



**HAL**  
open science

# Nanotubes de carbone pour la délivrance transdermique électro-stimulée de substances biologiquement actives

Jean-François Guillet

## ► To cite this version:

Jean-François Guillet. Nanotubes de carbone pour la délivrance transdermique électro-stimulée de substances biologiquement actives. Chimie thérapeutique. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2017. Français. NNT : 2017TOU30348 . tel-02001023

**HAL Id: tel-02001023**

**<https://theses.hal.science/tel-02001023>**

Submitted on 1 Feb 2019

**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 Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

---

**Présentée et soutenue par :**

**Guillet Jean-François**

le jeudi 9 novembre 2017

**Titre :**

Nanotubes de carbone pour la délivrance transdermique électro-stimulée de substances biologiquement actives

---

**École doctorale et discipline ou spécialité :**

ED SDM : Sciences et génie des matériaux - CO034

**Unité de recherche :**

CIRIMAT (UMR 5085) - IPBS (UMR 5089)

**Directeur/trice(s) de Thèse :**

Dr. Emmanuel Flahaut, CNRS, Toulouse

Dr. Muriel Golzio, CNRS, Toulouse

**Jury :**

Dr. Franck Couillaud, CNRS, Bordeaux (Rapporteur)

Dr. Martine Mayne – L'Hermite, CEA, Saclay (Rapporteur)

Pr. Christel Laberty-Robert, Université Pierre et Marie Curie, Paris

Dr. Marc Monthieux, CNRS, Toulouse

Dr. Audrey Tourette, Université Paul Sabatier, Toulouse

Dr. Justin Teissie, CNRS, Toulouse







# Table des matières

## CHAPITRE 1 – BIBLIOGRAPHIE

I.	Les Nanotubes de carbone.....	19
A.	Définitions et structures.....	19
B.	Méthodes de synthèse .....	21
B.i.	Décharge par arc électrique.....	21
B.ii.	Synthèse par ablation laser.....	21
B.iii.	Dépôt chimique catalytique en phase vapeur (CCVD : Catalytic Chemical Vapour Deposition) .....	22
C.	Propriétés et applications .....	23
C.i.	Propriétés mécaniques.....	23
C.ii.	Propriétés électroniques .....	23
C.iii.	Applications biomédicales .....	24
C.iv.	Toxicité.....	24
II.	Les matériaux composites.....	25
A.	Définition.....	25
B.	Les nanocomposites.....	25
B.i.	Nanocomposites NTC.....	27
III.	Les Hydrogels.....	28
A.	Définition.....	28
B.	Hydrogels naturels et synthétiques.....	29
B.i.	Naturels.....	29
B.ii.	Synthétiques.....	30
B.iii.	Synthèse d'hydrogels .....	31
C.	Hydrogels nanocomposites .....	36
IV.	Les polymères bio-sourcés .....	39
A.	Définition.....	39
A.i.	Alginate de sodium .....	40
A.ii.	L'agarose.....	41
V.	Dispositifs médicaux pour la délivrance transdermique .....	44
A.	Anatomie de la peau.....	44
A.i.	L'épiderme .....	45
A.ii.	Le derme .....	46
A.iii.	L'hypoderme .....	47
B.	La perméabilité de la peau aux agents thérapeutiques.....	47

B.i.	<i>Absorption cutanée</i> .....	48
VI.	<i>Méthodes de délivrance de principes actifs au travers de la peau</i> .....	50
A.	<i>Introduction</i> .....	50
B.	<i>Méthodes</i> .....	51
B.i.	<i>Méthodes chimiques</i> .....	51
B.ii.	<i>Méthodes actives</i> .....	52
C.	<i>Techniques électriques</i> .....	53
C.i.	<i>Iontophorèse</i> .....	53
C.ii.	<i>Electroporation</i> .....	55.

## **CHAPITRE 2 – MATERIELS ET METHODES**

I.	<i>Matériaux</i> .....	69
A.	<i>Préparation des DWNT</i> .....	69
A.i.	<i>Poudre Composite</i> .....	69
A.ii.	<i>Extraction des nanotubes</i> .....	70
II.	<i>Méthodes de mise en forme utilisées</i> .....	71
A.	<i>L'électrospinning</i> .....	71
B.	<i>Fluides Supercritiques</i> .....	73
C.	<i>Lyophilisation</i> .....	75
III.	<i>Techniques de caractérisation</i> .....	76
A.	<i>Caractérisations morphologiques des échantillons</i> .....	76
A.i.	<i>Microscopie optique en contraste de phase</i> .....	76
A.ii.	<i>Microscopie optique à fluorescence</i> .....	76
A.iii.	<i>Microscopie électronique à balayage (MEB)</i> .....	78
B.	<i>Techniques spectroscopiques</i> .....	79
B.i.	<i>Spectroscopie à fluorescence</i> .....	79
B.ii.	<i>Spectroscopie Raman</i> .....	81
B.iii.	<i>Mesure de turbidité</i> .....	84
C.	<i>Caractérisations électriques</i> .....	84
C.i.	<i>Spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE)</i> .....	84
C.ii.	<i>Mesures tension/courant</i> .....	88
IV.	<i>Electroporation</i> .....	89
A.	<i>Matériels expérimentaux</i> .....	89
A.i.	<i>Générateur</i> .....	89
B.	<i>Expériences ex vivo</i> .....	91
B.i.	<i>Modèle de peau</i> .....	91

B.ii.	<i>Dispositif expérimental</i> .....	92
-------	--------------------------------------	----

### **CHAPITRE 3 – CHOIX ET MISE EN FORME DU MATERIAU**

I.	<i>Electrospinning</i> .....	101
A.	<i>Choix du polymère</i> .....	102
A.i.	<i>PMMA</i> .....	102
B.	<i>Composite PMMA/DWNT</i> .....	104
B.i.	<i>Analyses morphologiques des fibres PMMA/DWNT</i> .....	105
C.	<i>Structure Cœur-coquille PMMA/DWNT</i> .....	108
II.	<i>Hydrogels</i>	111
A.	<i>Etude des dispersions DWNT/polymère</i> .....	111
B.	<i>Préparation des nanocomposites agarose/DWNT</i> .....	115
B.i.	<i>Séchage par lyophilisation</i> .....	116
B.ii.	<i>Etudes comportementales d'imprégnations agarose et agarose/DWNT</i> .....	117
B.iii.	<i>Séchage par CO<sub>2</sub> supercritique</i> .....	120
B.iv.	<i>Séchage à l'air</i> .....	122

### **CHAPITRE 4 – CARACTERISATION ET EVALUATION DES PROPRIETES DU DISPOSTIF**

I.	<i>Caractérisation des hydrogels nanocomposites</i> .....	138
A.	<i>Procédé d'élaboration</i> .....	138
A.i.	<i>Hydrogel nanocomposite</i> .....	138
B.	<i>Etude du séchage et gonflement des échantillons</i> .....	141
B.i.	<i>Cinétique de gonflement des échantillons CTRL-AG &amp; DWNT-AG</i> .....	143
C.	<i>Relargage de la molécule Dextran-FITC</i> .....	149
C.i.	<i>Spectroscopie à fluorescence</i> .....	149
D.	<i>Stabilité des hydrogels en fonction du pH</i> .....	151
E.	<i>Relargage des DWNT en conditions extrêmes</i> .....	152
E.i.	<i>Détection de l'agarose et des DWNT par spectroscopie Raman</i> .....	153
E.ii.	<i>Tests de relargage de l'échantillon DWNT-AG à 50 et 80°C</i> .....	154
F.	<i>Caractérisations morphologiques</i> .....	157
F.i.	<i>Analyse MEB</i> .....	157
G.	<i>Caractérisations électriques</i> .....	159
G.i.	<i>Spectroscopie d'impédance</i> .....	160
G.ii.	<i>Mesures de courant de polarisation et conduction</i> .....	166

### **CHAPITRE 5 - EXPERIMENTATIONS EX VIVO**

I.	<i>Tests ex-vivo des dispositifs</i> .....	182
A.	<i>Electrodes métalliques</i> .....	182



A.i.	<i>Tests de contrôle</i> .....	182
A.ii.	<i>Tests d'électrostimulation</i> .....	183
B.	<i>Electrodes hydrogels nanocomposites</i> .....	187
B.i.	<i>Sans stimulation électrique</i> .....	187
B.ii.	<i>Avec stimulation électrique</i> .....	189
B.iii.	<i>Tests d'électrostimulation couplés aux mesures de courant</i> .....	194
C.	<i>Tests ex vivo couplés aux mesures de courant à différentes concentrations en DWNT</i> .	198
D.	<i>Observation topographique des échantillons</i> .....	202

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**





# INTRODUCTION

*Ces travaux de thèse se placent dans le cadre d'un projet collaboratif à l'interface de la Science des Matériaux et des Sciences du Vivant (Biophysique), faisant intervenir 2 laboratoires Toulousains, le CIRIMAT et l'IPBS.*

*Le CIRIMAT (Centre Interuniversitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux - équipe : Nanocomposites et Nanotubes de Carbone, NNC) regroupe des compétences relatives aux méthodes de synthèse et de mise en forme des matériaux, et plus précisément des nanomatériaux carbonés dont en particulier les nanotubes de carbone bi-parois (DWNT). L'IPBS (Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale) et plus particulièrement l'équipe Biophysique Cellulaire, est spécialiste de l'étude des mécanismes de délivrance de molécules au travers de cellules via l'application de champs électriques, mais également du développement d'outils innovants pour la délivrance, le ciblage ou le diagnostic in vivo.*

*La collaboration de ces deux équipes de disciplines différentes a permis l'émergence de ce projet de thèse visant à concevoir et fabriquer un dispositif à base de nanotubes de carbone dans le but de délivrer des molécules pharmacologiques au travers du derme par électrostimulation. Ce projet a été possible grâce au soutien de la COMUE et de la Région (bourse de thèse "NANODERM").*

*Avec l'avènement des nanotechnologies, les chercheurs ont adopté une nouvelle façon de penser les matériaux, initiée principalement par le développement de matériaux innovants aux propriétés diverses et variées. Actuellement, ces matériaux sont utilisés dans des secteurs tels que l'énergie, l'alimentaire, le médical et l'optique. L'utilisation de nanomatériaux et plus précisément des nanomatériaux carbonés comme par exemple les nanotubes de carbone ou encore le graphène fait l'objet d'une recherche active ouvrant la voie à toutes sortes d'applications comme les revêtements, l'automobile, l'ingénierie tissulaire, le biomédical ou encore la délivrance de molécules pharmacologiques.*

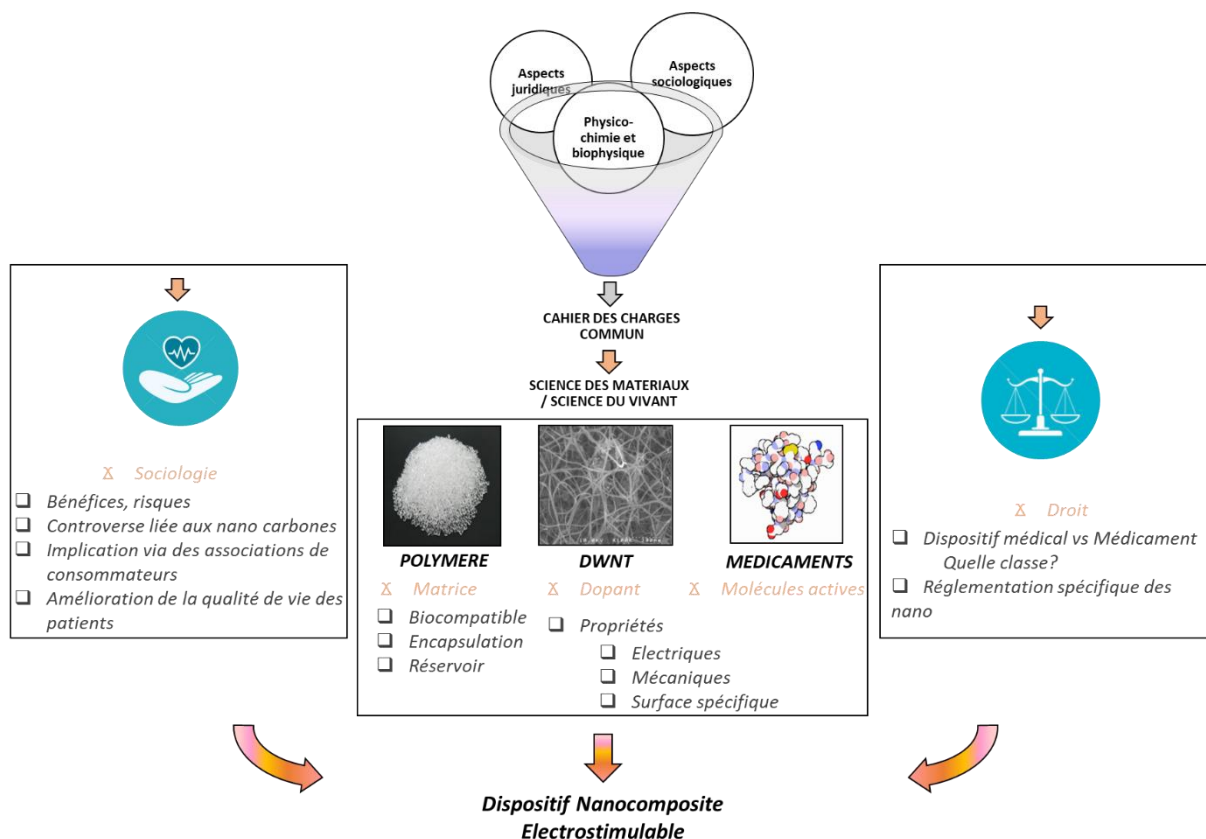
*Du côté des sciences du vivant et plus particulièrement dans le domaine de la délivrance de molécules par voie transdermique, les scientifiques, face à des méthodes de traitement actuellement peu ou pas assez efficaces, se sont attelés à développer différents outils permettant le passage de molécules pharmacologiques de différentes tailles au travers de l'épiderme vers le derme. Différentes approches ont été développées, telles que la méthode thermique (ablation laser), mécanique (microneedles), électrique (iontophorèse, électroporation), sans qu'aucune d'entre elles n'apporte actuellement de solution à la fois efficace et économiquement envisageable.*

*Cette approche interdisciplinaire implique donc de constituer un cahier des charges solide, prenant en compte d'entrée de jeu tous les paramètres relevant à la fois des deux disciplines impliquées. En effet, le dispositif devra nécessairement rentrer en contact avec des tissus biologiques (la peau) mais également sous l'application d'un stimulus électrique permettre de libérer au travers de l'épiderme vers le derme, une molécule pharmacologique, ce qui implique*

des notions de biocompatibilité et de stabilité, en plus des caractéristiques purement physico-chimiques requises pour le développement d'un tel dispositif. En particulier, la définition du cahier des charges fait intervenir d'autres paramètres relevant des Sciences Humaines et Sociales telles que la Sociologie et le Droit : en effet, si certains aspects tels que l'intérêt des médecins et des patients ou encore la réglementation en matière de mise sur le marché ne sont pas pris en compte dès la conception, il est probable que le développement d'un tel dispositif ne constitue qu'une belle étude académique sans aucun avenir en termes d'application réelle.

Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous avons bénéficié de la participation à un projet de plus grande envergure dans le cadre des Défis Nano du CNRS (projet CARBODERM), regroupant les deux équipes du CIRIMAT et de l'IPBS déjà décrites mais incluant aussi deux autres laboratoires nous apportant l'expertise et les compétences complémentaires nécessaires : le CERTOP (UMR 5044, Pr P.Chaskiel) pour les aspects sociologiques, et l'IMH (Pr I. Poirot-Mazères) pour les aspects juridiques. Le contexte du projet CARBODERM était le diabète, maladie touchant 422 millions de personnes (2014) et potentiellement 622 millions d'ici à 2040.

La figure ci-dessous illustre la manière dont les compétences de ces 4 laboratoires, relevant de 4 disciplines différentes, se sont articulées pour réaliser notre projet :



*Grâce aux compétences du CERTOP et de l'IMH, différents aspects fondamentaux pour la définition du cahier des charges ont pu être étudiés, comme par exemple les besoins d'un tel dispositif pour les utilisateurs (sociologie – bénéfices/risques technologiques), mais également la catégorie de produit pharmacologique à laquelle un dispositif de ce genre pourrait appartenir (droit – législation des nanos), ce qui a un impact considérable en termes de coûts de développement futur et qui conditionnerait l'éventuelle mise sur le marché (relations avec le règlement européen REACH, différence entre "médicament" et "dispositif médical").*

*D'un point de vue sociologique, l'étude s'est portée sur les controverses liées aux nanocarbones, mais plus précisément sur l'acceptation d'un tel dispositif médical ou l'usage de ce type de nanotechnologie dans la vie quotidienne de patients souffrant de diabète. Ceci a conduit l'étude à associer des tierces parties déterminantes, à savoir les "patients" (de manière collective via des associations) et les médecins (diabétologues).*

*La figure 1 présente également la partie matériaux qui illustre l'approche dans la conception du dispositif. Le matériau formant le dispositif devrait contenir trois éléments ayant chacun leurs fonctions : un polymère qui servira de matrice, biocompatible, de réservoir de stockage et permettra d'encapsuler les DWNT au cœur du réseau. Effectivement, bien qu'aucune publication à l'heure actuelle ne décrive de pénétration des DWNT par la peau, il demeure préférable que l'utilisateur soit protégé d'une éventuelle pénétration cutanée (en particulier en cas de peau lésée). Les DWNT apporteraient les propriétés électriques et mécaniques. Et enfin, la molécule pharmacologique concernée dans le cadre de notre étude est l'insuline.*

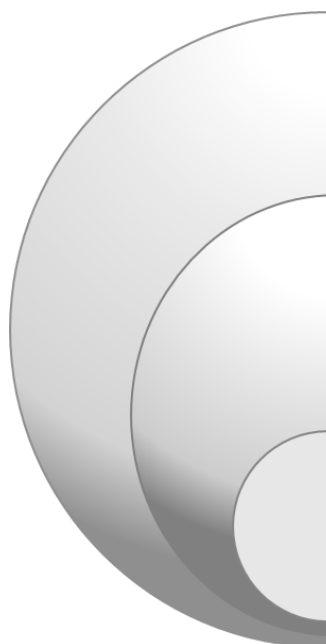
*Ainsi, pour la fabrication de notre dispositif, il est donc indispensable de prendre en compte ces différentes parties interconnectées entre la sociologie, le droit, la science des matériaux et la science du vivant. L'unification des quatre domaines a permis de développer ensemble un projet commun pour la fabrication d'un tel dispositif nanocomposite électro-stimulable.*

*S'agissant de travaux originaux à la fois au laboratoire et au niveau international, nous avons dû dans un premier temps tester différents matériaux "matrice" pour le nanocomposite, ainsi que différentes méthodes de mise en forme, tout en essayant de déterminer leur adaptation au cahier des charges initialement encore en cours de construction. Ce n'est que progressivement que le dispositif s'est construit, au fur et à mesure de l'avancement du projet. Au final, nos travaux se sont orientés vers des polymères biocompatibles ayant la capacité de former des hydrogels. L'utilisation d'un polymère bio-sourcé a été privilégiée, à cause de sa biocompatibilité naturelle, mais également pour des raisons écologiques et du fait de sa mise en œuvre sans solvant organique (uniquement de l'eau). Les questions relatives à la sécurité de mise en œuvre d'un tel type de matériau (relargage potentiel des nanotubes de carbone en conditions d'usage) ont aussi été prises en compte. Finalement, des tests de stimulations électriques ont été réalisés sur peau animale en conditions ex vivo (peau de souris) dans le but de réaliser une preuve de concept en testant différents dispositifs. Ce manuscrit décrit donc les différentes approches développées pour la fabrication du nanomatériau, mais également sa*

caractérisation du point de vue de sa capacité de stockage, de relargage ainsi que ses propriétés électriques dans le cadre de l'application visée.

**- Cahier des charges**

Le cahier des charges a été élaboré grâce à la coopération entre les différentes disciplines. Le tableau ci-dessous énumère de manière non-exhaustive les différents points fondamentaux du cahier des charges.

	<p><b>- DWNT</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Amélioration de la conductivité électrique et des performances mécaniques</li> <li>• Nanoparticules – Législation REACH</li> </ul>
	<p><b>- MATRICE</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hydrogel naturel (évite l'ajout de molécules chimiques potentiellement toxiques)</li> <li>• Biocompatible (Interaction matériau humain)</li> <li>• Réservoir &gt; 0,25ml de solution à 1mM</li> <li>• Piégeage des DWNT – Aucun relargage</li> <li>• Séchage – Dispositif médical</li> </ul>
	<p><b>- DISPOSITIF</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Biocompatible</b></li> <li>• <b>Electrostimulable</b></li> <li>• <b>Relargage de principes actifs sous stimulations électriques</b></li> <li>• <b>Ni brulures, ni relargage des DWNT</b></li> </ul>







# CHAPITRE 1

## BIBLIOGRAPHIE



# I. Les Nanotubes de carbone

## A. Définitions et structures

Le carbone peut se trouver naturellement sous forme amorphe (Fig.1-1(a)) (désorganisée) ou sous deux formes cristallines qui sont le diamant (carbone hybridé  $sp^3$ ; Fig.1-1(b)) et le graphite (Fig.1-1(c)). Ce dernier est formé d'une superposition de feuillets de graphène, à base d'atomes de carbone organisés en hexagones (carbone hybridé  $sp^2$ ). Dans le plan du graphène, les atomes sont liés par des liaisons covalentes ( $sp^2$ ) d'environ 1,4 Å de longueur. Perpendiculairement au plan graphène, ceux-ci sont liés par des interactions faibles de type  $\pi$ - $\pi$  stacking (Vander Walls) qui assurent la cohésion des feuillets de graphène entre eux avec une distance inter-feuillets de 3,4 Å<sup>1</sup>.

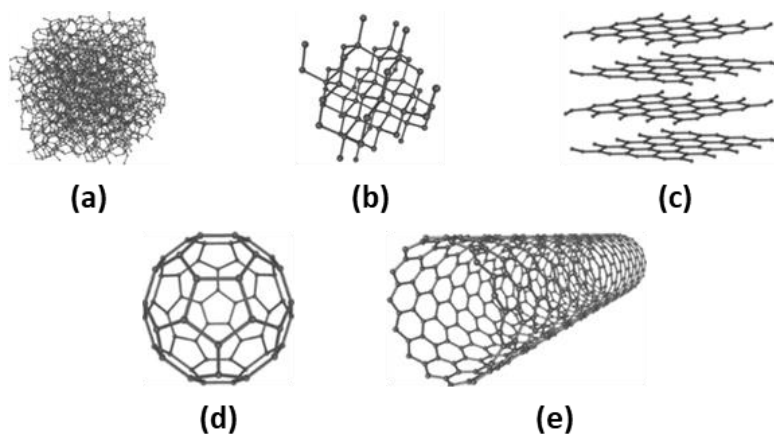


Figure 1-1 : Formes allotropiques du carbone : (a) carbone désorganisé ; (b) diamant ; (c) graphite (ici avec quatre feuillets de graphène) ; (d) fullerène (C<sub>60</sub>) ; (e) nanotube de carbone monoparoi.

