de bonnes conditions.

Puisque les produits de dégradation de ces polymères ne doivent pas être cytotoxiques. Une étude de cytotoxicité des produits de dégradation a été réalisée selon deux techniques différentes (MTT et Live and Dead) vis-à-vis des HUVECs. Les deux techniques ont démontré que tous les polymères ne présentent aucune cytotoxicité.

Là aussi, les propriétés d'hydrolyse des PDMMLAs leur confèrent une qualité particulière par rapport aux autres polyesters décrits dans la littérature et utilisés comme revêtement de stent, notamment le PLA. L'intérêt accordé au PDMMLA comme revêtement prometteur de stents est d'autant plus important que le PLA possèdant un caractère hydrophobe et une vitesse de dégradation lente qui peut atteindre 2 ans.

En conclusion, ce travail de thèse m'a permis d'effectuer une recherche pluridisciplinaire et d'ouvrir un nouvel axe dans le domaine cardiovasculaire. L'étude bibliographique réalisée m'a permis d'élargir mes connaissances dans le domaine des biomatériaux, de m'inspirer des études effectuées dans la même thématique de recherche pour définir les points d'intérêt pour la caractérisation et l'évaluation des PDMMLAs amorphes en tant que revêtement de stents pour le traitement de la resténose.

L'ensemble des démarches effectuées dans ce travail m'a permis de choisir deux polymères PDMMLA : le 30/70 et le 20/80 comme meilleures surfaces permettant surtout une meilleure adhésion et prolifération des HUVECs en plus des autres propriétés de surface favorable. Ce choix reste général pour une première approche.

Par ailleurs, il sera utile de compléter toutes ces démarches par des études supplémentaires qui doivent être effectuées afin de valider les PDMMLAs comme futur revêtement de stents. Ces études seront consacrées à :

- l'élaboration des PDMMLAs selectionnés (20/80 et 30/70) avec des masses molaires moins élevées que ceux étudiés dans ce travail (inférieur à 20 000 g/mol) afin d'accélérer la vitesse de dégradation de ces derniers tout en conservant leurs propriétés de surface ainsi que leur réponse biologique. La synthèse d'un terpolymère avec les fonctions latérales à la fois hydrophobes et hydrophiles chargés et neutres est envisageable.

- l'étude de l'adsorption/désorption de l'eau à la surface des polymères afin de compléter les études de tensiométrie effectuée dans l'eau.

- l'étude de l'adhésion des protéines (fibronectine, albumine, …) grâce à la tensiométrie qui peut détecter le comportement particulier des différentes protéines en fonction de la chimie de surface des biomatériaux. Les protéines d'adhésion possèdent différentes charges et donc différentes interactions avec le milieu aqueux ce qui permettra de définir une meilleure interaction cellulaire.

- l'étude de la réponse biologique des PDMMLAs vis-à-vis des cellules musculaires lissent (CMLs) qui sont impliquées d'une manière directe dans le processus de resténose et l'étude plus approfondie de l'adhésion des plaquettes et des monocytes sur ces polymères.

- l'évaluation de l'adhérence des films polymères à la surface métallique du stent ainsi que l'étude des propriétés de surface et de l'adhésion cellulaire sur le stent recouvert *in vitro*.

- la mise au point de la synthèse et de la caractérisation du greffage d'un principe actif antiprolifératif sur la chaîne macromoléculaire des PDMMLAs.

- l'évaluation des propriétés structurales, physicochimiques et biologiques des polymères comportant la molécule bioactive ainsi que l'étude de sa libération contrôlée *in vitro*.

Après examen des résultats de ces études *in vitro*, le choix du meilleur matériau sera fait en vue de ses propriétés physicochimiques et biologiques. L'étude de sa réponse biologique et de son comportement de dégradation *in vivo* devra être réalisée.

Au final, toutes ces études devraient permettre d'obtenir le revêtement de stents coronaires recherché depuis longtemps et qui détrônera, par ses propriétés, les matériaux d'actualité qui ont été adopté depuis plusieurs décennies.

Parallèlement à ces approches, comme évoquée dans l'introduction générale, une partie de ce travail a été consacré à la synthèse et la stéréochimie des polymères. L'élaboration de nouveaux stéréopolymères dérivés du poly(acide (*S*)-3,3-diméthylmalique) a été réalisée avec succès. Leur préparation a nécessité, dans un premier temps, la synthèse et la caractérisation chimiques de monomères chiraux. Ces monomères sont des β-lactones-α,α',β-trisubstituées obtenues après six étapes de synthèse. La synthèse établie nous a permis de préparer une série de β-lactones différentes et obtenues avec des rendements globaux compris entre 21 et 30%. Leur caractérisation par RMN a confirmé l'énantiopureté de 100% de ces monomères.

Dans un second temps, la polymérisation par ouverture de cycle de ces β-lactones a été effectuée en utilisant le benzoate de tétraéthylammonium comme amorceur. Les polymères correspondants (PDMMLAs semi-cristallins) ont été caractérisés par différentes techniques (FTIR, RMN ^{1}H et ^{13}C, $[\alpha]_D$, SEC, DSC et TGA). La RMN ^{13}C a confirmé l'isotacticité des PDMMLAs chiraux portant un seul centre stéréogène dans leur unité de répétition et a caractérisé la stéréorégularité des PDMMLAs chiraux portant deux centres stéréogènes. Ceci a été réalisé par la comparaison des résultats obtenus avec ceux des PDMMLAs amorphes. Par ailleurs, la DSC a été utilisée, d'une part, pour confirmer la semi-cristallinité des PDMMLAs chiraux (température de fusion (T_m)) et, d'autre part, pour la détermination de leurs propriétés thermiques (températures de transition vitreuse (T_g)). Il a été conclu que les PDMMLAs semi-cristallins sont plus rigides que les PDMMLAs amorphes (T_g supérieure).

La température de la décomposition thermique (T_d) a aussi confirmé la stabilité de ces polymères. Ils peuvent donc être utilisés dans des champs de températures importants.

En perspectives, les PDMMLAs semi-cristallins représentent un enjeu important d'un point de vue de leur stéréochimie. L'étude de leurs propriétés physicochimiques et biologiques sera nécessaire pour envisager leur utilisation dans le domaine biomédical.

ANNEXES

Annexe A

Le tableau suivant résume l'évaluation des stents actifs cités dans la deuxième partie du chapitre I.[k]

[k] Huang, Y., et al., *Drug-eluting biostable and erodible stents.* Journal of Controlled Release, 2014. **193**: p. 188-201.

Tableau 1. Evaluation des stents actifs.[k]

Médicament (s)	Nom du stent (fabricant)	Polymère (s)	Plate-forme	Descriptions	Statu [référence]
Elution de type limus à partir des revêtements bio-stables					
Sirolimus (140 µg/cm^2)	Cypher™ (Cordis)	PE-VA et PBMA	SS	80% de sirolimus libéré dans 30 jours, libération complète dans 90 jours	Approuvé par FDA
Zotarolimus (10 µg/mm)	Endeavor (Medtronic)	PC	Co–Cr	Presque 95% de zotarolimus libéré dans 15 jours	Approuvé par CE
Zotarolimus (10 µg/mm)	ZoMaxx ZES (Abbott Vascular)	PC-médicament et PC-couche finale	SS–tantalum	Environ 90% de zotarolimus libéré dans 30 jours	Abbott drops ZoMaxx
Zotarolimus (10 µg/mm)	Resolute (Medtronic)	BioLinx (C10 hydrophobe, C19 hydrophile et PVP)	Co–Cr	Environ 85% de médicament élué dans 60 jours et continue à éluer jusqu'à 180 jours	Approuvé par FDA (patients diabétiques) et CE
Everolimus (100 µg/cm^2)	XIENCE V (Boston Scientific)	PVDF-HFP et PBMA	Co–Cr	71% de l'évérolimus libéré à 28 jours et la libération complète au bout de 120 jours	Approuvé par FDA
Everolimus (100 µg/cm^2)	PROMUS PREMIER (Boston Scientific)	PVDF-HFP et PBMA	Pt-Cr	71% de l'évérolimus libéré à 28 jours et la libération complète au bout de 120 jours	Approuvé par FDA
Elution du médicament de type non-limus à partir des revêtements bio-stables					
Paclitaxel (15µg)	Taxus (Boston Scientific)	SBIS	SS	100% de paclitaxel libéré dans 30 jours	Approuvé par FDA
Elution de type limus à partir des revêtements biodégradables					
Sirolimus (6,6 µg/mm)	Supralimus (Sahajan and Medical)	**PLLA**-**PLGA**-**PCL**-PVP	SS	Presque 100% de sirolimus libéré dans 48 jours	Approuvé par CE
Sirolimus (125 µg/cm^2)	BioMime (Meril Life Science)	**PLLA** + **PLGA**	Co–Cr	Presque 100% de sirolimus libéré dans 30 jours	Approuvé par CE
Sirolimus (140 µg/cm^2)	Orsiro (Biotronik)	**PLLA** + couche du carbure de silicium	Co–Cr	Environ 50% de sirolimus libéré dans 30 jours	Approuvé par CE
Novolimus (4,6 µg/mm)	DESyne BD (Elixir Medical)	**PLA**	Co–Cr	Environ 90% de Novolimus libéré dans 90 jours	Approuvé par CE
Everolimus (5,6 µg/mm, 2.8 µg/mm)	SYNERGY (Boston Scientific)	**PLGA**	Pt–Cr	50% dans 60 jours	Approuvé par CE
Biolimus A9 (15.6 µg/mm)	BioMatrix Flex (Biosensors)	**PLA**	SS	45% dans 30 jours	Approuvé par CE
Biolimus A9 (15.6µg/mm)	Nobori (Terumo)	**PLA**	SS	45% dans 30 jours	Approuvé par CE

Biolimus A9 (15.6µg/mm)	Axxess (Biosensors)	**PLA**	Nitinol	45% dans 30 jours	Approuvé par CE
Antiproliferatif en combinaison avec un autre médicament (Stent à élution de deux médicaments)					
r-PEG-hirudine, iloprost	N.A.	**PLA**	SS	60% de r-PEG-hirudine élué dans les 1ères 24 h, mais l'iloprost avec un profil d'action prolongée	Préclinique
Sirolimus (7.7 µg/mm), triflusal (3.2 µg/mm)	N.A.	**PLGA**	Co–Cr	Environ 70% de sirolimus libéré dans 30 jours et presque100% de triflusal libéré dans 5 jours	Préclinique
Paclitaxel (1 µg/mm^2), cilostazol (6 µg/mm^2)	Cilotax stent	CAB hydrophile, biocompatible et bio-absorbable RESOMER	Co–Cr	Presque 100% de paclitaxel libéré dans 1 mois et la majorité de cilostazol dans 3 mois	Essai clinique
Rapamycin, estradiol	N.A.	Polymère libre	SS	60% de rapamycine libéré en 1 mois	Essai clinique
Sirolimus, anti CD-34 aticorps	Combo stent	Matrice biodégradable	SS	Total libéré dans 30 jours	Essai clinique
Paclitaxel (15 µg), pimecrolimus (162 µg)	N.A.	**PLGA**	Co–Cr	Presque 50% de pimecrolimus libéré dans les 1ères 48 h, libération complète dans 10 semaines et 100% de paclitaxel libéré dans 30 jours	Préclinique
Sirolimus, paclitaxel (90µg)	N.A.	**PLGA** et nanoparticules ACP (<150 nm)	SS	Presque 60% de paclitaxel et 50% de sirolimus libéré la 1ère semaine, environ 80% de paclitaxel et 70% de sirolimus libéré dans 21 jours.	Stade de recherche
Stents biodégradables avec revêtement biodégradable					
Paclitaxel (70 µg/cm^2)	DREAMS I (Biotronik)	**PLGA**	Mg	Libération contrôlée en 3 mois. A la fin, libération de paclitaxel et dégradation complète du Mg en 6 mois.	Essai clinique
Sirolimus	DREAMS II (Biotronik)	**PLLA**	Mg	Aucune information mise à jour	Essai clinique
Everolimus (100 µg/cm^2)	BVS 1.0 (Abbott Vascular)	**PDLLA**	PLLA	75% de l'évérolimus chargé dans 30 jours	Essai clinique
Sirolimus	ReZolve2 (REVA Medical)	N.A.	Dérivé de PTyr et PC	Majorité de sirolimus chargé libéré dans 90 jours	Essai clinique
Novolimus (5 mg/mm)	DESolve (Elixir Medical)	**PLLA**	PLLA	100% de novolimus chargé libéré entre 6 et 9 mois	Essai clinique
Mitomycin C (100 µg/stent)	N.A.	N.A.	PLLA/ PCL	33% de MMC chargé libéré pendant 12 mois	Préclinique
Cisplatin	N.A.	**PLGA**	PCL	Cisplatin libéré dans 4 semaines	Préclinique

Annexe B

Le tableau suivant résume quelques exemples d'applications biomédicales des polyesters cités dans la troisième partie du chapitre I.[1]

[1] Dimetex, *Etude des perspectives de développement des technologies textiles en ingénierie cellulaire et tissulaire,* 2008.

http://www.in2lifesciences.eu/sites/i2ls/files/technologies_textiles_ingenierie_tissulaire_cellulaire.pdf.

Tableau 1. Principales applications biomédicales des polyesters.[1]

Polymères	**PHA**	**PGA**	**PLA**	**PCL**
Peau	+	-	++	++
Os	++	-	++	++
Cartilage	++	-	++	+
Tendons et ligaments	++	++	++	++
Système nerveux	+	-	+	++
Différenciation cellulaire	-	-	-	++
Musculaire, tissus mous, vessie	-	++	++	-
Vasculaire	++	++	++	+

++ Application principale. + Application secondaire. – Pas d'application.

Materials Science and Engineering C 59 (2016) 998–1006

Contents lists available at ScienceDirect

Materials Science and Engineering C

journal homepage: www.elsevier.com/locate/msec

Effect of chemical heterogeneity of biodegradable polymers on surface energy: A static contact angle analysis of polyester model films

R. Belibel [a], T. Avramoglou [a], A. Garcia [b], C. Barbaud [a], L. Mora [a,*]

[a] INSERM U1148, Laboratory for Vascular Translational Science (LVTS), Institut Galilée, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, 99 Avenue Jean-Baptiste Clément, Villetaneuse F-93430, France
[b] CNRS UPR 3407, Laboratoire des Sciences des Procédés et des Matériau, Institut Galilée, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, 99 Avenue Jean-Baptiste Clément, Villetaneuse F-93430, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 28 March 2015
Received in revised form 10 September 2015
Accepted 2 October 2015
Available online 21 October 2015

Keywords:
Biodegradable (poly((*R*,*S*)-3,3 dimethylmalic acid) derivatives
Contact angle
Sessile drop
Surface tension
Heterogeneous surfaces

ABSTRACT

Biodegradable and bioassimilable poly((*R*,*S*)-3,3 dimethylmalic acid) (PDMMLA) derivatives were synthesized and characterized in order to develop a new coating for coronary endoprosthesis enabling the reduction of restenosis. The PDMMLA was chemically modified to form different custom groups in its side chain. Three side groups were chosen: the hexyl group for its hydrophobic nature, the carboxylic acid and alcohol groups for their acid and neutral hydrophilic character, respectively. The sessile drop method was applied to characterize the wettability of biodegradable polymer film coatings. Surface energy and components were calculated. The van Oss approach helped reach not only the dispersive and polar acid–base components of surface energy but also acid and basic components. Surface topography was quantified by atomic force microscopy (AFM) and subnanometer average values of roughness (Ra) were obtained for all the analyzed surfaces. Thus, roughness was considered to have a negligible effect on wettability measurements. In contrast, heterogeneous surfaces had to be corrected by the Cassie–Baxter equation for copolymers (10/90, 20/80 and 30/70). The impact of this correction was quantified for all the wettability parameters. Very high relative corrections (%) were found, reaching 100% for energies and 30% for contact angles.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Bio-polyesters are widely recommended in biomedical applications [1] as drug carriers [2] such as poly(L-lactic acid) (PLA), poly(glycolic acid) (PGA), poly(ε-caprolactone) (PCL) [3] and poly(malic acid) (PMLA) [4–8]. These biodegradable polyesters were used either alone or as copolymers side-chains to improve their mechanical properties, hydrolysis, long-term biodegradation or biocompatibility behavior for the desired therapeutic applications (PLGA [9,10], PLMA [11–15]…). Among this class of polymers, the PMLA is known to present good biocompatibility, non-toxicity in vitro and in vivo, non-immunogenic properties and stability in the bloodstream [5,16–19]. The particularity that led us to choose this family of polyesters is the presence of functionalized groups in their side-chain which, furthermore, allow chemical modification for grafting and thus, delivering drugs [20]. The copolymers derived from PMLA studied in this work were chosen to cover a coronary stent, and thus deliver a drug.

Indeed, surface wettability of the film coatings is directly governed by their chemical composition, which is known to modulate the implant biointegration [21]. Thus, it is of importance to measure contact angles in order to calculate the values of surface free energy and its components (dispersive, polar, acid and basic) for the films coatings. Indeed, this characterization could then be used to research relationships between surface chemical composition and cell response for further studies. However, copolymer surfaces are chemically heterogeneous and wettability of non-ideal surfaces is still under consideration in literature [22,23].

Basically, it is necessary to bring correction to contact angles because the different chemical composition in amphiphilic polymers is responsible for surface energy modifications compared to ideal homogeneous surfaces. Cassie–Baxter equation is generally used to perform theses corrections [24,25]. For heterogeneous surfaces composed of two homogeneous component surfaces (labeled 1 and 2 respectively) the equation is [26]:

$$\cos\theta^* = f_1 \cos\theta_1 + f_2 \cos\theta_2 \quad (1)$$

Where θ_1, θ_2, f_1 and f_2 (with $f_1 + f_2 = 1$) are contact angles and area surface fractions respectively for each component individually. θ^* is the Cassie apparent contact angle.

Moreover, surface roughness is also a parameter that has to be taken into account when contact angles studies are undertaken because in cases where average surface roughness (Ra) is important, contact angles can be increased due to this roughness [27]. Finally, correction due to the different chemical composition was calculated and the impact of this correction on surface free energies and components (dispersive, polar (acid and basic)) values was quantified. This quantification was

* Corresponding author.
E-mail address: Laurence.mora@univ-paris13.fr (L. Mora).

http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.10.010
0928-4931/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

performed as a function of the acidic percentage (AP) of the polymers chemical formulae.

The purpose of the present study was the characterization of polymer surfaces having a wide range of chemical composition by determining the contact angle, surface roughness and surface free energies and components for each sample. Therefore, this material is the poly((*R*,*S*)-3,3 dimethylmalic acid) (PDMMLA) obtained by anionic ring-opening polymerization of racemic α,α,β-trisubstituted-β-lactones as previously published [28–30].

2. Material and methods

2.1. Polymers synthesis

Amorphous PLA (M_n = 20 000 g/mol) was purchased from Sigma Aldrich (France). Anhydrous THF was distilled on sodium-benzophenone. In all other cases, the commercially available chemicals were purchased from Sigma Aldrich (France) and employed as received. All reactions, with anhydrous organic solvents were performed under nitrogen atmosphere. Synthetic PDMMLAs were prepared in anhydrous THF solution using the previously reported procedure [30]. The *β*-lactones monomers were synthesized according to the literature procedure as well [31]. Benzylic lactone (4-benzyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone), hexylic lactone (4-hexyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone) and benzyloxypropylic lactone (4-(3-benzyloxypropyl)carbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone) were used for the synthesis of corresponding homopolymers PDMMLA-H, PDMMLA-He and PDMMLA-OH, respectively. For the synthesis of the different copolymers, only benzylic and hexylic lactones were used. Briefly, as an example for the preparation of PDMMLAH_{20}-*co*-He_{80} (20/80), 513 mg (2,9 mmol) of benzylic lactone and 2 g (8,76 mmol) of hexylic lactone were dissolved in 50 mL of anhydrous THF solution and added, to a two-neck flask containing initiator (10^{-2} equiv., 0.116 mmol, 29.26 mg) under nitrogen atmosphere. The polymerization was followed by FTIR spectroscopy analysis indicating the disappearance of the lactone band at 1850 cm^{-1} and stirred at room temperature for 24 h (100% conversion). The polymer was isolated by precipitation in ethanol and then it underwent a catalytic hydrogenolysis in presence of palladium on charcoal to obtain carboxylic acid (PDMMLA-H and PDMMLA copolymers) and alcohol (PDMMLA-OH) [30]. The polymers with 0, 10, 20, 30 and 100% of acidic groups were named as 0/100, 10/90, 20/80, 30/70 and 100/0, respectively.

2.2. Samples preparation

To obtain polymer films, the PDMMLAs were dissolved in acetone and PLA in chloroform. The polymer solution was then deposited on glass slides. After the evaporation of solvant at room temperature, glass slides were dried at 37 °C overnight in a vacuum oven. Glass is used as a reference sample.

2.3. PDMMLA polymers characterization

2.3.1. Characterization of chemical structure

FTIR spectra were recorded on AVATAR 370 TF-IR Thermo Nicolet spectrometer using Nicolet OMNI-Sampler ATR Smart Accessory (Ge, DTGS). Adsorption bands are given in cm^{-1}.

^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on BRUKER AM-400 MHz spectrometer using CD_3COCD_3 as solvent and with the residual solvent signals as internal standard, unless otherwise indicated. Chemical shifts were given in ppm (δ) and coupling constants in Hz. The following abbreviations were used to describe the peak pattern: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet) and m (multiplet).

The absolute average molecular weights and molecular weight distributions were determined at room temperature by coupling online a high performance size exclusion chromatograph (HPSEC), a multi-angle laser light scattering detector (MALLS), a viscometer and a differential refractive index (dRI) detector. THF, used as carrier, was filtered through a 0.1 μm filter unit (Millipore, Billerica, USA), carefully degassed (DGU-20A3R Shimadzu, Kyoto, Japan), and eluted at a 0.5 mL/min flow rate (LC10Ai Shimadzu, Kyoto, Japan). 100 μL of a 0.2 μm-filtered sample solution (at about 20 mg/mL) were injected with an automatic injector (SIL-20A HT Shimadzu, Kyoto, Japan). The column packing was a polystyrene-divinylbenzene gel. The MALLS photometer, a miniDawn TREOS from Wyatt Technology Inc. (Santa Barbara, CA, USA) was provided with a fused silica cell and a Ga–As laser (λ = 665.8 nm). The whole collected data: light scattering (LS), dRI were analyzed using the Astra v6.0.6 software package. Molar mass were obtained with the Zimm order 1 method. The concentration of each eluted fraction was determined with dRI (RID10A Shimadzu, Kyoto, Japan) according to the measured values of dn/dc (0.05 mL/g) [32].

All glass transition (*T*g) temperatures of different polymers were obtained using Differential Scanning Calorimetry (DSC). DSC was measured on a SDT Q600 analyzer (TA instrument, Guyancourt, France). In a typical run, polymers were first put in the furnace and heated from −60 °C to 200 °C by means of a temperature ramp of 10 °C/min. This operation was repeated twice. *T*g was determined from the inclination point of the second heating curve.

2.3.2. Atomic force microscopy (AFM)

AFM was used to obtain topographic images of surface samples. The AFM machine was a nanoscope 5 (Bruker-Nano) and the cantilever was a Veeco tip silicon probe with aluminum reflex coating (resonant frequency: 300 kHz) and with a constant force of 40 N/m. Imaging was performed in the air, at room temperature, and using the tapping mode. Surface morphology and roughness parameters were determined by the AFM software program. The (10 μm × 10 μm) 2D images of topography were obtained with a resolution of 256_256 pixels. Surface roughness (Ra (nm)) was then evaluated from 10 μm × 10 μm (100 μm^2) images.

2.3.3. Contact angle measurements and surface free energy (SFE) calculations

Contact angles were carried out using a GBX Scientific Instrument (Romans, France). A drop of 2 μL of a chosen probe liquid was deposited on the sample surface through a syringe. The drop image was stored by a video camera and an image analysis system (Windrop++ software) calculated the contact angle (*θ*) from the shape of the drop. Before measurement, samples were rinsed in distilled water and dried under N_2. Contact angles were measured in the air at room temperature. For each substratum, three probe liquids (L) of different polarities were used: distilled water, formamide (Sigma Chemical CO) and diiodomethane (Sigma Chemical CO—St. Louis MO USA). For each probe liquid and surface, 10 contact angles were measured (with two separate samples) and the mean value was calculated. The total SFE (γ_{TOT}) of the different surfaces were calculated using the Van Oss model [33] which brings together the dispersive (γ_{LW}) and the polar acid–base (γ_{AB}) components. The polar acid–base (γ_{AB}) components are itself divided into two parts, acid (γ_A) and basic (γ_B).

2.3.4. Statistical analysis

The statistics used here for contact angle and AFM measurements were based on a comparison of variances and means of two populations by the Student test (t-test with Excel software). Statistical calculations were performed using n = 10 different values (two separate samples) for contact angles measurements and using n = 3 different areas (4 μm^2, 25 μm^2 and 100 μm^2 separate samples) for AFM roughness calculations. The probability of correlation was based on the Pearson coefficient (p). While *p*-value is less than 0.01, a statistically significant difference is achieved between the two populations of values that are compared.

3. Results and discussion

3.1. PDMMLA polymers synthesis

For this study, six polymers were chosen: three homopolymers and three statistical copolymers. Only copolymers are tested in selected biomedical applications in other studies (data not shown). For a closer characterization of the behavior of polymers, the homopolymers should also be studied. Since the six polymer films were deposited on glass slides and the PLA was the most used polymer for the coating of stents in recent years [34], all results in this study were also compared for each case with glass and PLA. The –COOH group in the side-chain furnishes the acid hydrophilic character for copolymers, the hexyl group brings the hydrophobic character and the –OH group provides the neutral hydrophilic character. The alcohol functions on the homopolymer chains (PDMMLA-OH named HP-OH) were often used for its opsonization phenomenon [35]. At the same time, acid hydrophilic and hexylic homopolymers (PDMMLA-H 100/0 in the present paper and PDMMLA-He labeled as 0/100, respectively) were synthesized. Three statistical copolymers with different hydrophobic/hydrophilic balance in the side-chain of copolymers were also prepared: PDMMLAH$_{10}$-*co*-He$_{90}$ named 10/90, PDMMLAH$_{20}$-*co*-He$_{80}$ named 20/80 and PDMMLAH$_{30}$-*co*-He$_{70}$ named 30/70 (Fig. 1).

These carboxylic acid ratios incorporated during the polymer synthesis (translated by "AP") were selected to vary the kinetic of hydrolysis. The degradation, regardless of carboxylic acid percentage (10, 20 and 30), was more or less slower. Since these materials will be in direct contact with blood and vascular cells, it is important to study the wettability, thermomechanical and viscoelastic properties and cell interaction behavior. Finally, we will be able to determine the appropriate PDMMLA copolymer having the best qualities to cover the metallic stent. Such an attempt is essential to overcome the limitations of the existing degradable polymers such as PLA. Despite its widespread use for medical applications, PLA exhibits frequently a limited cell response and poor interaction with body tissue and fluids [14,19,36–38]. Its major disadvantages are slow degradation, poor hydrophilicity and poor ductility (higher glass temperature (*Tg*)) which limit its applications [36,39]. Therefore, the modification of PLA surface properties has become crucial to especially meet the requirements of biomedical applications [9,11,14,40]. Unfortunately, adjusting its rate of degradation, surface wettability, functionalization and thermo-mechanical properties is somewhat deficient.

The objective of this work is to determinate the surface properties of different PDMMLA polymer films.

Synthetic PDMMLAs were successfully prepared by a living anionic ring-opening polymerization of corresponding β-lactones as monomers: benzylic lactone "R = –CH$_2$Ph", hexylic lactone "R = –(CH$_2$)$_5$–CH$_3$" and benzyloxypropylic lactone "R = –(CH$_2$)$_3$–O–CH$_2$Ph" in anhydrous THF solution using the previously reported procedure (Scheme 1) [30]. PDMMLA statistical copolyesters were prepared from two different racemic β-lactones (benzylic and hexylic lactones). The latter were chosen because they bring the hydrophilic and hydrophobic characters to these copolymers. The tetraethylammonium benzoate was used as initiator (Scheme 1).