C'est à partir des années 1980 que les scientifiques découvrent deux nouvelles formes de carbone à priori considérées comme non présentes sur terre (mais mises en évidence dans le milieu interstellaire). En 1985, *Kroto et al.*<sup>2</sup> met en évidence les fullerènes, et en particulier le C<sub>60</sub>, synthétisés par ablation laser. Cette molécule comprend 60 atomes de carbone disposés aux sommets d'un polyèdre régulier, que l'on peut représenter par un ballon de football. En 1991, *S. Iijima*<sup>3</sup> observe au microscope électronique à transmission un sous-produit de la synthèse des fullerènes (Fig.1-1(d)). Il s'agit de tubes creux, composés de feuillets de carbone  $sp^2$  enroulés sur eux-mêmes, et fermés à leurs extrémités par des demi-fullerènes. Ces structures tubulaires, avec des longueurs pouvant varier du micromètre au millimètre (voire plus)<sup>4</sup> selon leur méthode de préparation, seront nommées par *Iijima* « nanotubes de carbone » ou NTC (Fig.1-1(e)). Un nanotube de carbone peut être composé d'un ou de plusieurs cylindres (Fig. 1-2(a, b)) et ont un diamètre variant de moins de 1nm à plusieurs dizaines de nanomètres en fonction du nombre de parois.

Ainsi, il existe les nanotubes de carbone mono-paroi (*single-wall carbon nanotubes- SWNT*) ; les nanotubes de carbone double-paroi (*double-walled carbon nanotubes – DWNT*) et enfin les nanotubes de carbone multi-parois (*multi-walled carbon nanotubes – MWNT*) (Fig.1-2(b)). Les MWNT sont généralement composés de 2 à 50 tubes concentriques (configuration dite en « *poupées russes* »). Les DWNT sont à la frontière entre les SWNT et les MWNT.

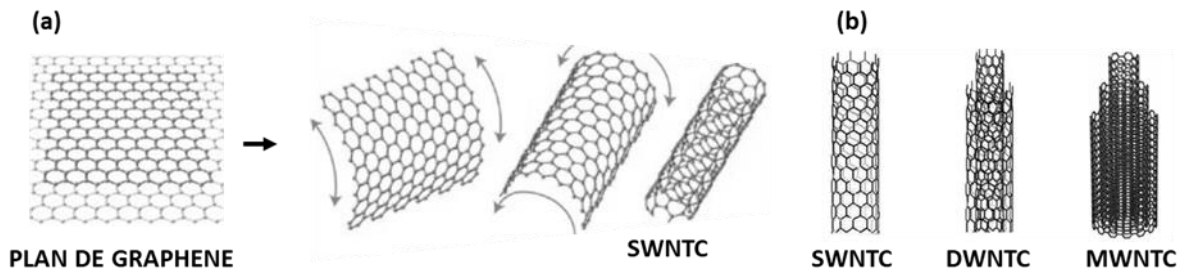


Figure 1-2 : (a) Enroulement d'un feuillet de graphène sur lui-même jusqu'à obtention d'un nano tube de carbone mono paroi ; (b) Différentes conformations géométriques des nanotubes de carbone.<sup>5,6</sup>

La structure d'un NTC monoparoi est totalement définie par un vecteur que l'on note  $C_h$ . Ce vecteur définit aussi un angle d'hélicité,  $\theta$  (Fig.1-3(a)). Le vecteur est défini par la relation suivante :  $C_h = na_1 + ma_2$ ,  $n$  et  $m$  étant deux entiers positifs, et  $a_1$   $a_2$  les deux vecteurs unitaires définissant le plan de graphène.

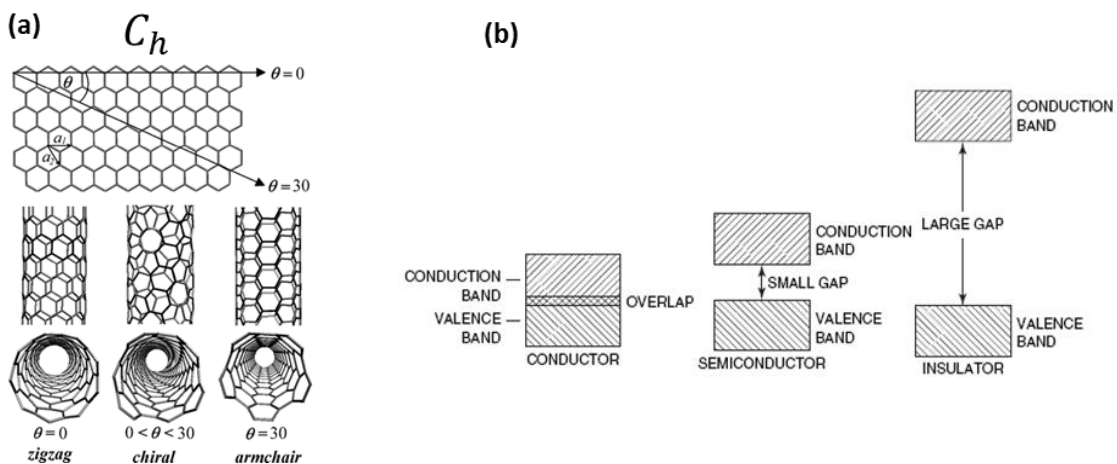


Figure 1-3 : (a) Schéma représentant les vecteur  $C_h$  et angle  $\theta$  d'hélicité ou de chiralité d'un nanotube de carbone ; (b) Bande de conduction et de valence dans un matériaux conducteur, semi-conducteur, et isolant.

Les propriétés des NTC notamment électriques, obéissent à certaines règles en lien avec leur chiralité. En effet, lorsque la différence des indices dans le couple  $(n,m)$  est égale à un multiple de 3 (0 inclus), alors le nanotube aura un caractère métallique (absence de gap entre les bandes de valence et de conduction (Fig.1-3(b)). Dans tous les autres cas, il est semi-conducteur. Cette relation permet de déterminer très simplement dans le cas d'un NTC

monoparoi le caractère électrique qu'il possède, à savoir métallique ou semi-conducteur. Le caractère semi-conducteur s'exprime naturellement lorsque  $n \neq m$  avec  $n-m$  non multiple de 3.

- ❑ *NTC zigzag* :  $(n, 0)$  et  $\theta = 0^\circ$  - *Peuvent être métalliques ou semi-conducteurs (métalliques si  $n$  est un multiple de 3)*
- ❑ *NTC armchair (fauteuil)* :  $(n, n)$  et  $\theta = 30^\circ$  - *Sont uniquement métalliques.*
- ❑ *NTC chiral* :  $(n, m)$  et  $0 < \theta < 30^\circ$

## B. Méthodes de synthèse

Il existe diverses méthodes pour synthétiser les *NTC*. Celles-ci sont toutes basées sur le même principe utilisant une source carbonée, sous forme solide ou gazeuse, et le plus généralement la présence d'un catalyseur.

Les différentes techniques disposent généralement d'une panoplie de conditions opératoires permettant de générer, selon les conditions expérimentales, tous les types de *NTC* (*SWNT*, *DWNT*, *MWNT*), sans que leurs caractéristiques structurales / physico-chimiques (*chiralité*, *qualité*, *pureté*) soient totalement contrôlées. Trois techniques majeures se distinguent : l'arc électrique, l'ablation laser et le dépôt chimique catalytique en phase vapeur (*CCVD*). Le dépôt chimique catalytique est une voie de synthèse dite à « température modérée », contrairement aux deux autres qui sont considérées comme des voies de synthèse à haute température.

### B.i. Décharge par arc électrique

Le principe de la décharge par arc électrique repose sur l'application d'un champ électrique intense sous atmosphère inerte et à faible pression entre deux électrodes de graphite. Cet état provoque l'apparition d'un plasma engendrant la sublimation de l'anode ( $>3000^\circ\text{C}$  température de fusion du graphite) et ainsi la production de produits carbonés de différentes natures à la cathode (électrodes imprégnés par des métaux de transitions (Fe, Ni, Co, Yttrium))<sup>7</sup>. Ce type de synthèse fut utilisé initialement pour la synthèse des fullerènes<sup>8</sup>, et par la suite des sous-produits comme les *SWNT*<sup>9</sup> ou *MWNT*<sup>3</sup>. Malheureusement, cette technique ne peut être industrialisée, car elle conduit à des produits hétérogènes, *i.e.* à une grande variété de matières carbonées, nécessitant plusieurs étapes de purification (et une augmentation du coût de production). La génération de l'arc devient aussi rapidement problématique lorsque le diamètre des électrodes augmente.

### B.ii. Synthèse par ablation laser

La méthode de synthèse par ablation laser a initialement permis de découvrir les fullerènes<sup>2</sup>. Cette méthode consiste à insérer un bloc de graphite dans un four chauffé à une température avoisinant les  $1200^\circ\text{C}$ . Le carbone est vaporisé sous l'application d'un rayonnement laser de

haute énergie (pulsé ou continu). Les produits carbonés ainsi obtenus sont entrainés par un flux de gaz inerte et récupérés au niveau d'un collecteur en cuivre refroidi<sup>10</sup>. En ajoutant des catalyseurs métalliques (Co, Ni) au graphite, il est possible d'obtenir des *SWNT*<sup>11</sup>. Cette méthode permet d'obtenir des *NTC* de grande pureté, avec cependant de faibles rendements. Elle est de plus très coûteuse.

### B.iii. Dépôt chimique catalytique en phase vapeur (CCVD : Catalytic Chemical Vapour Deposition)

Cette technique est l'une des méthodes de synthèse des *NTC* les plus utilisées, notamment pour la production industrielle<sup>12</sup>, permettant la production de *SWNT* ou de *MWNT*, selon les conditions expérimentales. Des quantités industrielles allant jusqu'à la tonne peuvent être préparées. Le principe de cette méthode est relativement simple et basé sur la décomposition d'un gaz carboné à la surface de nanoparticules catalytiques le plus souvent métalliques<sup>13</sup>, à des températures généralement comprises entre 400 et 1200 °C<sup>14</sup>. Le carbone décomposé diffuse en surface des nanoparticules, jusqu'à précipiter à la saturation<sup>15</sup> pour former un "chapeau" qui se soulève suite à l'apport constant en carbone, formant ainsi un nanotube de carbone (Fig.1-4(a)).

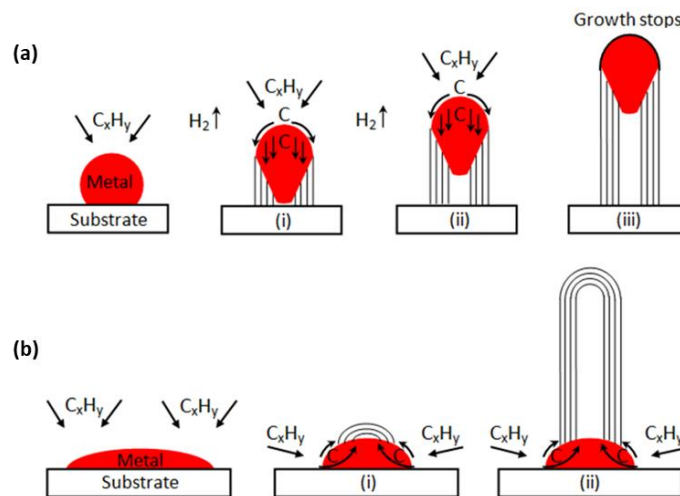


Figure 1-4 : Croissance des nanotubes de carbone sur particule métallique : (a) « tip-growth model », (b) « base-growth model »<sup>16</sup>

D'un point de vue mécanistique, le dépôt de type « tip-growth » (Fig.1-4(a)) implique une interaction faible entre le catalyseur et le substrat et la source de carbone se décompose en surface de la particule. Les produits migrent ensuite vers le bas via la particule métallique. Les *NTC* croissent sous la particule métallique, poussant ainsi l'intégralité de la particule hors du substrat. Pour le dépôt de type « base-growth », le mécanisme fait intervenir la création d'un chapeau de graphène qui se forme sur le dessus de la particule. Le chapeau se décolle lorsque la paroi du *NTC* croit. La taille de la particule catalytique détermine ainsi généralement le

diamètre des *NTC*. La nanoparticule peut donc se trouver à une des deux extrémités du *NTC*, en fonction du mécanisme de croissance, comme le montre la *Figure 1-4*<sup>17</sup>. Eventuellement dans le cas des *MWNT*, la particule peut se fragmenter au cours de la croissance et ainsi être emprisonnées à l'intérieur du *NTC*. Un large éventail de sources carbonées peut être utilisé, comme par exemple le monoxyde de carbone (*CO*)<sup>14</sup>, des hydrocarbures comme le méthane (*CH<sub>4</sub>*)<sup>18</sup>, l'acétylène (*C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>*)<sup>19,20</sup>, le propylène (*C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>*)<sup>20</sup>, ou encore le benzène, le toluène ou même les alcools<sup>21</sup>. La composition des catalyseurs est également variée. En général, il s'agit de nano particules métalliques, dispersées sur un substrat, soit directement mises en contact avec le gaz carboné (aérosols), soit générées *in situ* lors de la synthèse. Les catalyseurs sont souvent composées de fer (*Fe*)<sup>19</sup>, cobalt (*Co*)<sup>20</sup>, ou nickel (*Ni*). Il est également possible d'utiliser des mélanges constitués de particules bimétalliques Co/Molybdène<sup>22</sup>, Fe/Co, Co/Ni<sup>18,19</sup>. La mise en œuvre de catalyseurs sous forme de solutions solides permet la génération *in situ* des nanoparticules et donc d'éviter leur croissance exagérée<sup>23</sup>. Cette technique sera utilisée pour la synthèse des *DWNT* au cours de ces travaux.

## C. Propriétés et applications

La structure, la forme tubulaire et le diamètre nanométrique confèrent aux *NTC* un facteur de forme très intéressant pour de nombreuses applications, notamment du point de vue de leurs propriétés mécaniques et électriques.

### C.i. Propriétés mécaniques

Les scientifiques se sont rapidement penchés sur les propriétés mécaniques de ces nanomatériaux. La résistance aux déformations s'est révélée 100 fois supérieure à celle de l'acier, à section égale, avec une masse 6 fois plus faible<sup>24</sup>. D'autre part, les *NTC* montrent une grande flexibilité : en effet, ils peuvent subir des flexions très importantes et réversibles jusqu'à atteindre des angles critiques de 110°<sup>25</sup>. Leur dureté peut dans certains cas être supérieure à celle du diamant<sup>26</sup>. Les *NTC* sont des candidats idéaux pour être utilisés dans la fabrication de matériaux nanocomposites, notamment dans les domaines de l'aérospatial et de l'automobile.<sup>27</sup> Ils sont utilisés comme renforts dans tous types de matrices polymères, céramiques et métaux.

### C.ii. Propriétés électroniques

Les propriétés électroniques des *NTC* dépendent de leur angle d'enroulement et de leur diamètre, ainsi que nous l'avons décrit préalablement. Dans le cas des *SWNT*, la proportion est de 2/3 de *NTC* semi-conducteurs pour 1/3 de *NTC* métalliques. Avec les *MWNT*, chacun des feuillets est relativement indépendant du point de vue de ses propriétés électriques. En effet, chaque feuillet peut être soit semi-conducteur, soit métallique. Bien qu'un certain couplage entre les parois consécutives soit décrit, il est considéré généralement que la proportion de *NTC* de type métallique augmente avec le nombre de parois. Les *NTC*



présentent un très grand intérêt dans le domaine de la microélectronique. Ils peuvent transporter des densités de courant supérieures à  $10^9$  A/cm<sup>2</sup> (à 300°C pendant un temps très court)<sup>28</sup>. Ces valeurs de densité de courant peuvent être 1000 fois supérieures à celles supportées par les métaux (cuivre, argent)<sup>29</sup>. L'augmentation du nombre de parois provoque l'augmentation de la proportion de défauts<sup>30</sup>, et donc une diminution de la conductivité électrique et une dégradation des propriétés mécaniques. Les *NTC* bi-parois (*DWNT*) offrent la conformation géométrique idéale à la frontière des *NTC* mono et multiparois. Leur caractère métallique est très prononcé (75-80%). Les densités de courant peuvent atteindre par exemple  $9.10^8$  A/cm<sup>2</sup> pour les *DWNT* oxydés<sup>31</sup>. La distance inter-tube est quelquefois décrite comme une variable qui influence le caractère semi-conducteur des *NTC*. Par exemple, plus cette distance augmente, plus le *NTC* interne sera métallique pour les *NTC* à chiralité *zig-zag/zig-zag*<sup>32</sup>. En réalité, ce type de conformation est très rare, et en pratique la structure de chacun des *NTC* composant un *DWNT* n'est pas contrôlée lors de la synthèse, bien que des travaux récents montrent que certaines configurations (relations entre tube interne et externe) soient favorisées alors que d'autres sont au contraire défavorisées<sup>33</sup>. Cependant, la distance inter-parois varie peu (*entre 0,34 et 0,35 nm*).

### ***C.iii. Applications biomédicales***

Depuis plusieurs années, un grand intérêt est porté aux *NTC* dans les domaines de la biologie et de la recherche médicale. En effet, leurs propriétés électroniques remarquables, leur sensibilité à l'environnement extérieur et leurs dimensions nanométriques en font des candidats idéaux pour la fabrication de biocapteurs pour la détection de biomolécules<sup>34</sup>.

Des biocapteurs à base de *NTC* pour la détection de protéines<sup>35</sup>, du glucose<sup>36</sup>, de l'ADN ou encore de l'urée ont vu le jour. D'autre part, leur composition chimique (carbone) et leurs structures essentiellement inertes, confèrent aux *NTC* une biocompatibilité intéressante.

Les *NTC* peuvent potentiellement être utilisés dans la régénération tissulaire. En effet, il a été montré que les cellules neuronales ont une forte affinité pour les *NTC*, celles-ci préférant s'accrocher aux *NTC* lorsqu'elles ont le choix, et permettant donc leur guidage<sup>37</sup>. Les substrats de *MWNT*<sup>38</sup> et de *SWNT*<sup>39</sup> permettent d'amplifier la communication électrique entre neurones.

Enfin, du fait de leur taille nanométrique, de leur surface spécifique élevée et de la possibilité de remplir leur canal central par une molécule d'intérêt thérapeutique, les *NTC* ont rapidement été étudiés en tant que systèmes de vectorisation de molécules pharmacologiques au cœur de l'organisme<sup>40</sup>. Toutefois, ces applications sont tout de même à prendre avec précaution en rapport avec la potentielle toxicité des *NTC*.

### ***C.iv. Toxicité***

Les risques de la fabrication et de l'utilisation de nanomatériaux à l'échelle industrielle sur l'environnement et la santé ont longtemps été ignorés. Cependant, de nombreuses équipes

de recherche étudient actuellement la toxicité potentielle de ces nanoparticules *in vitro et in vivo*<sup>40,41</sup>. La toxicité des *NTC* est à l'étude afin de mieux comprendre l'interaction de ces nanomatériaux avec notre organisme. Cette toxicité dépend de nombreux facteurs dans le cas d'une exposition non intentionnelle dont la voie d'exposition: orale, respiratoire ou encore cutanée.

D'une part, les résidus catalytiques (nanoparticules métalliques) peuvent potentiellement être toxiques pour l'organisme. En effet, des résidus de fer, provenant par exemple des catalyseurs de synthèse, peuvent entraîner la formation de radicaux libres ( $OH^\bullet$ ) et ainsi provoquer l'endommagement cellulaire. Des résidus de cobalt peuvent également, par exemple, conduire à des défauts au niveau des chromosomes.<sup>42</sup> D'autre part, la modification chimique des parois des *NTC* peut fortement impacter leur potentielle toxicité<sup>43</sup>. Les parois étant directement au contact avec le milieu, ce sont elles qui vont conditionner l'interaction entre les *NTC* et les milieux biologiques. De manière générale, plus les *NTC* ont un taux de fonctionnalisation élevé (avec la conséquence de les raccourcir au cours des étapes de préparation), et plus cela facilite leur dispersion et permet à l'organisme de les éliminer plus rapidement<sup>44</sup>. Dans le cas contraire, les *NTC* vont souvent circuler dans l'organisme avant de s'accumuler dans différents organes tels que le foie, la rate, les poumons<sup>45</sup>, dans lesquels ils sont difficilement biodégradables.

Les nanomatériaux sont maintenant omniprésents. Aussi, certains scientifiques s'intéressent à la façon dont ils peuvent être utilisés au quotidien tout en minimisant leurs risques potentiels dès leur conception, par exemple en modifiant leurs tailles par agrégation, ou leurs surfaces par encapsulation ou enrobage. Cette approche qui a été nommée «*Safer by design*»<sup>46,47</sup>, développe une nouvelle façon de penser et de concevoir les matériaux.

## ***II. Les matériaux composites***

### ***A. Définition***

Un composite est un matériau dans lequel se trouvent au moins deux phases de natures différentes, et qui combine les propriétés de chacun des constituants<sup>48</sup>. Un composite est donc formé de plusieurs phases chimiquement distinctes (non miscibles) séparées par une interface.

### ***B. Les nanocomposites***

Un composite sera appelé « *nanocomposite* » si au moins une des deux phases possède une dimension de l'ordre du nanomètre, tel que décrit ci-dessous par Sanchez<sup>49,50</sup>:

*"Nous appellerons matériaux hybrides tout système organo- minéral ou biominéral dans lequel l'une au moins des composantes, organique ou inorganique, se situe dans un domaine de taille compris entre le dixième de nanomètre et la dizaine de nanomètres. Ces diverses composantes*

peuvent être des molécules, des oligomères ou des polymères, des agrégats, voire des particules. Ces matériaux sont donc des nanocomposites, voire des composites à l'échelle moléculaire."

Selon les interactions entre les différents constituants, ceux-ci peuvent être répertoriés en deux grandes classes :

- ❑ **Classe 1 :**  
Structure où les interactions entre les constituants sont faibles, comme typiquement les interactions de Van der Waals, les liaisons hydrogènes ou bien électrostatiques.
- ❑ **Classe 2 :**  
Structure où les interactions sont fortes et comprennent des constituants organiques minéraux liés chimiquement par des liaisons iono-covalentes ou bien covalentes.

Les nanocomposites sont aujourd'hui largement étudiés et ce dans différents domaines, comme par exemple l'énergie<sup>51</sup>, l'alimentaire<sup>52</sup>, les capteurs<sup>53</sup>, ou encore l'optique<sup>54</sup>. Du point de vue du matériau, un nanocomposite ne peut l'être que si l'état de dispersion des objets au sein de la matrice considérée est maîtrisé. En effet, pour obtenir les propriétés de chaque élément, il convient de les disperser de façon individuelle. La Figure 1-5 représente un schéma définissant différents types de composite (de type lamellaire).

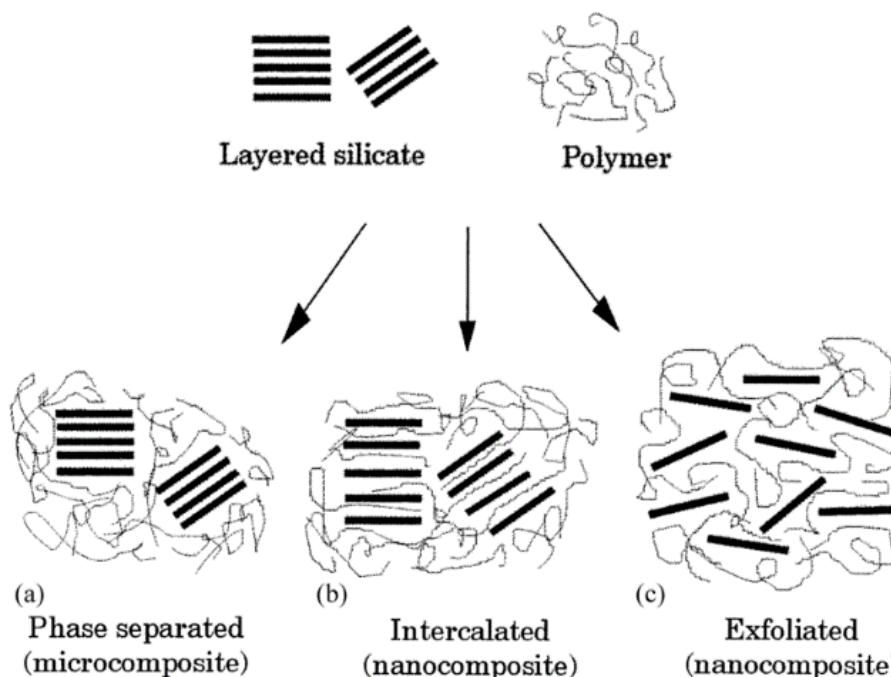


Figure 1-5 : Représentation des structures correspondantes aux micro et nanocomposite (lamellaire) à base de polymère<sup>55</sup>.

En d'autres termes, les nanocomposites (sous forme exfoliés (c)) permettent de créer plus de surface interfaciale (par exemple  $\approx 2600 \text{ m}^2/\text{gr}$  théorique dans le cas du graphène) ce qui a

pour conséquence d'améliorer considérablement les propriétés d'interface du matériau au regard des propriétés macroscopiques.

### **B.i. Nanocomposites NTC**

Au vu des excellentes propriétés mécaniques des *NTC*, ceux-ci ont rapidement été mélangés avec différentes matrices afin de fabriquer des nanocomposites aux propriétés diverses et variées. Dans les équipements sportifs par exemple, les composites polymère/*NTC* permettent de diminuer considérablement la masse des objets tout en améliorant leurs propriétés mécaniques. Ce type de nanocomposite est largement utilisé pour améliorer les propriétés mécaniques, mais aussi thermiques et électriques des polymères<sup>56-58</sup>. Les recherches ont ainsi permis d'utiliser les propriétés intrinsèques des *NTC*<sup>59-61</sup> à l'échelle macroscopique. Par exemple dans le domaine de l'aéronautique, leur utilisation permettrait d'obtenir des avions plus légers consommant moins de carburant, tout en présentant des propriétés mécaniques équivalentes voire supérieures. On peut les trouver également dans les peintures anti-feu (dissipation de la chaleur), mais aussi dans les revêtements anti-chaleur ou encore dans le secteur de l'automobile (dissipation des charges électriques).

L'un des problèmes majeurs des *NTC* dans les nanocomposites est la dispersion de ces objets. En effet, leur nature hydrophobe induit une limitation au regard des interactions *NTC*/Polymère. Ce caractère est attribué à l'interaction  $\pi$ - $\pi$  entre les tubes induisant la formation d'agglomérats de *NTC* au sein du nanocomposite. Pour pallier à ce problème, les scientifiques ont mis au point des techniques permettant de maximiser et de maintenir l'état de dispersion des *NTC*. Ainsi, il est possible de réaliser une fonctionnalisation de surface par des amines ( $NH_2$ ), hydroxyles ( $OH$ ), ou encore des fonctions carboxyliques ( $COOH$ )<sup>62,63</sup>. Il existe également une autre stratégie pour améliorer leur dispersion en solution aqueuse, en utilisant par exemple des brins d'ADN, des protéines, des tensioactifs ou des polymères amphiphiles dans le but de modifier leurs propriétés de surface. Une dispersion optimisée des *NTC* permet d'obtenir lors de la fabrication d'un composite, un seuil de percolation des *NTC* très bas.

La *Figure 1-6(a)* montre la conductivité électrique d'un nanocomposite (*EPOXY/NTC*) en fonction du pourcentage en masse de *NTC* où l'on observe clairement trois états fondamentalement différents. La variation brutale de conductivité indique que le seuil de percolation des *NTC* est atteint. Ainsi cette étude met en évidence le phénomène de percolation des *NTC* dans la matrice polymère, en accord avec la théorie de percolation universelle. Selon la nature des *NTC*, du polymère, du procédé de dispersion, le seuil de percolation peut fortement varier et modifier le pourcentage massique de *NTC*<sup>64</sup> nécessaire pour atteindre le seuil de percolation.

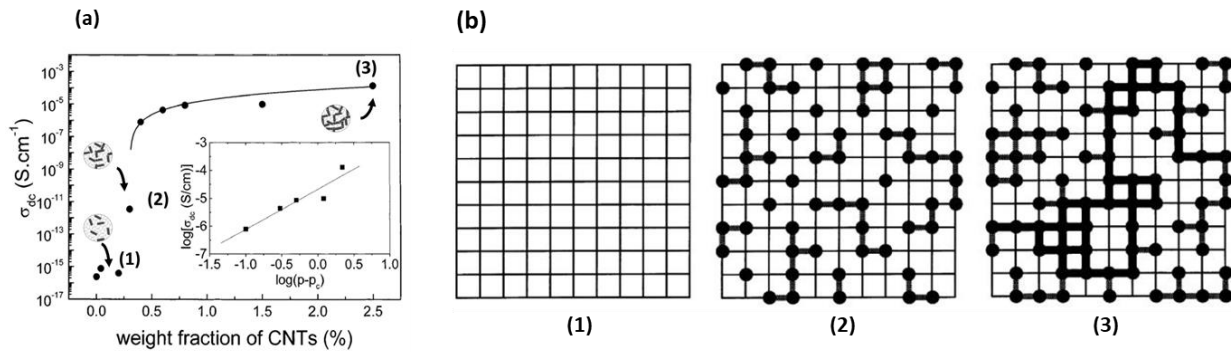


Figure 1-6 : (a) courbe de percolation des NTC dans un composite NTC/EPOXY ; (b) représentation schématique de la théorie de percolation. <sup>58,65</sup>

### III. Les Hydrogels

#### A. Définition

Les hydrogels forment des réseaux tridimensionnels composés de polymères à caractère hydrophile et potentiellement biocompatible. Ces matériaux contiennent deux phases une phase solide formée par le réseau polymérique, et une seconde phase liquide (aqueuse). De par leur affinité avec l'eau, les hydrogels sont capables d'absorber pour certains plus de 1000 fois leur masse sèche. La synergie de ces deux phases permet donc d'obtenir des matériaux à caractère mou et élastique. Les hydrogels peuvent être chimiquement stables ou dégradables car ils peuvent aussi se dissoudre ou encore se désagréger. Selon les conditions environnementales, il est possible de les trouver sous différentes formes structurales : amorphe, semi-cristalline, supramoléculaire ou encore sous forme d'agrégats colloïdaux. L'ensemble du réseau tridimensionnel (3D) des hydrogels est maintenu par des liaisons pouvant être d'origine physique (par exemple : liaison hydrogène) ou chimique (liaison covalente). Dans le domaine biomédical, leur souplesse et leur grande perméabilité permettent de nombreuses applications.

On peut donc classer les hydrogels selon différentes catégories <sup>66</sup> :

- Provenance du polymère : hydrogel naturel, synthétique, hybride
- Nature de la réticulation : physique ou chimique
- Caractéristiques du réseau polymérique : réseau homo-polymérique ou co-polymérique, réseau de polymère enchevêtré.
- Taux de gonflement de l'hydrogel (capacité de stockage)
- Durée de vie : dégradable ou non dégradable

Les hydrogels se présentent sous différentes formes physiques <sup>67</sup>:

- Solide mou (Lentille de contact)

- Poudre comprimée (Pilules ou capsules pour ingestion orale)*
- Microparticules (Vecteur bio adhésif ou traitement de plaies)*
- Revêtements (implants, pilules, capsules)*
- Membrane feuillet (réservoir dans un patch de libération sous cutanée)*
- Liquide (formant un gel au chauffage ou au refroidissement)*

Ces différentes caractéristiques démontrent bien la grande variabilité des hydrogels du point de vue de leurs origines, ou encore de leurs formes physiques. Malgré ces différences, il est tout de même possible de décrire de façon générale la structure d'un réseau tridimensionnel réticulé, que l'on peut exprimer par trois paramètres fondamentaux <sup>68</sup>:

- Le pourcentage volumique de polymère sous forme hydratée.*
- La distance moyenne entre chaque point de réticulation.*
- La taille des pores dans le réseau.*

Les propriétés hydrophiles et hydrophobes des différents polymères utilisés pour la fabrication d'hydrogel vont directement agir sur les réactions d'auto-assemblages moléculaires de l'hydrogel considéré. En effet, les composés hydrophiles sont solubles dans l'eau mais pas dans les corps gras. A contrario, les composés hydrophobes sont solubles dans les corps gras, mais insolubles dans l'eau. Les hydrogels et leurs technologies de mise en forme ont largement évolué et trouvent des applications dans de très nombreux domaines, tels que l'industrie agroalimentaire <sup>69</sup>, l'agriculture, la pharmacie ou encore le médical <sup>70</sup>. A l'heure actuelle, l'ingénierie tissulaire développe ces matériaux pour reconstituer la peau par exemple <sup>71</sup>, mais également comme vecteur médicamenteux <sup>72</sup> qui permet de contenir un principe actif (PA) et de contrôler sa libération.

## **B. Hydrogels naturels et synthétiques**

Les hydrogels peuvent être classés en deux catégories différentes en fonction de leur origine naturelle ou synthétique. Il est également possible de fabriquer des hydrogels composés de polymère naturel et synthétique.

### **B.i. Naturels**

Les hydrogels à base de polymères naturels peuvent être fabriqués grâce à une grande variété de polymères « bio-sourcés », comme la matière végétale, le blé, le maïs, les algues marines. Ils sont également appelé les polymères *bio-sourcés*. En absence d'eau (*par échange de solvant : éthanol ou autres*), ces matériaux peuvent subir des modifications et donc présenter des propriétés différentes, principalement définies par la phase liquide dans le réseau.

Les hydrogel *bio-sourcés* présentent des caractéristiques très intéressantes dans de nombreux domaines de la recherche liées à leurs propriétés uniques telles que leurs forte biocompatibilité<sup>73</sup>, biodégradabilité<sup>74</sup>, mais également à leur nature hydrophile (*polaire* : -OH, -COOH) permettant d'éviter l'utilisation de solvant toxique<sup>75</sup>. A noter que dans certains cas, les polymères peuvent contenir des branches hydrophobes (*Apolaire* : -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>3</sub>). On parlera alors de domaine hydrophile ou hydrophobe. Le *Tableau 1-1* recense plusieurs polymères d'origine naturelle, ainsi que leur nature chimique.

<i>Tableau 1-1 – Polymères naturels les plus couramment utilisés dans la fabrication des hydrogels<sup>67</sup></i>	
Polymères Bio-sourcés	
<i>Polymères anioniques :</i>	- <i>Acide hyaluronique</i> - <i>Alginate</i> - <i>Pectine</i>
<i>Polymères cationiques :</i>	- <i>Chitosane</i> - <i>Polylysine</i>
<i>Polymères amphiphiles :</i>	- <i>Collagène</i> - <i>Fibrine</i>
<i>Polymères neutres :</i>	- <i>Dextran</i> - <i>Agarose</i>

*Pour résumer, les hydrogels utilisant des polymères d'origine naturelle sont largement utilisés notamment dans le domaine du biomédical, comme par exemple pour l'ingénierie tissulaire<sup>76,77</sup>, ou encore pour la délivrance de molécules<sup>78,79</sup>. Cependant, les propriétés physicochimiques de ce type d'hydrogel peuvent varier. En effet, cette stabilité dépend de leur environnement (pH, ions, température...). Les scientifiques se sont donc rapidement intéressés à l'amélioration des propriétés de ces matériaux par l'addition de polymères de natures différentes<sup>80</sup>, ou encore de nanoparticules<sup>75,81</sup>.*

## **B.ii. Synthétiques**

Les hydrogels d'origine synthétique peuvent être fabriqués grâce à une grande variété de monomères synthétiques. Tout comme leurs homologues naturels, ils possèdent des propriétés de rétention d'eau très intéressantes. Tout comme les hydrogels bio-sourcés, ils peuvent présenter un caractère hydrophile ou hydrophobe et ne sont donc pas forcément solubles dans l'eau. Toutefois, le caractère hydrophobe de ces polymères peut être ajusté pour obtenir un caractère plutôt hydrophile et donc permettre leur solubilisation en milieu aqueux. Par ailleurs, la structure des polymères synthétiques peut être modifiée de manière à satisfaire la biodégradabilité et la bio-fonctionnalité. A titre d'exemple, l'une des premières étude d'hydrogel avait comme objectif de développer des dispositifs médicaux et plus précisément des lentilles de contact<sup>82,83</sup>. Le *Tableau 1-2* recense plusieurs monomères utilisés pour la synthèse d'hydrogels synthétiques.

Tableau 1-2 – Monomères synthétiques les plus couramment utilisés dans la fabrication des hydrogels. <sup>67,68</sup>

Polymères Synthétiques	
Hydroxyéthyl méthacrylate (HEMA)	Anionique
N-vinyl-2-pyrrolidone(NVP))	Anionique
Acétate de vinyl (VAc)	Neutre
Acide acrylique (AA)	Anionique
Acide méthacrylique (MAA)	Anionique
Éthylène glycol diacrylate/diméthacrylate (EGDA/EGDMA)	(Neutre)

Ces différents polymères peuvent être réticulés de différentes façons comme les polymères bio- sourcés, la méthode et la nature de la gélification définissent les propriétés du gel formé.

### B.iii. Synthèse d'hydrogels

De ce fait, en fonction du type de propriété souhaitée, deux méthodes de fabrication des hydrogels permettent d'obtenir soit un hydrogel « permanent » soit un hydrogel « réversible ». Les principales méthodes de synthèse chimiques ou physiques pour la fabrication d'hydrogels, sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 1-3 – Méthodes couramment utilisées pour la fabrication des hydrogels. <sup>67</sup>

Hydrogels réversibles (Physiques)	Hydrogels permanents (Chimiques)
- Chauffage ou refroidissement d'une solution (ex. agarose ou gélatine dans l'eau)	- Irradiation (ex. irradiation (ex :UV <sup>84</sup> ) de PEO dans l'eau)
- Diminution du pH pour former un gel par liaisons hydrogènes entre deux polymères en solution aqueuse (ex. PEG)	- Réticulation chimique (ex. traitement du collagène avec du glutaraldéhyde)
- Mélange de solutions d'un polyanion et d'un polycation pour former un gel sous forme de coacervat complexe (ex. alginate de sodium plus polylysine)	- Copolymérisation d'un monomère par un agent réticulant en solution (ex. HEMA + EGDMA)
- Gélification d'une solution de polyélectrolyte avec un ion multivalent de charge opposée (ex. alginate de sodium + calcium)	- Polymérisation d'un monomère dans un polymère solide différent pour former un réseau interpénétré (ex. acrylonitrile + amidon)
	- Conversion chimique d'un polymère hydrophobe en hydrogel (ex. hydrolyse partielle de poly (acétate de vinyle) PVAc - PVA)



### a. Hydrogels réversibles

Les hydrogels « *physiques* » également appelés hydrogels « *réversibles* » sont formés d'un enchevêtrement de polymères maintenus par des liaisons de type hydrogène ou ionique. A titre d'exemple, un mélange constitué d'un polyélectrolyte et d'un ion de valence différente et de charge opposée, provoque la formation d'un hydrogel par l'interaction de ces deux entités. Une fois réticulés, les gels physiques laissent apparaître des défauts sous forme de zones hétérogènes au cœur même du réseau. En effet, ces défauts se manifestent par la présence de chaînes de polymère restant libres dans la matrice. Ils forment ainsi un réseau transitoire dans le gel formé. Les sites de réticulation d'un hydrogel physique ne sont pas permanents (liaisons faibles). L'un des exemples le plus parlant concerne l'alginate de sodium, polymère qui sera décrit plus en détails dans la suite de ce chapitre. Comme décrit dans le *Tableau 1-3*, la réticulation physique de ce type de gels peut être engendrée par de nombreux facteurs, tels que le pH, la température, la force ionique ou encore la lumière<sup>67</sup>. Le schéma de la *Figure 1-7* montre la formation d'hydrogels physiques ionotropique et polyionique.

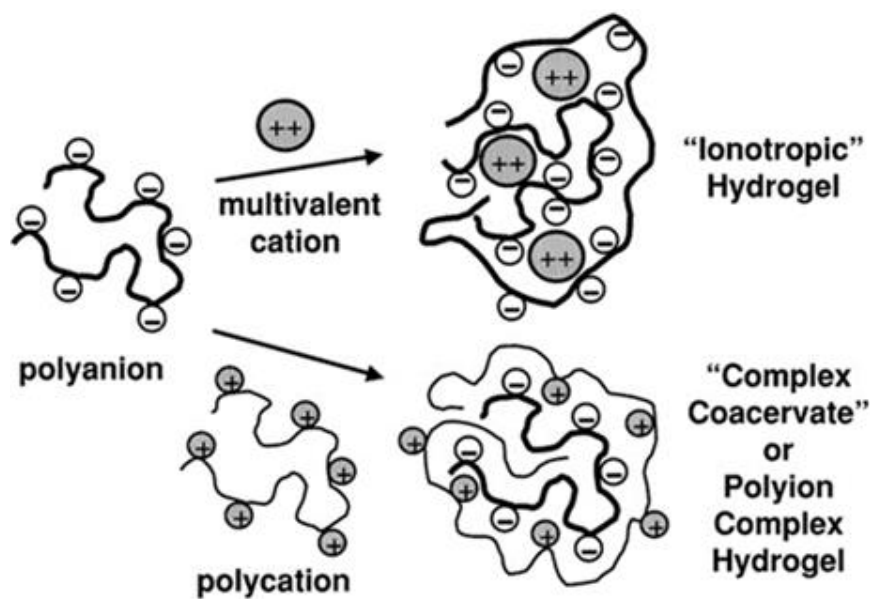


Figure 1-7 : Schéma représentant la formation de deux types d'hydrogel physique, l'un étant ionique: hydrogel « ionotropique » ( ex : Alginate de sodium ), l'autre étant polyionique ( ex : Alginate / polylysine)<sup>67</sup>

### b. Hydrogels permanents

Les hydrogels peuvent être « *permanents* » lorsqu'ils sont réticulés de manière covalente. Comme les hydrogels physiques, les hydrogels chimiques présentent aussi des inhomogénéités. Ainsi, il existe des régions dans le réseau où la densité de réticulation est élevée, qu'on appelle des « *agglomérats* ». Ces agglomérats sont répartis parmi les régions de faible densité de réticulation, où l'eau peut s'introduire plus facilement. Il peut également se produire une séparation de phases lors de la formation du gel, provoquant ainsi la formation

de cavités remplies d'eau. Ainsi, dans les gels chimiques, les chaînes de polymères libres constituent des défauts à l'intérieur du réseau et ne contribuent pas à l'amélioration des propriétés mécaniques (*élasticité*) de ces derniers<sup>67</sup>. La *Figure 1-8* présente schématiquement quelques exemples de formations d'hydrogels chimiques (*Poly et copolymérisation*).

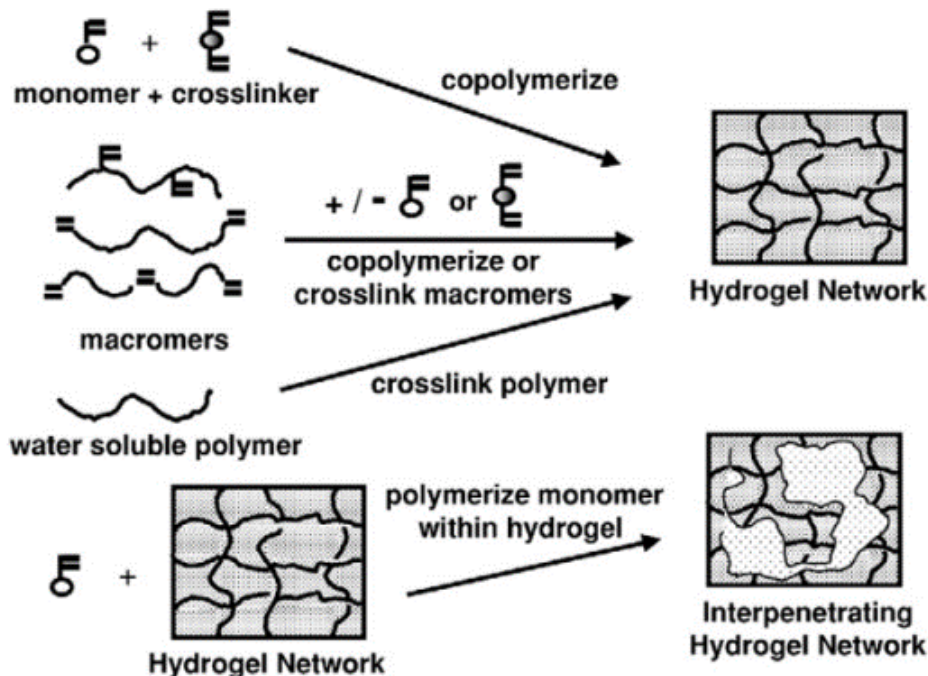


Figure 1-8 : Schéma représentant la formation d'hydrogels chimiques, par polymérisation ou réticulation de polymère hydrosoluble<sup>67</sup>.

Dans la suite de cette étude, nous développerons plus précisément deux polymères naturels (hydrogels réversibles) en utilisant deux méthodes de gélification différentes.

### c. Hydrogels stimulables

Une des grandes particularités de certains hydrogels est leur capacité à réagir à des stimuli extérieurs, et ainsi subir des modifications plus ou moins importantes d'un point de vue structural (structure du réseau), gonflement, perméabilité, ou encore des propriétés mécaniques. On peut classer les hydrogels (*Fig.1-9*) dans différentes catégories reflétant leurs réponses à l'application d'un stimulus externe.