3.2. Polymer characterization

3.2.1. Characterization of polymers chemical structure

The different polymers were characterized by FTIR, ^{1}H and ^{13}C NMR, SEC and DSC. The different copolymers characteristics are given in the table. FTIR spectroscopy analysis showed the ester characteristic band at 1751 cm^{-1} and the disappearance of the lactone band at 1838 cm^{-1} for all polymers (Fig. 2).

The chemical structure of all PDMMLA polymers was confirmed by ^{1}H and ^{13}C NMR (Table 1). Therefore, signals around 5.20 and 7.38 ppm on ^{1}H NMR spectrum confirmed the presence of benzylic group and those around 0.89, 1.26 and 4.10 ppm characterized the hexylic group. In addition, signals assigned to benzyloxypropylic group are appeared at 1.93, 3.54, 4.27 and 4.49 ppm.

The co-monomers relative contents (10, 20 and 30%) were obtained by ^{1}H NMR using the integration ratio of peak at 4.15 ppm corresponding to –CH$_2$–O-hexyl and that at 5.20 ppm corresponding to –CH$_2$–O-benzyl (Fig. 3a).

Fig. 3a showed that the proportion of the benzylic and the hexylic units in the copolymer 30/70 was 30.1% and 69.9%, respectively.

After a catalytic hydrogenolysis in presence of 10% of palladium on charcoal on the polyester, it's possible to obtain carboxylic acid group (when R = –CH$_2$Ph) and alcohol group (when R = –(CH$_2$)$_3$–O–CH$_2$Ph) (Scheme 1). As mentioned above, these ionic and non-charged groups (carboxylic acid and alcohol, respectively) are used one hand for their hydrophilic properties and other hand for the possibility to react with bioactive or targeting molecules [28,41,42]. The hexyl group is used for their hydrophobic properties, which gives access to a wide variety of amphiphilic copolymers. Polymers catalytic hydrogenolysis was confirmed by the disappearance of benzylic peaks at 5.2 and 7.4 ppm on ^{1}H NMR spectrum for 100/0 and copolymers (Fig. 3b) and with the disappearance of benzyloxypropylic peaks at 1.93, 3.54, 4.27 and 4.49 ppm.

Glass temperature (*Tg*) of PDMMLA copolymers don't exceed 20 °C which is lower than the physiological temperature whereas PLA has a higher *Tg* (about 63 °C) having thus less ductility and softness (Table 2). These thermal properties of PDMMLA polymers present an encouraging result for applying these biomaterials to cover the cardiovascular stents.

3.2.2. Atomic force microscopy

AFM images of surfaces are shown in Fig. 4a. Roughness surface distribution appears to be more homogeneous 10/90 (0.106 ± 0.002) surface compared to the two other copolymers 20/80 (0.184 ± 0.008)

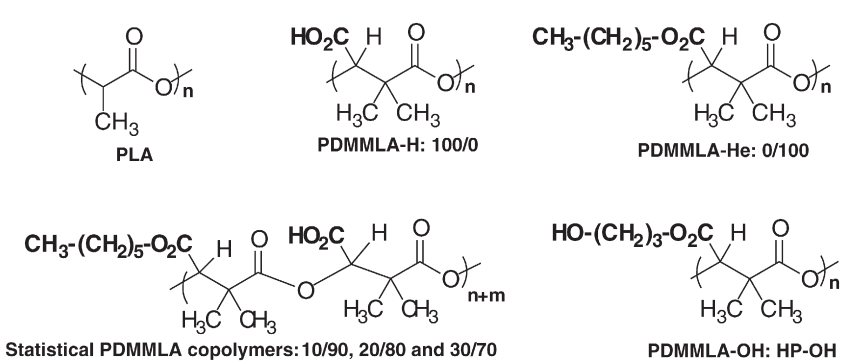
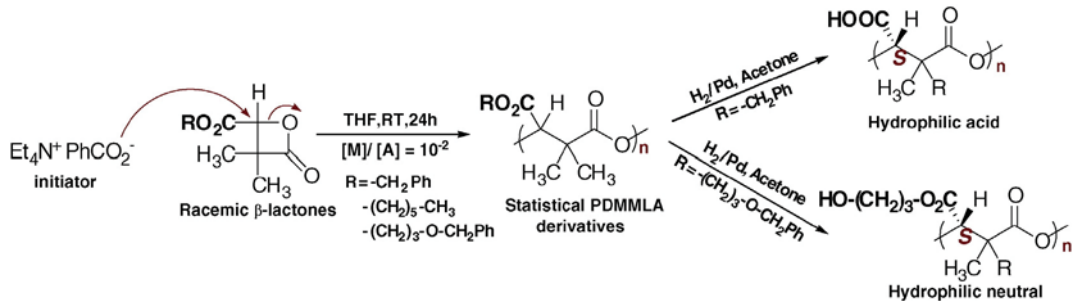


Fig. 1. Chemical structures of different studied polymers.



Scheme 1. Synthetic route to PDMMLA derivatives.

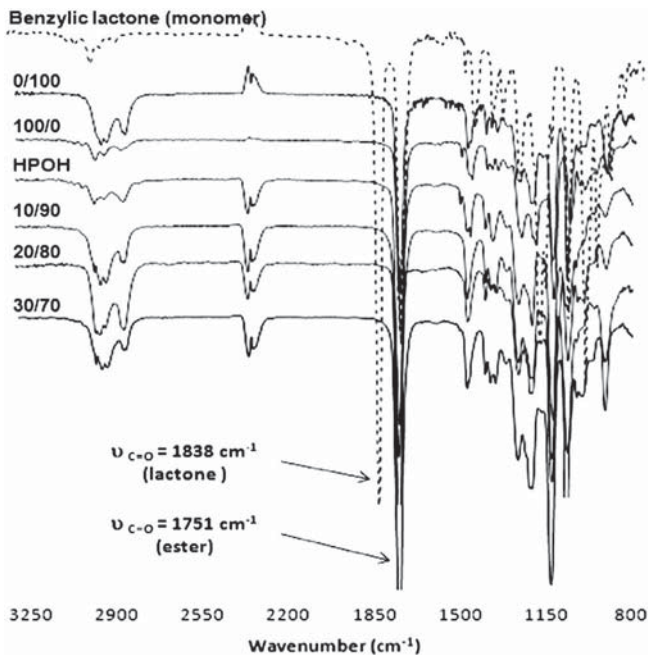


Fig. 2. FTIR spectra of the benzylic lactone monomer and PDMMLA polymers.

and 30/70 (0.216 ± 0.014). All the other surfaces, except homopolymers 0/100 (0.056 ± 0.009) and 100/0 (0.169 ± 0.014), are more heterogeneous in term of surface topography (glass (0.362 ± 0.004), PLA (0.486 ± 0.075) and HP-OH (1.112 ± 0.355)). Fig. 4b summarizes the Ra values of all the considered surfaces. Because surface roughness was on the order of nanometers, it did not affect contact angles. Also, the potential impact of surface roughness on surface energy calculation and contact angle values was considered as negligible. Thus, it was not taken into account in this paper, as in other studies [43,44]. Moreover, a statistically linear correlation ($R^2 = 0.98$, $p < 0.01$) was found between the four polymers versus AP (0/100, 10/90, 20/80 and 30/70) (Fig. 4b). For all these samples, average roughness Ra (nm) was found to be statistically different, two by two using n = 3 different values for each group. Indeed, a statistical significance difference was observed between two groups: PLA—0/100 ($p < 0.01$), 0/100—10/90 ($p < 0.001$), 10/90—20/80 ($p < 0.001$), 20/80—30/70 ($p < 0.01$), 30/70—100/0 ($p < 0.01$) and 100/0—HP-OH ($p < 0.001$). A significant difference was also obtained between "glass" and PLA, 0/100, 10/90, 20/80, 30/70, 100/0 and HP—OH ($p < 0.05$, $p < 0.0001$, $p < 0.0001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$ and $p < 0.001$, respectively).

3.2.3. Rough wettability

Water sessile drop contact angle values are shown in Table 3. Hydrophobicity in PDMMLA copolymers increases with the decreasing of the acidic group's percentage incorporated in the side-chain of copolymer (AP). The statistical analysis between all the samples two by two, using n = 20 different values for each group, revealed that a statistical significance difference was observed between two groups: PLA—0/100, 0/100—10/90, 10/90—20/80, 20/80—30/70, 30/70—100/0, 100/0—glass and 100/0—HP-OH ($p < 0.0001$ for all groups).

The PLA water contact angle is in accordance with the literature [45, 46]. Formamide and diiodomethanne contact angle values are also shown in Table 3. They are used to calculate the total surface free energies and components (dispersive, polar (acid and basic)) for all samples.

For formamide contact angle values, a statistical analysis between all the samples two by two, using n = 20 different values for each group, gave that a statistical significant difference was observed between two groups: PLA—0/100, 0/100—10/90, 10/90—20/80, 20/80—30/70 and 30/70—100/0 ($p < 0.001$ for all groups) and no significant difference between 100/0—HP-OH group ($p > 0.05$). In the same manner, for diiodomethane contact angle values, a statistical analysis between all these samples groups indicated a significant difference, for the same couples of surfaces as just above for formamide ($p < 0.001$).

Table 1
^{1}H and ^{13}C NMR data for all PDMMLA homopolymers and copolymers.

Polymers		^{1}H NMR (δ ppm)[(a)]	^{13}C NMR (δ ppm)[(a)]
Homopolymers	0/100	0.86 (m, 3 H, $\underline{CH_3}$–CH_2), 1.26 (m, 9 H, CH_3, 3 × CH_2), 1.40 (m, 3 H, CH_3), 1.59 (m, 2 H, $\underline{CH_2}$), 4.10 (m, 2 H, CH_2–O), 5.38 (m, 1 H, CH).	14.47 ($\underline{CH_3}$–CH_2), 23.35 (CH_3), 26.34 ($\underline{CH_2}$–CH_3), 29.34 (CH_3), 32.25 (3 × CH_2), 46.03 (C), 66.29 (CH_2–O), 77.15 (CH), 168.25, 173.71 (2 × C═O).
	100/0	1.20 (m, 3 H, CH_3), 1.29 (m, 3 H, CH_3), 5.17 (m, 2 H, CH_2), 5.35 (m, 1 H, CH), 7.36 (m, 5 H, Ph).	21.54, 30.60 (2 × CH_3), 45.78 (C), 67.72 (CH_2–O), 76.83 (CH), 129.18, 129.32, 136.08, 136.17 (Ph), 167.88, 173.57 (2 × C═O).
	HPOH	1.24 (m, 6 H, 2 × CH_3), 1.93 (m, 2 H, CH_2), 3.54 (m, 2 H, CH_2–O), 4.27 (s, 2 H, CH_2–CO_2), 4.49 (s, 2 H, $\underline{CH_2}$–Ph), 5.39 (m, 1 H, CH), 7.28 (m, 5 H, Ph).	22.35 (2 × CH_3), 45.74 (C), 63.47, 63,56 (–O–$\underline{CH_2}$–CH_2–$\underline{CH_2}$–O–), 66.95 (–$\underline{CH_2}$–CH_2–O–), 73.21 ($\underline{CH_2}$–Ph), 77.01 (CH), 128.09, 128,20, 128,98, 139,56 (Ph), 168.04, 173,62 (2 × C═O).
Copolymers	10/90 20/80 30/70	0.89 (t, 3 H, $\underline{CH_3}$–CH_2), 1.31 (m, 18 H, 4 × CH_3 and 3 × CH_2), 1.64 (m, 2 H, CH_2), 4.15 (m, 2 H, CH_2–$\underline{CH_2}$–O), 5.20 (m, 2 H, Ph–$\underline{CH_2}$–O), 5.33 (m, 2 H, 2 × CH), 7.40 (m, 5 H, Ph).	14.45 ($\underline{CH_3}$–CH_2), 23.32 (2 × CH_3), 26.31 ($\underline{CH_2}$–CH_3), 29.31 (2 × CH_3), 32.22 (3 × CH_2), 45.98 (2 × C), 66.28 ($\underline{CH_2}$–$\underline{CH_2}$–O), 67.88 (Ph–$\underline{CH_2}$–O), 77.14 (2 × CH), 129.38, 129.62, 136.45 (Ph), 168.22, 168.29, 173.68, 173.90 (4 × C═O).

[a] NMR data for all PDMMLA polymers before hydrogenolysis. ^{1}H NMR (400 MHz in CD_3COCD_3) and ^{13}C NMR (100 MHz in CD_3COCD_3).

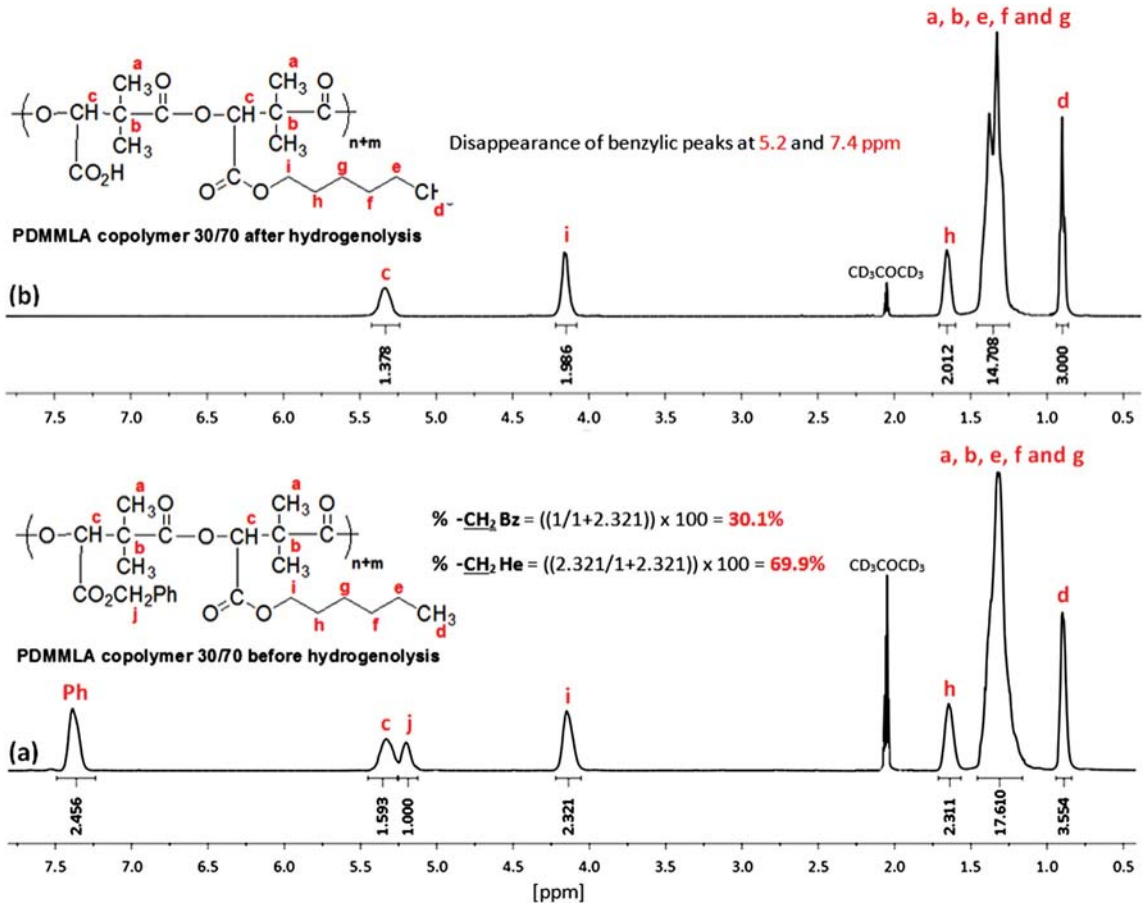


Fig. 3. ^{1}H NMR spectra of PDMMLA copolymer 30/70 (a) before hydrogenolysis and (b) after hydrogenolysis.

Fig. 5a shows the total surface free energy (γ_{TOT}) for each surface (non-Cassie corrected). Its value clearly increases with AP. It also indicates the values of non-corrected dispersive (γ_{LW}) and polar acid–base component (γ_{AB}) of the surface free energy. Polar interactions are due to Coulomb interactions between permanent dipoles but also to interactions between induced and permanent ones whereas time fluctuations in the molecules charge distribution contribute to dispersive interactions [47]. For surface free energy, dispersive and polar acid–base components, the statistical analysis between all the samples two by two (PLA—0/100, 0/100—10/90, 10/90—20/80, 20/80—30/70, 30/70—100/0, 100/0—glass and 100/0—HP-OH), using n = 20 different values for each group, revealed that a statistical significance difference was observed between all groups ($p < 0.001$ for all groups).

For all the surfaces γ_{LW} is higher than γ_{AB} due to the major presence of $-CH_2$ groups inside the polymer chains. However γ_{AB} is not negligible and is increasing regularly with AP which brings polar oxygen atoms in the structure. This correlation includes not only the chemically heterogeneous copolymers (10/90, 20/80, 30/70) but also the two homogeneous references (0/100 and 100/0). Glass exhibits a high polar component due to its oxygen atoms containing free electrons as well. This is confirmed by Fig. 5b where it can be seen that non-corrected

Table 2
Characterization of different homopolymers and copolymers.

Polymers		Copolymers composition (%)[b]		Characterization of polyesters				
		PDMMLA-H	PDMMLA-He	M_{nTh} (g/mol)[c]	M_n (g/mol)[c]	M_w (g/mol)[c]	D[c]	*Tg* (C°)[d]
Homopolyesters	PLA[a]	/	/	20 000	12 805	13 042	1.02	+63.4[e]
	0/100	/	/	23 400	19 789	21 283	1.07	−15.0
	100/0	/	/	22 800	29 393	30 120	1.02	+67.9
	HP-OH	/	/	29 200	19 955	20 842	1.04	+7.6
copolyesters	10/90	9.99	90.01	22 860	18 062	19 109	1.05	−14.2
	20/80	19.90	80.10	22 920	18 293	20 015	1.09	+8.2
	30/70	30.10	69.90	22 980	18 549	20 776	1.12	+20.0

M_{nTh} = theoretical M_n.
[a] Commercial amorphous PLA.
[b] Calculated from ^{1}H NMR results.
[c] HPSEC-MALLS-dRI in THF, 0.5 min.
[d] Determined by DSC.
[e] Obtained from literature [41].

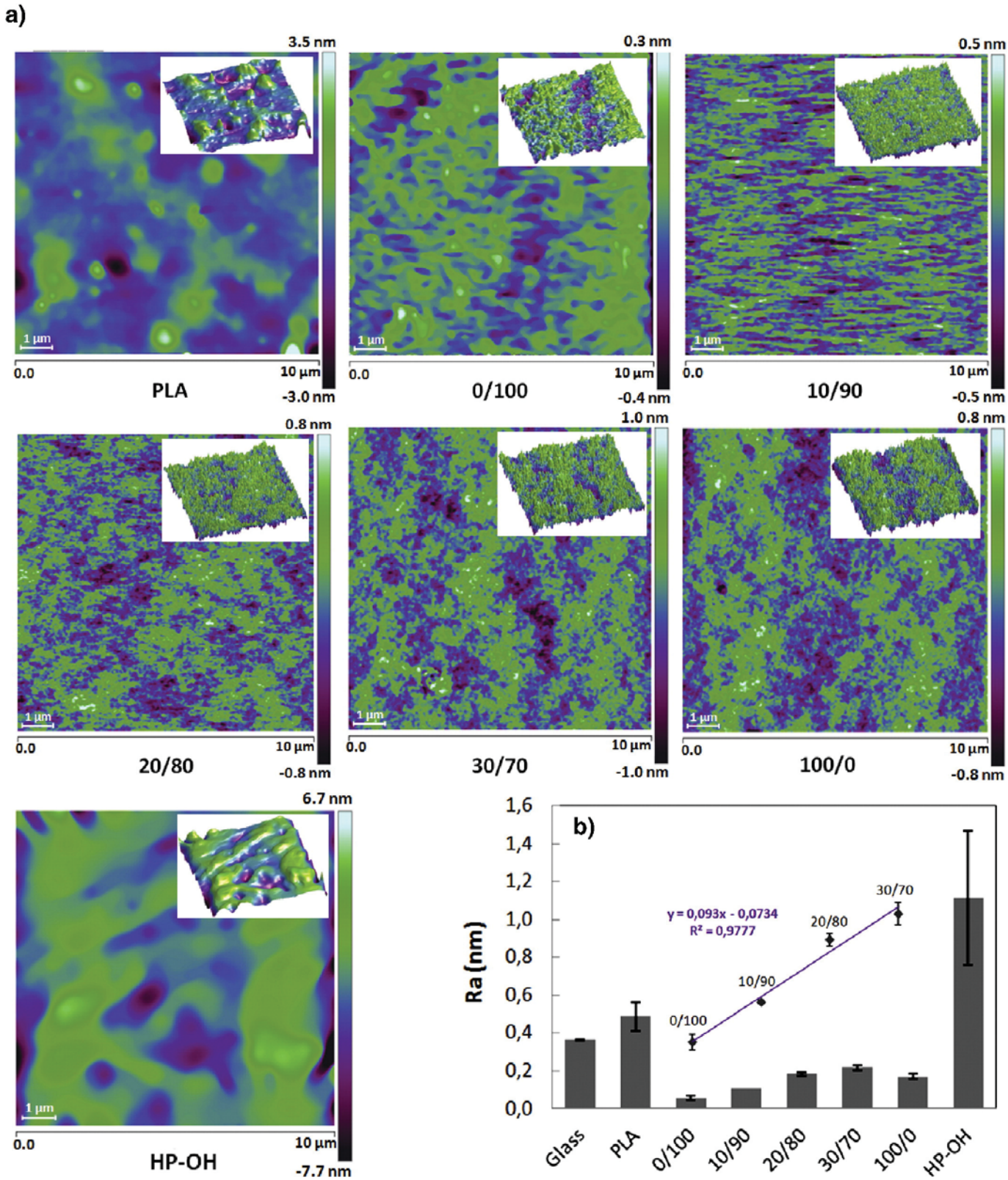


Fig. 4. Polymers AFM: (a) 2D and 3D images and (b) average roughness Ra (nm) and Ra linear correlation with % A of polymers.

basic component of the surface energy is very small for all the samples and statistically significantly different ($p < 0.001$ for all groups), two by two (10/90—20/80, 20/80—30/70, 30/70—100/0 and 100/0—HP-OH), using n = 20 different values for each group. No significant difference ($p > 0.05$) between groups (PLA—0/100, 0/100—10/90) was observed. In addition, the non-corrected acidic components (Fig. 5b) are related to AP and statistically significantly different, two by two (0/100—10/90, 10/90—20/80, 20/80—30/70, 30/70—100/0 and 100/0—HP-OH) using n = 20 different values for each group ($p < 0.001$ for all groups) except for PLA—0/100 group ($p > 0.05$).

Table 3
Water, formamide and diiodomethane contact angles by sessile drop method for all the surfaces.

Samples	Glass	PLA	0/100	10/90	20/80	30/70	100/0	HP-OH
Water contact angle (°)	39.24 ± 0.80	77.28 ± 0.58	92.44 ± 0.36	88.73 ± 0.61	85.94 ± 0.09	81.10 ± 0.88	25.68 ± 1.35	72.15 ± 0.18
Formamide contact angle (°)	30.04 ± 1.47	37.45 ± 1.05	66.44 ± 0.08	71.76 ± 0.74	76.65 ± 0.14	78.21 ± 0.47	21.96 ± 1.07	22.11 ± 0.80
Diiodomethane contact angle (°)	44.6 ± 1.18	25.34 ± 1.70	41.42 ± 0.01	42.69 ± 0.04	45.25 ± 0.50	47.25 ± 0.49	53.13 ± 1.50	43.35 ± 1.04

All of the above data of PLA sample were in accordance with the reported studies in the literature [46].

3.3. Cassie corrections of contact angles and surface energies

Fig. 6a details the linear fit of relationship between the Cassie corrected surface energy and components versus the Cassie corrected water contact angle for the two references samples and the three copolymers. These five samples range from 0 to 100% of AP with the references located at the extremes. All the energy components are found to be different significantly, two by two ($p < 0.01$), except 0/100 compared to 10/90 for basic component because of very small values.

All the energies, except the LW component, decrease when contact angle increases (surface more and more hydrophobic). Fig. 6b shows the reverse behavior versus AP.

However, little discrepancies were observed between the two representations and this was quantified by the values of R^2 correlation coefficient (linear fit extrapolation) in all the cases (Fig. 7). The linear fits were compared for corrected (*) or non-corrected contact angles and energy values in versus contact angle or AP. The basic component is the one that needs to be corrected the most.

It was worth noting that if Cassie correction is applied, representations versus contact angles or versus AP bring both R^2 values closer to 1 than if not corrected (Fig. 7). After correction it was observed that R^2 for contact angle was higher than for AP whereas it is the reverse if no correction is made. In case it is impossible to apply Cassie correction, it is better to represent the relationship between surface energy and components versus AP than versus water contact angle.

In order to go further on the evaluation of the impact of Cassie correction on contact angles (Fig. 8a) and on surface energies (Fig. 8b) relative percentage of the correction was calculated as a function of AP. Relative impact of Cassie correction is maximum for formamide first (maximum 28%). then water (6% maximum) and finally diiodomethane. This result can be explained by the fact that formamide and water are polar solvents compared to diiodomethane. The necessity for correction increases with AP.

Moreover, total and acid energy components relative corrections (%) increase with AP whereas base and acid–base ones diminish. Corrections could reach 100% for basic component around 80% for acid–base one and around 50% for acidic surface energy.

It is important to quantify Polar acid–base and/or apolar surface energy components with accuracy for a better understanding of cell behavior in contact with a biomaterial [27]. Indeed, water contact angle and total surface free energy are generally not sufficient parameters to explain differences in cell response. In contrast, acidic or basic surface energy components can be parameters but enable us to discriminate

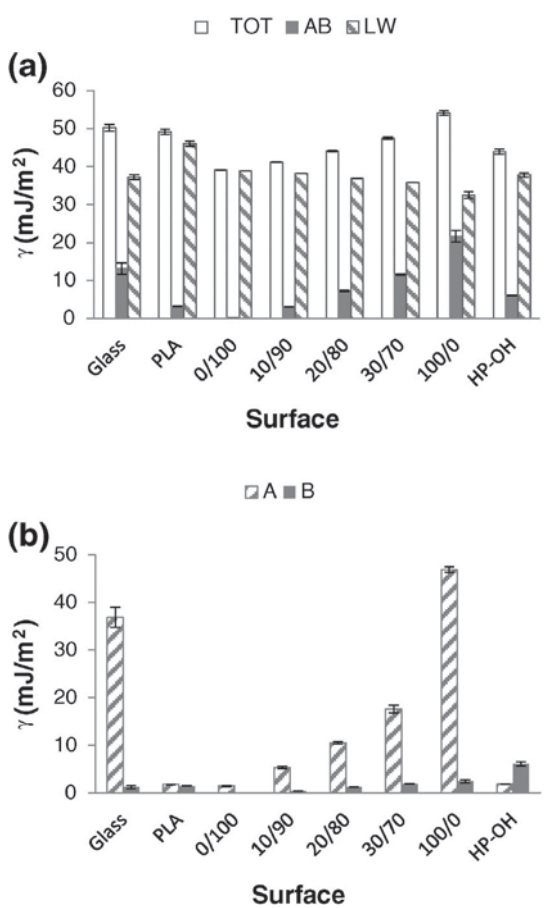


Fig. 5. (a) Total surface free energy (γTOT) dispersive (LW) and polar acid–base (AB). (b) Acidic and basic components of surface energy for each surface.

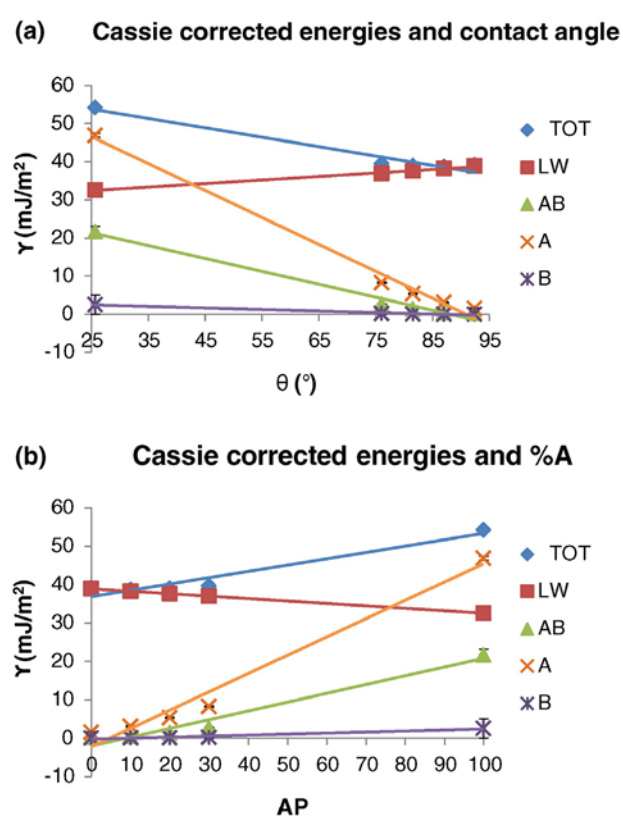


Fig. 6. Surface free energy and components versus water contact angle after Cassie correction (a) versus θ and (b) versus % A.

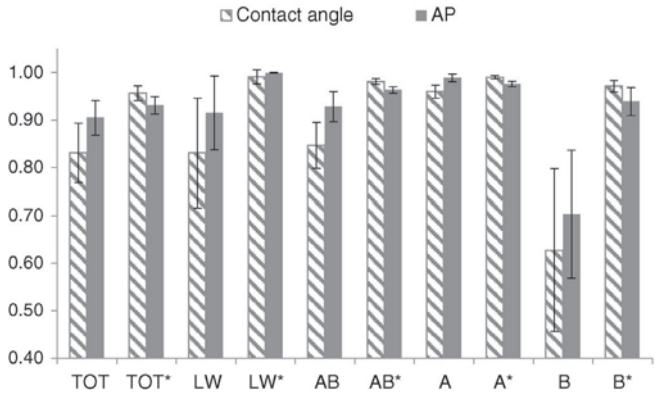


Fig. 7. Linear correlation coefficient R^2 as a function of water contact angle or AP for surface energy components.

between biomaterial surfaces [27]. That is why it is of importance, in biomaterial research, not only to reach these values but also to correct them from artifacts such as those induced by the different chemical composition of polymers structure. Besides, an analysis of protein adsorption onto the surfaces of interest could help to go further in the understanding of the correlations between material surface chemistry and biocompatibility. For example, dynamic contact angle (DCA) could detect particular protein adsorption behavior depending on the biomaterial surface chemistry as it has been shown for polysaccharides polyelectrolytes films. In this study, endothelial cell proliferation was found to be in relation with the ability of fibronectin to easily change the conformation during DCA cycling depending on the film surface chemistry [21].

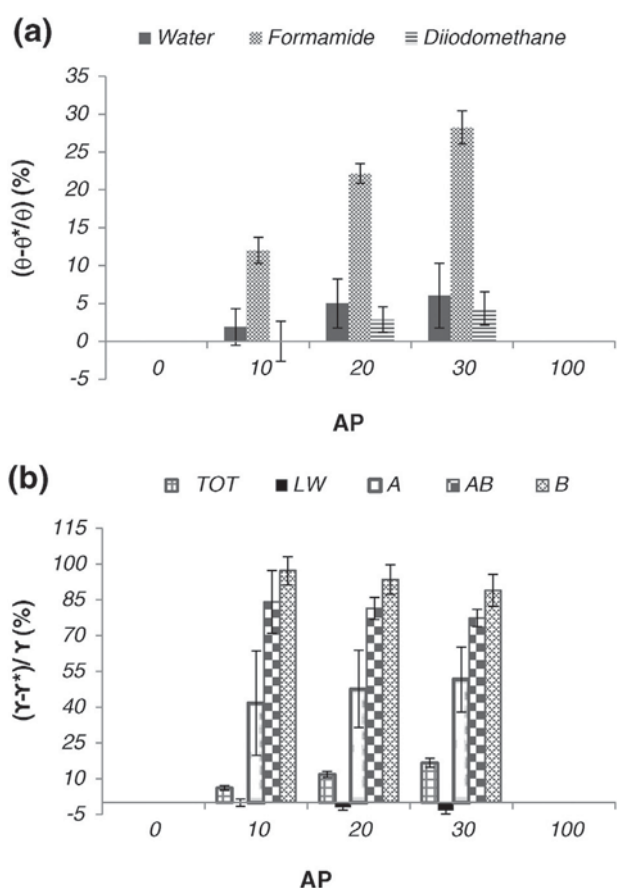


Fig. 8. (a) Impact of Cassie–Baxter correction on contact angle versus AP for water formamide and diiodomethane probe liquids. (b) Relative modification of surface energy values after Cassie–Baxter correction.

Biocompatibility, mechanical properties, and drug-loading capacity are the general considerations of a selected polymer as stent-coating for eluting drugs. Indeed, the surface properties of the polymer which covers the stent are the main factor that affects the biological response (immediate and long-term response) between the stent and the vascular tissue and blood. These stent-coating surface properties are the surface texture, charge and energy. According to literature, the surface energy is the most important factor in determining the thrombogenicity in blood. The affinity of the polymer surface with water increases with increasing surface energy and therefore the increase of thrombogenicity in the blood medium [48].

Another very important factor is the surface roughness. The thrombogenicity increases on rougher surfaces. This due to the higher blood protein adsorption, activation and aggregation of platelet [48]. Thus, a stent coating should have good interaction with blood, be incorporated by the vascular tissue and present the advantage to minimize the inflammatory response. This is thanks to its good surface properties.

The present work shows that this biomaterial presents good thermal and surface properties (low *Tg* and surface energy and functional hydrophilic molecules on its chain which adjusts their properties and interactions with body tissue). This precisely meets the requirements of the intended cardiovascular application.

4. Conclusion

In this work, the wettability of the different PDMMLA derivatives' surfaces was successfully characterized. On the one hand, the surface free energy and its components (dispersive, polar, acid and basic) were determined for each surface. On the other hand, influence of acidic percentage incorporated in the side-chain of copolymers on wettability, morphology and surfaces properties of polyesters was investigated because three of these samples exhibited a heterogeneous chemical composition. Cassie–Baxter equation was used to bring corrections to the experimental contact angles. Finally, the impact of this correction on contact angles and subsequent surface energy and components was quantified. It was found necessary to apply correction in order to improve the quality of the relationships obtained between the wettability parameters and the percentage of acid indicated in the chemical formula of the polymer. Moreover, as shown in this study, adding only 10% of acidic hydrophilic group in a polymer chemical composition, allows us not only to shape rational design structure and the morphology of the PDMMLA copolymers, but also to control and tailor their wettability properties. This approach that focuses on their thermomechanical properties is important to study their degradation rate and their biological effects considering that hydrophilic/hydrophobic balance plays an important role in the material/cell's interactions.

References

[1] H.Y. Tian, Z.H. Tang, X.L. Zhuang, X.S. Chen, X.B. Jing, Biodegradable synthetic polymers: preparation, functionalization and biomedical application, Progress In Polymer Science 37 (2011) 237–280.
[2] K.F.D.W. Pack, A.M. Klibanov, R. Langer, Visual evidence of acidic environment within degrading poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres, Pharmaceutical Research 17 (2000) 100–106.
[3] R. De Santis, A. Russo, A. Gloria, U. D'Amora, T. Russo, S. Panseri, M. Sandri, A. Tampieri, M. Marcacci, V.A. Dediu, C.J. Wilde, L. Ambrosio, Towards the design of 3D fiber-deposited poly(epsilon-caprolactone)/iron-doped hydroxyapatite nanocomposite magnetic scaffolds for bone regeneration, Journal Of Biomedical Nanotechnology 11 (2015) 1236–1246.
[4] Z.W. Huang, V. Laurent, G. Chetouani, J.Y. Ljubimov, E. Holler, T. Benvegnu, P. Loyer, S. Cammas-Marion, New functional degradable and bio-compatible nanoparticles based on poly(malic acid) derivatives for site-specific anti-cancer drug delivery, International Journal Of Pharmaceutics 423 (2012) 84–92.
[5] J.Y. Ljubimova, J. Portilla-Arias, R. Patil, H. Ding, S. Inoue, J.L. Markman, A. Rekechenetskiy, B. Konda, P.R. Gangalum, A. Chesnokova, A.V. Ljubimov, K.L. Black, E. Holler, Toxicity and efficacy evaluation of multiple targeted polymalic acid conjugates for triple-negative breast cancer treatment. Journal of Drug Targeting 21 (2013) 956–967.

[6] P. Loyer, S. Cammas-Marion, Natural and synthetic poly(malic acid)-based derivates: a family of versatile biopolymers for the design of drug nanocarriers. Journal of Drug Targeting 22 (2014) 556–575.
[7] A. Lanz-Landázuri, A. Martínez de Ilarduya, M. García-Alvarez, S.n. Muñoz-Guerra, Poly(β,L-malic acid)/doxorubicin ionic complex: a pH-dependent delivery system, Reactive and Functional Polymers 81 (2014) 45.
[8] Y. Qiao, X. Duan, L. Fan, W. Li, H. Wu, Y. Wang, Synthesis of controlled molecular weight poly (β-malic acid) and conjugation with HCPT as a polymeric drug carrier, Journal of Polymer Research 21 (2014) 1–9.
[9] P. McDonald, J. Lyons, L. Geever, C. Higginbotham, In vitro degradation and drug release from polymer blends based on poly(dl-lactide). poly(l-lactide-glycolide) and poly(ε-caprolactone), Journal of Materials Science 45 (2009) 1284–1292.
[10] S.T. Schmitz-Hertzberg, W.C. Mak, K.K. Lai, C. Teller, F.F. Bier, Multifactorial design of poly(d.l-lactic-co-glycolic acid) capsules with various release properties for differently sized filling agents, Journal of Applied Polymer Science 130 (2013) 4219.
[11] L. Wang, X. Jia, Y. Chen, Y. Che, Z. Yuan, Synthesis, degradability, and cell affinity of poly (DL-lactide-co-RS-hydroxyethyl-beta-malolactonate), Journal Of Biomedical Materials Research Part A 87A (2008) 459–469.
[12] K.L. Lai, B. He, Z.W. Gu, Preparation and cell compatibility of functionalized biodegradable poly(DL-lactide-co-RS-beta-malic acid), Chinese Journal Of Polymer Science 26 (2008) 177–186.
[13] Y. Liu, W. Wang, J. Wang, Y. Wang, Z. Yuan, S. Tang, M. Liu, H. Tang, Blood compatibility evaluation of poly(d.l-lactide-co-beta-malic acid) modified with the GRGDS sequence, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 75 (2010) 370.
[14] J. Qian, W. Xu, W. Zhang, X. Jin, Preparation and characterization of biomorphic poly(l-lactide-co-β-malic acid) scaffolds, Materials Letters 124 (2014) 313.
[15] Y. Zhang, C. Ni, G. Shi, J. Wang, M. Zhang, W. Li, The polyion complex nano-prodrug of doxorubicin (DOX) with poly(lactic acid-co-malic acid)-block-polyethylene glycol: preparation and drug controlled release, Medicinal Chemistry Research 24 (2015) 1189–1195.
[16] H. Ding, G. Helguera, J.A. Rodriguez, J. Markman, R. Luria-Perez, P. Gangalum, J. Portilla-Arias, S. Inoue, T.R. Daniels-Wells, K. Black, E. Holler, M.L. Penichet, J.Y. Ljubimova, Polymalic acid nanobioconjugate for simultaneous immunostimulation and inhibition of tumor growth in HER2/neu-positive breast cancer, Journal of Controlled Release 171 (2013) 322–329.
[17] B.-S. Lee, M. Vert, E. Holler, Water-soluble Aliphatic Polyesters: Poly(Malic Acid)s, Biopolymers Online. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, KGaA, 2005.
[18] B. Gasslmaier, et al., Synthetic substrates and inhibitors of β-poly(L-malate)-hydrolase (polymalatase), Eur. J. Biochem. 267 (2000) 5101.
[19] B. He, J. Bei, S. Wang, Morphology and degradation of biodegradable poly(L-lactide-co-β-malic acid), Polymers for Advanced Technologies. 14 (2003) 645–652.
[20] L.K. Sarah, X.T. Vinh, K. Cathrin, P.B. Anaïs, P.D. Andrew, Synthetic strategies, sustainability and biological applications of malic acid-based polymers, Green Materials 2 (2014) 107–122.
[21] S. Benni, T. Avramoglou, H. Hlawaty, L. Mora, Dynamic contact angle analysis of protein adsorption on polysaccharide multilayer's films for biomaterial reendothelialization, BioMed research international 2014 (2014) 679031.
[22] D. Bonn, J. Eggers, J. Indekeu, J. Meunier, E. Rolley, Wetting and spreading, Reviews Of Modern Physics 81 (2009) 739–805.
[23] E.H. Sohn, B.G. Kim, J.S. Chung, H. Kang, J.C. Lee, Wettability of the morphologically and compositionally varied surfaces prepared from blends of well ordered comb-like polymer and polystyrene, Journal of Colloid and Interface Science 354 (2011) 650.
[24] T.T. Chau, W.J. Bruckard, P.T.L. Koh, A.V. Nguyen, A review of factors that affect contact angle and implications for flotation practice, Advances In Colloid And Interface Science 150 (2009) 106–115.
[25] R. Di Mundo, F. Bottiglione, G. Carbone, Cassie state robustness of plasma generated randomly nano-rough surfaces, Applied Surface Science 316 (2014) 324–332.
[26] E. Bormashenko, Why does the Cassie–Baxter equation apply? Colloids And Surfaces A-Physicochemical And Engineering Aspects 324 (2008) 47–50.
[27] L. Ponsonnet, K. Reybier, N. Jaffrezic, V. Comte, C. Lagneau, M. Lissac, C. Martelet, Relationship between surface properties (roughness. wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour, Materials Science & Engineering C-Biomimetic And Supramolecular Systems 23 (2003) 551–560.
[28] C. Barbaud, S. Cammas-Marion, P. Guerin, Poly(beta-malic acid) derivatives with non-charged hydrophilic lateral groups: synthesis and characterization, Polymer Bulletin 43 (1999) 297–304.
[29] C. Barbaud, F. Faÿ, F. Abdillah, S. Randriamahefa, P. Guérin, Synthesis of new homopolyester and copolyesters by anionic ring-opening polymerization of α,α′,β-trisubstituted β-lactones, Macromolecular Chemistry and Physics 205 (2004) 199.
[30] F. Ouhib, S. Randriamahefa, P. Guerin, C. Barbaud, Synthesis of new statistical and block co-polyesters by ROP of alpha,alpha,beta-trisubstituted beta-lactones and their characterizations, Designed Monomers And Polymers 8 (2005) 25–35.
[31] C. Barbaud, F. Abdillah, F. Faÿ, M. Guerrouache, P. Guérin, Synthesis of new alpha,alpha,beta-trisubstituted beta-lactones as monomers for hydrolyzable polyesters, Designed Monomers and Polymers 6 (2003) 353.
[32] F.E. Kohn, et al., The ring-opening polymerization of D,L-lactide in the melt initiated with tetraphenyltin, Journal Of Applied Polymer Science 29 (1984) 4265–4277.
[33] J. Van Oss Carel, Forces interfaciales en milieux aqueux. Chimie(ed. Masson) 1996 14–402.
[34] Y. Huang, H.C.A. Ng, X.W. Ng, V. Subbu, Drug-eluting biostable and erodible stents, Journal of Controlled Release 193 (2014) 188.
[35] F.M. Zambaux, F. Bonneaux, R. Gref, E. Dellacherie, C. Vigneron, MPEO-PLA Nanoparticles: Effect of MPEO Content on Some of Their Surface Properties, 44John Wiley & Sons. Inc., 1999 109–115.
[36] L. Xiao, et al., Poly(Lactic Acid)-Based Biomaterials: Synthesis, Modification and Applications. Chapter 11, INTECH Open Access Publisher, 2012 248–282.
[37] M. Persson, et al., Effect of bioactive extruded PLA/HA composite films on focal adhesion formation of preosteoblastic cells, Colloids Surf. B: Biointerfaces 121 (2014) 409.
[38] Y.-Q. Wang, J.-Y. Cai, Enhanced cell affinity of poly(l-lactic acid) modified by base hydrolysis: wettability and surface roughness at nanometer scale, Curr. Appl. Phys. 1 (2007) 108.
[39] I.M. De Rosa, et al., Poly(lactic acid)/phormium tenax composites: morphology and thermo-mechanical behavior, Polym. Compos. 32 (2011) 1362.
[40] J. Wang, et al., Preparation and pH controlled release of polyelectrolyte complex of poly(l-malic acid-co-d,l-lactic acid) and chitosan, Colloids Surf. B: Biointerfaces 115 (2014) 275.
[41] M.A. LeboucherDurand, V. Langlois, P. Guerin, 4-carboxy-2-oxetanone as a new chiral precursor in the preparation of functionalized racemic or optically active poly(malic acid) derivatives, Polym. Bull. 36 (1996) 35–41.
[42] S. Cammas, M.M. Bear, L. Moine, R. Escalup, G. Ponchel, K. Kataoka, P. Guerin, Polymers of malic acid and 3-alkylmalic acid as synthetic PHAs in the design of biocompatible hydrolyzable devices, International Journal of Biological Macromolecules 25 (1999) 273–282.
[43] Gaydos, A.W. Neumann, Line tension in multiphase equilibrium systems, Applied Surface Thermodynamics (1996) 169–238.
[44] E.I. Vargha-Butler, E. Kiss, C.N.C. Lam, Z. Keresztes, E. Kalman, L. Zhang, A.W. Neumann, Wettability of biodegradable surfaces, Colloid And Polymer Science 279 (2001) 1160–1168.
[45] D. Cohn, H. Younes, Biodegradable PEO/PLA block copolymers, Journal of Biomedical Materials Research 22 (1988) 993.
[46] Spiridon, K. Leluk, A.M. Resmerita, R.N. Darie, Evaluation of PLA-lignin bioplastics properties before and after accelerated weathering, Composites Part B-Engineering 69 (2015) 342–349.
[47] I. Chemistry, Operating manual DataPhysics OCA, DataPhysics Instruments GmbH, 1–4, 2002.
[48] Y. Huang, Drug Eluting Stents: Anti-inflammatory Approach to Prevent Restenosis After Stent Implantation, 2003.

Synthesis of New Optically Active α,α′,β-Trisubstituted-β-Lactones as Monomers for Stereoregular Biopolyesters

Rima Belibel, Christel Barbaud

INSERM U1148, Laboratory for Vascular Translational Science (LVTS), Institut Galilée, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, 99 Avenue Jean-Baptiste Clément, Villetaneuse F-93430, France
Correspondence to: C. Barbaud (E-mail: barbaud@univ-paris13.fr)

Received 1 April 2015; accepted 22 May 2015; published online 30 June 2015
DOI: 10.1002/pola.27724

ABSTRACT: Various optically active (4*R*)-alkyloxycarbonyl-3,3-dialkyl-2-oxetanones as monomers were synthesized from L-(*S*)-malic acid in six steps to prepare a new family of stereopolyesters for biomedical applications. The synthesis began with an esterification followed of a dialkylation in the aim to introduce hydrophobic groups as methyl or reactive group as allyl. Then, a saponification has permitted to obtain the corresponding diacids that reacted with appropriate alcohols to furnish different monoesters. The last and most important step was activation of hydroxyl group of monoesters with the asymmetric carbon configuration inversion according to the Mitsunobu reaction. Thus, this reaction has provided lactones from monoesters with 100% enantiomeric excess which was confirmed by ^{1}H NMR and by the synthesis of corresponding isotactic and semicrystalline homopolyesters. © 2015 Wiley Periodicals, Inc. J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem. **2015**, *53*, 2586–2597

KEYWORDS: chirality; diacid; isotactic homopolyester; monoesters; monomers; α,α′,β-trisubstituted-β-lactones

INTRODUCTION The development of new and design monomers for biomedical and therapeutic application is innovative in the field of research in organic chemistry. Indeed, a large family of α,α′,β-trisubstituted-β-lactones has been prepared from racemic diethyloxalpropionate to furnish synthetic racemic and amorphous polyesters.[1,2] These biodegradable and bioassimilable polymeric materials can be used in temporary therapeutic applications as drug delivery systems.[3,4] At present, the possibility of taking advantage of chirality to modify and adjust physical and mechanical properties of polymers and copolymers derived from poly((*R*,*S*)−3-alkyl-3-methylmalic acid) (PAMMLA) is essential if we regard the fact that these biopolyesters were used for different biomedical applications (Fig. 1).[5]

Indeed, the hydrolysis of atactic poly((*R*,*S*)−3,3-dimethylmalic acid) (R = methyl) gave the corresponding (*R*,*S*)−3,3-dimethylmalic acid.[6,7] Moreover, in the literature, the chiral diacid L-(*R*)−3,3-dimethylmalic acid is a natural and nontoxic compound involved in the biosynthesis of pantothenate that is used in the synthesis of coenzyme A catalyzed by the enzyme β,β-dimethyldehydrogenase (EC.1.1.1.84) to give ketovaline (Scheme 1).[7]

The enantiomeric composition and distribution of stereogenic centers in polymer chains affect properties of the resulting polymers such as the morphology or the rate of the degradation.[8] Anionic ring-opening polymerization of chiral α,α′,β-trisubstituted-β-lactones leads to semicrystalline poly((*S*)−3-alkyl-3-methylmalic acid) derivatives (Scheme 2).

In this report, we are investigating the synthesis of various chiral α,α′,β-trisubstituted-β-lactones. These can be easily prepared in two steps from diacid, synthesized from commercial L-(*S*)-malic acid in four stages (Scheme 3).

Worthy of interest, the R group will be either methyl or allyl group and the R′ group will be either benzyl, benzyloxypropyl, or hexyl group. The role of R and R′ is well defined: it allows (i) chemical modifications and the possibility to build bioactive or targeting molecules on the skeleton of the polyester in the case of benzyl, benzyloxypropyl, or allyl group, (ii) an adjustment of the hydrophilic/hydrophobic balance in the case of methyl or hexyl group compared with poly(malic acid) derivatives. Finally, we also report on the homopolymerization of the benzylic lactone by anionic ring-opening polymerization that led to a stereoregular and semicrystalline homopolymer with only isotactic sequences.

EXPERIMENTAL

General Methods

All optical rotation $[\alpha]_D$ (°) data were determined using Biot's law: $\alpha = [\alpha]_D\ \ell c$. The observed optical rotation α is

© 2015 Wiley Periodicals, Inc.

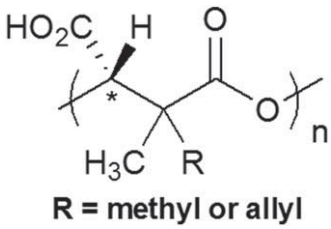
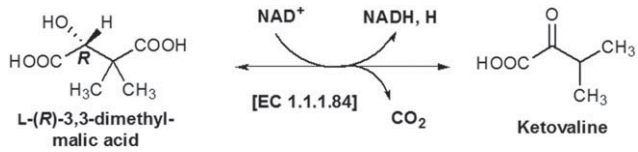


FIGURE 1 Structure of poly((*R*,*S*)−3-alkyl-3-methylmalic acid) (PAMMLA).

measured. The specific optical rotations of different products were taken at the intervals 21–25 °C and 0.5–1.3 mg mL^{-1} in acetone, by using Bellingham and Stanley ADP410 High Accuracy polarimeter (units for *[α]*, *c* and ℓ, usually deg cm^3 g^{-1} dm^{-1}, g cm^{-3}, and dm, respectively and $\ell = 1$ dm). The absolute average molecular weights and molecular weight distributions were determined at room temperature by coupling online a high-performance size-exclusion chromatograph (HPSEC), a multiangle laser light scattering detector (MALLS), a viscometer, and a differential refractive index (dRI) detector. Acetone, used as carrier, was filtered through a 0.1-μm filter unit (Millipore, Billerica), carefully degassed (DGU-20A3R Shimadzu, Kyoto, Japan), and eluted at a 0.5-mL min^{-1} flow rate (LC10Ai Shimadzu, Kyoto, Japan). A 100-μL of 0.2-μm filtered sample solution (at about 20 mg mL^{-1}) was injected with an automatic injector (SIL-20A HT Shimadzu, Kyoto, Japan). The column packing was a polystyrene–divinylbenzene gel. The MALLS photometer, a miniDawn TREOS from Wyatt Technology Inc. (Santa Barbara, CA) was provided with a fused silica cell and a Ga-As laser ($\lambda = 665.8$ nm). The whole collected data: light scattering (LS), dRI were analyzed using the Astra v6.0.6 software package. Molar mass were obtained with the Zimm order 1 method. The concentration of each eluted fraction was determined with dRI (RID10A Shimadzu, Kyoto, Japan) according to the measured values of d_n/d_c (0.097 mL g^{-1}).[9] Melting temperature (T_m) and glass transition temperature (T_g) of homopolymer were obtained using differential scanning calorimetry (DSC). DSC was measured on a SDT Q600 analyzer (TA instrument, Villeurbanne, France). In a typical run, polymer was first putted in the furnace and heated from room temperature to 200 °C by means of a temperature ramp of 10 °C min^{-1}. This operation was repeated twice. T_g was determined from the inclination point of the second heating curve while mp was taken from the maximum of the endothermic peak in the first heating run. Melting points of solid compounds mp (°C) were determined with a WME Kofler apparatus. The TLC were revealed with the UV wavelength (254 nm) and with a solution which consists on: the absolute EtOH (93 mL), the *p*-anisaldehyde (2.5 mL), the concentrated H_2SO_4 (3.5 mL), and the acetic acid (1 mL). Flash chromatography was performed with silica gel (C—C 35–70 μm, 60 Å). ^{1}H and ^{13}C NMR spectra were recorded on BRUKER AM-400 MHz spectrometer using CD_3COCD_3 as solvent and with the residual solvent signals as internal standard unless otherwise indicated. Chemical shifts were given in ppm (δ) and coupling constants in Hz. The following abbreviations are used to describe the peak pattern: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), and m (multiplet). FTIR spectra were recorded on AVATAR 370 TF-IR Thermo Nicolet spectrometer using Nicolet OMNI-Sampler ATR Smart Accessory (Ge, DTGS). Adsorption bands are given in cm^{-1}. Anhydrous tetrahydrofuran (THF) was distilled on sodium-benzophenone. In all other cases, the commercially available reagent-grade solvents were employed without purification. All reactions, with anhydrous organic solvents were performed under nitrogen atmosphere. All the glass apparatus were kept one night in a drying-oven at 100 °C. Elemental analyses were performed by the National Center for Scientific Research, Villeurbanne, France.



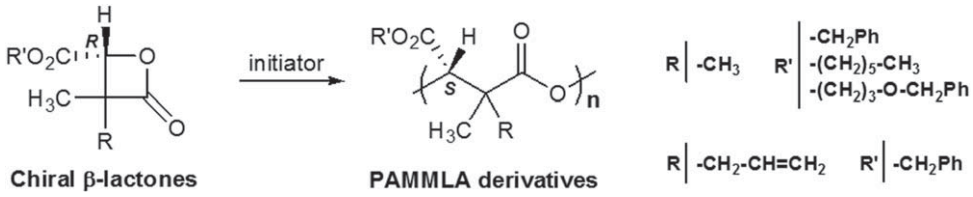
SCHEME 1 Biosynthesis of ketovaline by β,β-dimethyldehydrogenase (EC.1.1.1.84).