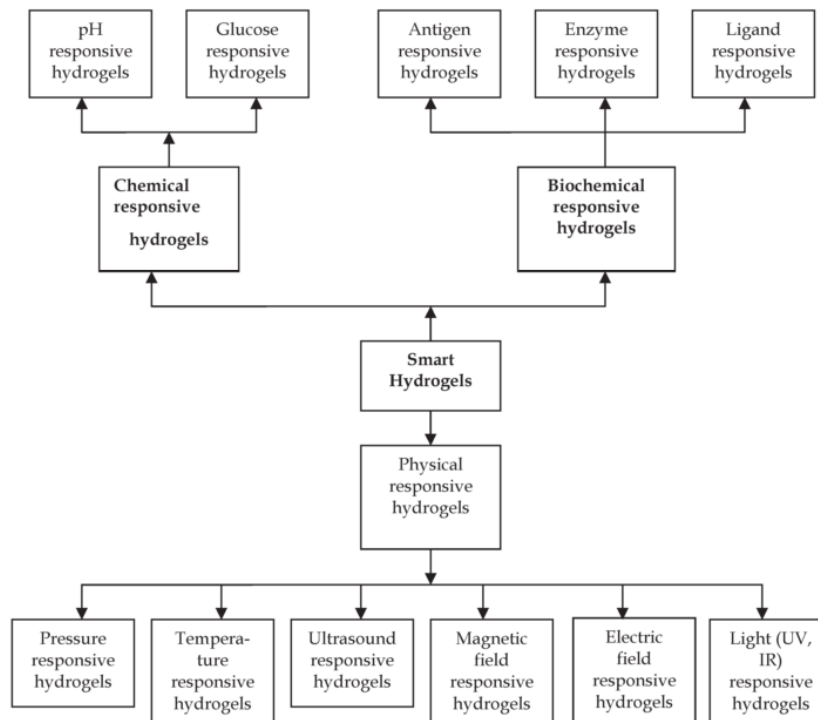


Figure 1-9 : Classification des hydrogels stimulables selon l'origine du stimulus, Physique, Chimique, Biochimique <sup>66</sup>

Les hydrogels stimulables<sup>85</sup> sont des matériaux qui présentent un grand intérêt dans le domaine du stockage et de la délivrance médicamenteuse. Effectivement, la structure poreuse du réseau permet à la molécule considérée de s'introduire dans l'hydrogel, ce qui la protège en présence d'enzymes ou de pH faible comme par exemple dans le cas d'une ingestion orale. La façon dont la molécule thérapeutique est incorporée dans l'hydrogel impacte le contrôle de sa délivrance en fonction de son interaction avec la matrice<sup>78</sup>. Malgré le fort potentiel des hydrogels stimulables, ceux-ci semblent avoir une efficacité limitée par le relargage de molécules due à leurs faibles propriétés mécaniques engendrant leur détérioration stimulation après stimulation sa détérioration. Par ailleurs il est généralement observé qu'un relargage trop rapide de la molécule<sup>86</sup>. Quelques exemples de réponses d'hydrogels aux stimuli sont donnés ci-après en fonction du stimuli :

#### □ Sensibilité au pH

Ces hydrogels sont constitués d'un squelette en polymère possédant des fonctions libres « dangling bonds » à caractère ionique dont la caractéristique est de pouvoir accepter ou donner un proton lors d'une variation de pH. Ce phénomène est régi par la modification du degré d'ionisation, ce qui engendre le changement de la charge de ces fonctions et peut donc engendrer de rapides variations de volume. Typiquement, les hydrogels anioniques (*groupe libre : acide carboxylique*) ou cationiques (*groupe libre : fonction amine*) sont sensibles au pH. Les mécanismes dirigeant ce phénomène dépendent de la charge ionique et du pKa des fonctions considérées, mais également de la force ionique de la solution extérieure<sup>66,87,88</sup>.

#### ☐ *Sensibilité à la température*

Les hydrogels sensibles à la variation de température, sont appelés hydrogels thermosensibles. Un changement de température induit une transition solide-gel (sol-gel) à une température critique. Par exemple, la gélatine (hydrogel physique) est liquide à des températures supérieures à 35°C. Certaines interactions moléculaires comme les interactions hydrophobes ou encore les liaisons hydrogènes, sont des acteurs principaux dans la variation de volume des gels. Ainsi, l'interaction des liaisons hydrogènes polymère/eau deviennent défavorables au regard de l'interaction polymère/polymère. Ce phénomène entraîne la déshydratation du réseau (dégonflement) et donc sa rétractation. Plusieurs études reportent la fabrication de ce type d'hydrogel à base de différents polymères : méthylcellulose<sup>89</sup>, ou encore l'un des plus utilisés à savoir le Poly N-isopropylacrilamide<sup>72</sup>. Ce type d'hydrogel est utilisé dans le domaine de la délivrance de médicaments<sup>90</sup>.

#### ☐ *Sensibilité à une molécule : exemple du glucose*

L'hydrogel est composé d'un mélange de polymère le plus souvent cationique<sup>91,92</sup> ayant encapsulé de l'insuline ainsi qu'une enzyme : la glucose oxydase. En présence de glucose et d'oxygène, la glucose oxydase convertit le glucose en acide gluconique, ce qui provoque une diminution du pH au sein du réseau, engendrant le gonflement (groupes cationiques) de l'hydrogel, ce qui a pour conséquence le relargage de l'insuline<sup>66,93</sup>. Ces hydrogels ont pour fonction d'améliorer la prise d'insuline par les malades. Ils permettent la libération d'une quantité d'insuline définie par le taux de glucose présent.

*Pour résumer, les hydrogels présentent des propriétés diverses :*

- ☐ *Biocompatibilité / dégradabilité*
- ☐ *Propriétés mécaniques variables : Gels durs, mous, cassant, etc.*
- ☐ *Porosité variable*
- ☐ *Contrôle du gonflement / dégonflement sous application de stimuli externes*

*Les différents points discutés illustrent bien l'étendue du domaine d'activité des hydrogels au regard de leur nature, leur mise en forme et leurs propriétés intrinsèques. Chacun de ces critères est à prendre en compte pour l'obtention d'un matériau aux propriétés désirées. Ces hydrogels peuvent aussi être « modifiés » avec des nanoparticules ce qui permet d'améliorer certaines de leurs propriétés voire d'en obtenir de nouvelles.*

## C. Hydrogels nanocomposites

Les nanocomposites hydrogels aussi appelés « *hydrogels hybrides* » sont définis, par un réseau tridimensionnel réticulé de manière physique ou chimique (similairement aux hydrogels seuls) et incluant des nanomatériaux qui peuvent être de nature très variable : les nanoparticules carbonées (*NTC*, *Graphène*, *nano diamant*), nanoparticules polymériques, nanoparticules inorganiques (*hydroxyapatite*, *silice*, *silicates*, *oxyde de fer*), nanoparticules métalliques (*or*, *argent*). Ces nanoparticules interagissent directement avec le réseau polymérique, ce qui permet l'obtention de nouvelles propriétés (Fig.1-10).<sup>94-96</sup>

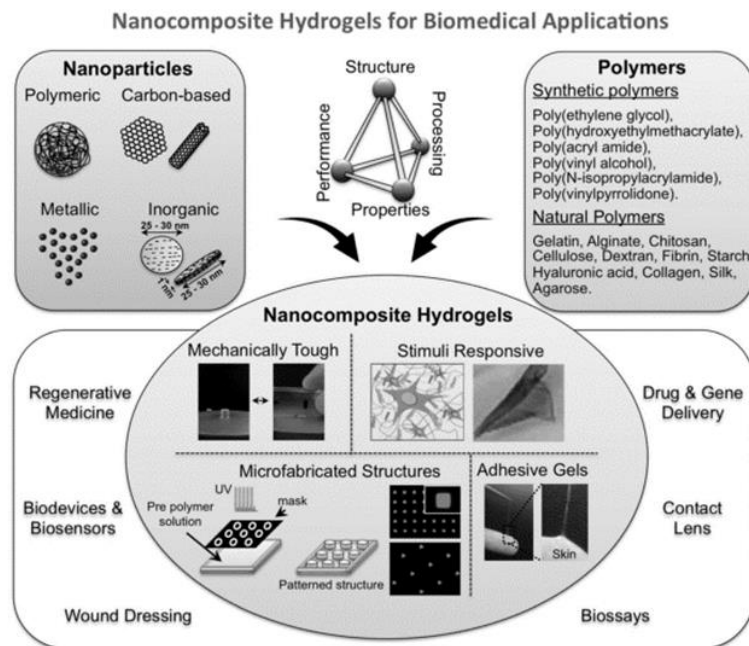


Figure 1-10 : Schéma représentant le panel de nanoparticules utilisées dans le domaine du biomédical comme les nanoparticules carbonées, polymériques, inorganiques, métal/métal oxyde, combinées avec différents polymères pouvant être naturels ou synthétiques. Ces différents nanocomposites peuvent être réticulés de manière physique ou chimique.<sup>96</sup>

### □ Hydrogels Nanocomposites à base de nanomatériaux carbonés

Les nanomatériaux carbonés comme les *NTC* ou encore le graphène, les fullerènes, les nano diamants sont largement étudiés pour de potentielles applications biomédicales<sup>94,97</sup>. Les *NTC* et le graphène sont utilisés pour leurs multifonctionnalités, à savoir leurs hautes propriétés mécaniques et leurs propriétés électriques intéressantes. Par exemple, les nanocomposites à base de *NTC* et de graphène sont étudiés pour des applications en tant que biocapteurs, dans l'ingénierie tissulaire, la délivrance de molécules, etc<sup>94,98,99</sup>. D'autres études montrent l'efficacité des *NTC* pour la délivrance passive de diclofénac de sodium ( $\approx 300\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )<sup>100</sup> au travers de la peau. Dans ce cas, la présence des *NTC* ralentit la diffusion de la molécule, permettant ainsi de mieux réguler la cinétique de relargage, tout en améliorant la capacité de stockage de la molécule.

## □ Hydrogels nanocomposites électro-stimulés

La bibliographie décrit plusieurs travaux concernant l'étude des propriétés électriques des hydrogels. La complexité de ce type de matériaux réside dans le fait qu'il ne s'agit ni d'un matériau liquide, ni d'un matériau solide (*Fig.1-11(b)*). Les hydrogels peuvent contenir jusqu'à 97% d'eau et renferment très souvent aussi des ions. La *Figure 1-11(a)* montre la structure d'un matériau nanocomposite biphasique présentant une matrice isolante (polymère) et un additif conducteur (*NTC*).

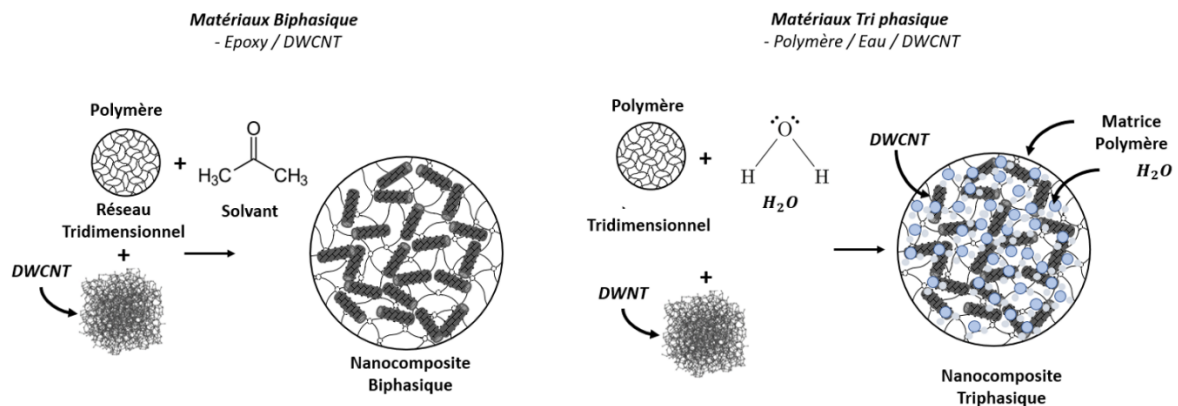


Figure 1-11 : (a) Représentation d'un nanocomposite biphasique classique ; (b) représentation d'un nanocomposite triphasique comportant l'eau inclut dans les pores de la structure en polymère, et les NTC.

Un nanocomposite hydrogel contenant des *NTC* comporte trois phases (ou plus), constituées de deux milieux isolants : l'eau contenue dans les pores (potentiellement ionisée), le polymère (matrice), et le matériau conducteur (*NTC*) est illustré en *Figure 1-11(b)*. Il semble évident que le comportement des *NTC* dans un matériau biphasique à morphologie 3D (exemple : nanocomposite époxy/*NTC*), n'est pas le même que dans un hydrogel. En effet, l'expansion du réseau pour la même masse de *NTC* dans un hydrogel, provoque la diminution du pourcentage volumique de *NTC* et potentiellement une modification des conditions de percolation. Pour comprendre le comportement des *NTC* en phase liquide, des chercheurs proposent de mesurer le seuil de percolation des *NTC* (seuls) dans un liquide, en faisant varier différents paramètres comme la nature des *NTC*<sup>101</sup>, leur concentration ou encore la tension appliquée. La percolation des *NTC* apparaît à une concentration plus faible que celle d'un matériau solide, de type époxy/*NTC*. Ceci peut être expliqué en partie par la mobilité plus importante des *NTC* lorsqu'ils sont dispersés dans un liquide et sous l'influence d'un champ électrique.

Les hydrogels sensibles au courant électrique sont généralement composés d'un mélange de poly-électrolytes synthétique et naturel. Lors de l'application d'un stimulus électrique, les hydrogels gonflent, dégonflent et se déforment, en fonction de la géométrie et de l'orientation des électrodes<sup>102</sup>. En conséquence, la réponse à un stimulus d'origine électrique provoque le relargage de la molécule par différents mécanismes. Lors de la stimulation les molécules médicamenteuses chargées migrent à l'électrode de charge opposée, mais le plus

souvent, la contraction de l'hydrogel induite par le champ électrique provoque l'éjection de la molécule hors du gel considéré. Le phénomène de dégonflement (le plus courant) peut s'expliquer par trois mécanismes :

- ❑ *Apparition d'un gradient de contraintes au sein de l'hydrogel*
- ❑ *La variation de pH aux abords de l'électrode, provoquant l'électrolyse de l'eau (augmentation du pH à la cathode et diminution à l'anode)*
- ❑ *Electro-osmose de l'eau en synergie avec l'électrophorèse.*

Ces phénomènes dépendent de la nature du matériau considéré, mais aussi des conditions expérimentales. Les hydrogels classiques présentent une limitation d'un point de vue de ces réponses. En effet, la non linéarité du relargage<sup>103</sup> lors de l'application d'un stimulus externe répété engendre la fatigue du matériau<sup>104</sup>. L'intérêt d'ajouter des nanomatériaux (*NTC*, *graphène*) dans les hydrogels est bien d'améliorer leurs propriétés intrinsèques, particulièrement mécaniques et électriques. Plusieurs équipes travaillant sur le développement des hydrogels pour la délivrance intra-dermique (voie sous-cutanée) démontrent l'effet des *NTC* sur les propriétés électriques et donc sur le relargage<sup>105</sup>. La plupart du temps, les mesures de conductivité (hydrogels stimulables) sont effectuées à l'aide d'un Ohmmètre classique<sup>106</sup>. Les résultats montrent une importante diminution de la résistance, de l'ordre de  $\approx 50\%$ , ce qui est en bien inférieur à ce qui est décrit pour des nanocomposites biphasiques. Il semblerait que ces valeurs de résistances élevées soient dues à la faible concentration en *NTC* utilisée ( $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) qui engendrerait une diminution modérée de cette résistance. Toujours en regard des propriétés électriques des hydrogels, d'autres équipes<sup>107</sup> travaillant avec des nanocomposites *MWNT*/gélatine, augmentent la concentration des *MWNT* pour atteindre la percolation à des concentrations bien supérieures au cas des nanocomposites biphasiques<sup>108</sup>. Les auteurs montrent, à l'aide de mesures par impédancemétrie (en courant alternatif), que plus la quantité de *NTC* augmente plus la conductivité du nanocomposite augmente, jusqu'à atteindre la percolation. La percolation est atteinte par la déshydratation contrôlée de l'hydrogel. La variation de volume entraîne la déformation du réseau et permet aux *NTC* de se rapprocher pour finalement percoler. Ces composites polymère / *NTC* ont des conductivités pouvant atteindre  $7 \text{ ms.cm}^{-1}$ , contre  $2 \text{ ms.cm}^{-1}$  pour l'échantillon sans nanotubes. Le gain de conductivité dû à cette percolation n'est pas vraiment significatif contrairement à un composite biphasique comme le montre la *Figure 1- 6(a)*. D'une part, la diminution de la quantité d'eau provoque l'augmentation de la concentration en ions ce qui pourrait engendrer l'augmentation de la conductivité ionique, d'autre part la viscosité augmente ce qui devrait produire l'effet inverse. Il semble donc assez difficile d'expliquer ce phénomène. Le courant alternatif permet aux ions de bouger librement au sein du polymère. Ceci est toutefois limité par la fréquence en rapport à leurs tailles.

Les hydrogels ne sont pas la seule structure comprenant un liquide à laquelle les scientifiques s'intéressent. Il existe également les matériaux *Sol-Gel*. A titre d'exemple, il a été rapporté qu'un gel de silice dopé avec des *NTC* présente une percolation dès  $0,1\%$ <sup>109</sup>. Dans ces

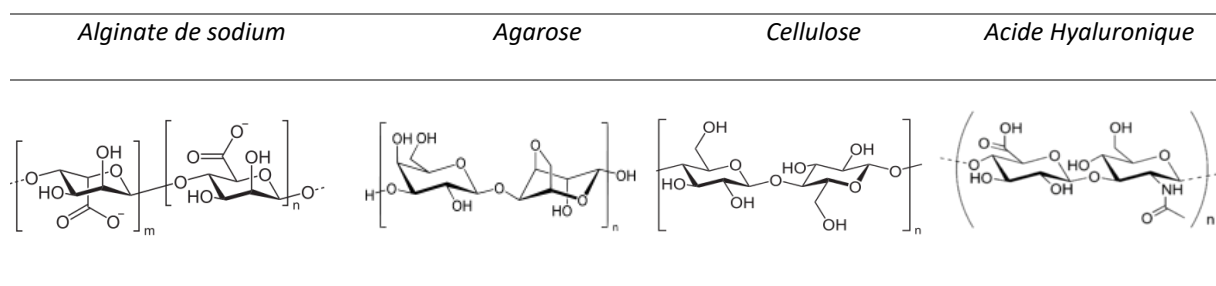
travaux, les mesures d'impédance ont permis de mettre en évidence un régime de conduction à la fois ionique (contribution des ions) et électronique (contribution des *NTC*). Il est montré que la contribution des *NTC* intervient à basse fréquence, typiquement de 0,1 mHz jusqu'à environ 100 Hz. La plupart de ces travaux utilisent des mesures d'impédance en tension sinusoïdale, ce qui est idéal en première approche pour observer l'effet des *NTC* sur la conduction ionique ou électronique de l'hydrogel, et permet donc de déterminer le taux de percolation des *NTC*.

## IV. Les polymères bio-sourcés

### A. Définition

Une meilleure prise en compte des aspects environnementaux et la chimie « verte », pousse à faire évoluer les méthodes de fabrication actuellement utilisées. Ainsi, les polymères naturels (*Tableau 1-4*) et particulièrement les polysaccharides, jouissent d'un essor nouveau et d'un intérêt dans le domaine du biomédical dans lequel leur biocompatibilité et/ou bioresorbabilité présentent un intérêt indéniable. Leur principal défaut concerne leurs piètres propriétés mécaniques qui peuvent être problématiques pour certaines applications. Les interactions des polymères naturels avec l'environnement les prédestinent à se dégrader et donc à potentiellement perdre leurs propriétés. Plusieurs travaux rapportent l'utilisation des biopolymères<sup>111,112</sup> pour la dispersion des *NTC*. En effet, les chaînes de polymère s'organisent autour du nanotube de carbone changeant donc ses propriétés, notamment son caractère hydrophobe et potentiellement sa charge de surface. Certains sont connus et ce même du grand public, comme l'alginate, l'agar-agar, l'amidon ou encore le chitosane.

*Tableau 1-4 – Quelques exemples de polymères bio-sourcés.*



Les biopolymères se dégradent naturellement dans l'organisme par hydrolyse et libèrent des molécules assimilables et non toxiques. En galénique, les formulations permettant le relargage de principe actif (*PA*) font appel à ces propriétés de biorésorbabilité. En effet, les polymères biosourcés sont généralement solubles dans l'eau et permettent donc de limiter l'usage de solvants organiques polluants et dangereux.



## A.i. Alginate de sodium

### a. Définition

Lorsque l'acide alginique est lié à un ion métallique, il en résulte la formation d'alginate de différents types pouvant être solubles ou insolubles dans l'eau. Il se trouve que les alginate à caractère insoluble possèdent des fonctions carboxylate ( $\text{COO}^-$ ) liées à un cation empêchant leur solubilisation. Les autres à caractère soluble se solubilisent dans l'eau et ainsi peuvent former des liaisons avec un métal mono ou divalent (i.e ;  $\text{K}^+$  ;  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ )<sup>113</sup>(Fig.1-12). Les alginate sont des copolymères (polymères issus de la copolymérisation d'au moins deux types de monomères chimiquement différents) non ramifiés.

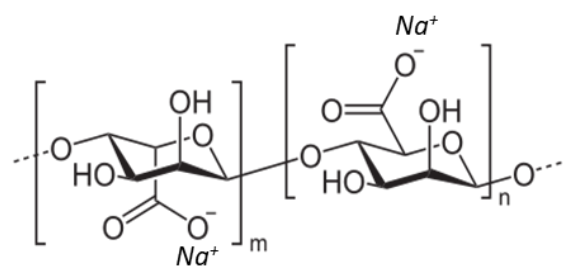


Figure 1-12 : Illustration représentant la structure de l'alginate de sodium de formule  $(\text{C}_6\text{H}_7\text{Na}_{1/2}\text{O}_6)_n$

Le plus gros avantage des alginate et des hydrogels en général est leur faculté à former un réseau tridimensionnel offrant ainsi une très grande capacité de rétention d'eau. Leur structure est par ailleurs stable à température ambiante. De manière générale, l'alginate offre des propriétés rhéologiques intéressantes. Sa dissolution permet en effet d'augmenter la viscosité de la solution aqueuse si bien qu'elle est très utilisée dans de nombreux domaines industriels tels que le textile, le papier, la cosmétique, l'agroalimentaire, mais également le médical. La configuration structurale de l'alginate définit ses propriétés mécaniques. L'alternance de blocs de natures différentes (*blocs Guluroniques (G) ou Mannuroniques (M)*) permet d'obtenir des alginate aux propriétés différentes. (Fig.1-13)

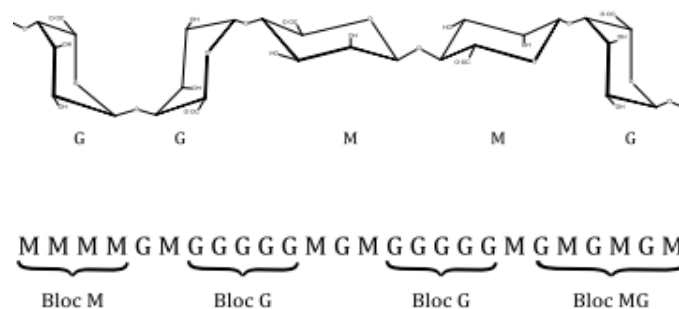


Figure 1-13 : Structure des différents blocs composant l'alginate à savoir les blocs G et les blocs M – (b) distribution possible des blocs

## b. Gélification

Lors de la « gélification », les chaînes adoptent une configuration géométrique dite en boîte à œufs. Plus l'alginate est riche en blocs G, plus le réseau formé sera solide et structuré. Il sera alors prêt à être utilisé pour la fabrication de gel (Fig.1-14). Par ailleurs, les gels à fortes proportions de blocs M sont plus flexibles. Ceci est principalement dû à la force de liaison ionique et à la flexibilité de la chaîne. Leur utilisation principale concerne les épaississants et stabilisants<sup>114,115</sup>. Le gel d'alginate se forme instantanément en présence de cations divalents, qui viennent se substituer à l'ion sodium associé aux fonctions carboxylates (Fig.1-12) et lier ainsi deux chaînes d'alginate entre elles formant le gel. La présence d'ions monovalents tels que le sodium ou le potassium ne permet pas de former des ponts divalents entre les chaînes.<sup>116</sup>.