Monomers Synthesis

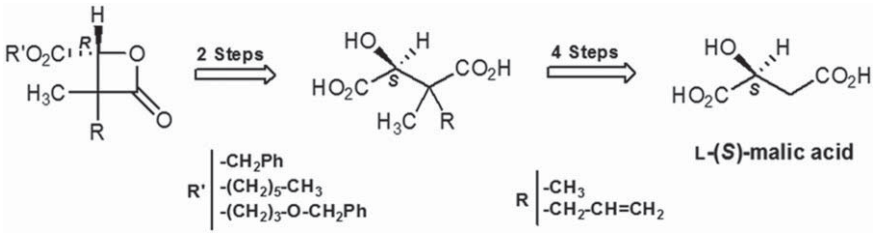
(*S*)-Diethyl Malate 1

A solution of 20.0 g (149 mmol) of L-(*S*)-malic acid dissolved in 100 mL of absolute ethanol and 6.8 mL of concentrated hydrochloric acid (HCl) was stirred at reflux for 4 h. The solvent was evaporated under vacuum, and the residue was purified by distillation (bp = 83 °C, 1mm Hg),[10] to give 27.3 g of the product **1** as a colorless oil in 96% yield.

R_f 0.39 (SiO_2, AcOEt/cyclohexane, 1:3). $[\alpha]_D^{22}$: −16.3 (c = 1.1, acetone), lit.[11] $[\alpha]_D^{22}$: −15.6 (c = 5.3, acetone). ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 1.23 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, CH_3), 1.25 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, CH_3), 2.67 (dd, 1H, $J = 6.9$, J =15.8 Hz, CH_2), 2.78 (dd, 1H, $J = 4.8$ Hz, $J = 15.8$ Hz, CH_2), 4.11 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz, CH_2), 4.17 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz, CH_2), 4.18 (dd, 1H, $J = 7.1$ Hz, CH). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm):



SCHEME 2 Anionic ring-opening polymerization of chiral α,α',β-trisubstituted-β-lactones.



SCHEME 3 Retrosynthetic pathway.

14.07 (2 × CH_3), 39.52 (CH_2), 60.61, 61.22 (2 × CH_2–CH_3), 67.99 (CH), 170.44, 173.31 (2 × C═O).

General Alkylation Procedure

First, at 0 °C under nitrogen atmosphere, a solution of n-BuLi (n-BuLi) (1.6 M in hexanes, 14.6 equiv) was added dropwise to a stirring solution of diisopropylamine (2.3 equiv) in anhydrous THF (200 mL for 1 mol of n-BuLi) to generate *in situ* the lithium diisopropylamide. Next, After 30 min, the reaction mixture was cooled to −78 °C and the dissolved compound (1 equiv) in anhydrous THF was added dropwise for 10 min. After stirring at −78 °C for 1 h then 30 min at −30 °C, a solution of methyl iodide or allyl bromide (2 equiv) in anhydrous THF was added dropwise under nitrogen atmosphere. The reaction mixture was stirred at −78 °C and followed by TLC. After 2 h, this reaction was quenched by addition of solid ammonium chloride (NH_4Cl), diluted with AcOEt and acidified with HCl 2M until pH = 1–2. The reaction mixture was poured into a separatory funnel containing 100 mL of water and 200 mL of AcOEt. Organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with 3 × 80 mL AcOEt. The combined organic phases were washed with brine, dried over sodium sulfate (Na_2SO_4), and filtered. The residue of evaporation was purified by flash chromatography on silica gel using AcOEt/cyclohexane, 1:3 as eluent. All values of alkylation products R_f were obtained from elution system AcOEt/cyclohexane, 1:3.

(2S)-Diethyl-3-methylmalate 2

Alkylation Procedure

n-BuLi (103.7 mL, 1.1 mol, 1.6M), diisopropylamine (24.5 mL, 173 mmol) in 225 mL of anhydrous THF, compound **1** (15.03 g, 79 mmol) in 15 mL of anhydrous THF and methyl iodide (2 equiv, 9.7 mL, 157 mmol) in 10 mL of anhydrous THF. The product **2** was obtained as light yellow oil (11.8 g) after purification in 73% yield.

R_f 0.48. $[\alpha]_D^{22}$: −20.1 (c = 1.19, acetone). ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 1.17 (d, 3H, J = 7.1 Hz, CH_3—CH), 1.20 (t, 3H, J = 7.2 Hz, CH_3—CH_2), 1.25 (t, 3H, J = 7.2 Hz, CH_3—CH_2), 2.92, 2.93 (qd, 1H, J = 4.0 Hz, CH—CH_3), 4.09 (m, 4H, 2 × CH_2—CH_3), 4.29 (dd, 1H, J = 4 Hz, CH—OH). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 14.12 (2 × CH_3–CH_2), 14.16 (CH_3), 43.97 (CH—CH_3), 60.64, 61.29 (2 × CH_2–CH_3), 73.06 (CH—OH), 172.80, 173.08 (2 × C═O).

(2S)-Diethyl-3,3-dimethylmalate 3

Alkylation Procedure

n-BuLi (93.2 mL, 0.99 mol, 1.6M), diisopropylamine (21.8 mL, 155 mmol) in 200 mL of anhydrous THF, compound **2** (14.45 g, 70.7 mmol) in 15 mL of anhydrous THF and methyl iodide (2.2 equiv, 9.4 mL, 152 mmol) in 10 mL of anhydrous THF. The product **3** is purified to get 12 g (yield 78%) as yellow oil.

R_f 0.59. $[\alpha]_D^{22}$: +8.89 (c = 1.23, acetone). ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 1.12, 1.21 (2s, 6H, 2 × CH_3), 1.23 (t, 6H, J = 7.0 Hz, 2 × CH_3—CH_2), 4.11 (q, 2H, J = 7.0 Hz, CH_2—CH_3), 4.17 (q, 2H, J = 7.0 Hz, CH_2—CH_3), 4.35 (d, 1H, CH). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 14.07 et 14.12 (2 × CH_3—CH_2), 19.90, 22.05 (2 × CH_3), 46.86 (C), 60.70, 61.33 (CH_2—CH_3), 75.57 (CH), 172.86, 175.31 (2 × C═O).

(2S)-Diethyl-3-allylmalate 7

Alkylation Procedure

n-BuLi (77 mL, 816 mmol, 1.6M), diisopropylamine (18 mL, 128 mmol) in 160 mL of anhydrous THF, compound **1** (10.6 g, 55.9 mmol) in 10 mL of anhydrous THF and allyl bromide (2 equiv, 10.5 mL, 122 mmol) in 7 mL of anhydrous THF. The product **7** (8.87 g) was obtained after purification in 69% yield as a colorless oil.

R_f 0.50. $[\alpha]_D^{22}$: −11 (c = 1.40, acetone). ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 1.19 (t, 3H, J = 7.1 Hz, CH_3—CH_2), 1.25 (t, 3H, J = 7.1 Hz, CH_3—CH_2), 2.34 (ddd, 1H, J = 7.3 Hz, J = 8.0 Hz, J = 13.3 Hz, CH_2—CH), 2.50 (ddd, 1H, J = 6.6 Hz, J = 7.3 Hz, J = 13.3 Hz, CH_2—CH), 2.90 (ddd, 1H, J = 4.0 Hz, J = 7.3 Hz, J = 7.3 Hz, CH—CH_2), 4.03–4.29 (m, 5H, 2 × CH_2—CH_3, CH—OH), 5.04 (dd, 1H, J = 1.7 Hz, J = 10.0 Hz, CH═CH_2), 5.10 (dd, 1H, J = 1.7 Hz, J = 17.0 Hz, CH═CH_2), 5.83 (dddd, 1H, J = 6.6 Hz, J = 8.0 Hz, J = 10.0 Hz, J = 17.0 Hz; CH═CH_2). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 14.21, 14.24 (4 × CH_3—CH_2), 32.55 (2 × CH_2—CH), 49.1, 49.6 (2 × CH—CH_2), 60.8, 61.4 (4 × CH_2—CH_3), 71.2, 71.5 (2 × CH—OH), 116.9, 117.3 (2 × CH_2═CH), 136.23, 136.26 (2 × CH═CH_2), 171.8, 172.1, 173.0, 173.3 (4 × C═O. Anal. calcd for $C_{11}H_{17}O_5$: C, 57.38; H, 7.88. Found: C, 57.13; H, 8.23.

(2S)-Diethyl-3-allyl-3-methylmalate 8

Alkylation Procedure

In the first method, n-BuLi (23.3 mL, 247 mmol, 1.6M), diisopropylamine (5.5 mL, 39 mmol) in 50 mL of anhydrous THF, product **2** (14.45 g, 16.9 mmol) in 5 mL of anhydrous THF, and the allyl bromide (2.2 equiv, 3.3 mL, 37 mmol) in 3 mL of anhydrous THF. After purification, the product **8** was obtained (1.5 g, yield 45%) as colorless oil. In the second method, under identical conditions, n-BuLi (25.4 mL,

269 mmol, 1.6M), diisopropylamine (6.0 mL, 42.5 mmol) in 50 mL of anhydrous THF, compound **7** (4.25 g, 18.5 mmol) in 5 mL of anhydrous THF and methyl iodide (2.2 equiv, 2.4 mL, 38.8 mmol) in 3 mL of anhydrous THF. After purification, the product **8** was obtained (2.8 g, yield 62%) as colorless oil.

R_f 0.60. $[\alpha]_D^{22}$: +8.48 (c = 0.76, acetone). ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 1.14 (s, 3H, CH_3), 1.23 (t, 3H, J = 7.1 Hz, CH_3—CH_2), 1.25 (t, 3H, J = 7.1 Hz, CH_3—CH_2), 2.28 (dd, 1H, J = 8.0 Hz, J = 13.6 Hz, CH_2—CH), 2.50 (dd, 1H, J = 6.8 Hz, J = 13.6 Hz, CH_2—CH), 4.07–4.20 (m, 5H, 2 × CH_2—CH_3, CH—OH), 5.04 (dd, 1H, J = 1.7 Hz, J = 10.0 Hz, CH_2=CH), 5.10 (dd, 1H, J = 1.7 Hz, J = 17.0 Hz, CH_2=CH), 5.75 (dddd, 1H, J = 6.6 Hz, J = 8.0 Hz, J = 10.0 Hz, J = 17.0 Hz; CH=CH_2). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 14.5 (2 × CH$_3$—CH_2), 17.6 (CH_3), 40.1 (CH$_2$—CH), 50.9 (C—CH_3), 61.1, 61.7 (2 × CH$_2$—CH_3), 76.1 (CH—OH), 118.6 (CH$_2$=CH), 134.7 (CH=CH_2), 172.9, 174.3 (2 × C=O). Anal. calcd for $C_{12}H_{20}O_5$: C, 59.00; H, 8.25. Found: C, 58.96; H, 8.56.

General Saponification Procedure

Diacids were prepared by saponification of diesters described before. A mixture of dialkylated diester (1 equiv), and potassium carbonate (6 equiv) in distilled water was first refluxed for 1 h then cooled to room temperature and extracted with AcOEt. The aqueous phase was acidified with HCl 6M until pH = 2, evaporated to dryness under vacuum to give a white salt containing the diacid and KCl. Diacid was recovered in AcOEt and concentrated under vacuum. Chloroform was added to precipitate diacid which then filtered to give a white crystalline solid.

(2S)−3,3-Dimethylmalic Acid 4

Saponification Procedure

Diacid **4** was obtained from the compound **3** (280 mg, 1.28 mmol) and potassium carbonate (1 g, 8 mmol) in 6 mL of distilled water as a white solid (163 mg) in 77% yield.mp = 94–96 °C. $[\alpha]_D^{22}$: +5.09 (c = 1.08, acetone). ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 1.20 (s, 3H, CH_3), 1.24 (s, 3H, CH_3), 4.41 (s, 1H, CH). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 19.97, 21.14 (2 × CH_3), 45.88 (C), 74.78 (CH), 173.23, 176.27 (2 × C=O).

(2S)−3-Allyl-3-methylmalic Acid 9

Saponification Procedure

Diacid **9** was obtained from the compound **8** (1.02 g, 7.25 mmol) and potassium carbonate (3.5 g, 25.0 mmol) in 30 mL of distilled water as a white solid (587.8 mg) in 75% yield.mp = 123–125 °C. $[\alpha]_D^{22}$: +23.8 (c = 1.5, acetone). ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 1.14 (s, 3H, CH_3), 2.37 (dd, 1H, J = 8.0 Hz, J = 13.6 Hz, CH_2—CH), 2.53 (dd, 1H, J = 6.8 Hz, J = 13.6 Hz, CH_2—CH), 4.36 (s, 1H, CH—OH), 5.02–5.09 (m, 2H, CH_2=CH), 5.72–5.91 (m, 1H, CH=CH_2). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 16.5 (CH_3), 39.5 (CH$_2$—CH), 49.7 (C—CH_3), 74.8 (CH—OH), 117.7 (CH$_2$=CH), 133.95 (CH=CH_2), 173.2, 175.1 (2 × C=O). Anal. calcd for $C_8H_{12}O_5$: C, 51.06; H, 6.43. Found: C, 60.31; H, 6.49.

General Monoesterification Procedure

At first, diacid was placed in a round-bottomed flask and cooled in an ice bath. Then, trifluoroacetic anhydride (TFAA) (3.3 equiv) was added dropwise at 0 °C under nitrogen atmosphere. The white mixture was stirred 30 min at 0 °C and 2 h 30 min at room temperature. TFAA in excess and formed trifluoroacetic acid (TFA) were evaporated under vacuum at room temperature. Under nitrogen atmosphere, the desired alcohol (1 equiv) was added to the intermediate cyclic anhydride obtained. The mixture was stirred overnight at room temperature. The resulting yellow solution was dissolved in AcOEt and the organic layer was washed three times with saturated $NaHCO_3$ solution. The combined organic layers were adjusted to pH = 2 with HCl 6M solution and subsequently extracted by AcOEt. The organic layers were also collected, dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated under vacuum. The corresponding monoester was at last purified by flash chromatography on silica gel (AcOEt/cyclohexane, 3:7) then used in the reaction of lactonization. All values of monoesterification products R_f were given from elution system AcOEt/cyclohexane, 3:7).

3-Benzyloxycarbonyl-2,2-dimethyl-(3S)-hydroxypropanoic acid 5a

Monoesterification Procedure

The mixture of the diacid **4** (380.7 mg, 2.35 mmol), TFAA (1 mL, 7 mmol) and benzyl alcohol (243 μL, 2.35 mmol) has furnished after purification the monoester **5a** (478.5 mg, yield 81%) as a pure white solid.

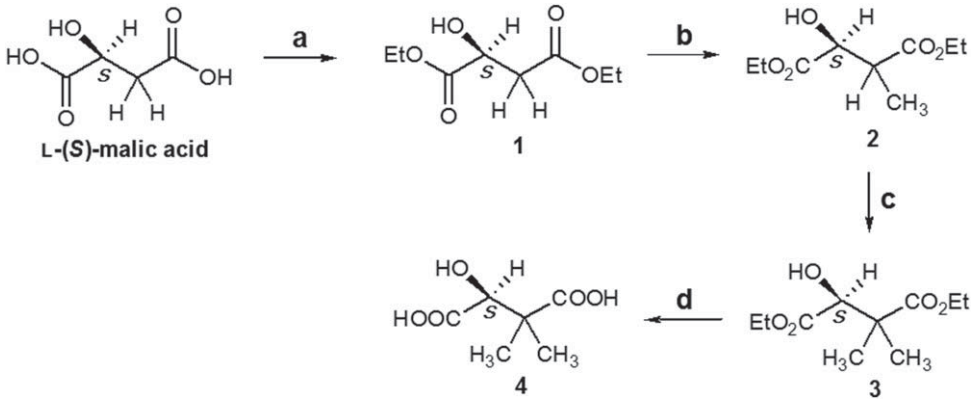
R_f 0.30. mp = 93–95 °C. $[\alpha]_D^{22}$: −6.05 (c = 0.99, acetone). ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 1.16 (s, 3H, CH_3), 1.22 (s, 3H, CH_3), 4.46 (s, 1H, CH—OH), 5.18 (s, 2H, J = 3.0 Hz, CH_2—Ph), 7.37 (m, 5H, Ph). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 20.66, 21.74 (2 × CH_3), 46.64 (C), 67.01 (CH$_2$—Ph), 75.89 (CH—OH), 128.82, 128.88, 129.01 (Ph), 172.85, 176.62 (2 × C=O). Anal. calcd for $C_{13}H_{16}O_5$: C, 61.90; H, 6.39. Found: C, 62.06; H, 6.69.

3-Hexyloxycarbonyl-2,2-dimethyl-(3S)-hydroxypropanoic acid 5b

Monoesterification Procedure

The mixture of the diacid **4** (356 mg, 2.2 mmol), TFAA (1 mL, 7 mmol) and hexyl alcohol (273 μL, 2.2 mmol) gave after purification the monoester **5b** (297.8 mg, yield 55%) as a yellow oil.

R_f 0.48. $[\alpha]_D^{22}$: +2.27 (c = 1.1, acetone). ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 0.88 (t, 3H, J = 7.0 Hz, CH_3—CH_2), 1.16 (s, 3H, CH_3), 1.22 (s, 3H, CH_3), 1.25 (m, 6H, 3 × CH_2), 1.62 (m, 2H, CH_2—CH_2—O), 4.10 (t, 2H, J = 7.0 Hz, CH_2—O), 4.39 (s, 1H, CH—OH). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 13.88 (CH$_3$—CH_2), 20.41, 21.70 (2 × CH_3), 22.77 (2 × CH_2), 25.86 (CH_2), 31.73 (CH_2), 46.44 (C), 65.35 (CH_2—O), 75.64 (CH—OH), 172.93, 176.57 (2 × C=O). Anal. calcd for $C_{12}H_{22}O_5$: C, 58.52; H, 9.00. Found: C, 57.18; H, 8.26.



SCHEME 4 Preparation of (2*S*)−3,3-dimethylmalic acid **4**. Reagents and conditions: (a) EtOH, HCl, 4 h, reflux, 96%, (b) 1) LDA, THF, −78 °C, 2) CH_3I, −78 °C, 73%, (c) 1) LDA, THF, −78 °C, 2) CH_3I, −78 °C, 78%, (d) K_2CO_3, H_2O, 1 h, reflux, 77%.

3-(3′-Benzyloxypropyl)oxycarbonyl-2,2-dimethyl-(3S)-hydroxypropanoic acid 5c

Monoesterification Procedure

The mixture of the diacid **4** (374.5 mg, 2.31 mmol), TFAA (1.5 mL, 10 mmol) and 3-benzyloxy-1-propanol (365 μL, 2.31 mmol) has furnished after purification the monoester **5c** (527.7 mg, yield 74%) as a colorless oil.

R_f 0.41. $[\alpha]_D^{22}$: +6.2 (c = 0.5, acetone). ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 1.18 (s, 3H, CH_3), 1.24 (s, 3H, CH_3), 1.94 (tt, 2H, J = 6 Hz, CH_2), 3.58 (t, 2H, J = 6 Hz, CH_2-O), 4.26 (t, 2H, J = 6 Hz, CH_2—CO_2), 4.39 (s, 1H, CH—OH), 4.50 (s, 2H, CH_2Ph), 7.28 (m, 5H, Ph). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 20.98 (CH_3), 22.30 (CH_3), 33.92 (CH_2), 46.97 (C), 63.19 (CH_2—CO_2), 67.39 (CH_2—O), 73.45 (CH_2Ph), 76.28 (CH—OH), 128.24, 128.39, 129.14 139.95 (Ph), 173.39, 177.15 (2 × C═O). Anal. calcd for $C_{16}H_{22}O_5$: C, 61.92; H, 7.15. Found: C, 60.39; H, 7.27.

3-Benzyloxycarbonyl-2-allyl-2-methyl-(3S)-hydroxypropanoic acid 10

Monoesterification Procedure

The mixture of the diacid **9** (251 mg, 1.3 mmol), TFAA (1 mL, 7 mmol) and benzyl alcohol (394 μL, 1.3 mmol) has furnished after purification the monoester **10** (290 mg, yield 80%) as a colorless oil.

R_f 0.32. $[\alpha]_D^{22}$: +35.8 (c = 0.6, acetone). ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 1.12 (s, 3H, CH_3), 2.27 (dd, 1H, J = 8.0 Hz, J = 13.6 Hz, CH_2—CH), 2.51 (dd, 1H, J = 6.8 Hz, J = 13.6 Hz, CH_2—CH), 4.42 (s, 1H, C*H*—OH), 5.00–5.02 (m, 1H, CH_2═CH), 5.03–5.05 (m, 1H, CH_2═CH), 5.20 (d, 2H, J = 1.2 Hz, CH_2—Ph), 5.70 (dddd, 1H, J = 6.6 Hz, J = 8.0 Hz, J = 10.0 Hz, J = 17.0 Hz; C*H*═CH_2), 7.40 (m, 5H, Ph). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 17.3 (CH_3), 40.27 (CH_2—CH), 50.5 (*C*—CH_3), 67.02 (CH_2—Ph), 76.1 (*C*H—OH), 118.5 (CH_2═CH), 128.9, 129.1, 129.2 (Ph), 134.6 (*C*H═CH_2), 172.7, 175.4 (2 × C═O). Anal. calcd for $C_{15}H_{18}O_5$: C, 64.74; H, 6.52. Found: C, 65.36; H, 7.22.

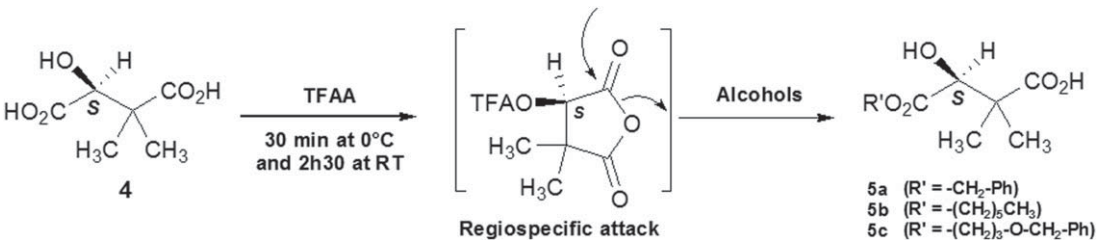
General Lactonization Procedure

Under nitrogen atmosphere, the dry monoester and PPh_3 (1 equiv) were dissolved in anhydrous THF. A solution of DIAD (1 equiv) in anhydrous THF (10 mL for 2 mmol of monoester) was added dropwise at 0 °C under nitrogen atmosphere. The mixture was stirred 1 h at 0 °C then 1 h 30 min at room temperature. The reaction was followed by TLC. The solvent THF was evaporated under vacuum and the formed Ph_3P═O was precipitated in cold diethyl ether. After filtration and evaporation of Et_2O precipitate, the residue was purified by flash chromatography on silica gel using AcOEt/cyclohexane as eluent to give different final lactones as transparent oil that conserved at 0 °C under N_2. The lactones R_f was obtained using the same column eluting system.

(4R)-Benzyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone 6a

Lactonization Procedure

The reaction of monoester **5a** (989 mg, 3.9 mmol) with PPh_3 (1.03 g, 3.9 mmol) in THF (14 mL) and DIAD (772 μL, 3.92 mmol) in THF (2 mL) has furnished after purification (AcOEt/cyclohexane, 2:8) the lactone **6a** (807 mg, yield 88%).



SCHEME 5 Synthesis of 3-alkyloxycarbonyl-2,2-dimethyl-(3*S*)-hydroxypropanoic acid.

TABLE 1 Monoesterifications Results

Monoesters	Alcohols	R′	Yield[a] (%)	$[\alpha]_D^{22}$ (°)
5a	$PhCH_2OH$	$—CH_2Ph$	81	−6.05
5b	$CH_3(CH_2)_5OH$	$—(CH_2)_5CH_3$	55	+2.27
5c	$PhCH_2O(CH_2)_3OH$	$—(CH_2)_3—O—CH_2Ph$	74	+6.20
10	$PhCH_2OH$	$—CH_2Ph$	80	+35.80

[a] Isolated after purification by flash chromatography on silica gel.

R_f 0.40. $[\alpha]_D^{22}$: −19.6 (c = 1.07, acetone). FTIR (neat, cm^{-1}) 1756 (C═O ester), 1834 (C═O lactone). ^1H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 1.17 (s, 3H, CH_3), 1.51 (s, 3H, CH_3), 4.96 (s, 1H, CH—O), 5.29 (s, 2H, CH_2—Ph), 7.41 (m, 5H, Ph). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 17.49, 21.60 (2 × CH_3), 58.21 (C), 67.59 (CH_2—Ph), 77.42 (CH—O), 129.14, 129.17, 129.36 (Ph), 167.86, 173.51 (2 × C═O). Anal. calcd for $C_{13}H_{14}O_4$: C, 66.66; H, 6.02. Found: C, 66.41; H, 6.10.

(4R)-Hexyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone 6b

Lactonization Procedure

The reaction of monoester **5b** (1.96 g, 7.97 mmol), with PPh_3 (2.1 g, 7.97 mmol) in THF (27 mL) and DIAD (1.57 mL, 7.97 mmol) in THF (2 mL) has furnished after purification (AcOEt/cyclohexane, 1:9), the lactone **6b** (1.27 g, yield 70%).

R_f 0.42. $[\alpha]_D^{22}$: −26.6 (c = 0.6, acetone). FTIR (neat, cm^{-1}) 1756 (C═O ester), 1839 (C═O lactone). ^1H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 0.90 (t, 3H, J = 7.0 Hz, CH_3—CH_2), 1.25 (s, 3H, CH_3), 1.34 (m, 6H, 3 × CH_2), 1.53 (s, 3H, CH_3), 1.69 (m, 2H, CH_2—CH_2—O), 4.23 (t, 2H, J = 7.0 Hz, CH_2—O), 4.89 (s, 1H, CH—OH). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 14.42 (CH_3—CH_2), 18.02, 22.06 (2 × CH_3), 23.33, 26.35 (2 × CH_2), 29.40 (CH_2), 32.25 (CH_2), 58.41 (CH_2—O), 66.45 (C—C═O), 77.93 (CH), 168.35, 173.97 (2 × C═O). Anal. calcd for $C_{12}H_{20}O_4$: C, 63.14; H, 8.83. Found: C, 62.86; H, 8.61.

(4R)-(3′-Benzyloxypropyl)carbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone 6c

Lactonization Procedure

The reaction of monoester **5c** (390 mg, 1.26 mmol) with PPh_3 (330.5 mg, 1.26 mmol) in THF (10 mL) and DIAD (250 μL) in THF (2 mL) has furnished after purification (AcOEt/cyclohexane, 2:8), the lactone **6c** (290 mg, yield 78%).

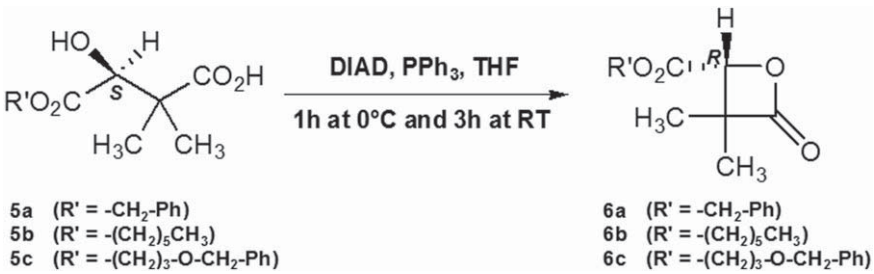
R_f 0.35. $[\alpha]_D^{22}$: −15.2 (c = 1.34, acetone). FTIR (neat, cm^{-1}) 1756 (C═O ester), 1830 (C═O lactone). ^1H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 1.23 (s, 3H, CH_3), 1.50 (s, 3H, CH_3), 1.99 (tt, 2H, J = 6 Hz, CH_2), 3.59 (t, 2H, J = 6 Hz, CH_2—O), 4.36 (t, 2H, J = 6 Hz, CH_2—CO_2), 4.51 (s, 2H, CH_2—Ph), 4.84 (s, 1H, CH—OH), 7.28 (m, 5H, Ph). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 18.18 (CH_3), 22.23 (CH_3), 30.08 (CH_2), 58.61 (C-3), 64.01 (CO_2CH_2), 67.43 (CH_2O), 73.69 (CH_2Ph), 78.14 (CH—O), 128.52, 128.64, 129.38, 140.06 (Ph), 168.45, 174.07 (2 × C═O). Anal. calcd for $C_{16}H_{20}O_5$: C, 65.74; H, 6.90. Found: C, 65.46; H, 7.13.