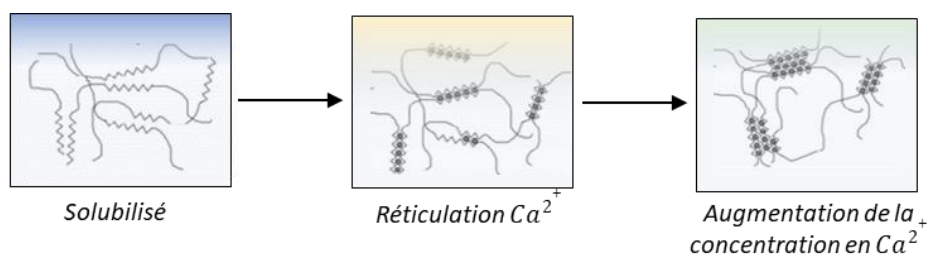


Figure 1-14 : Réticulation de l'alginate de sodium en configuration « boîte à œufs » par intercalation d'ions calcium.

De nombreux cations divalents peuvent être utilisés pour « réticuler » l'alginate. On observe une plus grande affinité avec les cations  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ <sup>117</sup> qui induisent la conformation structurale en « boîte à œufs ». L'agrégation des chaînes entre elles permet la formation du gel<sup>118</sup>. Il est également possible que d'autres ions offrent cette possibilité. Il s'agit du plomb, cuivre, cadmium, baryum, strontium, nickel, zinc, cobalt<sup>117</sup>. Une liaison ionique apparaît entre la fonction carboxylate et l'ion métallique<sup>113</sup>. La principale méthode de mise en forme de l'alginate de sodium est la voie ionique. Plus particulièrement, l'utilisation des ions  $\text{Ca}^{2+}$  permet d'obtenir un gel résistant et uniforme<sup>119</sup>. En effet sous l'action d'une autre solution saline, il se peut que les espèces en présence réagissent avec l'alginate, et entraînent la déstabilisation des ions calcium du réseau. Typiquement ce phénomène pourrait se produire dans une solution de fluide corporel (transpiration, fluide biologique) pouvant dépasser  $\text{pH}$  7.4<sup>120</sup>. Par ailleurs, d'autres ions divalents ou trivalents peuvent interagir avec les chaînes et venir substituer l'ion calcium, ce qui créerait une différence d'uniformité au niveau du réseau. Cette substitution peut conduire au relargage des chaînes et donc à la déstabilisation du réseau polymérique<sup>67</sup>.

### A.ii. L'agarose

#### a. Définition

L'agar agar est un polygalactoside extrait de la paroi cellulaire de certaines algues rouges. Plus précisément, il s'agit d'espèces répondant aux noms de Gélidium et Gracilaria<sup>121</sup>. L'agar

trouve son origine au Japon, il y a 400 ans. Il était alors vendu sous forme de solution chaude ou de gel (froid). Son industrialisation en extrait sec a démarré au début du 18ème siècle et il est maintenant appelé Agar-agar. Le terme « Agar » est aujourd’hui le plus utilisé et l’agarose est en fait un polymère non ramifié issu d’agar purifié. L’agarose est largement utilisée en biologie, notamment pour l’électrophorèse de l’ADN.

L’agar-agar est composé en réalité de deux polymères, à savoir :

- ❑ L’agaropectine(anionique) est plutôt hydrophile, constituée d’unités d’agarobiose substituées (groupements polaires : pyruvates ( $\text{CH}_2\text{-CO-COO}^-$ ), sulfates ( $\text{SO}_3^-$ )<sup>121,122</sup>).
- ❑ L’agarose, constituée majoritairement d’agarobiose contenant de nombreux radicaux hydrophobes comme  $\text{CH}_2\text{O}$  ainsi que des groupements OH et H responsables de la gélification de l’agar agar. La quantité de groupements sulfates peut varier et rendre l’agarose plus ou moins hydrophile selon leurs quantités respectives<sup>123</sup>.

L’agarose a une masse moléculaire d’environ 120 000 g. mole<sup>-1</sup> (disaccharides) et contient principalement du D-galactose et du 3,6-anhydro-L-galactose (Fig.1-15). L’agarose trouve son utilisation dans l’industrie agroalimentaire comme épaississant, gélifiant ou stabilisant, ou dans l’industrie pharmaceutique comme excipient, laxatif, ou encore agent de libération. L’agarose permet également la culture de microorganismes en microbiologie <sup>115</sup>. Les propriétés les plus intéressantes de l’agarose résident dans sa température de fusion/gélification, ses propriétés électriques<sup>124,125</sup> ainsi que sa facilité de mise en forme.

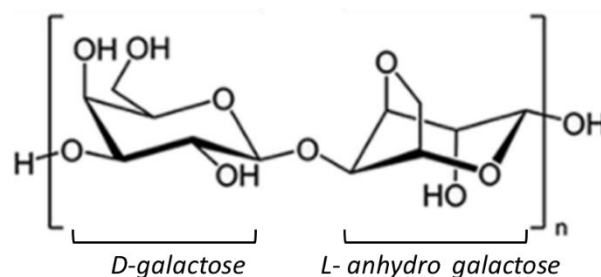


Figure1-15 : Structure chimique de l’agarose, présentant l’unité de répétition de l’agarose avec ; D-Galactose et le L-Anydro Galactose.

### b. Gélification

L’agarose est un polymère linéaire, les chaînes forment des hélices (Fig.1-16) qui s’agrègent entre elles pour former un enroulement<sup>121,126</sup>. Une fois la gélification effectuée, on observe des pores de tailles variant entre 100 et 300 nm <sup>127</sup>, également dépendant de la concentration en agarose. Plus la concentration en agarose augmente, plus la taille des pores diminue. La transition « sol » vers l’état « sol-gel » se déroule en quelques étapes :

- ❑ La solubilisation du polymère en voie humide et en température permet aux chaînes de s’étendre. Les chaînes se distribuent ensuite de manière homogène sous forme

d'hélices lors du refroidissement. Enfin, il apparaît l'agrégation entre les hélices lorsque le point de gélification de l'agarose est atteint.<sup>128</sup>

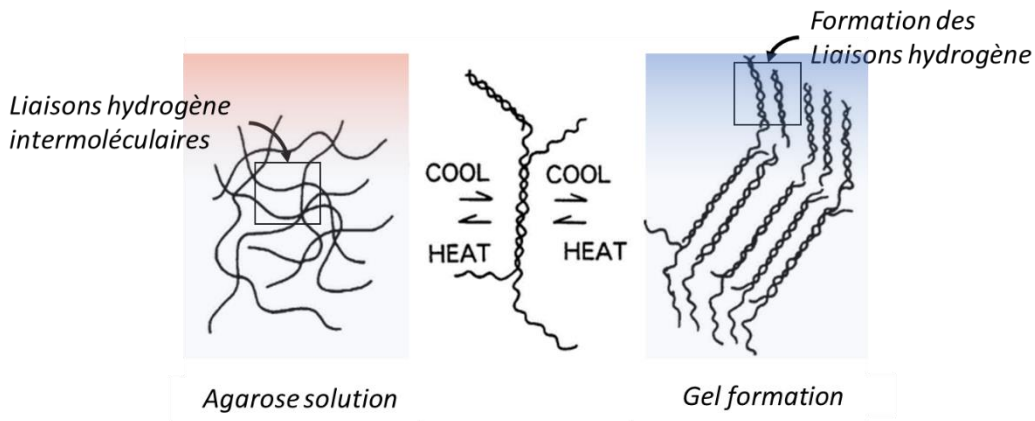


Figure 1-16 : Formation du gel d'agarose – Suspension d'agarose chauffée à une température supérieure à 85°C qui perturbe la liaison hydrogène des groupes – OH et O. Au refroidissement, les liaisons hydrogène s'interconnectent pour former un réseau hydraté<sup>129</sup>

Pour obtenir un gel, la solution contenant l'agarose doit être portée à une température d'environ 87°C (*Température de fusion Tf*) puis par la suite refroidie afin d'atteindre la gélification complète du système à environ 40°C (*Tg*)<sup>129</sup>. L'agarose comporte deux types de groupements, hydrophiles et hydrophobes. La chaîne d'agarose est pauvre en radicaux de type hydrophiles  $SO_3^-$  et au contraire riche en radicaux hydrophobes  $CH_2-O$ . Ces différents radicaux sont répartis de part et d'autre du réseau. Etant donné la présence de radicaux de différentes natures, les chaînes de polymère se placent parallèlement entre elles de façon à ce que les radicaux hydrophobes soient tournés vers l'intérieur et les radicaux hydrophiles vers l'extérieur. Le processus de gélification de la solution se déroule selon le schéma ci-dessus (Fig.1-16) qui montre plusieurs états en fonction de la température. Les chaînes de polymères s'associent entre elles pour former une double hélice piégeant ainsi l'eau au cœur de l'enchevêtrement formé. La gélification de l'agarose a la propriété d'être réversible, ce qui lui confère un atout de recyclage majeur<sup>113,130</sup>. En effet, en élevant à nouveau la température au-delà de 87°C, on peut fondre le polymère tout en conservant ses propriétés mécaniques et thermiques. A la différence d'autres polysaccharides, la formation du gel ne nécessite aucun autre composant, ce qui lui confère l'appellation de polymère « *spécifiquement neutre* ».

L'agar comporte des caractéristiques très intéressantes en tant que biopolymère<sup>121</sup>:

- Il possède un grand pouvoir gélifiant.
- Aucun réactif n'est à ajouter pour produire le gel tel que le potassium ou le calcium ou tout autre cation divalent comme par exemple pour les alginates.
- Sa structure est stable dans un large domaine de pH ( $5 \leq \text{pH} \leq 8$ ).
- L'agarose est stable à une température même légèrement supérieure à 100°C.

- ❑ A 1,5 %m en polymère en solution aqueuse, il ne fond pas entre 30 et 40°C (température interne du corps humain). En revanche, il se liquéfie au-delà de 85°C. C'est l'une des propriétés très originales de l'agarose.
- ❑ Son gel a une excellente réversibilité, ce qui permet donc de le gélifier et de le refondre à plusieurs reprises sans perdre ses qualités.

L'agarose est un polymère qui comme tous les biopolymères se démocratise dans le domaine des nanocomposites. Certaines études décrivent la fabrication d'un matériau (hydrogel) à base d'agarose dans le but d'obtenir un gel conducteur électronique et possédant également des propriétés d'auto-réparation activées par la température<sup>131</sup> ou d'autres applications concernant la délivrance de molécules par l'encapsulation de protéines et peptides par des nanoparticules d'hydrogel d'agarose<sup>81</sup>.

## V. Dispositifs médicaux pour la délivrance transdermique

La peau est un organe complexe qui comporte différentes couches ayant des propriétés physico-chimiques et biologiques différentes.

### A. Anatomie de la peau

La peau humaine a une épaisseur moyenne qui varie de 2 à 3 millimètres en fonction de sa location sur le corps (dos, ventre, bras, jambes). Elle est constituée de trois couches définies qui sont (en allant de la surface au cœur de la peau) : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Fig.1-17). Avec une surface d'environ 2m<sup>2</sup> chez l'adulte, sa masse frôle les 13 % de la masse totale du corps humain.

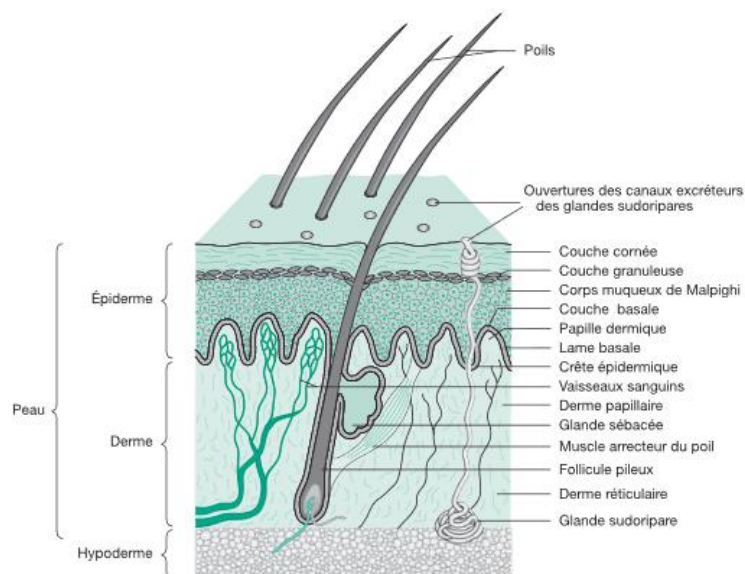


Figure 1-17 : Coupe de la peau - Source : Perlemuter L, Perlemuter, G. *Cycles de la vie et grandes fonctions*, « Cahiers des sciences infirmières ». Elsevier Masson SAS, 2010

La principale fonction de la peau est sa fonction barrière qui comporte différents aspects. Cette barrière physique permet de limiter le passage d'éléments du milieu intérieur vers le milieu extérieur et inversement. Effectivement, le *stratum corneum* est formé d'une structure lamellaire qui permet d'empêcher l'eau de s'évaporer. La peau possède des défenses contre les attaques de différentes origines comme par exemple les microorganismes pathogènes. En effet son pH acide ou encore la présence de cellules immunitaire permettent cette protection. Le renouvellement épidermique permet également d'empêcher la pénétration d'éléments extérieurs. Celle-ci sert également de protection mécanique de par sa structure complexe.

### A.i. L'épiderme

L'épiderme est la couche de la peau la plus proche de la surface. Il est délimité par la lame basale qui le sépare du derme. Il est composé depuis la surface du *stratum corneum* ou couche cornée, de la couche granuleuse et enfin de la couche basale. Dans cette zone, il n'y a pas de vaisseaux sanguins. L'épiderme a une épaisseur moyenne de 200  $\mu\text{m}$ , avec un minimum de 100  $\mu\text{m}$  au niveau des paupières et maximum de 800  $\mu\text{m}$  au niveau des paumes des mains et des plantes des pieds (Fig.1-18).

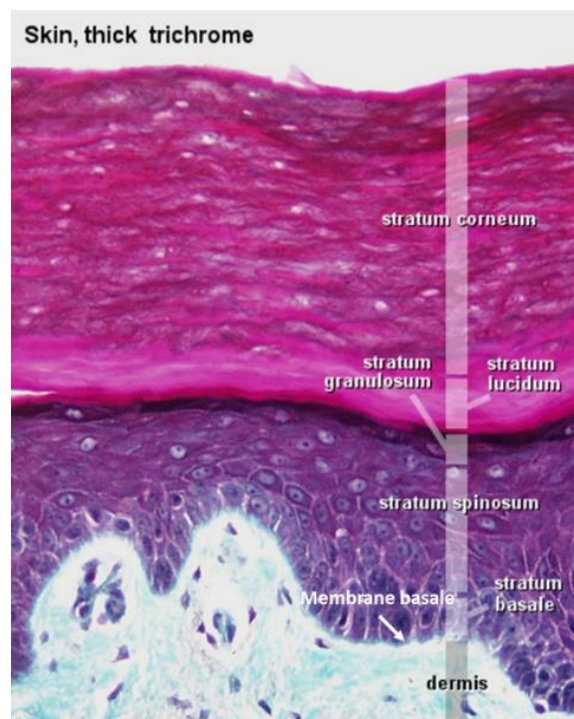


Figure 1-18 : Image optique d'une coupe transversale de la peau humaine : montrant l'épiderme et le derme - image trichrome (School of Anatomy and Human Biology - The University of Western Australia Lutz Slomianka).

Le renouvellement de cette couche épidermique s'effectue tous les 39 jours. Les cellules qui se trouvent dans la couche basale de l'épiderme migrent lentement en direction de la surface en se transformant progressivement et perdant leur noyau. La kératine synthétisée par les

kératinocytes est une protéine fibreuse qui confère au *stratum corneum* des propriétés diélectriques particulières. Dans la matrice de l'épiderme, composée à 90% de kératinocytes, se trouvent également les mélanocytes qui sont eux responsables de la couleur de la peau. S'y trouvent également les cellules de Langerhans qui jouent un rôle dans la défense immunitaire. Le *stratum corneum* est la couche en extrême surface de l'épiderme, la lame basale est la plus profonde des strates, ces deux couches sont décrites ci-dessous.

### **a. Le stratum corneum**

Le *stratum corneum* (Fig.1-18) est la partie en surface de la peau. Cette partie ne représente qu'une petite portion de l'épiderme d'épaisseur de 10 à 20  $\mu\text{m}$  à l'état sec mais de 40  $\mu\text{m}$  à l'état hydraté<sup>132,133</sup>. La couche cornée comprend approximativement 15 couches de cellules mortes (*cornéocytes*) comprenant une centaine de doubles couches lipidiques, qui se présentent sous la forme d'écailles. Cette couche cornée est en contact permanent avec le monde extérieur et nous protège des agressions de par son caractère quasi imperméable à l'eau. Elle s'exfolie constamment du fait du renouvellement des cellules âgées par des cellules plus jeunes. Les cellules mortes de surface s'éliminent par le lavage de la peau, le frottement des vêtements, etc. La couche cornée est hydratée, ce qui lui confère ses propriétés de souplesse. D'un autre côté le *stratum corneum* devient très fragile en cas d'altération (brûlure, griffure, plaie), et perd sa fonction de barrière protectrice, ce qui entraîne des risques d'infections<sup>134</sup>. En surface extrême de la peau se trouve le premier rempart constitué d'un film hydrolipidique. Cette protection est constituée de sébum, de débris épidermiques, ou de sels minéraux. Cette barrière protège la peau de l'humidité, de la sécheresse, des agressions microbiennes.

### **b. La membrane basale**

La membrane basale (Fig.1-18) est une matrice extracellulaire aux fonctions très élaborées. Elle est structurée par de très fins feuillets d'épaisseur de l'ordre de 50 à 80 nm. Cette membrane assure une fonction non seulement de cohésion et de soutien mécanique, mais également biologique, comme sa fonction de filtration des sels ou des petites molécules. La membrane basale communique des signaux modulant la migration, la prolifération ou encore la différenciation cellulaire. La membrane basale est un passage clef marquant une frontière entre l'épiderme et le derme.

## **A.ii. Le derme**

Le derme, localisé en-dessous de l'épiderme, forme la première et la plus épaisse couche véritable de la peau. Celui-ci est séparé de l'épiderme par la membrane basale, qui représente un filtre de diffusion vis-à-vis des molécules qui circulent entre le derme et l'épiderme. Le derme est un tissu interfacial (Fig.1-18, 1-19) qui comprend des cellules du derme appelées fibroblastes, entourées par une matrice extracellulaire. Il contient plusieurs organes comme

des vaisseaux sanguins et les terminaisons nerveuses. Le derme se divise en deux régions : le derme papillaire et le derme réticulaire. Le derme et l'épiderme s'interconnectent tout au long d'une zone dans laquelle se trouvent les papilles (petites excroissances où se divisent les réseaux sanguins) ainsi que les terminaisons nerveuses, sensibles à la chaleur.

### A.iii. L'hypoderme

L'hypoderme est la partie la plus profonde de la peau. Il est constitué de cellules graisseuses, organisées en lobules, séparées par des membranes fibreuses et traversées par des vaisseaux sanguins. L'hypoderme est une couche difficile à discerner (Fig.1-19) où se situent les glandes sudorales qui produisent et libèrent la sueur via des petits canaux invisibles à l'œil nu. Ces canaux, au nombre de 2 millions environ, sont répartis sur toute la surface de la peau même s'ils sont largement plus nombreux sur les paumes des mains.

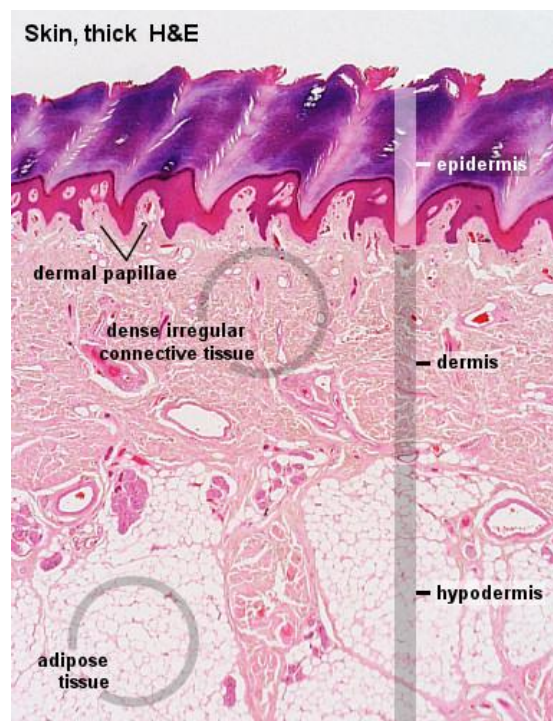


Figure 1-19: Structure du derme, épiderme, hypoderme – (School of Anatomy and Human Biology - The University of Western Australia Lutz Slomianka )

## B. La perméabilité de la peau aux agents thérapeutiques

Le *stratum corneum* confère à la peau ses propriétés barrières. C'est la raison pour laquelle il est difficile de faire traverser des molécules au travers de la peau sans destabiliser cette couche de protection. Il existe différents endroits sur le corps où la peau est d'avantage perméable comme par exemple les muqueuses, la peau du scrotum et les paupières. D'autres zones du corps telles que le visage, la tête, la poitrine, le dos, les fesses, l'abdomen, les bras



et les cuisses possèdent une perméabilité intermédiaire. Généralement, pour l'application de patches transdermiques, il est préférable d'utiliser les zones telles que les cuisses, les bras, le dos et la poitrine (peau fine). Ainsi pour chaque substance médicamenteuse utilisée, un site d'application doit être déterminé. Il est donc crucial de bien choisir la zone où le dispositif est placé. Il faut que la peau à cet endroit, soit saine et propre. Notons également que la perméabilité de la peau varie en fonction de l'âge et de l'état de santé. <sup>135</sup>

*Les principaux paramètres pouvant faire varier la perméabilité de la peau sont :*

- Le flux sanguin. Celui-ci augmente au niveau du derme. Le flux sanguin peut être modifié par certaines affections ou certains médicaments*
- L'état d'hydratation de celle-ci : une peau hydratée sera plus perméable qu'une peau sèche.*
- Les éraflures et les irritations*
- Plus la température de la peau augmente plus celle-ci sera perméable. Les brûlures provoquent également une augmentation de la perméabilité.*
- Les coups de soleil.*

## ***B.i. Absorption cutanée***

L'absorption cutanée est un phénomène de diffusion passive qui s'applique à chaque couche de la peau et se scinde en différentes étapes. La distribution de la molécule au travers de la peau se produit selon une concentration qui décroît de façon linéaire vers les couches plus profondes.