(4R)-Benzyloxycarbonyl-3-allyl-3-methyl-2-oxetanone 11

Lactonization Procedure

The reaction of monoester **5d** (187 mg, 0.72 mmol) with PPh_3 (189 mg, 0.72 mmol) in THF (10 mL) and DIAD (141 μL, 0.72 mmol) in THF (0.5 mL) has furnished after purification (AcOEt/cyclohexane, 2:8) the lactone **6d** (160 mg, 84% yield).

R_f 0.43. $[\alpha]_D^{22}$: −20 (c = 0.56, acetone). FTIR (neat, cm^{-1}) 1746 (C═O ester), 1845 (C═O lactone). ^1H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 1.50 (s, 3H, CH_3), 2.33 (ddt, 1H, J = 1.2 Hz, J = 8.0 Hz, J = 13.6 Hz, CH_2—CH), 2.42 (ddt, 1H, J = 1.4 Hz, J = 6.8 Hz, J = 13.6 Hz, CH_2—CH), 4.98 (s, 1H, CH—OH), 5.07–5.09 (m, 1H, CH_2═CH), 5.11–5.13 (m, 1H, CH_2═CH), 5.27 (q, 2H, J = 12.1 Hz, CH_2—Ph), 5.70 (dddd, 1H, J = 6.6 Hz, J = 8.0 Hz, J = 10.0 Hz, J = 17.0 Hz; CH═CH_2), 7.40 (m, 5H, Ph).^3C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 19.59 (CH_3), 36.68 (CH_2—CH), 61.35 (C—CH_3), 68.01 (CH_2—Ph), 77.34 (CH—OH), 120.11 (CH_2═CH), 129.53, 129.7, 132.28 (Ph), 136.29 (CH═CH_2), 168.08 (2 × C═O). Anal. calcd for $C_{15}H_{16}O_4$: C, 69.22; H, 6.20. Found: C, 70.69; H, 6.72.



SCHEME 6 Preparation of (4*R*)-alkyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone.

TABLE 2 Lactonizations Results.

Lactones	Yield[a] (%)	$[\alpha]_D^{22}$ (°)	e.e[b] (%)	IR (cm^{-1})	Global Yield (%)
6a	88	−19.6	100	1756; 1834	30
6b	70	−26.6	100	1756; 1839	16
6c	78	−15.2	100	1756; 1830	24
11	84	−20.0	100	1746; 1845	21

[a] Isolated after purification by flash chromatography on silica gel.
[b] Confirmed by ^{1}H NMR and by synthesis of corresponding isotactic homopolymer for lactone **6a**.

Homopolymerization: Synthesis of Poly(benzyl (*S*)-3,3-dimethylmalate) (PDMMLABz)

PDMMLABz was synthesized by anionic ring-opening polymerization of corresponding lactone **6a** in the presence of tetraethylammonium benzoate (10^{-2} equiv per mol monomer) as initiator.

Preparation of the Initiator

An amount of 41.5 mg of tetraethylammonium benzoate $\mathbf{C_6H_5COO^-\ {}^+N(Et)_4}$ (628.10^{-2} mmol, $M = 251$ g mol^{-1}) was put into absolute ethanol freshly distilled on sodium (1.04 mL) to obtain a concentration of 0.159 mol L^{-1}.

The initiator solution (10^{-2} equiv, 6.28 μmol, 40 μL) was then placed in the polymerization flask under nitrogen atmosphere. The ethanol was eliminated under vacuum at room temperature for 1 h. The vacuum was broken under inert atmosphere and the initiator was kept under nitrogen atmosphere. The monomer **6a** (147 mg, 628 μmol) was also kept under N_2 stream for 1 h, dissolved in 5 mL of anhydrous THF and then transferred under N_2 in the polymerization flask containing the initiator. The polymerization was conducted at room temperature for 24 h and was followed by FTIR spectroscopy analysis, which showed the disappearance of the β-lactone band at 1834 cm^{-1} (100% conversion). The homopolymer was dissolved in acetone, neutralized with one drop of acetic acid, purified by precipitation into absolute ethanol, separated, and tried under vacuum. (m = 126 mg).

$[\alpha]_D^{22}$: −16.6° (c 0.6, acetone). $T_g = +41.5$ °C and $T_m = 124.3$ °C. Size-exclusion chromatography (SEC) (HPSEC-MALLS-dRI, acetone): $M_n = 96\ 070$ g mol^{-1}. $M_w = 110\ 400$ g mol^{-1}. $D = 1.15$. FTIR (neat, cm^{-1}) 1756 (C═O ester). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 1.09 (m, 3H, CH_3), 1.17 (m, 3H, CH_3), 5.05 (m, 2H, CH_2), 5.28 (m, 1H, CH), 7.25 (m, 5H, Ph). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 20.46 et 22.23 (2 × CH_3), 45.33 (C), 67.46 (CH_2—O), 76.08 (CH), 128.61, 128.75, 134.96 (Ph), 167.47, 173.07 (2 × C═O).

RESULTS AND DISCUSSION

For the first time, the synthesis of (4*R*)-benzyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone **6a** from (2*S*)−3,3-dimethylmalic acid **4** is the most investigated in this report.

The synthesis of (2*S*)−3,3-dimethylmalic acid **4** started with an esterification in acid conditions of L-(*S*)-malic acid to furnish, after purification by vacuum distillation, chiral (*S*)-diethyl malate **1** in excellent yield (96%).[12] Then, a first methylation, performed with prepared *in situ* lithium diisopropylamide (LDA) at −78 °C in presence of 2 equivalents of methyl iodide, has given chiral (2*S*)-diethyl-3-methylmalate **2** in a good yield (73%) which can be methylated again in the same conditions to obtain (2*S*)-diethyl-3,3-diméthylmalate **3** after purification by chromatography on silica gel (78% yield).[13] Then, this optically active compound **3** was saponified at reflux to obtain, after purification by precipitation in chloroform, diacid **4** with a good yield (77%) (Scheme 4).[14,15] The ^{1}H NMR spectra of **4** confirmed the complete saponification, which has shown the disappearance of peaks corresponding to ethyl ester groups.

Later, from this diacid **4**, the strategy to prepare these new chiral lactones is based on the synthetic way for racemic α,α',β-trisubstituted-β-lactones, already described.[1,2] The (2*S*)-benzyl-3,3-dimethylmalolactonate **6a** represented in Scheme 6 is the first optically active lactone we have

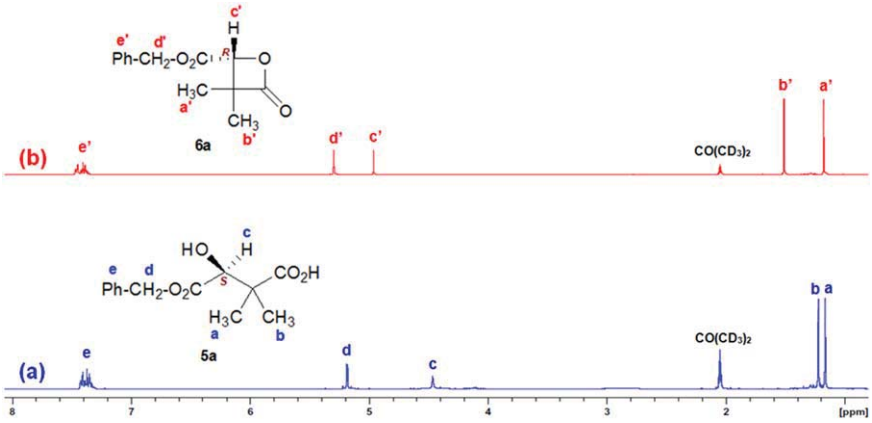
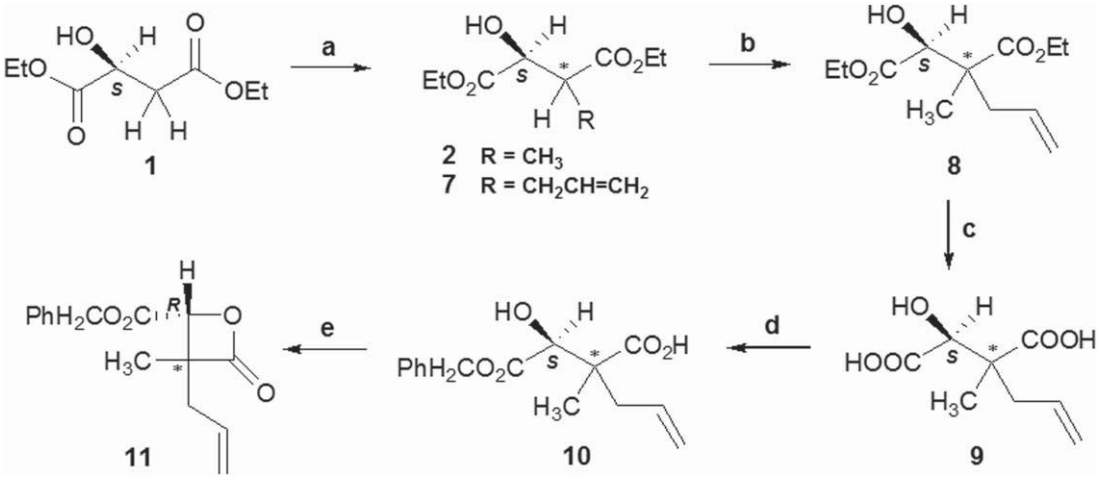


FIGURE 2 ^{1}H NMR spectra of (a) monoester **5a** and (b) corresponding lactone **6a**. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]



SCHEME 7 Synthesis of (4*R*)-benzyloxycarbonyl-3-allyl-3-methyl-2-oxetanone **11**. Reagents and conditions: (a) 1) LDA, THF, −78 °C, 2) CH_3I, −78 °C, 73% or $CH_2{=}CH{-}CH_2{-}Br$, −78 °C, 69%, (b) 1) LDA, THF, −78 °C, 2) CH_3I, −78 °C, 45% or $CH_2{=}CH{-}CH_2{-}Br$, −78 °C, 62% 78%, (c) K_2CO_3, H_2O, 5 h, reflux, 75%, (d) TFAA, $PhCH_2OH$, 30 min at 0 °C and 2 h 30 min at room temperature, 80%, (e) DIAD, PPh_3, THF, 84%.

synthesized. The diacid **4** prepared above was treated by 3.3 equivalents of trifluoroacetic anhydride (TFAA) to provide the nonisolated intermediate cyclic anhydride represented in Scheme 5. After evaporation of TFAA in excess and formed trifluoroacetic acid (TFA) under vacuum at room temperature, the treatment of this intermediate compound with 1 equivalent of benzyl alcohol has led to β-hydroxyacid having very good regiospecificity.[2,16] The presence of triflate group (OTFA) which is very electro-attractive oriented exclusively the attack of different alcohols on the neighboring carbonyl function which was therefore the most deficient in electrons. Thus, this benzylic monoester, namely 3-benzyloxycarbonyl-2,2-dimethyl-(3*S*)-hydroxypropanoic acid **5a**, was obtained with 81% yield (Scheme 5, Table 1). This stage defines the hydrophobic or hydrophilic nature of the repeating unit of the desired polymer by the choice of the different alcohols. Indeed, the carbon aliphatic chain of hexyl group will give a very hydrophobic character to the polymer. The benzyl and benzyloxy groups will provide the acid and neutral hydrophilic character of the polymer, respectively after hydrogenolysis.

For the lactonization, β-lactones were prepared by the activation of either the carboxyl or hydroxyl groups of monoesters. Thus, α,α,β-trisubstituted-β-lactones were synthesized by reaction with diisopropylazodicarboxylate (DIAD) and triphenylphosphine (TPP) according to the Mitsunobu reaction.[17,18] In this reaction, the lactones were obtained via hydroxyl group activation with inversion of configuration of asymmetric carbon atom according to the mechanism, already described on the racemic lactones.[2] Thereby, the benzylic monoester **5a** was treated with TPP (1 equiv) and DIAD (1 equiv) in anhydrous THF as solvent at 0 °C for thirty minutes and at room temperature for 1 h. Then, the lactone was purified by chromatography on silica gel to give **6a** in 88% yield (Scheme 6, Table 2).

Simultaneously, in the aim to supply other physicochemical properties at the polymer, several optically active α,α,β-trisubstituted-β-lactones were prepared from L-(*S*)-malic acid according the same procedure as lactone **6a**: (4*R*)-hexyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone **6b**, (4*R*)-(3-benzyloxypropyl)carbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone **6c**. Therefore, the chiral lactones **6b** and **6c** were synthesized from diacid **4** with hexyl alcohol or 3-benzyloxy-1-propanol respectively in

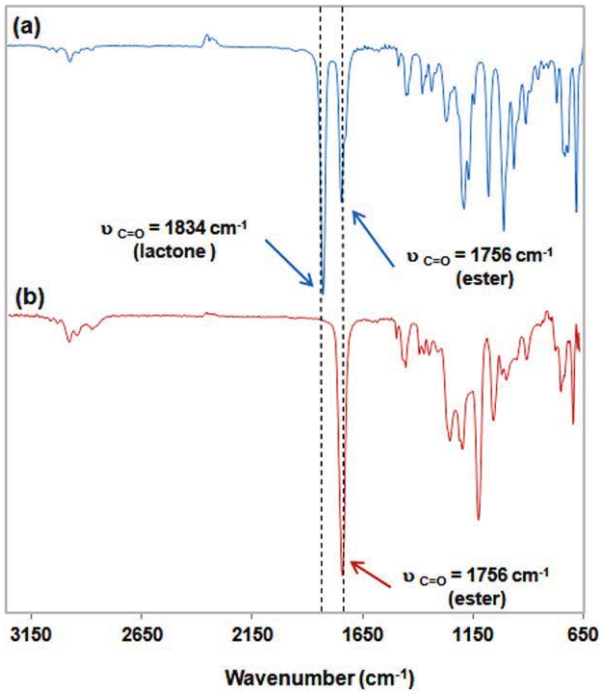


FIGURE 3 FTIR spectra of (a) chiral lactone **5a** and (b) chiral homopolymer PDMMLABz. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

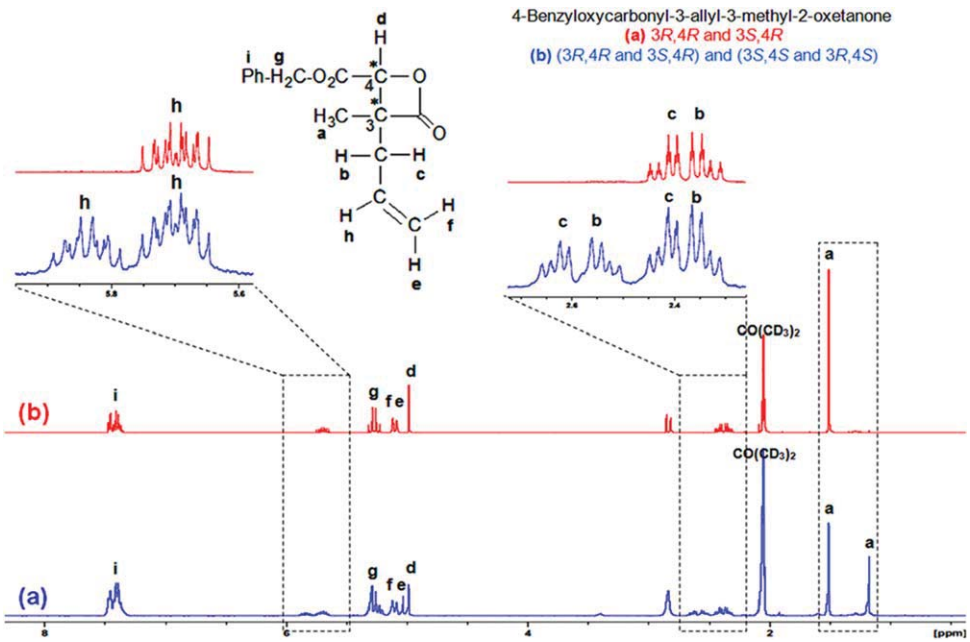


FIGURE 4 ^{1}H NMR spectra of (a) achiral lactone 4-benzyloxycarbonyl-3-allyl-3-methyl-2-oxetanone and (b) chiral lactone (4*R*)-benzyloxycarbonyl-3-allyl-3-methyl-2-oxetanone **11**. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

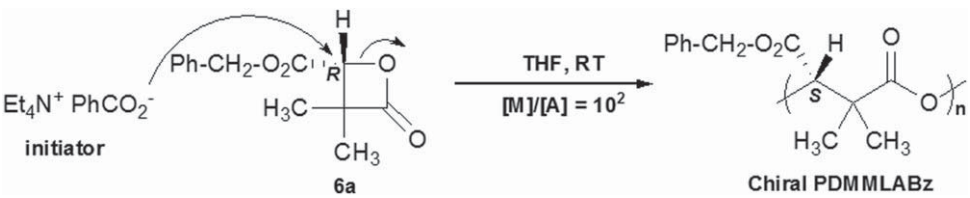
two steps. First, monoesters 3-hexyloxycarbonyl-2,2-dimethyl-(3*S*)-hydroxypropanoic acid **5b** and 3-(3′-benzyloxypropyl)oxycarbonyl-2,2-dimethyl-(3*S*)-hydroxypropanoic acid **5c** were prepared. The following step, the corresponding lactones **6b** and **6c** were obtained with good yield after purification (Schemes 5 and 6). The results are summarized in Tables 1 and 2.

^{1}H NMR analysis of the different lactones **6a**, **6b,** and **6c** displayed two singlets (a′ and b′) corresponding to two methyl groups at about 1 ppm. They are distant of around 0.35 ppm due to the formation of the lactone cycle which prevented their free rotation. Indeed the difference of the two singlets (a and b) corresponding to monoesters was almost zero (about 0.04 ppm) (Fig. 2).

In a second time, the synthesis of one other new lactone **11**, containing two chiral-centers and except two diastereoisomers (*RR* and *RS*): ((3*R*,4*R*)−4-benzyloxycarbonyl-3-allyl-3-methyl-2-oxetanone and (3*R*,4*S*)−4-benzyloxycarbonyl-3-allyl-3-methyl-2-oxetanone)), was carried out using (2*S*)−3-allyl-3-methylmalic acid **9** and benzyl alcohol. The diacid **9** was obtained with 75% yield after saponification from (2*S*)-diethyl-3-allyl-3-methylmalate **8** which can be achieved from two different products: (i) from (2*S*)-diethyl-3-methylmalate **2**, performed with lithium diisopropylamide (LDA) at −78 °C in presence of 2.2 equivalents of allyl bromide (45% yield), (ii) from (2*S*)-diethyl-3-allylmalate **7** in presence of methyl iodide in the same conditions (62% yield). (2*S*)-diethyl-3-allylmalate **7** was prepared by a methylation of **1** in presence of 2 equivalents of allyl bromide (69% yield). The two methods of preparation of **9** gave good yield after purification by chromatography (Scheme 7). Then, monoester 3-benzyloxycarbonyl-2-allyl-2-methyl-(3*S*)-hydroxypropanoic acid **10** and the corresponding lactone (4*R*)-benzyloxycarbonyl-3-allyl-3-methyl-2-oxetanone **11** were successively obtained as describe for other lactones (Scheme 7; Tables 1 and 2). FTIR spectroscopy showed two bands at about 1750 cm^{-1} and 1850 cm^{-1} that are attributed to the ester and lactone functions, respectively for each β-lactone **6a**, **6b**, **6c**, and **11** (Fig. 3).

The presence of allyl group will chemically modify the corresponding homopolymer.

Specifically, we have first used the ^{1}H NMR spectroscopy to confirm the enantiomeric purity of these new optically active lactones. For this reason, we have compared ^{1}H spectral data of lactone **11** with this corresponding racemic



SCHEME 8 Synthesis of stereoregular homopolyester PDMMLABz.

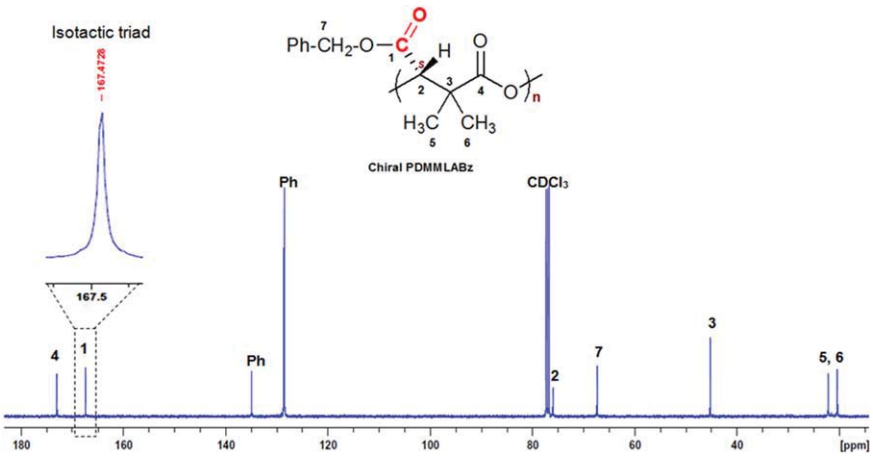


FIGURE 5 ^{13}C NMR spectra for chiral PDMMLABz. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

lactone. Thus, we have decided to synthesize a molecule containing a crude mixture of four stereoisomers lactones ((3*R*,4*R*)−4-benzyloxycarbonyl-3-allyl-3-methyl-2-oxetanone; (3*R*,4*S*)−4-benzyloxycarbonyl-3-allyl-3-methyl-2-oxetanone; (3*S*,4*S*)−4-benzyloxycarbonyl-3-allyl-3-methyl-2-oxetanone; and (3*S*,4*R*)−4-benzyloxycarbonyl-3-allyl-3-methyl-2-oxetanone) which was prepared from the starting racemic diethyloxalpropionate using procedure reported in literature.[2] The relative configurations in diastereoisomeric pairs *RR* and *RS*, and *SS* and *SR* were assigned based on ^{1}H NMR spectral data. In parallel, enantiomeric excess of diastereoisomeric pairs 3*R*,4*R* and 3*S*,4*R* of lactone **11** was also estimated based on ^{1}H NMR spectral data. In the case of lactone **11**, ^{1}H NMR spectrum showed a single resonance at 1.50 ppm (methyl group), while for two diastereoisomeric pairs 3*R*,4*R* and 3*S*,4*R*, and 3*S*,4*S* and 3*R*,4*S* we observed the appearance of the two signals at 1.17 and 1.50 ppm with a 40:60 ratio indicating that the enantiomeric excess of our lactone **11** was 100%. Signals at 2.38 and 2.58 ppm (CH_2 allyl group), and 5.70 and 5.83 ppm (CH allyl group) gave the similar information (Fig. 4).

Finally, four chiral lactones with *R* absolute configuration were successfully obtained with a global yield which can vary between 15% and 30% (Table 2). Interestingly, the preparation of their corresponding isotactic homopolyesters will be performed by anionic ring-opening polymerization of corresponding monomers lactones and led to 100% isotactic and semicrystalline polymers with the presence of only (*S*)-repeating units in the polymer skeleton. These results would confirm also the 100% enantiomeric excess of the different synthesized lactones.

Therefore, a first approach for the development of these polymers was the synthesis of the chiral benzylic homopolymer PDMMLABz from the corresponding chiral lactone **6a** as

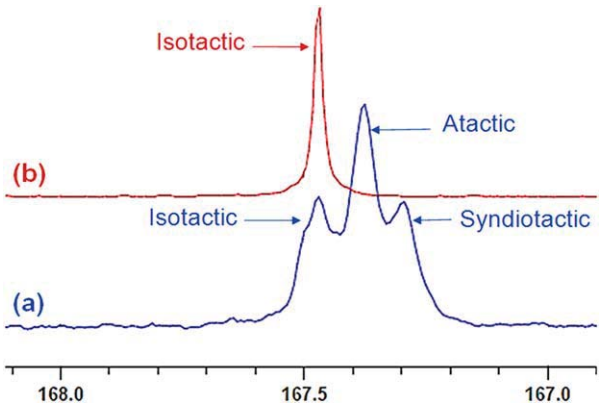


FIGURE 6 ^{13}C NMR spectra of C=O signals of lateral ester groups of (a) atactic PDMMLABz and (b) isotactic PDMMLABz. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

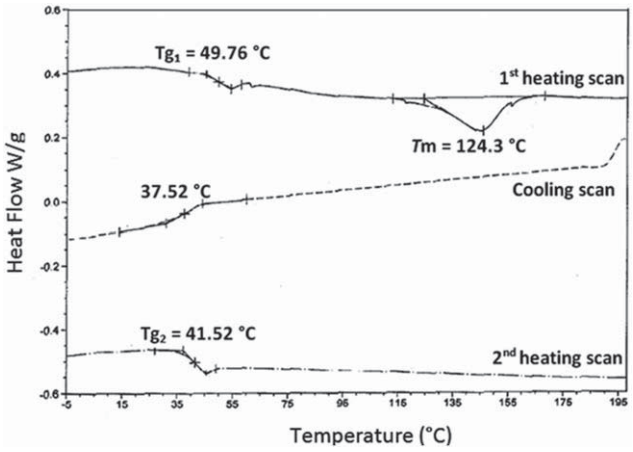


FIGURE 7 First and second DSC heating and First DSC cooling scans for chiral PDMMLABz.

described in the experimental section using tetraethylammonium benzoate as initiator with 100% conversion (Scheme 8).[19] Homopolymer was characterized by ^{1}H- and ^{13}C NMR, DSC, and SEC. Signals at 5.29 and 7.41 ppm on ^{1}H NMR spectrum confirmed the presence of benzyl group. ^{13}C NMR spectroscopy was used to identify the stereoregularity of the homopolyester.[19] The carbonyl peak around 167 ppm is a particularly sensitive and effective signal which provides the stereo information. In case of observation of three peaks, the racemic polymer is present, indicating atactic fragments in the polymer chain corresponding to isotactic, syndiotactic, and atactic triads. If only a single peak is visible, it can be identified as chiral polymer, representing syndiotactic or isotactic polymer.[20–23]

TABLE 3 Characterization of Chiral Homopolymer PDMMLABz.

Polymer	M_{nTh} (g mol^{-1})	M_n (g mol^{-1})[a]	M_w (g mol^{-1})[a]	D[a]	T_g (°C)[b]	T_m (°C)[b]	$[\alpha]_D^{22}$ (°)
Chiral PDMMLABz	23,400	96,070	110,400	1.15	41.5	124.3	−16.6
Racemic PDMMLABz[c]	23,400	27,840	29,760	1.07	39.1	–	–

M_{nTh} = theoretical M_n.
[a] HPSEC-MALLS-dRI in acetone, 0.5 min.
[b] Determined by DSC in the second heating.
[c] Synthesized and characterized in the same conditions that chiral PDMMLABz.

As mentioned in Figure 5, PDMMLABz showed only one fine peak due to the exclusive isosequence corresponding to isotactic triad (SSS) at 167.47 ppm which has been assigned by comparison with amorphous PDMMLABz that showed one triplet corresponding to syndiotactic triad (SRS and RSR) at 167.34 ppm, atactic triad (RRS and SSR) at 167.40 ppm and isotactic triad (SSS and RRR) at 167.47 ppm (Fig. 6).[19] This isotacticity was confirmed by DSC, which showed a melting temperature $T_m = 124.3$ °C. DSC analysis data provided also a glass transition temperature $T_g = 41.5$ °C from a second heating cycle at a heating rate of 10 °C min^{-1}. This high T_g value explain the rigidity of aromatic group in the lateral chain of benzylic homopolymer, which causes over restriction for rotating the substituent along the polymer backbone (Fig. 7).