### ***a. Mécanismes***

*L'absorption cutanée d'un principe actif (PA) se déroule en 3 étapes :*

- Entrée d'un PA au sein d'une structure comme par exemple la pénétration dans le stratum corneum.*
- Diffusion : Passage d'un PA d'une couche à une autre comportant des propriétés structurelles et fonctionnelles différentes.*
- Absorption : Passage du PA dans la circulation sanguine.*

Les trois principales voies de pénétration cutanée (*Fig.1-20*) sont la voie intercellulaire (entre les cellules), intracellulaire (passage dans la cellule) et annexielle, c'est-à-dire par le biais de chemins annexes au stratum corneum (glandes sudoripares, follicules).

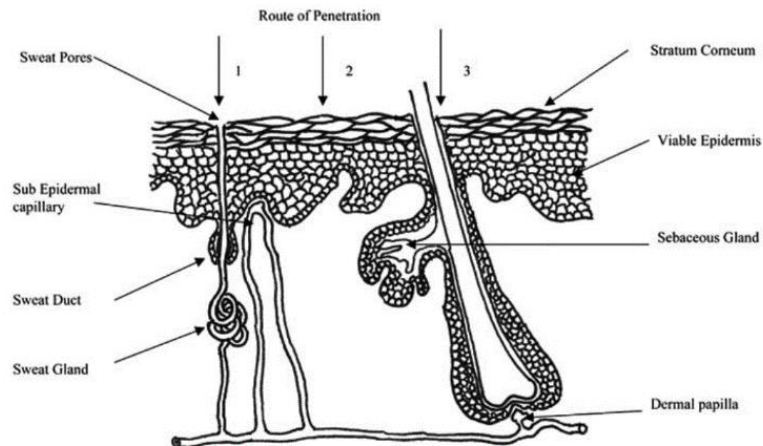


Figure 1-20 : Voies de pénétration cutanée : entre les cellules, au travers des cellules, ou encore profitant de chemins annexes (glandes sudoripares, follicules pileux, etc.)<sup>136</sup>.

Les voies folliculaires ne sont pas considérées comme les voies principales de pénétration, ne couvrant qu'une surface infime comparativement à la voie transcutanée. De manière générale, les molécules de petites tailles empruntent la voie intracellulaire.

La diffusion d'une molécule au travers d'une membrane semi-perméable, dans notre cas la peau, est proportionnelle à la différence de concentration de part et d'autre de la membrane. Ce phénomène de diffusion est régi par la loi de *Fick*.

$$J = K_p \Delta c = \frac{K_m D \Delta c}{e}$$

□  $J$  : Flux percutané ( $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ )

□  $K_p$ : Coefficient de perméabilité ( $\text{cm}/\text{h}$ ) =  $\frac{K_m D}{e}$

Ce coefficient correspond à la vitesse de diffusion. Il est fonction de la nature de la molécule, des excipients, ainsi que de l'épaisseur de la membrane considérée. ( $K_p$  lyposoluble >  $K_p$  hydrosoluble )

□  $\Delta c$  : Variation de concentration au sein de la membrane

□  $e$  épaisseur de la couche cornée en  $\mu\text{m}$

□  $K_m$ : Coefficient de partage couche cornée/véhicule (Le véhicule permet le transport d'une molécule.)

$K_m$  représente le rapport de solubilité substance diffusante / couche cornée / excipient. L'augmentation de  $K_m$  traduit une bonne affinité.

□  $D$  : Coefficient de diffusion ( $\text{cm}^2/\text{s}$ ) – Constantes de diffusion correspondant à chaque structure traversée (couche cornée, épiderme, derme)

Le coefficient  $D$  permet de déterminer comment la molécule diffuse au travers des différentes couches de la peau jusqu'à atteindre la circulation. Plus la taille de la molécule augmente et

plus la diffusion diminue. Le coefficient  $D$  détermine également l'imperméabilité de la peau, par exemple  $D=10^{-9} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$  pour le *stratum corneum* contre  $10^{-6} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$  pour l'épiderme et le derme. Ces chiffres montrent bien l'effet barrière du *stratum corneum*. Ce phénomène d'absorption transcutanée est fonction de différentes variables :

- ❑ L'épaisseur «  $e$  » de la couche cornée ( $\mu\text{m}$ )
- ❑ Changement du taux d'hydratation de la peau
- ❑ Diffusion de la molécule dans la couche cornée
- ❑ Libération / diffusion de la molécule dans ou de son véhicule
- ❑ Modification de la molécule en surface de la peau

Les mécanismes de diffusion au travers de la peau dépendent de nombreux paramètres. Pour ces raisons, des dispositifs divers et variés ont vu le jour dans le but d'améliorer la perméabilité de la peau. Ces dispositifs utilisent différentes méthodes qui sont décrites dans la suite de ce manuscrit.

## VI. Méthodes de délivrance de principes actifs au travers de la peau

### A. Introduction

Il existe plusieurs techniques de pénétration de la peau. Elles peuvent être passive/chimique ou active/physique. Celles-ci peuvent modifier les propriétés de barrière de la couche cornée de manière plus ou moins réversible. La *Figure 1-21* rassemble les différentes techniques permettant le passage transcutané de molécule à travers la peau comme la méthode de jet injection, les micro-needles, la micro-poration thermique et l'électroporation.

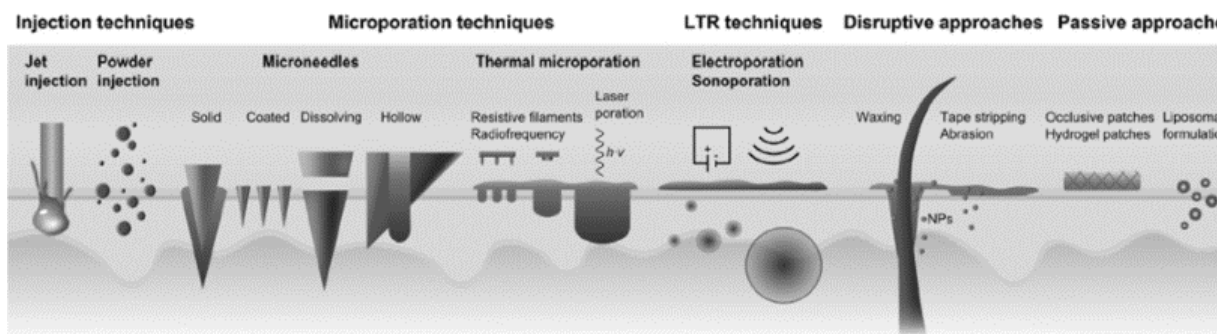


Figure 1-21 : Récapitulatif des différents techniques permettant la délivrance de molécules au travers la peau, incluant les méthodes passives et actives.<sup>137</sup>

L'injection par exemple est définie comme étant l'introduction sous pression dans l'organisme d'une substance médicamenteuse fluide au moyen d'une seringue. Celle-ci permet le dosage exact d'un produit, amené dans la circulation sanguine sans avoir subi de modification digestive. Ce type d'action permet une efficacité du médicament bien plus rapide que par la

voie orale (i.e. : *diabète*). L'injection est une méthode bas coût, rapide et directe, pour la délivrance de tout type de molécules dans le corps. Elle est cependant invasive.

Il en existe 4 types :

- Injection intradermique*
- Injection sous-cutanée (absorption lente)*
- Injection intramusculaire (absorption rapide)*
- Injection intraveineuse (action très rapide)*

*L'injection est une méthode classique de délivrance médicamenteuse, largement utilisée pour l'administration de molécules notamment à haut poids moléculaire mais invasive et nécessitant un savoir-faire. Ainsi, les recherches concernant l'amélioration de la perméabilité de la peau et le développement de technologies permettant le passage transdermique de molécules sont toujours d'actualité.*

## **B. Méthodes**

### **B.i. Méthodes chimiques**

Les scientifiques ont développé de nombreuses méthodes notamment chimiques pour parvenir à augmenter la perméabilité de la peau<sup>138,139</sup>. Il existe de nombreux composés chimiques tels que les molécules amphiphiles, les solvants, les tensioactifs permettant la création de défauts à l'échelle du nanomètre et rendant ainsi la peau perméable<sup>140</sup>. Les promoteurs chimiques comme les solvants ou les tensio-actifs sont plutôt à tendance allergène ou encore toxique pour l'être humain même s'ils permettent de modifier facilement les lipides du *stratum corneum*. Ce type de méthode améliore donc la perméabilité toutefois la toxicité de ces composés réduit leur utilisation<sup>140</sup>. La méthode passive la plus utilisée est le *patch transdermique*.

#### **Patch transdermique**

Le patch transdermique est un dispositif de délivrance par voie passive, capable de diffuser, à travers la peau, des molécules pharmacologiques de petite taille comme par exemple la nicotine (*Fig.1-22*). Un patch est constitué de plusieurs éléments :

- Un revêtement externe permettant de maintenir la substance active. Il s'agit d'un (revêtement) feuillet externe qui sert principalement de protection.*
- Un réservoir contenant les molécules pharmacologiques et un dispositif de libération de la substance médicamenteuse.*

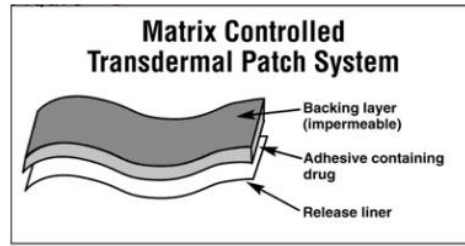


Figure 1-22 : (a) Patch transdermique en contact avec la peau d'un patient ; (b) Structure d'un patch transdermique.

Dans le dispositif se trouvent des excipients qui ont différentes fonctions : stabilisation, modification de la cinétique de libération ou encore amélioration de la diffusion transdermique des molécules pharmacologiques. Ils sont généralement composés de polymères et ont comme intérêt de contrôler la diffusion passive des molécules pharmacologiques vers la peau. Par ailleurs, les molécules ayant un faible poids moléculaire, traversent plus facilement les interfaces que les molécules de haut poids moléculaire. La masse moléculaire des molécules pharmacologiques ne doit donc pas dépasser  $500 \text{ g.mol}^{-1}$  pour permettre la pénétration cutanée passive. Cette contrainte ne permet donc pas d'administrer un certain nombre de molécules telles que les protéines issues des biotechnologies.<sup>141</sup>

## B.ii. Méthodes actives

### a. Définition et applications

Les méthodes actives comprennent de nombreux outils comme les ultrasons, l'assistance électrique, thermique<sup>142</sup> et mécanique (Fig.1-23). Ces méthodes utilisent une énergie extérieure qui agit comme une force motrice dans le transport de la molécule au travers de la peau. Celles-ci permettent également de perturber physiquement la couche cornée.<sup>142,143</sup>

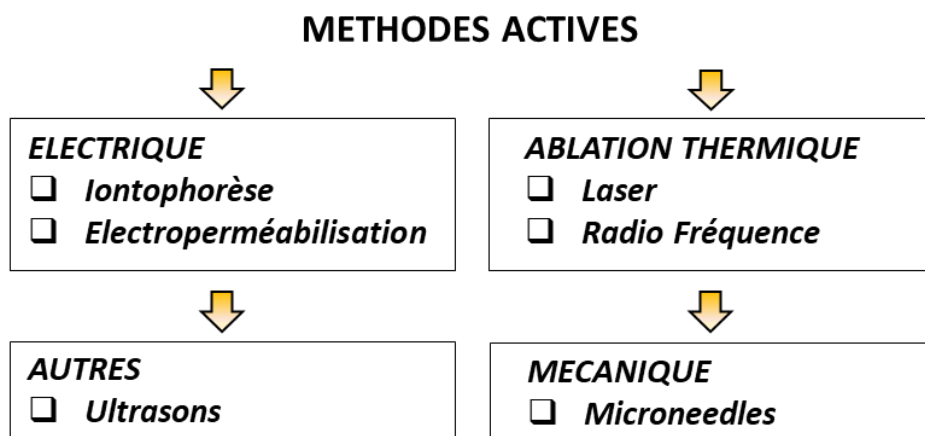


Figure 1-23: Méthodes de modification de la couche cornée par les méthodes actives (schéma inspiré de la référence <sup>144</sup>)

#### ☐ *Microneedles*

Les microneedles (micro-aiguilles) sont une technologie assez récente et représentent actuellement une voie de passage transdermique très prometteuse. En effet, le développement de différentes géométries de matériau est utilisé afin de permettre la délivrance de molécules<sup>145-148</sup> par pénétration cutanée. Des études récentes sur des souris *in vivo* <sup>149</sup> ont permis de démontrer la faisabilité du procédé pour la délivrance d'insuline, en réduisant significativement le taux de glucose dans le sang des souris.

#### ☐ *Ultrasons*

Cette technique non invasive permet d'améliorer le passage transdermique par l'utilisation d'ultrasons à relativement basse fréquence (50KHz). De plus, les temps de traitements sont courts de l'ordre de la vingtaine de secondes<sup>150</sup>.

#### ☐ *Laser*

L'ablation laser est déjà fréquemment utilisée dans le traitement dermatologique de la peau comme par exemple l'acné. Cette méthode permet de contrôler exactement l'exposition (temps/intensité) de la peau par le laser et ainsi obtenir l'ablation du stratum corneum sans endommager significativement les tissus inférieurs de l'épiderme<sup>151</sup>. Cette technique permet de sélectionner la zone de la peau à exposer.

#### ☐ *Radiofréquence*

L'ablation par radiofréquence expose la peau à une haute fréquence pendant une durée inférieure à 1 seconde, engendrant la formation de micro-conduits, et ainsi permettant le passage de molécules<sup>140</sup>.

#### ☐ *Méthodes électriques*

Dans la suite de cette étude, nous allons décrire plus précisément les méthodes électriques comme l'iontophorèse et l'électroporation.

## C. Techniques électriques

Il existe deux grands types de stimulations électriques pour la délivrance transdermique de molécules pharmacologiques, l'iontophorèse et l'électroporation <sup>144</sup>.

### C.i. Iontophorèse

#### a. Principe

L'iontophorèse est une technique qui utilise des tensions de faible amplitude, permettant l'amélioration du passage transdermique de molécules au travers de la peau (Fig.1-24)<sup>152,153</sup>. Toutefois, même si l'iontophorèse améliore modestement la perméabilité de la peau, sa

principale fonction reste de favoriser le transport de molécules. Les molécules chargées migrent sous influence de l'électrophorèse, alors que les molécules non chargées sont entraînées par le flux électroosmotique<sup>154-156</sup> généré par le mouvement des cations (*i.e* ;  $Na^+$ ) dans le *stratum corneum*<sup>156</sup>. Ces différents phénomènes permettent le guidage de molécules ionisées ou non au travers des différentes strates de la peau jusqu'à atteindre les vaisseaux sanguins<sup>154,157</sup>. L'iontophorèse n'est pas une technique spécifiquement connue pour modifier les propriétés barrière de la peau, celle-ci permet par l'influence de la tension électrique appliquée de diffuser des molécules de plusieurs centaines de Daltons au travers de la peau. Ce type de système se compose d'un contrôleur alimenté par une batterie, accompagné d'un patch généralement à usage unique, pré-rempli, interchangeable et flexible<sup>157</sup>. Plusieurs paramètres sont ajustables, comme le type d'électrodes utilisées, l'intensité du courant, et la forme du signal<sup>158,159</sup>. L'intensité du courant appliqué, et donc la vitesse de diffusion des molécules, est limitée par l'irritation et la douleur causée par la stimulation électrique<sup>160</sup>. Actuellement l'iontophorèse est utilisée cliniquement pour l'anesthésie locale (lidocaïne)<sup>161</sup>, ou encore pour traiter les patients atteints hyperhidrose (transpiration excessive)<sup>162</sup>, mais aussi pour l'extraction du glucose<sup>163</sup>. L'iontophorèse est une technique non invasive pour la peau. En effet, l'utilisation d'une tension électrique de faible intensité ne produit aucune dégradation irréversible, contrairement à l'électroporation qui peut être invasive<sup>154</sup>.

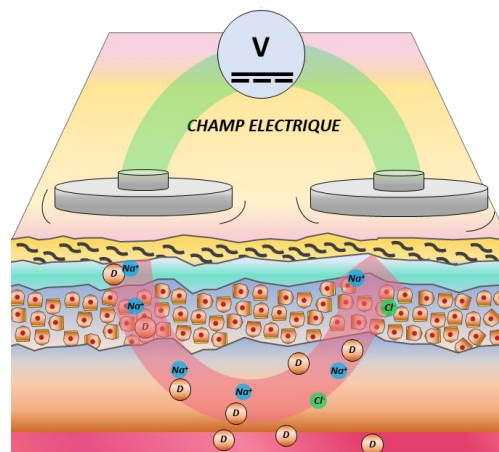


Figure 1-24 : Méthode de délivrance médicamenteuse par iontophorèse composée d'une anode contenant la molécule active permettant son relargage, et la cathode qui récupère les ions de charge opposée.

Cette technique est donc non invasive et permet la délivrance de molécules au travers de la peau. Son seul problème est qu'elle ne permet de délivrer que des molécules de petites tailles.

### b. Facteurs influents

Le passage de molécules au travers de la peau par la technique d'iontophorèse dépend de nombreux facteurs. Notamment, la taille des molécules est un facteur important et détermine la probabilité de passage de la molécule. Il a donc été montré que le transport de molécules diminue avec l'augmentation du poids moléculaire (sel > acide aminé > insuline)<sup>158,164,165</sup>. La taille maximum des molécules pouvant être délivrées par ce système n'est pas exactement connue car elle dépend de nombreux facteurs (Tableau 1-5), la force ionique<sup>166,167</sup>, la

composition du fluide ionique<sup>168</sup>, mais aussi de la taille de la molécule<sup>169</sup> de sa charge<sup>170</sup> de sa polarité<sup>171</sup> (hydrophile) et bien évidemment de sa masse moléculaire<sup>172</sup>.

Parmi les facteurs opératoires, il y'a la densité de courant<sup>173</sup>, la composition des électrodes (aluminium, platine, argent), la durée de l'application ainsi que l'intensité du courant continue/pulsé<sup>174,175</sup>, ainsi que la concentration de la molécule considéré<sup>176</sup>. D'un point de vue biologique, la peau (*localisation, présence de pilosité*)<sup>177</sup> joue un rôle majeur tandis que le flux sanguin<sup>178</sup> n'agit pas sur la pénétration de la molécule. Le temps maximum d'utilisation d'un tel dispositif est fonction de l'intensité du courant appliqué. En effet, un temps trop long pourrait engendrer une irritation de la peau pouvant aller jusqu'à sa brûlure. Le courant nécessite d'être assez élevé pour atteindre un flux convenable (maximum  $0,5 \text{ mA.cm}^{-2}$ ) mais celui-ci ne doit pas irriter la peau<sup>179</sup>.

*Tableau 1-5 : Récapitulatif des différents facteurs affectant la délivrance de molécules par iontophorèse<sup>159</sup>*

<i>Propriété physico/chimique</i>	<i>Molécule pharmacologique</i>	<i>Facteur expérimental</i>	<i>Facteur biologique</i>
<i>Taille moléculaire</i>	<i>pH</i>	<i>Intensité du courant</i>	<i>Variabilité du patient</i>
<i>Masse moléculaire</i>	<i>Force ionique</i>	<i>Densité de courant</i>	<i>Flux sanguin</i>
<i>Charge</i>	<i>Solution ionique</i>	<i>Courant pulsé</i>	<i>pH de la peau</i>
<i>Concentration</i>		<i>Durée d'application</i>	<i>Condition de la peau</i>
		<i>Electrodes</i>	

*L'iontophorèse est une méthode transdermique à faible tension électrique permettant la délivrance de molécules pharmacologiques de différents types. Toutefois, celle-ci est limitée selon la taille des molécules.*

### **C.ii. Electroporation**

Cette technique permet la création de « pores » au niveau de la membrane plasmique des cellules sous l'application d'un champ électrique externe. Ce procédé, selon les paramètres du champ électrique, permet l'introduction de molécules d'intérêt thérapeutique (ADN) au cœur des cellules ou des tissus. L'application d'un champ électrique pulsé permet aux molécules présentes dans l'espace extracellulaire de rentrer dans les cellules et ainsi permettre l'étude de leurs effets sur des tumeurs<sup>180</sup>, ou encore de l'expression du gène<sup>181,182</sup>. Plus généralement, ce phénomène est aussi utilisé dans l'agroalimentaire comme par exemple pour la pasteurisation, pour la stérilisation ou encore pour changer les propriétés mécaniques des tissus afin de favoriser leur valorisation (fruits, légumes)<sup>183-185</sup>.



## a. Principe

Le phénomène de perméabilisation des membranes cellulaires a été largement étudié et est bien connu depuis de nombreuses années<sup>186,187</sup>. Ce phénomène a été décrit pour la première fois en 1979<sup>188,189</sup>. Lors de l'application d'une tension électrique intense (50-1000V) pendant une courte durée ( $\mu s$ - $ms$ ) au travers d'une cellule ou d'un tissu, leurs structures respectives (membrane, matrice extra-cellulaire) se réarrangent, engendrant leur perméabilisation<sup>190</sup> transitoire et permettant ainsi la diffusion de molécules<sup>154,191-193</sup>.

L'électroporation est aujourd'hui utilisée en routine pour le transfert de molécules d'intérêt thérapeutique *in vitro* dans des cellules et différents tissus comme les tumeurs (*in vivo*)<sup>194-196</sup>. Ce transfert de molécules est particulièrement intéressant du point de vue des applications dans les domaines de la biologie, des biotechnologies ou encore de la médecine.

Les principales caractéristiques concernant l'électroporation sont<sup>197</sup>:

- L'application d'un champ électrique pulsé pendant un temps court ( $\mu s$ - $ms$ )
- Chargement de la membrane lipidique (bicouche lipidique)
- Changement local et rapide de la structure de la membrane
- Remplissage des structures membranaires en eau, conduisant à la perforation de la membrane (chemins aqueux ou pores)
- Augmentation remarquable du transport ionique et moléculaire

Le champ électrique appliqué sur une membrane (Fig.1-25) crée un potentiel transmembranaire  $\Delta\psi_E$  qui s'additionne au potentiel natif  $\Delta\psi_0$ . La différence de potentiel induite par un champ électrique peut être décrite par l'équation suivante:

$$\Delta\psi_E = f \cdot g(\lambda) \cdot r \cdot E (\cos\theta(M)) (1 - e^{-\frac{t}{\tau}})$$

- $f$  : Facteur de forme de la cellule
- $g(\lambda)$  : Fonction qui décrit les propriétés de conduction des milieux extra- et intra-cellulaires et de la membrane
- $r$  : Rayon de la cellule
- $E$  : Intensité du champ électrique appliqué
- $\theta(M)$  : Angle entre la normale à la membrane la position ( $M$ ) et l'orientation du champ
- $t$  : durée de l'impulsion
- $\tau$  : Temps de charge de la membrane.

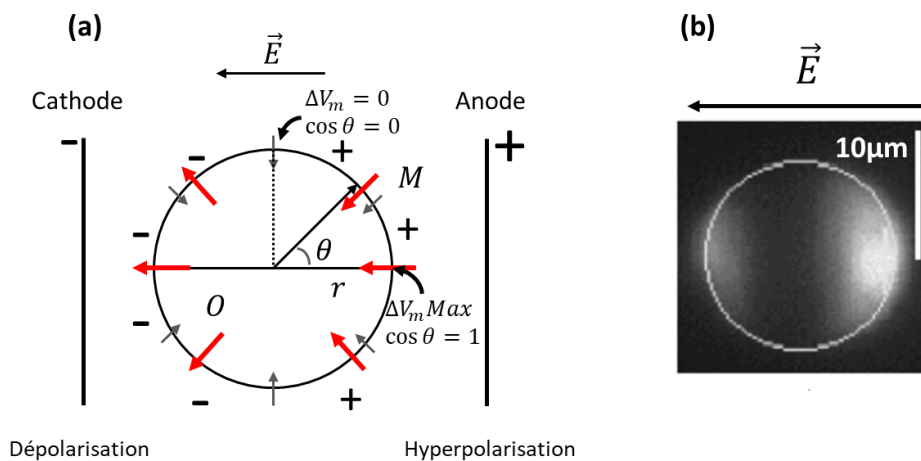


Figure 1-25 : (a) Schéma illustrant la répartition du champ électrique dans une cellule comprise entre deux électrodes (b) Image montrant le passage d'iodure de propidium 1 seconde après application du champ électrique<sup>182</sup>.

L'équation illustre bien la dépendance du phénomène au regard de l'intensité du champ électrique, au point considéré au niveau de la membrane plasmique et de la durée des impulsions. De part et d'autre de la membrane, on peut observer la réorganisation des charges, provoquée par l'application du champ électrique. Ceci engendre une hyperpolarisation du côté de l'anode et une dépolarisation du côté de la cathode (Figure 1-25(a)). Le champ électrique appliqué doit être adapté à la taille des cellules. En effet, plus le diamètre des cellules à perméabiliser est grand, plus le champ électrique à appliquer à ces cellules sera faible pour une durée d'impulsion constante.

Par exemple, pour une durée d'impulsion de 100  $\mu\text{s}$ , il faudra appliquer environ  $1000 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$  pour des cellules de type eucaryote (diamètre compris entre 10 et 30  $\mu\text{m}$ ) et de  $6000 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$  pour des bactéries comme *E. Coli* qui ont un diamètre de 1 à 5  $\mu\text{m}$ . L'intensité du champ électrique contrôle également la surface perméabilisée<sup>198</sup> (Figure 1-25(b)).

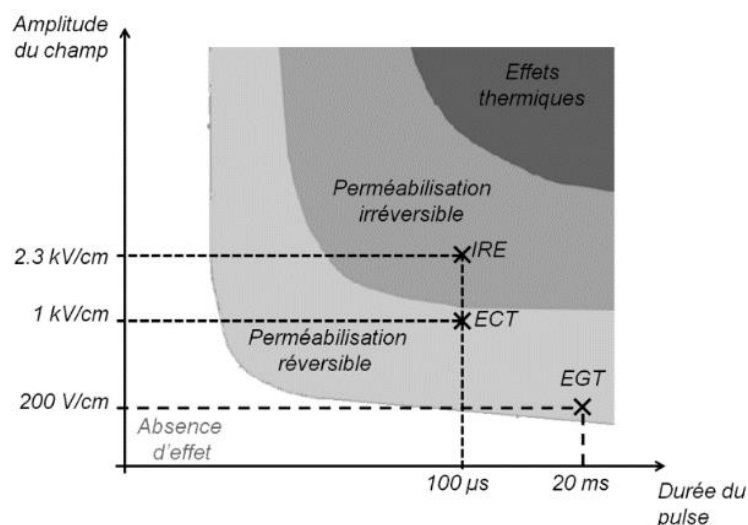


Figure 1-26 : Schéma illustrant les différents effets obtenus lors de l'application d'impulsions électriques sur une cellule (d'après Aude Silve, thèse universitaire, 2011).

Les champs électriques appliqués entraînent donc un phénomène transitoire au niveau des cellules, *i.e.* une déstabilisation transitoire de la membrane cellulaire. Ce phénomène a une variable temporelle qui correspond à une perméabilisation de quelques  $\mu\text{s}/\text{ms}$  lors de l'application du champ électrique et qui retourne à son état perméable après quelques millisecondes ou minutes (Fig.1-27). Lorsque le champ électrique est trop fort (durée, amplitude) cela induit des dégâts potentiellement irréversibles pour la cellule entraînant sa mort, on parle d'électroporation irréversible (IRE). Au-delà, des effets thermiques peuvent brûler les cellules (Fig.1-26).

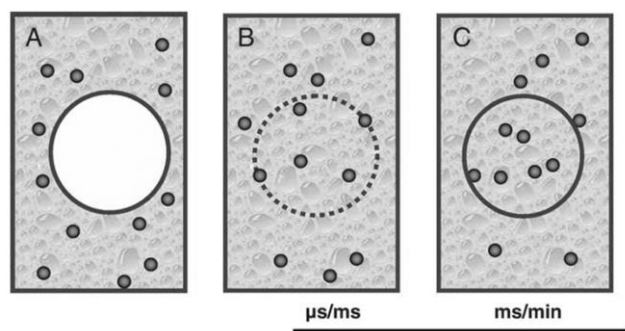


Figure 1-27 : Schéma reprenant les différents états d'une membrane sous application d'un champ électrique - (A) Avant l'application du champ électrique (sans perméabilisation) ; (B) Pendant l'application du champ électrique (phénomène temporel entre la  $\mu\text{s}$  et quelques  $\text{ms}$ ). La membrane devient perméable permettant des échanges de molécules entre les milieux intra et extracellulaire ; (C) Après application du champ électrique, la membrane redevient imperméable aux molécules de haute masse moléculaire (quelques  $\text{ms}$  voire  $\text{min}$  pour les plus petites), la molécule d'intérêt est alors emprisonnée à l'intérieur de la cellule.<sup>199</sup>

## □ Applications médicales

L'électroporation modifie donc la perméabilité de la cellule, contrairement à l'iontophorèse, qui agit en premier lieu sur la molécule. De ce fait, en fonction de la molécule d'intérêt, deux grandes applications médicales ont émergé.

### □ L'Electrochimiothérapie

L'électrochimiothérapie (ECT) est un traitement anti-cancéreux local basé sur l'administration par injection locale ou systémique d'un médicament cytotoxique qui est non ou peu perméant vis-à-vis des membranes cellulaires (bléomycine ou cis-platine) en combinaison avec l'électroperméabilisation. Ainsi lorsque des impulsions électriques courtes seront directement appliquées sur la zone à traiter, ces impulsions engendrent la perméabilisation de la membrane cellulaire de façon transitoire et réversible permettant aux médicaments d'entrer dans la cellule (Fig. 1-25). Les premiers essais cliniques ont été réalisés en France dès 1991<sup>200,201</sup>. Les paramètres fondamentaux pour l'efficacité de la méthode sont les paramètres électriques, le mode d'administration de la drogue, l'orientation des électrodes, le type et la taille des électrodes. Cette technique est actuellement utilisée dans de nombreux pays et permet de soigner les patients atteints de tumeurs.<sup>202-205</sup>

### □ L'Electrogénothérapie

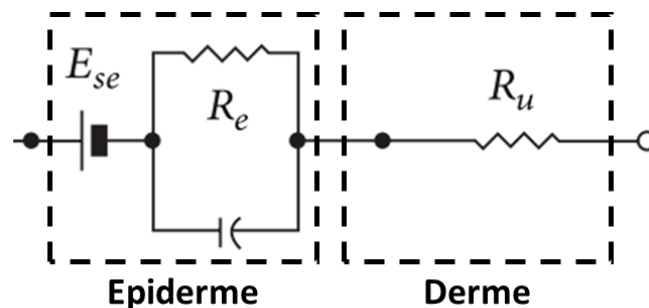
L'électrotransfert de gènes *in vivo* a été étudié dans différents tissus comme la peau<sup>206</sup>, les tumeurs<sup>207</sup>, la cornée<sup>208</sup>, mais également d'autres organes. Sous l'effet des impulsions électriques, il est possible de faire migrer (influence électrophorétique) l'ADN dans les tissus et lui permettre de pénétrer dans les cellules ou le transgène sera exprimé<sup>209,210</sup>. Cette technique permet de faire de la thérapie génique, de la vaccination ADN et de l'immunothérapie antitumorale<sup>207,211,212</sup>.

### b. Propriétés électriques de la peau

L'étude des propriétés électriques des tissus biologiques permet lors de l'application d'une tension électrique de déterminer le parcours préférentiel du courant au travers d'un tissu. Comprendre et connaître ces propriétés est essentiel pour permettre le développement d'applications dans le domaine du biomédical comme par exemple l'électrostimulation, l'hyperthermie, l'électrocardiographie *etc.* Les études par mesures d'impédance sur ce type de matériaux présentent un intérêt majeur en électrophysiologie et en biophysique.

### □ Mesures des propriétés

La première expérience démontrant l'existence d'une membrane cellulaire fut réalisée à l'aide de mesures diélectriques sur une suspension de cellules<sup>213</sup>. La *Figure 1-28* illustre la modélisation de la peau sous forme d'un circuit électrique équivalent. Les différents organes de la peau peuvent être assimilés à des modèles électriques à base de composants élémentaires simples comme des résistances ou des capacités<sup>214</sup>.



*Figure 1-28 : Représentation du circuit électrique équivalent de la peau, correspondant à différents organes à savoir l'épiderme et le derme.  $E_{se}$  est la différence de potentiel au travers de l'épiderme dont l'impédance s'exprime par une partie résistive ( $R_e$ ) et une partie capacitive ( $C_e$ ), le derme lui peut être représenté par une simple résistance ( $R_u$ )<sup>214</sup>.*

Pour étudier les propriétés électriques des tissus, il est nécessaire de pouvoir mesurer la conductivité électrique du tissu considéré. La grande variété de cellules ainsi que leur distribution au sein du tissu considéré en font un « matériau » d'étude fascinant et très complexe. C'est notamment pour ces raisons que généralement, il est préférable de raisonner

de façon macroscopique en considérant l'ensemble de la distribution biologique du système. La peau étant un organe très hétérogène, la pénétration du champ électrique dépend de plusieurs facteurs comme l'orientation du tissu, la fréquence, l'intensité du champ, mais également de paramètres spatiaux – temporels.

En effet, l'application d'un champ électrique sur un tissu engendre la variation de ses propriétés en fonction du temps. La peau présente des propriétés dites diélectriques dues principalement au stratum corneum. Comme précédemment évoqué, on discerne les trois différentes couches (*épiderme, derme, hypoderme*).

L'épiderme contient lui-même plusieurs couches, dont le *stratum corneum* qui possède d'excellentes propriétés diélectriques du fait de la superposition des couches de cellules mortes, en faisant du *stratum corneum* la partie la plus résistive de la peau. Des mesures électriques (*Tableau 1-6*) sur le *stratum corneum* seul montrent une conductivité de  $1,25 \cdot 10^{-6} \text{ S.m}^{-1}$ , alors que pour les tissus sous jacents<sup>215</sup> la conductivité est de l'ordre de  $0,2 \text{ S.m}^{-1}$ .

*Tableau 1-6 : Propriétés électriques de différents tissus vivants*<sup>180</sup>

	<i>Conductivité (S/m)</i>
<i>Tumeur</i>	<i>0,22-0,4</i>
<i>Graisse</i>	<i>0,02-0,04</i>
	<i>Transversal</i>
	<i>0,04-0,14</i>
	<i>Longitudinal</i>
<i>Muscle</i>	<i>0,3-0,8</i>
<i>Peau (Sèche)</i>	<i>0,000002-0,0002</i>
<i>Peau (humide)</i>	<i>0,0003-0,2</i>
<i>Stratum corneum</i>	<i>0,00000125</i>
<i>Couche inférieure</i>	<i>0,227</i>

*Les résultats présentés dans le Tableau 1-6 montrent les différentes propriétés électriques des tissus, et particulièrement celles de la peau. Les valeurs mesurées sont très dispersées démontrant ainsi la grande hétérogénéité de la peau.*

### *c. Electroporation de la peau*

Actuellement, les molécules à hauts poids moléculaires sont généralement délivrées par voie dermique (injection intradermique). L'électroporation de la peau est une méthode qui a été développée afin de faciliter la délivrance médicamenteuse.

#### *Mécanisme*

L'électroperméabilisation de la peau engendre la création de passages transdermiques au travers d'une centaine de membranes lipidiques (*stratum corneum*), permettant aux molécules de diffuser au travers de la peau afin de rejoindre le réseau sanguin. Des études ont montré qu'il était possible de perméabiliser une simple membrane lipidique en appliquant une tension électrique comprise entre 0.5 et 1V (impulsions courtes). En ce qui concerne la perméabilisation des membranes lipidiques multi-lamellaires au sein du *stratum corneum*, les

tensions utilisées sont plus élevées, de l'ordre de 50 à 100V<sup>193,216</sup> et dépend de plusieurs facteurs tels que la géométrie et la configuration des électrodes. Il est admis que la perméabilisation de la peau intervient pour des tensions typiquement >50V. Par ailleurs, il semblerait que l'utilisation de tension pulsée n'induit qu'une dégradation mineure de la peau<sup>217,218</sup>. Le mécanisme provoquant l'altération de la structure lipidique du *stratum corneum* durant l'application d'une forte tension serait attribué principalement à l'interaction entre l'eau (dipôle) et le champ électrique engendrant l'échauffement et la fusion très localisée du *stratum corneum*. Les études pratiques sur des doubles couches lipidiques montrent que la polarité de l'eau serait responsable de l'initiation de nanopores « aqueux » (Fig.1-29) avec la structure lipidique<sup>219</sup>. Le phénomène d'électroporation se concentre spontanément à des endroits bien précis que l'on nomme « *localized transport région* » (LTR) ou « *stratum corneum defect* », qui sont répartis de manière aléatoire à la surface de la peau<sup>220,221</sup>. Le développement de ces régions est associé à un phénomène thermique (*effet Joule*), qui engendre ainsi une élévation très localisée de température. Cette augmentation peut atteindre 60°C (et plus)<sup>222-226</sup> (*transition de phase des lipides du stratum corneum*). La présence d'un réseau de micro-trous restreint donc l'électroporation à des sites bien prédéfinis<sup>227</sup>.

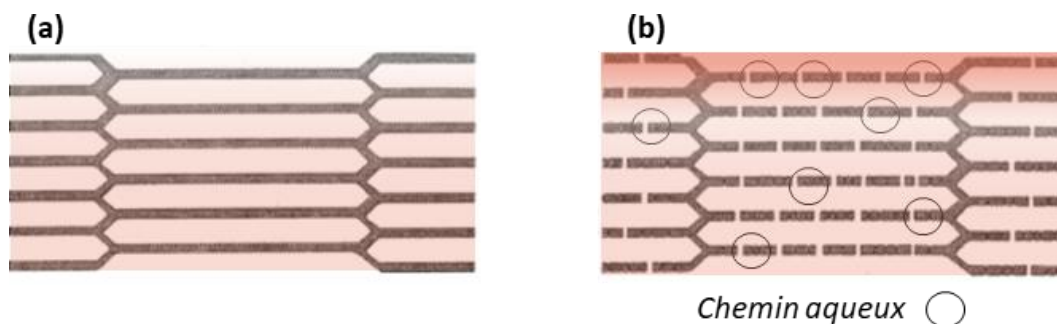


Figure 1-29 : Illustration représentant le *stratum corneum* (a) état du *stratum corneum* à l'état initial ; (b) formation des chemins aqueux (LTR) du *stratum corneum* après électroporation.<sup>216</sup>

Bien que la compréhension des mécanismes de perméabilisation de la peau ait largement évolué, il demeure encore des doutes concernant la validité de ces mécanismes.

### ❑ Facteurs influençant le transport moléculaire

De nombreux facteurs affectent le transport de molécules au travers de la peau. En effet, lors de la perméabilisation de la peau, différents mécanismes interviennent tels que la diffusion<sup>228</sup>, la force électrophorétique<sup>228,229</sup> et l'électroosmose<sup>228,230</sup>. Ces différents mécanismes peuvent coexister et ont des cinétiques différentes. La force électrophorétique est le principal phénomène qui conduit le transport des molécules chargées au travers de la peau. De nombreux (Tab.1- 7) paramètres peuvent faire varier de façon significative le transport transdermique de molécules par électroporation.

Tableau 1-7 : Paramètres affectant le contrôle du transport de molécules par électroporation<sup>230</sup>

Paramètres	Augmentation	Effets
Electrique	Amplitude des impulsions	+
	Nombre d'impulsions	+
	Durée des impulsions	+
Physico-chimique (Propriété de la molécule)	Charge	+
	Masse moléculaire	-
	Lipophilicité	-
Composition du stockage de la molécule	Poly ionique	-
	pH	+
	Viscosité	-

Les impulsions électriques sont définies par la forme du signal (exponentiel, vague carrée), la tension (50-1500V), le temps ou la durée ( $\mu s$ - $ms$ ), l'intervalle de temps entre les impulsions (s/min) ou fréquence (Hz). Les impulsions en vague carrée permettent un meilleur contrôle et une meilleure reproductibilité pour le transport de molécules. Cette forme est préférentiellement utilisée pour l'électro transfert de l'ADN dans les cellules eucaryotes. La vague exponentielle elle, est plutôt réservé au transport de petites molécules par voie transdermique<sup>230</sup>. La Figure 1-30 met en évidence l'influence conjointe de la durée des impulsions et de la tension appliquée sur le transport de molécule.

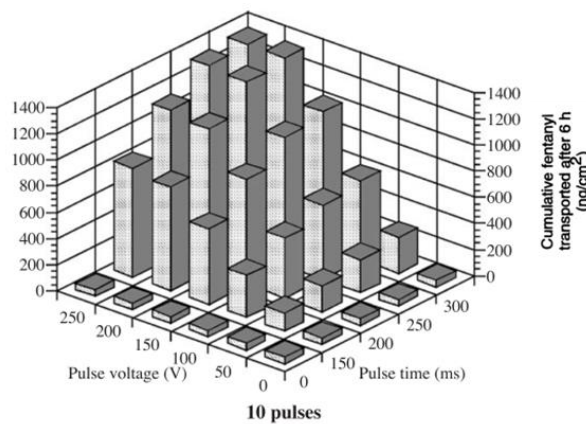


Figure 1-30 : Effet de la tension et du temps sur le transport de molécules (fentanyl) par électroporation<sup>228</sup>.

Concernant les impulsions, il en existe deux types usuellement décrits dans la littérature. La distinction entre ces deux protocoles est principalement liée à leurs durées / amplitudes d'impulsion<sup>230</sup>.

□ **Protocole 1**

- Nombre d'impulsions (>100)
- Temps d'impulsions (1-2 ms)
- Haute tension

## □ Protocole 2

- Nombre d'impulsions (>20)
- Temps d'impulsions (70-1000 ms)
- Tension intermédiaire

Dans le cas des impulsions de forme exponentielle, seulement quelques impulsions longues permettent d'améliorer significativement le transport moléculaire plutôt que de nombreuses impulsions courtes<sup>222</sup>. Les paramètres précédemment évoqués illustrent bien la grande variabilité de la technique et nous permettent ainsi de mieux comprendre les phénomènes de transport.

## □ Transport moléculaire

La formulation concernant le réservoir contenant la molécule joue également un rôle important sur le transport de molécule par électroporation, en effet la concentration en molécules permet de contrôler le transport. Typiquement plus la concentration en molécules est importante, plus le transport augmente. La présence d'ions dans le réservoir (solution tampons, contre-ions, espèces ioniques provenant de la peau) rentre en compétition avec la molécule à délivrer. De nombreux phénomènes peuvent se produire comme l'ionisation de la molécule (pH), la compétition ionique, la variation de conductivité ou le changement de viscosité. Ce sont autant de paramètres qui affectent le transport moléculaire<sup>228,231</sup>. Le tableau ci-après recense les études *in vitro* menées sur différents types de molécules.

Tableau 1-8 : Délivrance transdermique par électroporation de molécules de tailles charges et origines différentes<sup>232</sup>.

Composé	Masse moléculaire(Da)	Charge	Références
Eau	18	0	233
Fentanyl	336	+1	228,234
FITC	390	-1	235
Calcéine	623	-4	236,237
FITC-Dextran	4000-38000	-	235
Nano-micro sphère	10 nm – 45 µm	Fortement négatif	238,239

Cette partie illustre les différentes variables agissant directement sur le passage transdermique de molécules. Il est donc nécessaire de procéder à l'étude de la configuration géométriques des électrodes, des propriétés physicochimique de la molécule considérée et également de la solution tampon contenant la molécule. Le contrôle de ces paramètres permet d'activer et de favoriser le transport moléculaire au travers de la peau et principalement du *stratum corneum*.

## □ Electrodes

Concernant l'appareillage, les électrodes et notamment leur design jouent un rôle crucial dans l'efficacité du transport de molécules. De nombreuses géométries d'électrodes existent;



électrodes à plaque (Fig.1-31(a)) (pincement de la peau)<sup>240</sup>, réseau de microélectrodes<sup>240</sup> (Fig.1-31(b)) spécifiquement dédié aux applications *in vivo*. L'efficacité du transport est un facteur influencée par la géométrie d'électrodes, lié à la distribution du champ électrique au travers de la peau<sup>241</sup>. Les électrodes à géométrie simple (plates et parallèles) permettent de générer un champ électrique plus uniforme. Le réseau d'électrodes est formé d'un enchevêtrement d'électrodes plates, permettant de localiser les champs électriques au sein de la couche superficielle de la peau, évitant les effets indésirables sur les couches inférieures. Les électrodes sont donc un point central dans la distribution du champ électrique, mais d'autres paramètres influent tel que la charge de la molécule<sup>233</sup>, sa lipophilicité<sup>242</sup> et sa masse moléculaire<sup>235</sup>. Les électrodes généralement utilisées sont en acier inoxydable et parfois du fait de leur caractère inerte, en platine.