Theoretical molecular weights can be determinate by molar ratio of monomer to initiator [M]/[A]. The amorphous and nonstereoregular homopolyester PDMMLABz provided a molecular weight that was well correlated with theoretical values indicating the control of the polymerization (Table 3). Indeed, for chiral stereoregular homopolyester PDMMLABz, a high molecular weight (twice fold higher than expected value) with a very good molar mass distribution value ($D = 1.15$) was observed (Fig. 7; Table 3). Contrary to amorphous PDMMLABz, isotactic macromolecular chains organize themselves in crystalline zones which are not isolated, and that explains the high molecular weight value. This observation is consistent with the less solubility of polymer in acetone over time.

CONCLUSIONS

In summary, we have successfully synthesized four new monomers that presented different groups: benzylic, benzyloxypropylic and hexylic goup exhibiting in their main-chain, either two methyl groups or methyl and allyl groups with 100% purity. The polymerization of the benzylic lactone provided the corresponding isotactic and semicrystalline homopolyester with high reactivity and high molecular weight. Accordingly, this study presents an interesting and promising way to enrich the chemistry/biology field by the preparation of a large number of optically active α,α',β-trisubstituted-β-lactones with 100% enantiomeric excess and therefore their corresponding chiral homopolyesters or statistical and block copolyesters adapted according to the biomedical application.

REFERENCES AND NOTES

1 C. Barbaud, M. Guerrouache, P. Guérin, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 9513–9515.

2 C. Barbaud, F. Abdillah, F. Faÿ, M. Guerrouache, P. Guérin, *Design. Monom. Polym.* **2003**, *6*, 353–367.

3 H. Y. Tian, Z. H. Tang, X. L. Zhuang, X. S. Chen, X. B. Jing, *Prog. Polym. Sci.* **2011**, *37*, 237–280.

4 K. Fu, D. W. Pack, A. M. Klibanov, R. Langer, *Pharmaceutical Res.* **2000**, *17*, 100–106.

5 M. Vert, P. Guérin. Biomaterials Degradation; M. A. Barbosa, Ed.; Elsevier: Amsterdam; Oxford: New York/Tokyo, **1991**, pp. 35.

6 C. Barbaud, F. Faÿ, F. Abdillah, S. Randriamahefa, P. Guérin, *Macromol. Chem. Phys.* **2004**, *205*, 199–207.

7 C. T. Goodhue, E. E. Snell. *Biochemistry* **1966**, *5*, 403–408.

8 M. Vert, S. M. Li, G. Spenlehauer, P. Guerin, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1992**, *3*, 432–446.

9 F. E. Kohn, J. W. A. Vandenberg, G. Vanderidder, J. Feijen, *J. Appl. Polym. Sci.* **1984**, *29*, 4265–4277.

10 H. Adkins, H. R. Billica. *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, *70*, 3121–3125.

11 M. Friedkin, A. L. Lehninger. *J. Biol. Chem.* **1947**, *169*, 183.

12 S. G. Cohen, Z. Neuwirth, S. Y. Weinstein, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 5306–5315.

13 P. Dowd, S.-C. Choi, F. Duah, C. Kaufman, *Tetrahedron* **1988**, *44*, 2137–2148.

14 P. Coutrot, C. Grison, R. Sauvetre, *J. Organometallic Chem.* **1987**, *332*, 1–8.

15 W. Grell, H. Machleidt, *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1966**, *699*, 53–67.

16 M. J. Miller, J. S. Bajwa, P.G. Mattingly, K. Peterson, *J. Org. Chem*. **1982**, *47*, 4928–4933.

17 O. Mitsunobu, *Synthesis 1981*, **1981**, 1.

18 J. Mulzer, G. Brüntrup, A. Chucholowski, *Angew. Chem. Int. Ed*. **1979**, *18*, 622–623.

19 F. Ouhib, S. Randriamahefa, P. Guerin, C. Barbaud. *Des. Monom. Polym*. **2005**, *8*, 25.

20 J. E. Kemnitzer, S. P. McCarthy, R. A. Gross, *Macromolecules* **1993**, *26*, 1221–1229.

21 Y. Hori, T. Hagiwara, *Int. J. Biol. Macromol*. **1999**, *25*, 237–245.

22 M. Arcana, O. Giani-Beaune, F. Schue, W. Amass, A. Amass, *Polym. Int*. **2000**, *49*, 1348–1355.

23 M. Allmendinger, R. Eberhardt, G. A. Luinstra, B. Rieger, *Macromol. Chem. Phys*. **2003**, *204*, 564–569.

Synthesis and Characterizations of New Isotactic Homopolyesters, Statistical and Block Copolyesters Derived of Poly((*S*)-3,3-Dimethylmalic Acid) via the Lactone Route

Rima Belibel,[1] Imadeddine Azzouz,[2] Christel Barbaud[1]

[1]INSERM U1148, Laboratory for Vascular Translational Science (LVTS), Institut Galilée, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, 99 Avenue Jean-Baptiste Clément, Villetaneuse F-93430, France
[2]Laboratory ESYCOM EA2552, Université Paris-Est Marne La Vallée (UPEM), ESIEE Paris, 2 Boulevard Blaise Pascal, Noisy-le-Grand F-93162, France
Correspondence to: C. Barbaud (E-mail: barbaud@univ-paris13.fr)

Received 15 September 2015; accepted 15 November 2015; published online 00 Month 2015
DOI: 10.1002/pola.27997

ABSTRACT: This article presents the synthesis of a new family of synthetic isotactic polyesters derived from poly((*S*)-3,3-dimethylmalic acid) (PDMMLA). These polyesters are prepared via the lactone route bearing functionalized groups in its main or side chain. The aim of this work is twofold: metabolism and stereochemistry. First, the synthesis of these new polyesters is chosen to provide biodegradable polyesters biocompatible and bioassimilable by the human body. Next, the molecular chain of this family contains a stereogenic center in the aim to provide 100% isotactic homopolymers and copolymers (statistical and block). Finally, these polymers have been characterized by several analytical techniques: FTIR, ^{1}H and ^{13}C NMR, SEC, DSC, and TGA. The greatest importance will be given to the ^{13}C NMR and DSC to principally confirm the stereoregularity and crystallinity of these stereopolyesters. © 2015 Wiley Periodicals, Inc. J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem. **2015**, *00*, 000–000

KEYWORDS: poly((S)-3,3-dimethylmalic acid); functionalized and amphiphilic polyesters; stereoregularity; isotacticity

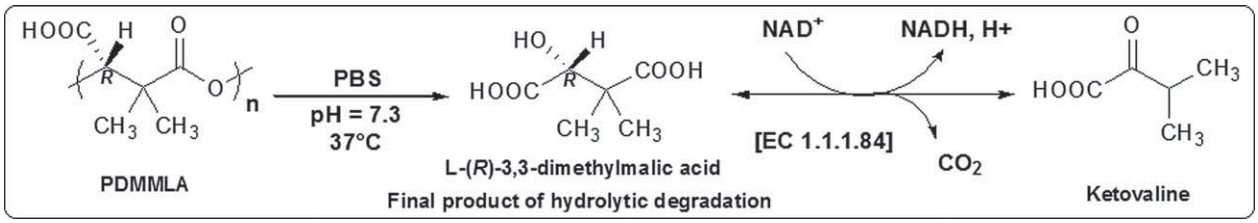
INTRODUCTION To complement and satisfy the broad field of biomedical requirements, it was important to develop new and designed synthetic polymers with a wide range of chemical, physical, and mechanical properties. Stereoregular polymers for chiral recognition are only at its beginning. For the synthetic stereopolymers, the chirality leads to supramolecular structures and makes easier the creation of highly crystalline materials. Indeed, the presence of chiral centers in the polymer repeating unit plays a key role to control the configurational and conformational structure of polymers and hence their morphology, solubility, and biodegradability.[1,2]

Although these chiral polymers like poly(lactic acid) (PLA) or polyhydroxyalkanoates (PHA) have been commonly used in the biomedical domain as biomaterials, surgical implants, medical devices, and drug delivery systems, they exhibit many advantages in comparison to achiral polymers.[3,4] In addition to these properties, PLA and PHA can be prepared by chemical or biological synthesis routes, respectively, with the presence of only (*R*)-repeating units in the skeleton for PHA and (*R*)- or (*S*)-repeating units for PLA with a biodegradable architecture.[5,6]

Among this class of polymers, poly(malic acid) includes a chiral center in the macromolecular repeating unit and a reactive group in the side chain. Unlike the aforementioned polymers, this parent polyester can undergo several chemical modifications. Many reactions are conceivable; it can hold an alkyl pendant group, lateral functional groups as an unsaturated bond, or an ester function which may be chemically modified. The ester function can be transformed to carboxylic acid group for coupling with bioactive molecules, hydrophilic oligomers, targeting protein, and macromolecular drugs.[7,8] In addition, they can have more sophisticated groups such as menthyl, adamantyl, cholesteryl, and lactic acid oligomers.[9–11]

This functionalized polyester can be prepared according to different routes starting from racemic or optically active malic acid[12] or aspartic acid[13] by chemical or biological synthesis routes. Optically active stereocopolymers of malic acid are accessible starting from L- or D-aspartic acid enantiomers[14] or L- or D-malic acid enantiomers[13] as chiral precursors. Our interest in this area prompted us to present, in this article, the chemical preparation of a new family of

© 2015 Wiley Periodicals, Inc.



SCHEME 1 Biosynthesis of ketovaline by β,β-dimethyldehydrogenase (EC.1.1.1.84).

synthetic and isotactic poly((*S*)-3,3-dimethylmalic acid) starting from L-(*S*)-malic acid.

The two major forces in this work are the chirality and the metabolism. This new degradable polymer was selected for its final degradation product for making compatible polymers with the living species from their use until their complete degradation.[15] Indeed, as mentioned earlier that it is possible to take the advantage of chiral center to control the structure of polymer and therefore their properties. It is also possible to start from biomolecules related to malic acid. The chiral diacid (*R*)-3,3-dimethylmalic acid coming from the hydrolytic degradation of isotactic poly((*R*)-3,3-dimethylmalic acid) is a natural and nontoxic compound that is present in the biosynthesis of pantothenate. This molecule appears in the synthesis of Coenzyme A catalyzed by the enzyme β,β-dimethyldehydrogenase (EC.1.1.1.84) to give ketovaline (Scheme 1).[16] Moreover, in the literature, the hydrolysis of atactic poly((*R*,*S*)-3,3-dimethylmalic acid) gave the corresponding (*R*,*S*)-3,3-dimethylmalic acid.[16,17]

Anionic ring-opening polymerization of chiral α,α,β-trisubstituted-β-lactones leads to a large family of semicrystalline and isotactic poly((*R*)-3,3-dimethylmalic acid) derivatives having lateral functional group with high molecular weight (Scheme 2).

The ultimate step of the monomer synthesis is a ring closure, leading to various chiral α,α,β-trisubstituted-β-lactones without any racemization. These lactones are easily prepared in two steps from diacid, synthesized from commercial L-(*S*)-malic acid in four stages.[18]

Moreover, the R group will be benzyl (Bz), benzyloxypropyl (Bn), or hexyl (He) group. These groups have been selected for two objectives: chemical modifications and adjustment of the hydrophilic/hydrophobic balance of polyesters. Indeed, benzylic and benzyloxypropylic groups are used for their protective role. After a catalytic hydrogenolysis in the presence of palladium on charcoal on the polyester, it is possible to obtain respectively carboxylic acid and alcohol functions (Scheme 2).

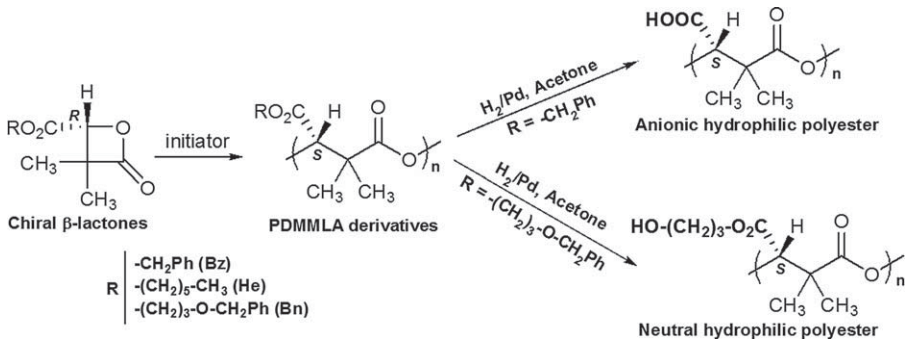
However, these ionic and noncharged polyesters will be used on one hand for their hydrophilic properties and on the other hand for allowing chemical modifications and reacting with bioactive or targeting molecules.[7,8,19] The hexylic group is interesting for its hydrophobic properties which give access to a wide variety of amphiphilic statistical and block copolymers.

The main objective of this study is the synthesis and the characterization of these new stereoregular polyesters. Thanks to several characterization methods such as Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), proton (^{1}H NMR) and carbon (^{13}C NMR) nuclear magnetic resonance spectroscopy, and size-exclusion chromatography (SEC), polymerization reactions and polymers' chemical structure were confirmed. ^{13}C NMR is widely used to establish stereoregularity of newly synthesized polymers. Thereafter, differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetric analysis (TGA) are utilized to confirm their semicrystallinity and study their thermal properties.

EXPERIMENTAL

General Details

All optical rotation $[\alpha]_D$ (°) data were determined using Biot's law: $\alpha = [\alpha]_D\ \ell c$. The observed optical rotation α is measured. The specific optical rotations of different products were taken at the intervals 21–25 °C and 0.6–1.3 mg/mL in



SCHEME 2 Anionic ring-opening polymerization of chiral α,α,β-trisubstituted-β-lactones and envisaged catalytic hydrogenolysis of benzylic and benzyloxypropylic groups of PDMMLAs.

acetone, by using Bellingham and Stanley Ltd ADP410 High Accuracy polarimeter (units for *[α]*, *c*, and *ℓ*, usually deg cm^3 g^{-1} dm^{-1}, g cm^{-3}, and dm, respectively and $\ell = 1$ dm). The absolute average molecular weights and molecular weight distributions were determined at room temperature by coupling online a high-performance size exclusion chromatograph (HPSEC), a multiangle laser light scattering detector (MALLS), a viscometer, and a differential refractive index (dRI) detector. Acetone, used as carrier, was filtered through a 0.1 μm filter unit (Millipore, Billerica, USA), carefully degassed (DGU-20A3R Shimadzu, Kyoto, Japan), and eluted at a 0.5 mL/min flow rate (LC10Ai Shimadzu, Kyoto, Japan). One hundred microliters of a 0.2 μm-filtered sample solution (at about 20 mg/mL) were injected with an automatic injector (SIL-20A HT Shimadzu, Kyoto, Japan). The column packing was a polystyrene-divinylbenzene gel. The MALLS photometer, a miniDawn TREOS from Wyatt Technology Inc. (Santa Barbara, CA, USA), was provided with a fused silica cell and a Ga-As laser ($\lambda = 665.8$ nm). The whole collected data, light scattering (LS), dRI were analyzed using the Astra v6.0.6 software package. Molar mass were obtained with the Zimm order 1 method. The concentration of each eluted fraction was determined with dRI (RID10A Shimadzu, Kyoto, Japan) according to the measured values of dn/dc (0.097 mL/g in acetone and 0.05 mL/g in THF).[20] All melting (T_m), crystallization (T_c), and glass transition (T_g) temperatures of different polymers were obtained using differential scanning calorimetry DSC Q2000. In a typical run, polymers were first put in the furnace and heated from −60 to 200 °C by means of a temperature ramp of 10 °C/min. This operation was repeated twice. T_g was determined from the inclination point of the second heating curve except for the block copolymer **P5** which was determined from the first heating curve. T_m and T_c were taken from the maximum of the endothermic peak in the first heating run. Thermogravimetric analysis data were obtained with a TGA Q50 at a heating rate of 10 °C/min under N_2 atmosphere. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on BRUKER AM-400 MHz spectrometer using $CDCl_3$ as solvent and with the residual solvent signals as internal standard unless otherwise indicated. Chemical shifts were given in parts per million (δ) and coupling constants in Hertz. The following abbreviations are used to describe the peak pattern: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quadret), and m (multiplet). IR spectra were recorded on AVATAR 370 TF-IR Thermo Nicolet spectrometer using Nicolet OMNI-Sampler ATR Smart Accessory (Ge, DTGS). Adsorption bands are given in cm^{-1}. Anhydrous THF was distilled on sodium-benzophenone. Absolute EtOH was employed without purification for the polymers precipitation and distilled over sodium for the preparation of the initiator solutions. All polymerization reactions were performed in anhydrous THF under nitrogen atmosphere. All the glass apparatus were kept one night in a drying-oven at 100 °C.

Polymers Preparation

Homopolymers and copolymers were synthesized by anionic ring-opening polymerization of corresponding monomers lactones in the presence of tetraethylammonium benzoate (10^{-2} equiv per mol monomer) as initiator.

Initiator Preparation

Tetraethylammonium benzoate $\mathbf{C_6H_5COO^-\ {}^+N(Et)_4}$ (40 mg, $M = 251$ g/mol) were put into 0.5 mL of absolute ethanol freshly distilled to obtain a concentration of 80 g/L.

Homopolymers Synthesis

General Procedure

The initiator solution was placed in the polymerization flask under nitrogen atmosphere. The ethanol was eliminated under vacuum at room temperature for 1 h. The vacuum was broken under inert atmosphere and the initiator was kept under nitrogen atmosphere. The β-lactone monomer was kept under N_2 stream in anhydrous THF (2 mL for 0.4 mmol of monomer) for 1 h and then transferred under N_2 in the polymerization flask containing the initiator. The polymerization was conducted overnight at room temperature. The homopolymerization was followed by FTIR spectroscopy analysis, which showed the disappearance of the β-lactone band at 1850 cm^{-1} (100% conversion). The homopolymer was dissolved in acetone, neutralized with a drop of acetic acid, purified by precipitation into absolute ethanol, separated, and dried under vacuum.

Poly(Benzyl (S)-3,3-Dimethylmalate) (PDMMLABz) P1

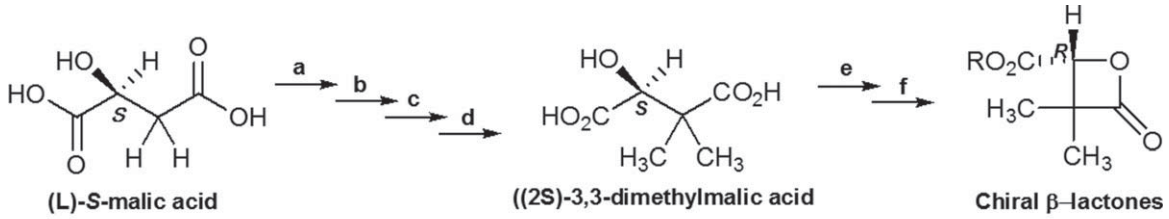
Homopolymer **P1** was synthesized from the monomer β-lactone (4*R*)-benzyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone (278 mg, 1.18 mmol) in the presence of tetraethylammonium benzoate (10^{-2} equiv, 11.86 μmol, 148 μL) as initiator. ($m = 275$ mg). $[\alpha]^{22}{}_D$: −16.6° (c 0.6, acetone). $T_g = +41.5$ °C and $T_m = 124.3$ °C. SEC (HPSEC-MALLS-dRI, THF): $M_n = 176{,}500$ g/mol. $M_w = 177{,}900$ g/mol. $D = 1.008$. FTIR (neat, cm^{-1}) 1756 (C═O ester). ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 1.09 (m, 3H, CH_3), 1.17 (m, 3H, CH_3), 5.05 (m, 2H, CH_2), 5.28 (m, 1H, CH), 7.25 (m, 5H, Ph). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 20.46 and 22.23 (2 × CH_3), 45.33 (C), 67.46 (CH_2–O), 76.08 (CH), 128.61, 128.75, and 134.96 (Ph), 167.47 and 173.07 (2 × C═O).

Poly(Hexyl (S)-3,3-Dimethylmalate) (PDMMLAHe) P2

Homopolymer **P2** was synthesized from the monomer β-lactone (4*R*)-hexyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone (122 mg, 533 μmol) in the presence of tetraethylammonium benzoate (10^{-2} equiv, 5.33 μmol, 67 μL) as initiator. ($m = 120$ mg). $[\alpha]^{22}{}_D$: −47.3° (c 0.8, acetone). $T_g = -9.1$ °C and $T_m = 158.2$ °C. SEC (HPSEC-MALLS-dRI, THF): $M_n = 111{,}200$ g/mol. $M_w = 111{,}700$ g/mol. $D = 1.004$. FTIR (neat, cm^{-1}) 1756 (C═O ester). ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 0.86 (m, 3H, $\underline{CH_3}$–CH_2), 1.26 (m, 9H, CH_3, 3 × CH_2), 1.40 (m, 3H, CH_3), 1.59 (m, 2H, CH_2), 4.10 (m, 2H, CH_2–O), 5.38 (m, 1H, CH). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 14.05 ($\underline{C}H_3$–CH_2), 19.89 (CH_3), 22.58 ($\underline{C}H_2$–CH_3) 23.00 (CH_3), 25.42, 28.50, and 31.39 (3 × CH_2), 45.42 (C), 65.94 (CH_2–O), 76.07 (CH), 167.70, and 173.10 (2 × C═O).

Poly(Benzyloxypropyl (S)-3,3-Dimethylmalate) (PDMMLABn) P3

Homopolymer **P3** was synthesized from the monomer β-lactone (4*R*)-(3′-benzyloxypropyl)carbonyl-3,3-dimethyl-2-



SCHEME 3 Chiral β-lactones synthesis route.[18]

oxetanone (297 mg, 1.01 mmol) in the presence of tetraethylammonium benzoate (10^{-2} equiv, 10.16 μmol, 127 μL) as initiator ($m = 290$ mg). $[\alpha]^{22}{}_{D}$: +12.8° (c 0.8, acetone). $T_g = +0.3$ °C and $T_c = 170.9$ °C. SEC (HPSEC-MALLS-dRI, THF): $M_n = 68\ 500$ g/mol. $M_w = 70{,}900$ g/mol. $D = 1.035$. FTIR (neat, cm^{-1}) 1756 (C=O ester). ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 1.23 (s, 3H, CH_3), 1.36 (s, 3H, CH_3), 1.89 (tt, 2H, $J = 6$ Hz, CH_2), 3.49 (*t*, 2H, $J = 6$ Hz, CH_2–O), 4.26 (*t*, 2H, $J = 6$ Hz, CH_2–CO_2), 4.47 (s, 2H, C$\underline{H}_2$–Ph), 5.33 (s, 1H, C$\underline{H}$–OH), 7.29 (m, 5H, Ph). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 29.03 (CH_3), 31.08 (CH_3), 45.39 (CH_2), 63.28 (C), 66.45 ($CO_2\underline{C}H_2$), 73.14 (CH_2O), 76.17 (CH_2Ph), 77.36 (CH–O), 127.75, 127.94, 128.52, 129.71, 138.34 (Ph), 167.60, and 173.17 (2 × C=O).

Poly(Benzyloxypropyl (R,S)-3,3-Dimethylmalate) (PDMMLABn′) P3′

Homopolymer **P3′** was synthesized from the monomer β-lactone *(R,S)*-(3′-benzyloxypropyl)carbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone (518 mg, 1.77 mmol) in the presence of tetraethylammonium benzoate (10^{-2} equiv, 17.7 μmol, 222 μL) as initiator ($m = 512$ mg). $T_g = -9.0$ °C. SEC (HPSEC-MALLS-dRI, THF): $M_n = 25\ 425$ g/mol. $M_w = 25\ 757$ g/mol. $D = 1.013$. FTIR (neat, cm^{-1}) 1746. ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 1.24 (m, 6H, 2 × CH_3), 1.93 (m, 2H, CH_2), 3.54 (m, 2H, CH_2–O), 4.27 (s, 2H, CH_2–CO_2), 4.49 (s, 2H, C$\underline{H}_2$–Ph), 5.39 (m, 1H, CH), 7.28 (m, 5H, Ph). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3COCD_3, δ ppm): 28.94 (2 × CH_3), 45.24 (CH_2), 62.97, 63.11 (C), 66.44 ($CO_2\underline{C}H_2$), 73.05 (CH_2O), 76.15, 76.35 (CH_2Ph), 77.35 (CH–O), 127.84, 128.23, 129.05, 129.80, 138.27 (Ph), 167.49, 167.54, 167.60 (C=O), 173.02, 173.09, 173.17 (C=O).

Statistical Copolymer Synthesis

Poly(Benzyl (S)-3,3-dimethylmalate-co-Hexyl (S)-3,3-Dimethylmalate) (PDMMLABz$_{50}$-co-He$_{50}$) P4

Statistical copolymer **P4** was synthesized from monomers (4*R*)-benzyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone (104 mg, 444 μmol) and (4*R*)-hexyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone (101.5 mg, 444 μmol,) in the presence of tetraethylammonium benzoate as initiator. The initiator solution was placed in the polymerization flask under nitrogen atmosphere (10^{-2} equiv, 8.89 μmol, 112 μL). The ethanol was eliminated under vacuum at room temperature for 1 h. The vacuum was broken under inert atmosphere and the initiator was kept under nitrogen atmosphere. The mixture of the two lactones in anhydrous THF (5 mL) was kept under N_2 stream for 1 h and then transferred under N_2 in the polymerization flask containing the initiator. The polymerization was conducted overnight at room temperature and followed by FTIR spectroscopy analysis, which showed the disappearance of the β-lactone band at 1850 cm^{-1} (100% conversion). Statistical copolymer **P4** was dissolved in acetone, neutralized with a drop of acetic acid, purified by precipitation into absolute ethanol, separated, and dried under vacuum ($m = 229$ mg). $[\alpha]^{22}{}_{D}$: −3.9° (c 1.3, acetone). $T_g = +12.2$ °C. SEC (HPSEC-MALLS-dRI, THF): $M_n = 233{,}300$ g/mol. $M_w = 252{,}700$ g/mol. $D = 1.083$. FTIR (neat, cm^{-1}) 1750 ester. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 0.86 (m, 3H, C$\underline{H}_3$–CH_2), 1.16 (m, 18H, 4 × CH_3, 3 × CH_2), 1.57 (m, 2H, CH_2), 4.06 (m, 2H, CH_2–C$\underline{H}_2$–O), 5.09 (m, 2H, Ph–C$\underline{H}_2$–O), 5.27 (m, 2H, 2 × CH), 7.28 (m, 5H, Ph). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 14.05 ($\underline{C}H_3$–CH_2), 19.48 and 20.21 (2 × CH_3), 22.56 ($\underline{C}H_2$–CH_3), 25.41 (CH_2), 25.54 (CH_3), 28.46, 31.01 and 31.37 (3 × CH_2), 45.34 (2 × C), 65.88 (CH_2–$\underline{C}H_2$–O), 67.48 (Ph–$\underline{C}H_2$–O), 76.06 (2 × CH), 128.59, 128.74, and 134.94 (Ph), 167.49, 167.63, and 173.05 (4 × C=O).

Block Copolymer Synthesis

Poly(Benzyl (S)-3,3-dimethylmalate-b-Hexyl (S)-3,3-Dimethylmalate) (PDMMLABz$_{50}$-b-He$_{50}$) P5

Block copolymer **P5** was synthesized from monomers (4*R*)-benzyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone and (4*R*)-hexyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone in the presence of tetraethylammonium benzoate as initiator. The initiator solution was placed in the polymerization flask under nitrogen atmosphere (10^{-2} equiv, 13.4 μmol, 168 μL). The ethanol was eliminated under vacuum at room temperature for 1 h. The vacuum was broken under inert atmosphere and the initiator was kept under nitrogen atmosphere. A solution of (4*R*)-benzyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone (157 mg, 670 μmol) in anhydrous THF (3 mL) was transferred under N_2 in the polymerization flask containing the initiator. The polymerization was conducted overnight at room temperature. A sample of the solution was analyzed by FTIR spectroscopy to control the total conversion of the first β-lactone. A solution of (4*R*)-hexyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone (153 mg, 670 μmol) in anhydrous THF (0.4 mL) was added to the precedent solution and the polymerization was conducted overnight at room temperature and followed by FTIR spectroscopy analysis, which showed the disappearance of the second lactone band at 1834 cm^{-1} (100%

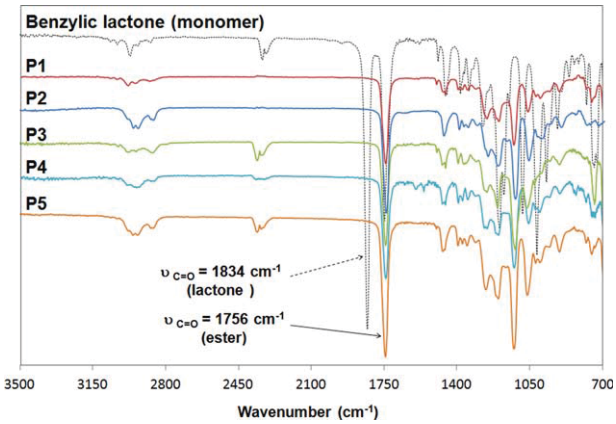


FIGURE 1 FTIR spectra of chiral benzylic lactone and different chiral PDMMLAs. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

conversion). The polymerization was stopped by neutralization with a drop of acetic acid. The solution was poured dropwise in absolute ethanol to precipitate the block copolymer **P5**. It was then separated and dried under vacuum ($m = 301$ mg). $[\alpha]^{22}_{D}$: $-22.7°$ (c 0.9, acetone). $T_{g1} = -3.3$ °C, $T_{g2} = +49.2$ °C and $T_m = 131.8$ °C. SEC (HPSEC-MALLS-dRI, THF): $M_n = 164{,}100$ g/mol. $M_w = 168{,}300$ g/mol. $D = 1.025$. FTIR (neat, cm^{-1}) 1756 ester. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 0.86 (m, 3H, $C\underline{H}_3$–CH_2), 1.27 (m, 18 H, 4 × CH_3, 3 × CH_2), 1.59 (m, 2H, CH_2), 4.05 (m, 2H, –CH_2–$C\underline{H}_2$–O), 5.05 (m, 2H, Ph–$C\underline{H}_2$–O), 5.28 (m, 1H, CH), 5.39 (m, 1H, CH), 7.27 (m, 5H, Ph). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 14.05 ($\underline{C}H_3$–CH_2), 19.87, and 20.44 and 22.26 (3 × CH_3), 22.58 ($\underline{C}H_2$–CH_3), 23.02 (CH_3), 25.42 (CH_3), 28.50, 31.03, and 31.39 (3 × CH_2), 45.34 and 45.42 (2 × C), 65.95 (CH_2–$\underline{C}H_2$–O), 67.46 (Ph–$\underline{C}H_2$–O), 76.07 (2 × CH), 128.60, 128.74, and 134.97 (Ph), 167.47, 167.70, 173.07, and 173.10 (4 × C=O).

RESULTS AND DISCUSSION

On one hand, chiral poly((*S*)-3,3-methylmalic acid) derivatives (chiral PDMMLAs: **P1**, **P2**, **P3**, **P4**, and **P5**) were prepared from corresponding chiral α,α,β-trisubstituted-β-lactones. To highlight the formation of the various chiral monomers α,α,β-trisubstituted, a very convenient route in six steps that was described in a previous work was remade (Scheme 3).[18]

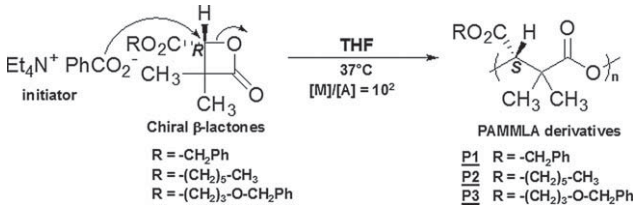
Three chiral β-lactones were prepared for this aim: (4*R*)-benzyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone (benzylic lactone), (4*R*)-hexyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone (hexylic lactone), and (4*R*)-(3′-benzyloxypropyl)carbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone (benzyloxypropylic lactone). The ^{1}H NMR analysis of these lactones was consistent with their structures. FTIR spectra showed two bands at 1756 and 1834 cm^{-1} that are attributed to the ester and lactone functions, respectively, for each β-lactone. The chiral benzylic, hexylic, and benzyloxypropylic lactones contain one stereogenic center with only *R* stereochemical configuration. The chiral center of the main chain of homopolymers and copolymers preparing with these lactones have only *S* stereochemical configuration.

With these new chiral β-lactones in hand, the polymerization of these stereoregular homopolyesters and copolyesters was carried out as described in the experimental section by living anionic ring-opening polymerization of corresponding monomers using tetraethylammonium benzoate (10^{-2} equivalent per mol monomer) as initiator.[18] Each polymer is characterized by ^{1}H and ^{13}C NMR, size-exclusion chromatography (SEC), and differential scanning calorimetry (DSC). For all

TABLE 1 Characterization of Chiral and Racemic Homopolymers and Copolymers

Polymer			M_{nTh} (g/mol)	M_n (g/mol)[a]	M_w (g/mol)[a]	D[a]	T_g (°C)[b]	T_m (°C)[b]	T_c (°C)[b]	$[\alpha]^{22}_{D}$ (°)
Chiral PDMMLA	Homopolymers	P1	23.400	176 500	177 900	1.008	+41.5	124.3	-	−16.6
		P2	22.800	111 200	111 700	1.004	−9.1	158.2	-	−47.3
		P3	29.200	68 500	70 900	1.035	+0.3	-	170.9	+12.8
	Statistical copolymer	P4	23.010	233 300	252 700	1.083	+12.2	-	-	−3.9
	Block copolymer	P5	23.010	164 100	168 300	1.025	−3.3, +49.2	131.8	-	−22.7
Racemic PDMMLA	Homopolymers	P1′	23.400	27 840	29 760	1.068	+39.1	-	-	-
		P2′	22.800	19 789	21 283	1.075	−14.2	-	-	-
		P3′	29.200	25 425	25 757	1.013	−9.0	-	-	-
	Statistical copolymer	P4′	23.010	23 244	27 811	1.196	+19.3	-	-	-
	Block copolymer	P5′	23.010	19 543	31 105	1.591	−0.1, +44.2	-	-	-

M_{nTh} = theoretical M_n.
[a] HPSEC-MALLS-dRI in acetone for racemic PDMMLAs and in THF for chiral PDMMLAs, 0.5 min.
[b] Determined by DSC, T_m and T_c in the first heating and T_g in the second heating.



SCHEME 4 Synthesis of stereoregular homopolyesters.

polymers, the conversion is complete after approximately 24 h confirmed with the disappearance of the lactone band at 1834 cm^{-1} in FTIR spectroscopy analysis (Fig. 1).

After dissolution in acetone and precipitation in ethanol, high molecular weights with a very good molar mass distribution value (D) close to unity were observed. Theoretical molecular weights can be determined by molar ratio of monomer to initiator $[M]/[A]$ (Table 1).

Initially, stereoregular homopolymers **P1** (PDMMLA-Bz), **P2** (PDMMLA-He), and **P3** (PDMMLA-Bn) are prepared from the corresponding chiral benzylic, hexylic, and benzyloxypropylic lactones, respectively (Scheme 4).

Chemical shifts at 5.28 and 7.20 ppm in ^{1}H NMR analysis were assigned to the $-CH_2$ benzylic group of **P1** [Fig. 2(a)] and those at 0.86, 1.26, 1.59, and 4.10 ppm were attributed to hexylic group of **P2** [Fig. 2(b)].

Figure 3 showed also ^{1}H NMR signals at 1.89, 3.49, 4.26, 4.47, and 7.29 ppm that indicated the presence of benzyloxypropylic group of **P3** [Fig. 3(a)].

Then, statistical and block copolyesters were prepared from two different lactones (benzylic and hexylic lactones) to obtain the polymers **P4** [Scheme 5(a)] and **P5** [Scheme 5(b)], respectively. They were purified by precipitation in ethanol.

Thus, the presence in the lateral chain of benzylic and hexylic ester groups in the ratio 50:50 was confirmed by ^{1}H NMR comparing the peak integrals assigned to the different comonomers. Indeed, the integration ratio of peak at 4.10 ppm corresponding to $-CH_2-O-$ hexyl is equivalent to that of the $-CH_2-O-$ benzyl at 5.20 ppm. Therefore, the proportion of the benzylic and the hexylic units in the copolymers was the same as that of the lactones monomers feed (Fig. 4). The absence of benzoate end group signal in ^{1}H NMR is explained by the polyesters high molecular weight.

On the other hand, racemic poly((*R*,*S*)-3,3-dimethylmalic acid) (racemic PDMMLAs: **P1′**, **P2′**, **P3′**, **P4′**, and **P5′**) were synthesized from corresponding racemic α,α,β-trisubstituted-β-lactones. The synthesis and the characterization of **P1′**, **P2′**, **P4′**, and **P5′** were previously demonstrated in the literature,[21] whereas the homopolymer **P3′** has been made for the first time in this article. The synthesis details are described above in the experimental section. In order to do so, three racemic β-lactones were prepared: benzylic, hexylic, and benzyloxypropylic (named 4-benzyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone, 4-hexyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone, and 4-(3′-benzyloxypropyl)carbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone, respectively). Indeed, the P3′ structure was confirmed by ^{1}H NMR. Signals at 1.93, 3.54, 4.27, and 4.49 and 7.20 ppm indicated the presence of benzyloxypropylic group of **P3′** [Fig. 3(b)]. This family of racemic PDMMLAs was synthesized in this article for comparison raison, to confirm the stereoregularity of stereoregular corresponding PDMMLAs. Table 1 showed their characterization data.

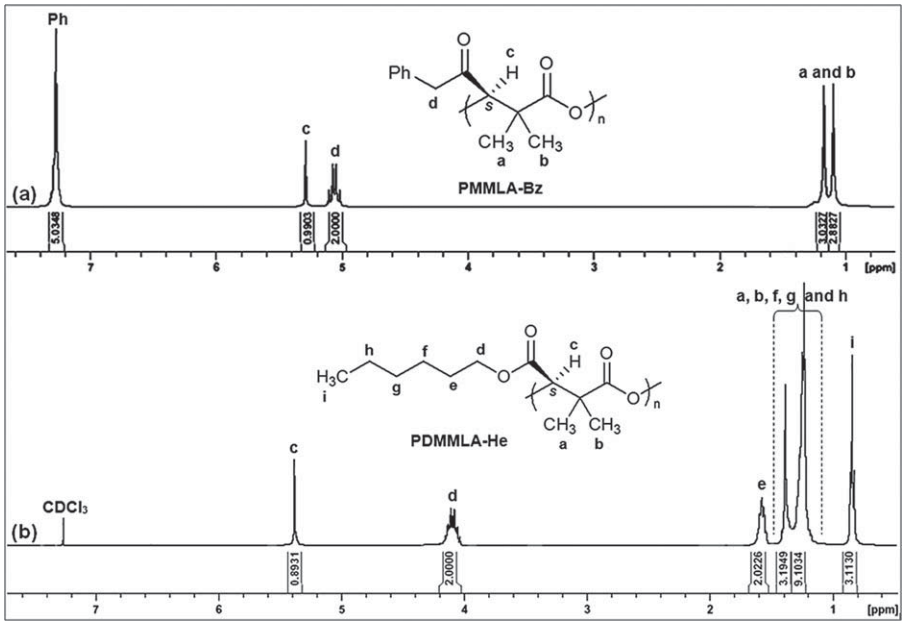


FIGURE 2 ^{1}H NMR spectra of chiral homopolymers (a) PDMMLA-Bz **P1** and (b) PDMMLA-He **P2**.

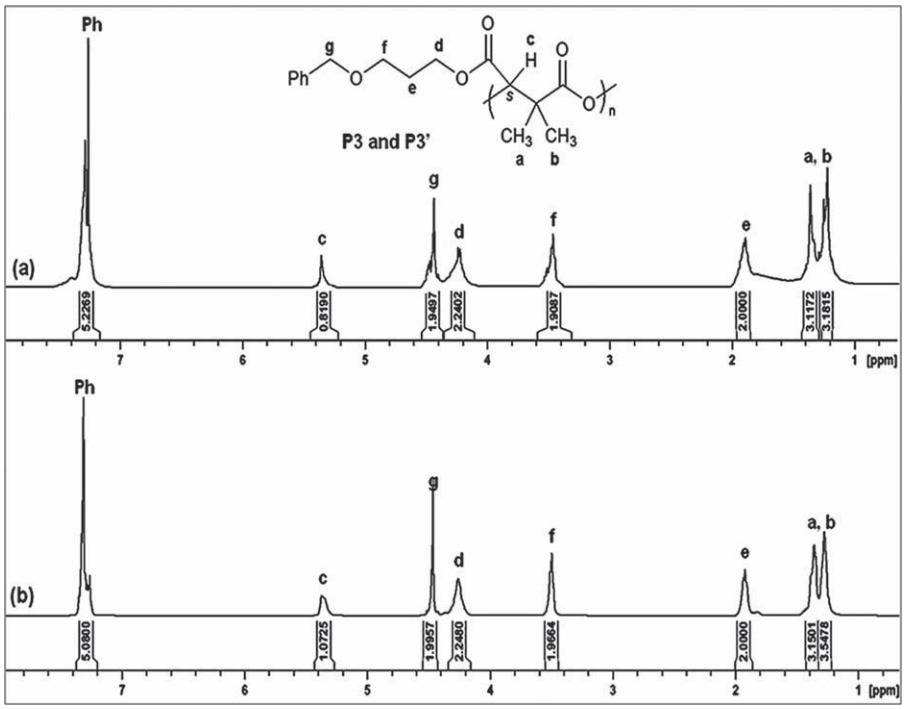


FIGURE 3 ^{1}H NMR spectra of (a) chiral homopolymer PDMMLA-Bn **P3** and (b) racemic homopolymer PDMMLA-Bn′ **P3′**.

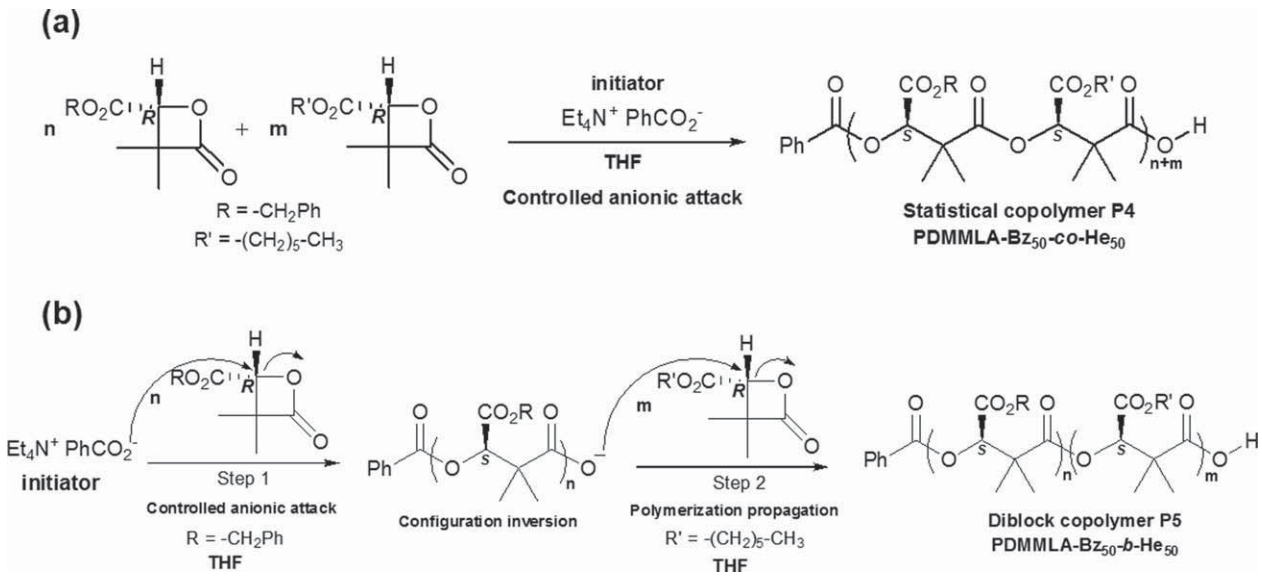
Regioregularity

α,α,β-trisubstituted β-lactones bear two methyl groups in the α-position. The absence of hydrogen atom in the α-position avoids transfer by H abstraction and, therefore, side reactions.[22–24]

Stereoregularity

Numerous reports appear in the literature where ^{13}C NMR spectroscopy was used to identify the stereoregularity of the polyester.[25–27] The carbonyl peak around 167 ppm is a particularly sensitive and effective signal, which provides the stereo information.[28–30] In case of observation of three peaks, the racemic polymer is present, indicating atactic fragments in the polymer chain corresponding to isotactic, syndiotactic, and heterotactic triads. The ratio of the signals indicates the ratio of atactic and isotactic or syndiotactic fragments in the polymer chain. If only a single peak is visible, it can be identified as chiral polymer, representing syndiotactic or isotactic polymer.[31]

The above synthetic methodology of stereoregular PDMMLA was quite convenient and efficient. Thus, obtaining racemic and chiral PDMMLAs in hand and comparing carbonyl peak



SCHEME 5 Synthesis of stereoregular (a) statistical copolyester **P4** and (b) block copolyester **P5**.

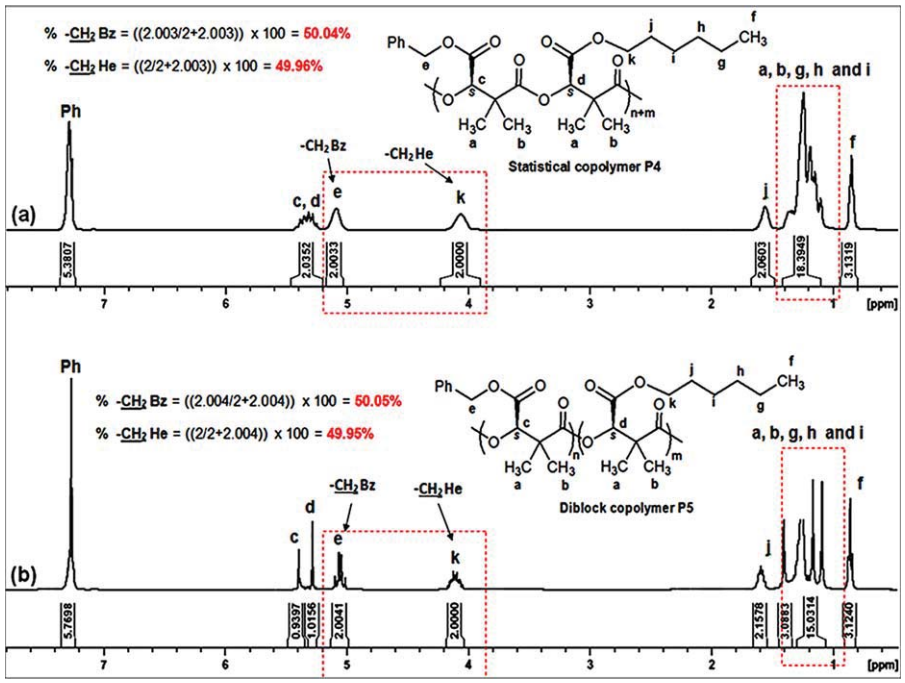


FIGURE 4 ^{1}H NMR spectra of chiral copolymers (a) statistical PDMMLA **P4** and (b) block PDMMLA **P5**. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

around 167 ppm corresponding to stereopolymers with data obtained from a series of racemic triads, we were able to confirm the isotacticity of stereoregular PDMMLA and accurately attribute the isotactic or syndiotactic sequence peaks for racemic PDMMLAs. To this end, Figure 5 shows the ^{13}C NMR spectra of different stereoregular PDMMLAs.

However, the carbonyl peak around 167 ppm for PDMMLA polymers showed one triplet corresponding to isotactic (i),

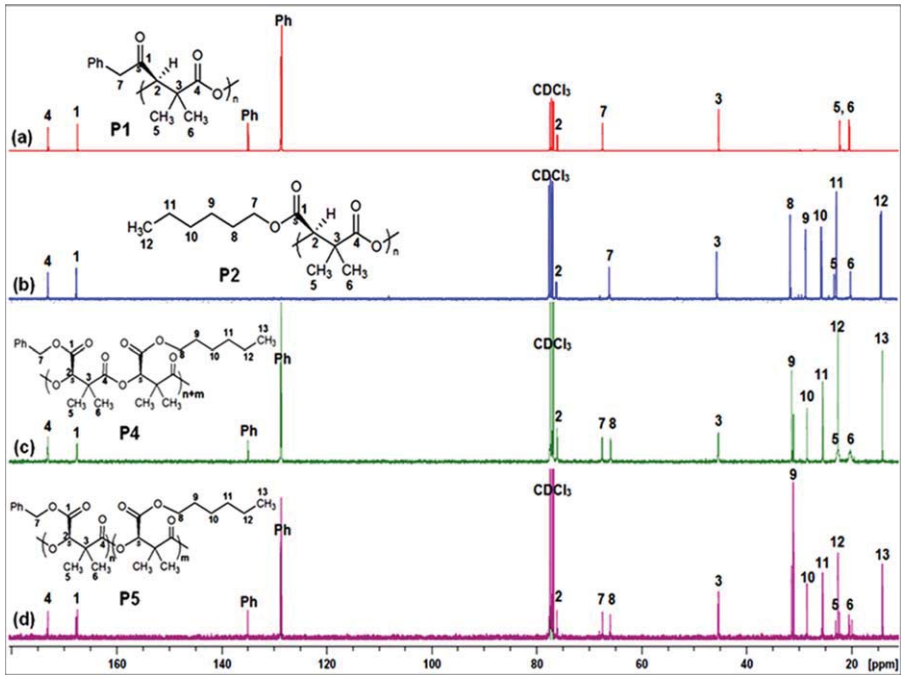


FIGURE 5 ^{13}C NMR spectra of chiral homopolymers (a) PDMMLABz **P1** and (b) PDMMLAHe **P2**, chiral statistical copolymer (c) PDMMLABz$_{50}$-*co*-He$_{50}$ **P4**, and chiral block copolymer (d) PDMMLABz$_{50}$-*b*-He$_{50}$ **P5**. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

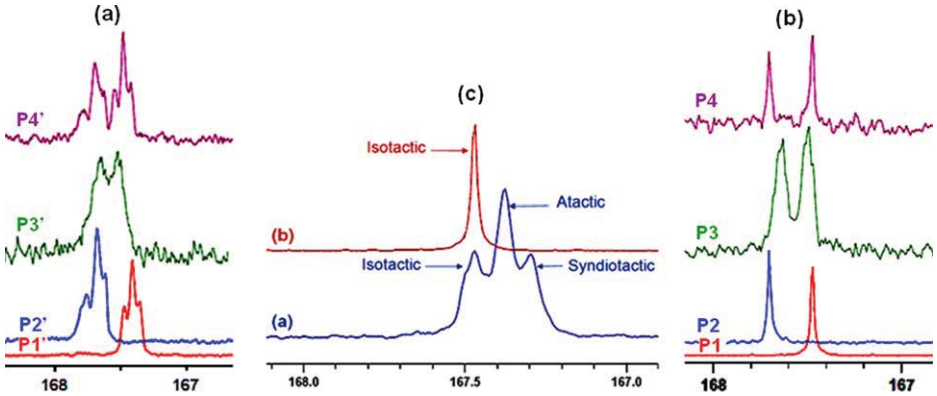


FIGURE 6 ^{13}C NMR spectra of C=O signals of lateral ester groups of (a) atactic PDMMLAs (**P1**′, **P2**′, **P4**′, and **P5**′), (b) isotactic PDMMLAs (**P1**, **P2**, **P4**, and **P5**), and (c) atactic PDMMLA-Bz **P1**′ and isotactic PDMMLA-Bz **P1** showing the distribution of the three triads. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

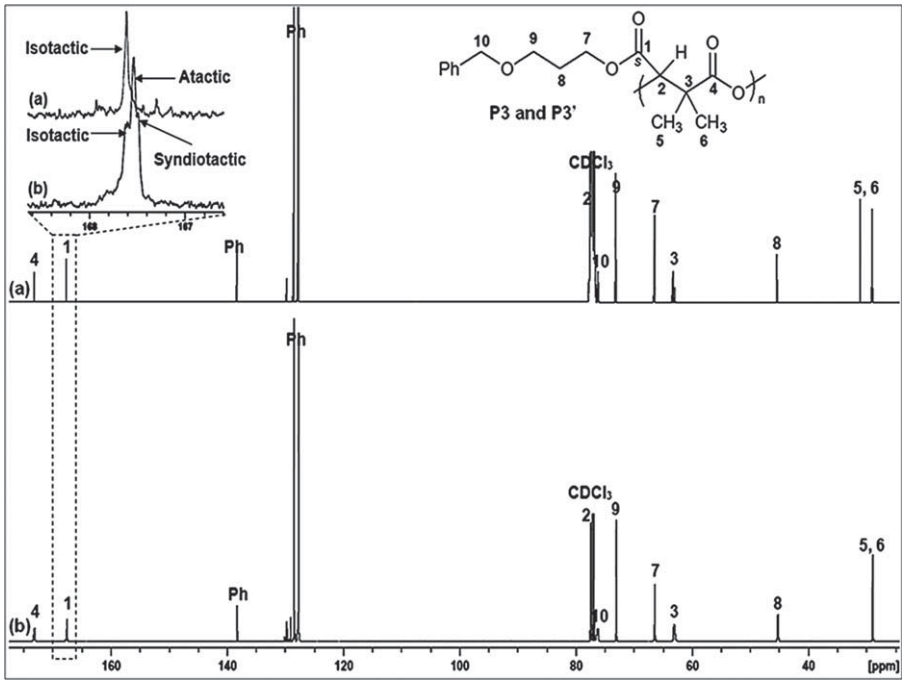


FIGURE 7 ^{13}C NMR spectra of homopolymers (a) isotactic PDMMLA-Bn **P3** and (b) racemic PDMMLA-Bn′ **P3**′.

syndiotactic (s), and atactic triads (a) in the case of homopolymers. In the case of copolymer, only one triplet corresponding to the two units which are undifferentiated (statistical copolymer) and two well-defined triplets corresponding to the two units that presented exactly the same chemical shifts of the two homopolymers (block copolymer))

TABLE 2 Attribution of the Different Triads Sequence Peaks of Different PDMMLAs

		Chiral PDMMLAs			Racemic PDMMLAs		
	Polymers	P1	P2	P3	P1′	P2′	P3′
Triads	Isotactic (%)[a]	100	100	100	25	27	32
	Atactic (%)[a]	/	/	/	53	54	50
	Syndiotactic (%)[a]	/	/	/	22	19	18

[a] Determined by ^{13}C NMR.

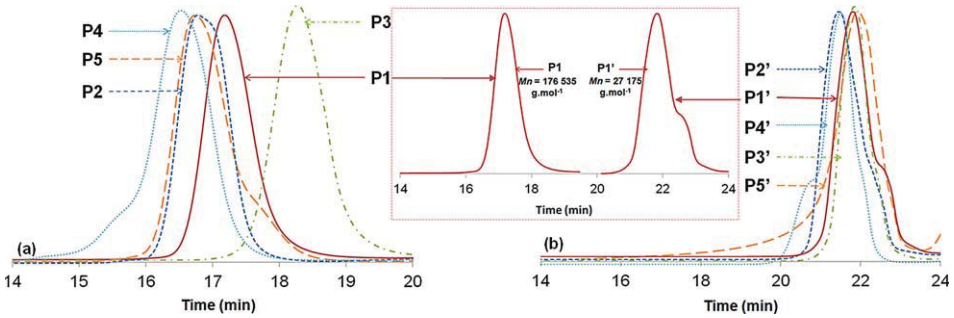


FIGURE 8 SEC curves of (a) chiral PDMMLAs (**P1**, **P2**, **P3**, **P4**, and **P5**) and (b) racemic PDMMLAs (**P1**′, **P2**′, **P3**′, **P4**′, and **P5**′). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

[Fig. 6(a)].[21] As mentioned in Figure 6(b), all stereoregular PDMMLAs showed only one fine peak due to the exclusive isosequence[32] corresponding to isotactic triad (i) which has been assigned by comparison with corresponding atactic PDMMLAs presented in Figure 5(c). Indeed, the chemical shift of the two homopolymers is slightly different. The isotactic triad of hexylic homopolymer **P2** (167.70 ppm) is the most deshielded as isotactic triad of benzylic homopolymer **P1** (167.47 ppm) that is exactly what has been observed with corresponding atactic homopolymers **P2**′ and **P1**′ (Fig. 7).

Furthermore, for statistical chiral copolymer **P4**, we observe the presence of two *peaks* which were *not really* distinct (167.49 and 167.63 ppm) because of their distribution in the polymer structure in a random manner. However, chiral block copolyester **P5** presents two well-defined peaks (167.47 and 167.70 ppm) having the same chemical shifts of

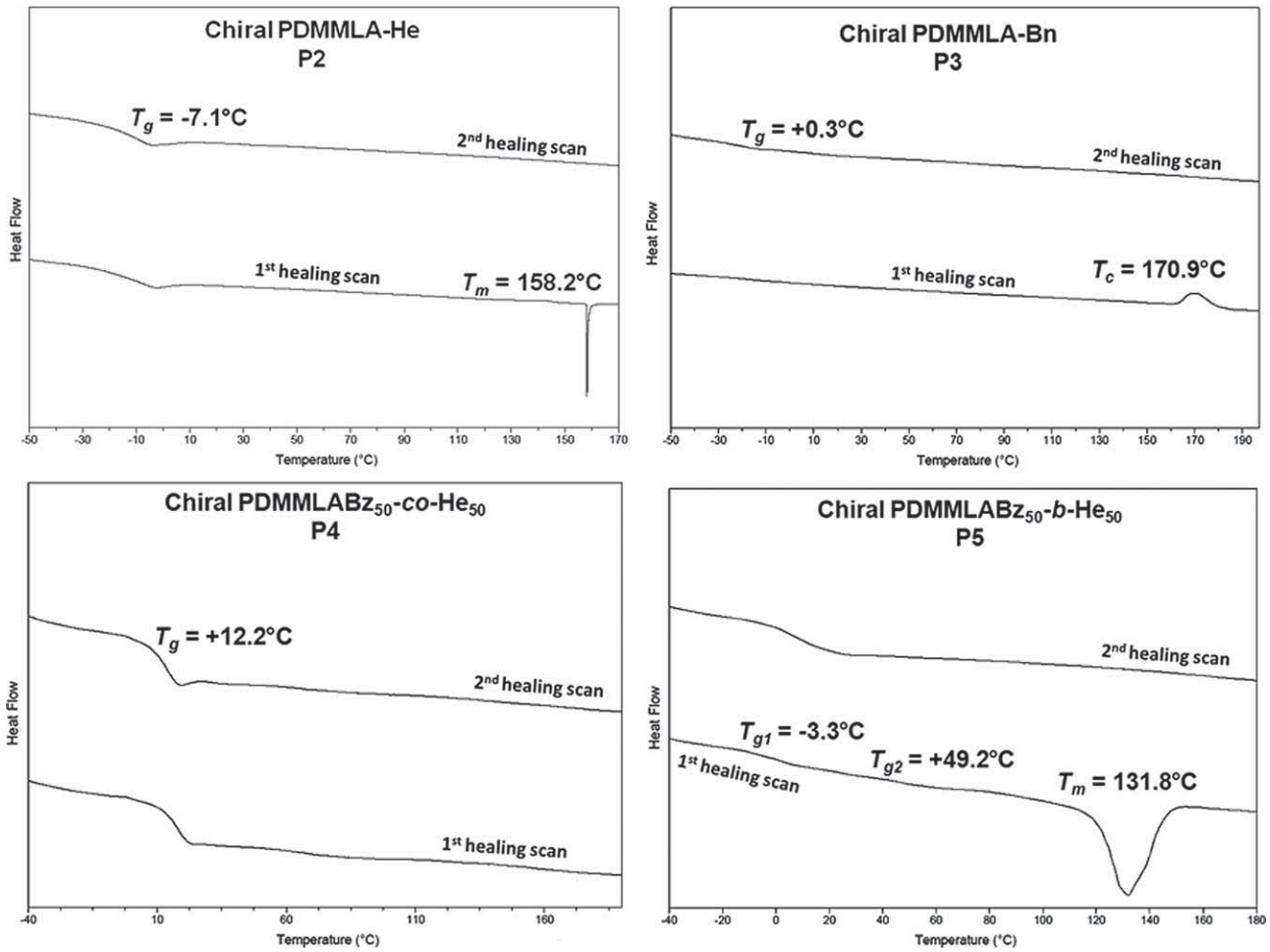


FIGURE 9 First and second DSC heating scans for chiral PDMMLAs (**P2**, **P3**, **P4**, and **P5**).

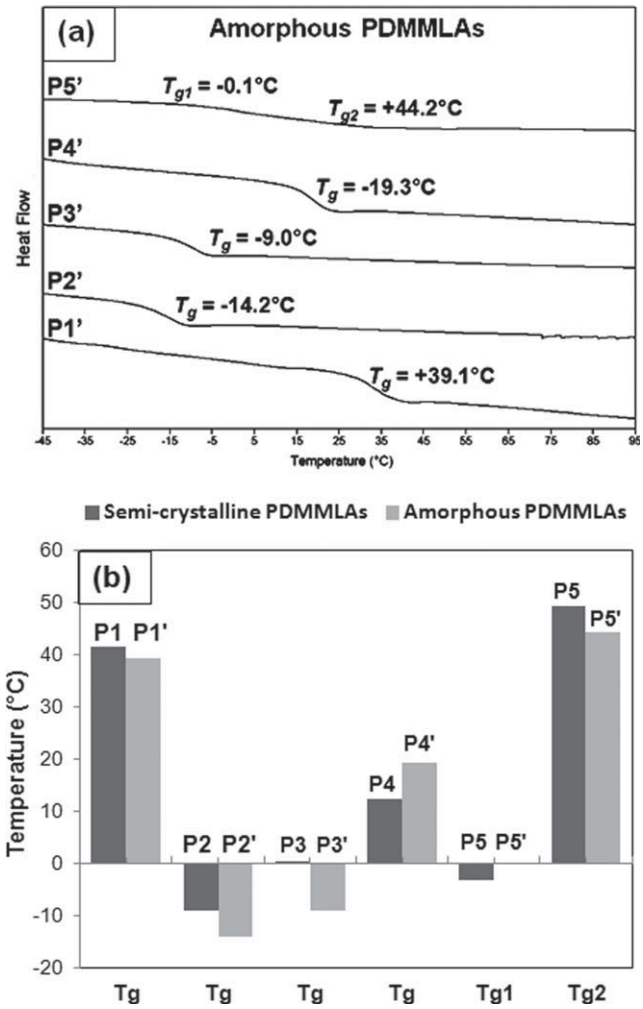


FIGURE 10 (a) Second DSC heating scans for racemic PDMMLAs (**P1**′, **P2**′, **P3**′, **P4**′, and **P5**′) and (b) comparison of T_g values for all chiral PDMMLAs and corresponding racemic PDMMLAs.

isotactic homopolymers triads **P1** and **P2**. There are also the same results observed with the corresponding atactic homopolymers **P4**′ and **P5**′ (Fig. 6).

Figure 7 showed ^{13}C NMR spectra of chiral and racemic benzyloxypropylic homopolymers (PDMMLA-Bn **P3** [Fig. 7(a)] and PDMMLA-Bn′ **P3**′ [Fig. 7(b)], respectively). Homopolymer **P3** afforded only one singlet which can be evidently assigned to isotactic triad by comparison with corresponding atactic PDMMLA-Bn′ **P3**′ which also presents the three triads (isotactic (i), syndiotactic (s), and atactic (a)).

These different data allowed to confirm on one hand the structure and isotacticity of chiral homopolyesters (**P1**, **P2**, and **P3**), statistical and block copolymers (**P4** and **P5**, respectively) obtained by anionic ring-opening polymerization of optically active α,α,β-trisubstituted β-lactones. Second, these data also settled the question of when the synthesis of atactic PDMMLA from racemic α,α,β-trisubstituted β-lactones, a mixture of isotactic, syndiotactic, and atactic sequences in polymer chain is rather observed. We can now accurately attribute the different triads sequence peaks of atactic PDMLLAs. Table 2 showed different triad percentages of all atactic and chiral PDMMLAs homopolymers. It showed that all chiral homopolymers are 100% isotactic and that atactic triad of all atactic PDMMLAs homopolymers is mainly formed (Table 2).

This relative narrowness of the resonance peaks of chiral PDMMLAs is in favor of the presence of only one stereosequence of monomer units. This result confirms also the formation of optically active β-lactones presented in another paper with 100% enantiomeric excess. It is already known from the literature that "*ring-opening polymerization of poly[(R) or (S)-benzyl β-malate] with configuration inversion of the asymmetric carbon* $\underline{C}$*–CO*$_2$*R of the β-lactone without any racemization of this carbon and with the formation of a carboxylate growing chain end*"[33] proves the absolute configuration (*S*) of asymmetric carbon of isotactic polyesters as mentioned before.

Molecular Weights

Absolute molecular weights were measured by size-exclusion chromatography in THF coupled with triangle laser-light scattering. Theoretical molecular weights can be determinate by molar ratio of monomer to initiator [*M*]/[*A*]. In the case of all stereoregular PDMMLAs, all values were found at least twofold higher than expected values with a very good molar mass distribution value obtained between 1.004 and 1.083 for all chiral PDMMLAs (Table 1 and Fig. 8). This observation is consistent with the less solubility of polymer in acetone over time in contrary to amorphous PDMMLAs. Indeed, the chiral macromolecules organize themselves in crystalline zones and are not isolated, which explains the high molecular weight values. At the same time, the amorphous and nonstereoregular corresponding PDMMLAs provided a molecular weight that was well correlated with theoretical values indicating the control of the polymerization (Table 1 and Fig. 8).

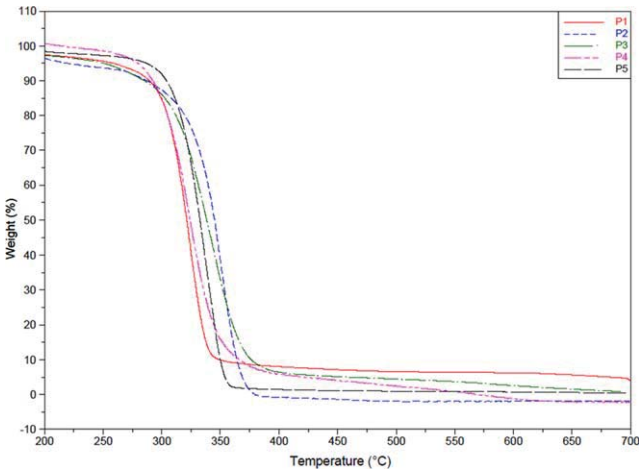


FIGURE 11 TGA curves of all chiral homopolymers. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

TABLE 3 Thermal Stability of Chiral Homopolymers and Copolymers

		T_d (°C)[a]			
Weight loss (%)		5	50	95	100
Polymers	P1	258	321	682	>700
	P2	219	344	368	379
	P3	250	338	460	≈700
	P4	279	324	421	568
	P5	286	332	354	510

[a] Decomposition temperature (T_d) occurs via TGA.

Thermal properties: semi-crystallinity (T_m), crystallization temperature (T_c), *glass*-transition temperature (T_g), and decomposition temperature (T_d).

The semicrystalline PDMMLA structures were confirmed by DSC which shows a melting temperature $\boldsymbol{T}_m$ observed on all semicrystalline polyesters. Unlike the two homopolymers **P1** and **P2** and the block copolymer **P5** that are semicrystalline ($T_{m\mathbf{P1}} = 124.3$ °C,[18] $T_{m\mathbf{P2}} = 158.2$ °C, and $T_{m\mathbf{P5}} = 131.8$ °C), statistical copolymer 50:50 **P4** is semicrystalline but has not a $\boldsymbol{T}_m$. This is due to the presence of a second component, in the copolymer structure, randomly mixed preventing its stereoregularity.[34] Besides, isotactic homopolymer **P3** has a crystallization temperature $\boldsymbol{T}_c$ ($Tc_{\mathbf{P3}} = 170.9$ °C) (Table 1 and Fig. 9).

In addition, DSC analysis data provided other information, glass transition temperature (T_g). In the case of chiral homopolyesters, the high T_g value for chiral **P1** (41.5 °C)[18] explains the rigidity of aromatic group in the lateral chain of benzylic homopolymer, which causes over restriction for rotating the substituent along the polymer backbone. On the other hand, owing to flexibility, **P2** shows the lower T_g value (−7.1 °C) consequent to a very decrease in rigidity of polymer sourced from hexylic ester group. Furthermore, it has been illustrated in Table 1 and Figure 10 that diblock copolymer **P5** exhibits two T_g values (−3.3 °C and +49.2 °C) corresponding to hexylic and benzylic units, respectively. However, statistical copolymer **P4** (50:50) presents only one logical T_g value (+12.2 °C) distributed between the two T_g values of **P1** and **P2** for a mixture with 50:50 molar ratio of homopolymers. In addition, T_g values of semicrystalline and amorphous benzyloxypropylic homopolymers **P3** and **P3′** were +0.3 and −9.0 °C, respectively [Figs. 9 and 10(a)].

Figure 10(a) shows the T_g values of all synthesized amorphous PDMMLAs. Besides the effect of structure and rigidity of the polymers chains, T_g is affected by their stereochemistry. Indeed, it was observed that all T_g values of amorphous PDMMLAs were lower than corresponding semicrystalline PDMMLAs and T_g increases with higher stereochemistry [Table 1 and Fig. 10(b)].

To further study the thermal stability of these polymers and ensure their use at a temperature range without any degradation, the thermogravimetric analysis (TGA) was effected for determining the weight loss of different PDMMLAs. TGA was performed under N_2 atmosphere at a heating rate of 10 °C/min from room temperature to 700 °C. The thermogram curves of the different PDMMLA homopolymers and statistical copolymer were compared (Fig. 11) and their weight loss temperatures of 5, 50, 95, and 100% were showed in Table 3.

All studied polymers had homogenous degradation curve (Fig. 11). The aromatic group in the lateral chain of homopolymers **P1** and **P3** lead to degradation in high temperature and especially in the case of benzylic homopolymer **P1** which is more rigid and less hydrophobic. It contains less carbon number in its side chain in comparison with **P3** (Table 3). At weight loss of 5%, T_d of **P1** and **P3** were almost identical (258 and 250 °C, respectively). Therefore, decomposition temperature (T_d) decreased with increasing of carbon number. Indeed, hexylic homopolymer **P2** which contain in its lateral chain a group of a linear chain of six carbons had the very low T_d values over the degradation. This phenomenon can be attributed to the flexibility of this hexylic group. However, T_d was sharply increased above 300 °C for all these polymers indicating the beginning of their decomposition. **P1** presented the highest value of T_d and a very slight weight loss. Indeed, it decomposed completely at T_d above to 700 °C, whereas **P2** had the lowest value and lost total weight at 379 °C. T_d of **P3** was between those of **P1** and **P2** and lost almost total weight at 700 °C.

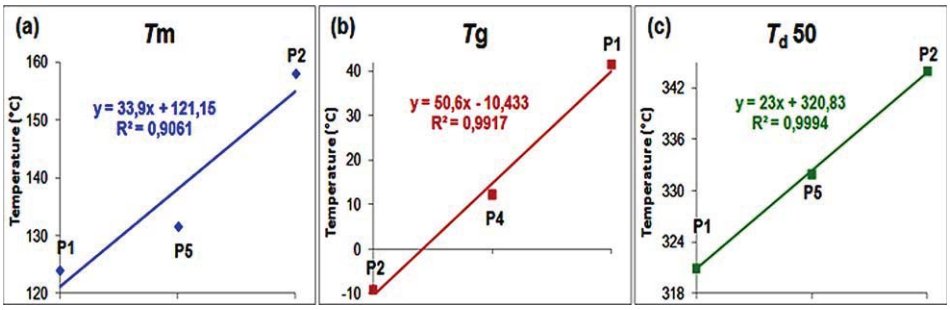


FIGURE 12 Linear relation between "polymers compositions (homopolymers (**P1** and **P2**) and their copolymers 50:50 (**P4** and **P5**)" and "(a) $\boldsymbol{T}_m$, (b) $\boldsymbol{T}_g$, and (c) T_d at weight loss of 50%." [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

In addition, Figure 11 depicted the TGA curve of statistical PDMMLA **P4** (50:50) and block copolymer PDMMLA **P5** (50:50). Their thermal stability was found between those of the corresponding homopolymers **P1** and **P2** apart at initial T_d which was slightly higher. Thus, at a weight loss of 100%, T_d value of **P4** and **P5** (568 and 510 °C, respectively) was an almost average between the two corresponding homopolymers values (calculated: 536 °C). This indicated also that the two components were ideally mixed in these copolymer systems (Fig. 11).

Finally, these results show that T_m, T_g, and T_d values (at weight loss of 50%) of **P1**, **P2** and their copolymers **P4** and **P5** presented linearity as a function on their compositions ($R^2 = 0.906$, 0.991, and 0.999, respectively) which confirmed the ideal mixing of the copolymer system (Fig. 12).

These polymers present a high thermal stability. Therefore, this study showed that thermomechanical properties such as crystallinity, melting point, or stereopolymers rigidity/flexibility of these materials depend on their structure design and stereochemistry. These properties can be easily adjusted by varying the ratio of monomers, also choosing the statistical or block copolymerization,[35–38] underlining the above results.

CONCLUSION

A series of poly((*S*)-3,3-dimethylmalic acid) derivatives was successfully synthesized and characterized in this work. These custom synthetic polymers are at the same time stereoregular, biodegradable, bioassimilable, and bearing functionalized groups, for adjusting their hydrophilic/hydrophobic balance. One hundred percent isotactic homopolymers, statistical and block copolymers were obtained from the corresponding chiral α,α,β-trisubstituted β-lactones containing one stereogenic center. ^{13}C NMR spectroscopy has been used mainly to study their tacticity and thus confirm their stereoregularity and DSC for their crystallinity. However, with furthering the use of synthetic polymers in the biomaterial field, this family of stereopolyesters has great potential in many biomedical applications such as drug delivery systems.

REFERENCES AND NOTES

1 M. Vert, S. M. Li, G. Spenlehauer, P. Guerin, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1992**, *3*, 432.

2 M. F. Gonzalez, R. A. Ruseckaite, T. R. Cuadrado, *J. Appl. Polym. Sci.* **1999**, *71*, 1223.

3 B. Kessler, B. Witholt, *Macromol. Symp.* **1998**, *130*, 245.

4 D. Wang, D. R. Robinson, G. S. Kwon, J. Samuel, *J. Control. Release* **1999**, *57*, 9.

5 W. J. Page, *Can. J. Microbiol.* **1995**, *41*, 1.

6 P. Törmälä, T. Pohjonen, P. Rokkanen, *Macromol. Symp.* **1997**, *123*, 123.

7 M. A. LeboucherDurand, V. Langlois, P. Guerin, *Polym. Bull.* **1996**, *36*, 35.

8 S. Cammas, M. M. Bear, L. Moine, R. Escalup, G. Ponchel, K. Kataoka, P. Guerin, *Int. J. Biol. Macromol.* **1999**, *25*, 273.

9 S. Cammas-Marion, P. Guerin, *Macromol. Symp.* **2000**, *153*, 167.

10 L. Moine, C. Amiel, W. Brown, P. Guerin, *Polym. Int.* **2001**, *50*, 663.

11 R. Bizzarri, F. Chiellini, R. Solaro, E. Chiellini, S. Cammas-Marion, P. Guerin, *Macromolecules* **2002**, *35*, 1215.

12 S. Cammas-Marion, P. Guerin, *Design. Monomers Polym.* **2000**, *3*, 77.

13 S. Cammas, I. Renard, K. Boutault, P. Guerin, *Tetrahedron Asymmetry* **1993**, *4*, 1925.

14 P. Guerin, M. Vert, C. Braud, R. W. Lenz, *Polym. Bull.* **1985**, *14*, 187.

15 M. Vert, P. Guerin, *Biofutur* **1992**, 52.

16 C. T. Goodhue, E. E. Snell, *Biochemistry* **1966**, *5*, 403.

17 C. Barbaud, F. Faÿ, F. Abdillah, S. Randriamahefa, P. Guérin, *Macromol. Chem. Phys.* **2004**, *205*, 199.

18 R. Belibel; C. Barbaud, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2015**, *53*, 2586.

19 C. Barbaud, S. Cammas-Marion, P. Guerin, *Polym. Bull.* **1999**, *43*, 297.

20 F. E. Kohn, J. W. A. Vandenberg, G. Vanderidder, J. Feijen, *J. Appl. Polym. Sci.* **1984**, *29*, 4265.

21 F. Ouhib, S. Randriamahefa, P. Guerin, C. Barbaud, *Design. Monomers Polym.* **2005**, *8*, 25.

22 C. Barbaud, F. Abdillah, F. Faÿ, M. Guerrouache, P. Guérin, *Design. Monomers Polym.* **2003**, *6*, 353.

23 S. L. King, V. X. Truong, C. Kirchhoefer, A. Pitto-Barry, A. P. Dove, *Green Mater.* **2014**, *2*, 107.

24 M. Iida, S. Hayase, T. Araki, *Macromolecules* **1978**, *11*, 490.

25 R. A. Gross, Y. Zhang, G. Konrad, R. W. Lenz, *Macromolecules* **1988**, *21*, 2657.

26 S. Bloembergen, D. A. Holden, T. L. Bluhm, G. K. Hamer, R. H. Marchessault, *Macromolecules* **1989**, *22*, 1656.

27 A. Leborgne, N. Spassky, *Polymer* **1989**, *30*, 2312.

28 J. E. Kemnitzer, S. P. McCarthy, R. A. Gross, *Macromolecules* **1993**, *26*, 1221.

29 M. Arcana, O. Giani-Beaune, F. Schue, W. Amass, A. Amass, *Polym. Int.* **2000**, *49*, 1348.

30 Y. Hori, T. Hagiwara, *Int. J. Biol. Macromol.* **1999**, *25*, 237.

31 M. Allmendinger, R. Eberhardt, G. A. Luinstra, B. Rieger, *Macromol. Chem. Phys.* **2003**, *204*, 564.

32 K. Boutault, S. Cammas, F. Huet, P. Guerin, *Macromolecules* **1995**, *28*, 3516.

33 P. Guerin, J. Francillette, C. Braud, M. Vert, *Makromol. Chem. Macromol. Symp.* **1986**, *6*, 305.

34 J. C. Middleton, A. J. Tipton, *Biomaterials* **2000**, *21*, 2335.

35 M. Trollsas, J. L. Hedrick, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4644.

36 M. Trollsas, H. Claesson, B. Atthoff, J. L. Hedrick, *Angew. Chem. Int. Edit.* **1998**, *37*, 3132.

37 M. Trollsas, J. L. Hedrick, D. Mecerreyes, P. Dubois, R. Jerome, H. Ihre, A. Hult, *Macromolecules* **1998**, *31*, 2756.

38 M. Trollsas, M. A. Kelly, H. Claesson, R. Siemens, J. L. Hedrick, *Macromolecules* **1999**, *32*, 4917.

Synthèse et caractérisations de nouveaux polyesters biodégradables dérivés du poly(acide 3,3-diméthylmalique) comme revêtement prometteur de stents cardiovasculaires

RESUME : A l'exception du chapitre bibliographique, cette thèse a été rédigée sous forme d'articles avec des résumés et des discussions tout en comparant les résultats obtenus à d'autres résultats de la littérature dans la même thématique de recherche. Ce travail s'organise en trois axes de recherche : la synthèse organique et la chimie des polymères, la physicochimie de la surface et l'étude de la réponse biologique et de la dégradation des polymères. La problématique de ce sujet de thèse s'articule autour de la resténose intra-stent qui représente la complication majeure de l'angioplastie par pose de stent dans les artères sténosées. Les stents actifs restent la solution actuellement utilisée pour le traitement de la resténose. Ce sont des stents métalliques recouverts d'un polymère qui comporte une substance bioactive généralement un antiprolifératif. Le rôle du polymère est de créer une barrière protectrice entre le métal et la paroi artérielle. Cette barrière doit améliorer la rugosité et la composition chimique du stent métallique, réparer l'endothélium par la prolifération des cellules endothéliales et inhiber la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses qui sont responsables d'une façon directe de la reformation de la plaque d'athérome. Les propriétés de surface du polymère lui confèrent un fort pouvoir d'adhérence au métal et de biocompatibilité vis-à-vis de la paroi artérielle. Les interactions créées entre le revêtement polymère et les cellules vasculaires sont modulées par les propriétés physicochimiques de la surface. C'est dans cette optique que mon sujet de thèse est organisé en deux thématiques. Le premier objectif de ma thèse est d'élaborer une série de polymères amorphes et d'étudier leurs propriétés physicochimiques (mouillabilité, rugosité, ...) et biologiques (adhésion, comportement et prolifération cellulaires) et de corréler ensuite ces propriétés afin de choisir le revêtement prometteur de stent coronaire. Une étude de dégradation a aussi été réalisée sur les polymères élaborés. Le deuxième objectif est consacré à la synthèse chimique et la stéréochimie des polymères. En effet, de nouveaux monomères optiquement actifs et de nouveaux stéréopolyesters ont été synthétisés et caractérisés dans le but de comparer leurs propriétés physicochimiques avec celles des polyesters amorphes étudiés comme revêtement de stent et d'enrichir le domaine des biomatériaux.

MOTS CLES : Poly(acide 3,3-diméthylmalique) biodégradable, revêtement de stent cardiovasculaire, propriétés physicochimiques, réponse biologique, biodégradation, stéréochimie des polymères, isotacticité.

Synthesis and characterizations of new biodegradable polyesters derivided of poly(3,3-dimethylmalic acid) as a promising cardiovascular stents coating

ABSTRACT: With the exception of bibliographic chapter, this thesis was written in the format of collection of articles with abstracts and discussions while comparing the results with other's in the literature in the same research theme. This work is organized in three tasks: organic synthesis and stereochemistry of polymers, surface physicochemical properties and biological response and degradation study of polymers. The issue of this thesis is based on in-stent restenosis which represents the major complications of angioplasty with stent placement. Drug-eluting stents are currently the solution used for the restenosis treatment. These are metal stents coated with a polymer having a bioactive substance which is generally an antiproliferative agent. The polymer role is to create a protective barrier between the metal and the arterial wall. This barrier must improve the roughness and the chemical composition of the metallic stent, repair the endothelium by the proliferation of endothelial cells and inhibit the proliferation and the migration of smooth muscle cells which are responsible to the reformation of atheroma plaque. The surface properties confer to polymer a strong adhesiveness to the metal and biocompatibility vis-a-vis of the arterial wall. Interaction created between the polymer coating and vascular cells are modulated by the physicochemical properties of the surface. It is in this context that my thesis is organized into two themes.The first aim of my thesis is to develop a series of amorphous polymers and study their physicochemical (wettability, roughness ...) and biological properties (adhesion, cell behavior and proliferation) and then correlate these properties to choose the promising coating coronary stent. A degradation study was also conducted on elaborate systems. The second is dedicated to chemical synthesis and stereochemistry of polymers. Indeed, new optically active monomers and the corresponding stereopolyesters were synthesized and characterized in order to compare their physicochemical properties with those of amorphous polyesters studied as a coating of the stent and enhance the biomaterials field.

KEYWORDS: Biodegradable poly(3,3 dimethylmalic acid), cardiovascular stent coating, physicochemical properties, biological response, biodegradation, stereochemistry of polymers, isotacticity.