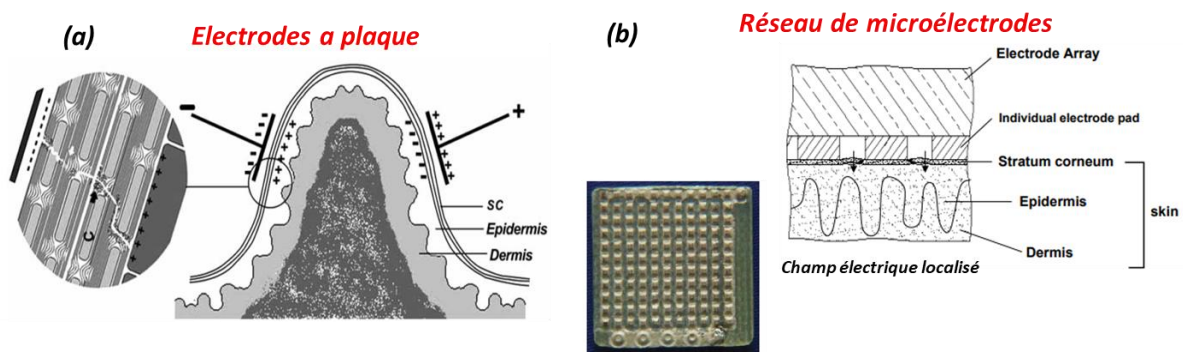


Figure 1-31 : (a) Electrodes à plaque permettant de pincer la peau (b) Réseau de microélectrodes permettant de localiser le champ électrique.

## CONCLUSION

*Ce chapitre bibliographique illustre la grande diversité de paramètres à prendre en considération dans le cadre de cette thèse. En effet, la fabrication d'un dispositif pour la délivrance transdermique doit prendre en compte les propriétés et les capacités des matériaux, mais également être attentive aux exigences du domaine de la science du vivant. L'interconnexion entre la science des matériaux et la science du vivant ne peut se faire que si les enjeux et les objectifs sont correctement définis comme dans le cahier des charges. L'utilisation de NTC pour le développement de ce type de technologie semble être intéressante et permettrait, si l'objectif est atteint, d'améliorer significativement la vie quotidienne de malades nécessitant des injections répétées tout au long de la vie comme dans le cas du diabète. Ce projet ouvre donc un nouveau champ de compétences à acquérir dans le but de développer/fabriquer et également de caractériser les propriétés du matériau fabriqué.*



## CHAPITRE 2

### MATERIELS ET METHODES



# I. Matériaux

## A. Préparation des DWNT

La préparation des DWNT est un procédé multi-étapes décrit en détail ci-dessous.

### A.i. Poudre Composite

Les DWNT utilisés dans le cadre de ce travail de thèse ont été synthétisés au sein du laboratoire par dépôt chimique catalytique en phase vapeur (CCVD). Le procédé de synthèse de nanotubes de carbone bi-parois a été étudié et développé au CIRIMAT<sup>22,30</sup>. Ainsi, la synthèse de DWNT comporte trois grandes étapes.

#### ❑ Préparation de la poudre de catalyseur :

0,130 g d'heptamolybdate d'ammonium ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) sont dissous dans une solution de 250 mL d'acide citrique ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ) diluée avec environ 15 mL d'eau distillée. La solution est chauffée à 50/60°C sous agitation magnétique. Successivement, du nitrate de cobalt (0,643 g) et du nitrate de magnésium (74,751 g) sont ajoutés à la solution sous agitation jusqu'à complète dissolution. Ensuite, la combustion de la solution est réalisée à 550°C pendant environ 15 minutes. Le solide obtenu est broyé et transféré dans une nacelle en céramique puis calciné à 450°C pendant 2h sous air.

#### ❑ Synthèse des DWNT à partir de la poudre de catalyseur :

On procède ensuite à la croissance des DWNT sous atmosphère réductrice et carbonée ( $\text{H}_2/\text{CH}_4$ ) à 1000°C. On obtient une poudre nanocomposite contenant les DWNT ainsi que les catalyseurs partiellement transformés. (Fig.2-1 (a))

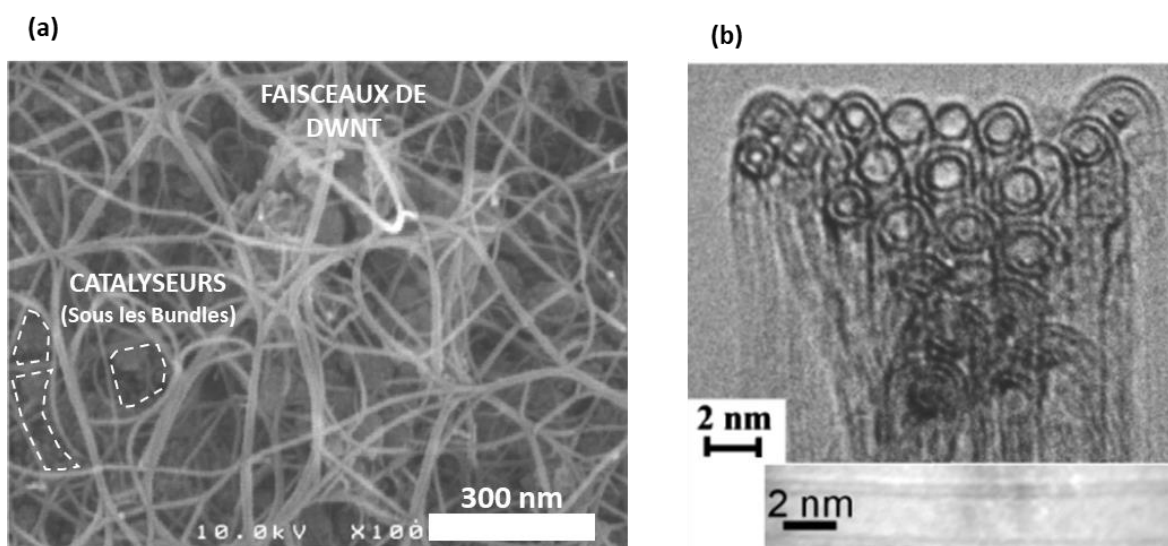


Figure 2-1 : (a) Image MEB des nanotubes bruts après synthèse, au premier plan on observe des faisceaux de DWNT, en arrière-plan on peut discerner le support catalytique ;(b) Image MET représentant un faisceau de DWNT de face faisant clairement apparaître le tube interne et le tube externe.<sup>22</sup>

□ *Extraction de la poudre nanocomposite :*

*La poudre composite obtenue comprend à la fois les DWNT mais aussi le support catalytique qui constitue environ 88% de la masse totale. Les NTC ne représentent que 12% massique de cette poudre avec 80% en nombre de DWNT<sup>61</sup>. La méthode de synthèse par CCVD permet d'obtenir une sélection très fine quant à la distribution des DWNT<sup>22,61</sup>. En plus des NTC, la poudre nanocomposite contient de la magnésie, des nanoparticules métalliques et également du carbone désorganisé. Cette poudre (Fig.2- 2) constitue notre lot d'échantillon initial.*



*Figure 2-2 : Poudre nanocomposite (friable) obtenue après la synthèse à la sortie du four de CCVD.*

## **A.ii. Extraction des nanotubes**

Les NTC sont récupérés après extraction de la poudre composite, étape permettant de dissoudre la magnésie, ainsi que les nanoparticules métalliques présentes au sein de la poudre nanocomposite.

La poudre nanocomposite est introduite dans un erlenmeyer afin d'ajouter de l'eau désionisée (DI) en quantité suffisante (*typiquement 28 mL d'eau désionisée pour 1 g de DWNT, voir Tab.2- 1*).

<i>Tableau 2-1 : Quantité de solution pour extraire 1 g de DWNT</i>	
	<i>Quantité</i>
<i>% Carbone dans la poudre composite (%m)</i>	<i>≈ 10-12</i>
<i>m NTC souhaitée (en mg)</i>	<i>1000</i>
<i>Masse de PC à extraire (g)</i>	<i>≈ 8,104</i>
<i>V eau désionisée (en mL)</i>	<i>≈ 28</i>
<i>V HCl 37% (en mL)</i>	<i>≈ 122</i>

Par la suite, on ajoute progressivement 122 mL d'HCL 37% à l'aide d'une pipette pasteur. La réaction du mélange étant exothermique, il faut positionner l'erlenmeyer dans un cristalliseur avec de l'eau fraîche. Une fois le mélange réalisé, l'erlenmeyer est recouvert d'un parafilm et placé dans un bain à ultrasons durant une dizaine de minutes afin de permettre une bonne homogénéisation de la suspension. Pour terminer le traitement, l'erlenmeyer est disposé sous agitation pendant 16 heures. On procède ensuite à la filtration des NTC (Fig.2-3) afin de les débarrasser des éléments solubilisés. On utilise pour cela un dispositif de filtration sur lequel on dispose une membrane en nitrate de cellulose (Merk Millipore, 0,45  $\mu\text{m}$ ). Un filtrat de

couleur bleu-vert est observé, du fait de la dissolution du Cobalt et du Molybdène. Les DWNT sont lavés à l'eau désionisée jusqu'à atteindre la neutralité. Après l'extraction des catalyseurs, le rendement est de 12%. Pour une masse de 1 g poudre nanocomposite, on récupère donc 0,12 g de NTC bruts.

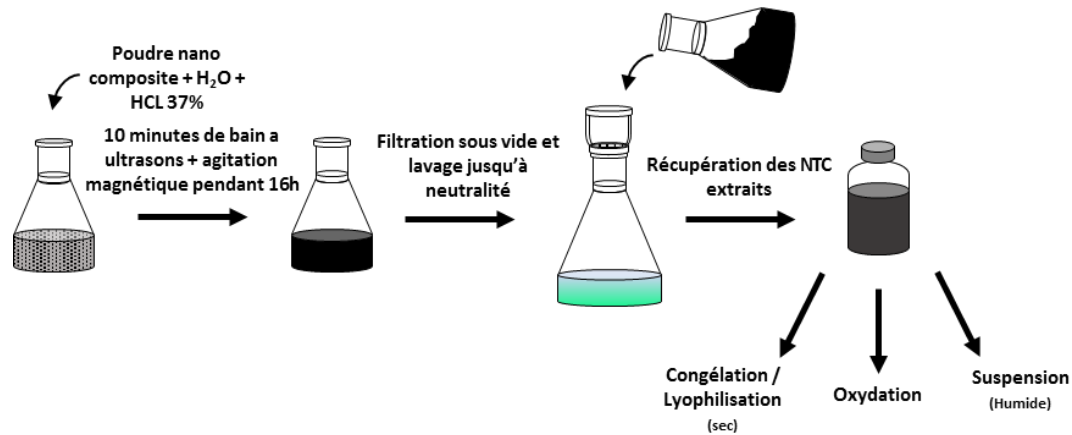


Figure 2-3 : Schéma représentant les différentes étapes d'extraction des NTC jusqu'à l'obtention de NTC bruts.

Plusieurs solutions sont à présent possibles :

**Congélation / Lyophilisation (séchage):**

Les DWNT sont récupérés dans un pilulier, auquel on rajoute de l'eau désionisée. L'ensemble est placé dans un bain à ultrasons pendant quelques minutes pour favoriser la dispersion et réduire la présence d'agglomérats. Enfin, le pilulier est placé dans un congélateur ou dans un bain d'azote liquide en vue d'être lyophilisé pendant 48h.

**Voie humide :**

Les DWNT récupérés dans un pilulier sont immergés dans une solution d'eau désionisée, en vue d'être utilisés à différentes fins. Cette voie de conservation (et d'utilisation) est préférable à la voie sèche, permettant de limiter les phénomènes d'agglomération des DWNT liés au séchage.

Ces DWNT ont été utilisés dans la fabrication des différents matériaux synthétisés dans le chapitre 3, dans les hydrogels nanocomposites obtenus est caractérisés au chapitre 4 est testés au chapitre 5.

## II. Méthodes de mise en forme utilisées

### A. L'électrospinning

L'électrospinning, en français « *électro-filage* » est une méthode de mise en forme des matériaux qui existe maintenant depuis plus d'un siècle. Elle a été étudiée par Lord Rayleigh qui cherchait au départ à déterminer le nombre de charges nécessaire pour vaincre les



tensions de surface d'une goutte d'eau<sup>243</sup>. Quelques années après ces études, un dispositif a vu le jour permettant de produire un spray à partir de solutions liquides soumises à un champ électrique. Le premier dispositif à fabriquer des fibres de polymères synthétiques a été fabriqué en 1934. Bien plus tard, dans les années 90, les premiers dispositifs de fabrication apparaissent sur le marché, pour d'abord s'orienter vers l'industrie du textile, puis dans le secteur de la recherche<sup>244</sup>. L'électrospinning est une technique simple, reproductible, uniforme, permettant de mettre en forme de nombreux matériaux. A contrario pour d'autres techniques de filage usuelles (*wet spinning*), les fibres fabriquées ont un diamètre compris entre le nanomètre et le micromètre. Les applications sont nombreuses dans les domaines de l'énergie, la filtration et bien sûr le secteur biomédical pour le développement de systèmes de relargage de médicament ou encore pour l'ingénierie tissulaire<sup>245-247</sup>.

### a. Principe de fonctionnement

L'électrospinning est gouverné par des phénomènes physiques assez complexes<sup>248,249</sup>. Cet instrument est composé d'un générateur à haute tension ( $U > 20 \text{ kV}$  en courant continu), une ou deux pompes, une ou deux seringues d'injection placées à la perpendiculaire d'un collecteur métallique (récepteur de la fibre), ou un cylindre rotatif (permettant l'orientation uniaxiale de la fibre) (Fig.2-4(a)). A noter que la seringue peut être positionnée de façon horizontale, mais également verticale.

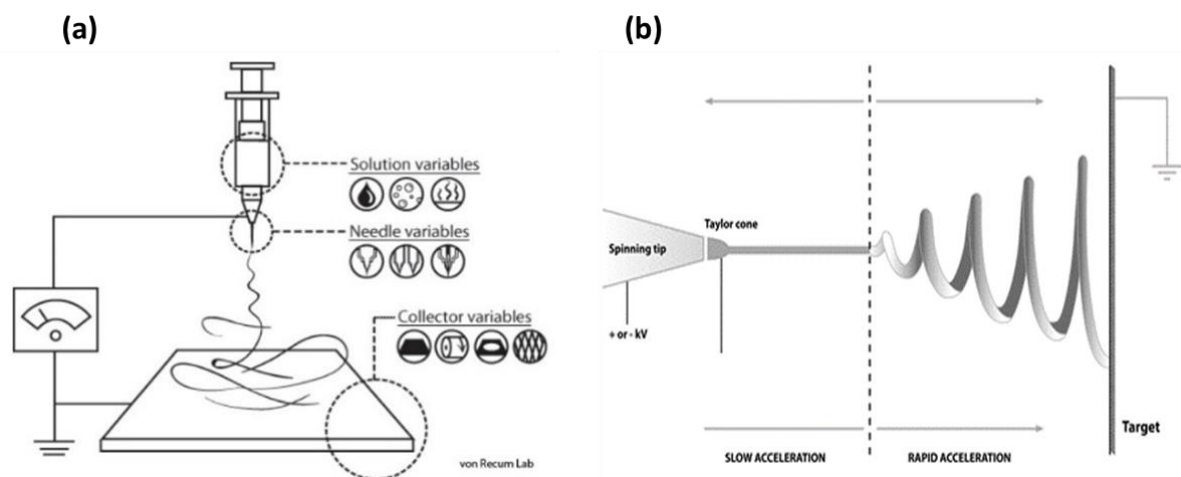


Figure 2-4 : (a)Schéma de principe du dispositif expérimental et des composants additionnels de l'électrospinning ; (b) Effet du champ électrique sur une solution polymérique dans le cadre de l'électrospinning. (The New Zealand Institute for Plant and Food Research Ltd)

Lorsque le champ électrique est suffisamment intense, il se produit alors l'étirement continu de la solution polymère/solvant vers la surface métallique opposée sous forme de jet de matière (Fig.2- 4(b)). Dès que le jet est fabriqué, plusieurs phénomènes apparaissent. Dans un premier temps, la fibre est soumise à une accélération lente dominée par l'apex de la buse provoquant la disposition des charges en surface (Fig.2-4(b)). Ensuite, il se produit une

transition provenant de l'accélération rapide de la fibre qui l'entraîne dans un phénomène de giration permettant l'évaporation du solvant ce qui conduit à l'augmentation de la viscosité. Enfin, le matériau prend une forme solide en surface du collecteur, formant un réseau de fibres.

La buse possède différentes configurations géométriques qui permettent de fabriquer des fibres unique, mais aussi de fabriquer des structures « cœur-coquille »<sup>248,250-253</sup> à un ou deux cœurs voire plus. La fabrication d'une structure « cœur-coquille » nécessite l'utilisation de deux buses disposées de façon coaxiale, la buse externe contient un polymère tandis que la buse interne contient un autre polymère ou une solution non-miscible au premier. A l'apex de la buse, deux gouttes se forment, l'une étant la coquille et l'autre le cœur. La goutte interne n'est pas reliée au potentiel, elle n'est donc pas chargée en surface contrairement à la solution externe. Il est possible de fabriquer également des structures poreuses, ou des nano fibres ayant un rapport volume / surface élevé<sup>254-259</sup> Le *Tableau 2-2* regroupe les différents paramètres jouant sur la morphologie de la fibre fabriquée.

<i>Paramètres</i>	<i>Effet sur la morphologie des fibres</i>		
<i>Potentiel appliqué (entre 15 kV et 30 kV)</i>	↑	Diamètres des fibres	↓
<i>Débit (entre 0.5 et 3 mL /h)</i>	↑	Diamètres des fibres	↑
<i>Distance aiguille/collecteur (entre 15 et 25 cm)</i>	↑	Diamètres des fibres	↓
<i>Concentration en polymère (viscosité) (entre 1% et 30% (m/V))</i>	↑	Diamètres des fibres	↑
<i>Conductivité de la solution</i>	↑	Diamètres des fibres	↓
<i>Volatilité du solvant</i>	↑	Génération de pores en surface des fibres	↑

Le matériel utilisé pour l'électrospinning est un « *Super-ES 2* » provenant de *E-Spin NANOTech*. Le *Tableau 2-3* contient un récapitulatif succinct des différents paramètres utilisés lors de ces travaux.

<i>Tension(kV)</i>	<i>Débit des pompes (mL/min)</i>	<i>Distance inter électrode (cm)</i>	<i>Position</i>	<i>T°C injection</i>
0 -30	50 µL/min – 3 mL/min	5 - 20	Verticale / Horizontale	T°C Ambiante

## **B. Fluides Supercritiques**

### **a. Généralités**

Le diagramme de phase en pression-température d'un corps pur décrit les différents états de la matière comme l'état solide, liquide ou encore gazeux. Comme le montre la *Figure 2-5* ces trois états sont délimités par des courbes d'équilibre : Solide-gazeux, solide-liquide et encore liquide-gazeux. Au-delà de ces trois états se situe un quatrième état dit « *supercritique* ». Tout

corps possède un point critique qui correspond à une température et à une pression donnée ; cette phase est considérée comme un « quatrième » état, qui n'est ni liquide ni gazeux ni solide.

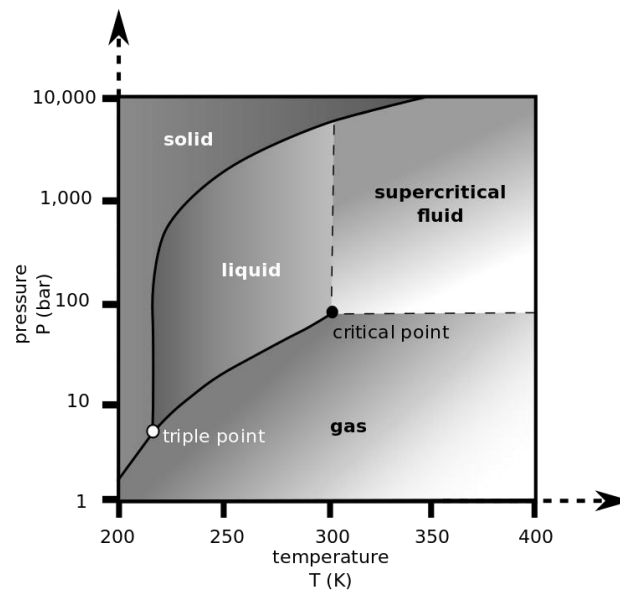


Figure 2-5 : Diagramme de phase du CO<sub>2</sub> représentant la température en Kelvin en abscisse et la pression en bar en ordonnée. (d'après Ben Finney Mark Jacobs)

Expérimentalement, les lignes séparant les différents domaines de stabilité (*gaz-liquide*) indiquent les valeurs de pression et température d'équilibre des phases considérées (Fig.2-5). Lorsque l'on suit ces lignes d'équilibre pour les valeurs élevées de pression et température, on note que celles-ci convergent vers un point appelé « *point critique* ». Au-delà de ces valeurs il n'y plus vraiment de distinction entre l'état liquide et gazeux, on appelle cet état l'état supercritique.

A titre d'exemple dans cette zone, l'eau est trop chaude pour être liquide et trop comprimée pour être gazeuse. Cet état particulier présente des propriétés intéressantes. En effet, celui-ci a une faible viscosité comme celle des gaz tout en ayant la masse volumique d'un liquide ayant également une grande diffusivité. La température critique de l'eau est de 374°C et sa pression critique de 221 bars. Le *Tableau 2-4* reporte les valeurs de température et de pression de l'état supercritique de différents solvants. On note que certaines valeurs sont très élevées, ce qui implique un coût énergétique élevé.

Tableau 2-4 : Propriétés super critiques de différents solvants

Fluide	Température (T <sub>c</sub> , °C)	Pression (P <sub>c</sub> , bar)
CO <sub>2</sub>	31,1	73,8
Eau	374,2	220,5
Toluène	315,6	41,147
Ethane	32,2	48,8

## *b. CO<sub>2</sub> supercritique*

L'état supercritique du CO<sub>2</sub> a été évalué à la fin des années 1970 ce qui a permis de préciser les conditions de température (31,1 °C) et de pression (74 bar). Dans cet état le CO<sub>2</sub> présente des propriétés de solubilisation de substances organiques. Sa non toxicité et ses propriétés en font un acteur principal dans de nombreux domaines tels que l'industrie pharmacologique, agroalimentaire et bien évidemment dans le milieu de la recherche.

### *Séchage supercritique*

Le séchage supercritique est un procédé qui permet de sécher un échantillon, en remplaçant la phase liquide par un fluide supercritique. Le passage de liquide à gaz est effectué sans diffusion de matière à travers une interface gaz-liquide en travaillant au-delà du point critique du solvant considéré. Pour des séchages de matériaux comportant de l'eau, il est nécessaire de remplacer l'eau immiscible dans le CO<sub>2</sub> par de l'éthanol, qui est miscible dans le dioxyde de carbone.

Dans le cadre des travaux de la thèse, les échantillons subissent une déshydratation par échange progressif de solvant dans des bains successifs d'éthanol/eau de concentration croissante (10, 30, 50, 70, 90, 100% en volume avec un intervalle de 15 min). Le dernier bain est constitué d'éthanol absolu, ce qui permet d'éviter les changements brusques de concentration. L'hydrogel devient par la suite alcool gel, il est immergé dans une autoclave, mis sous pression jusqu'au domaine de stabilité liquide du CO<sub>2</sub> à environ 50 bar et 20°C. On procède encore à un échange consécutif de solvant entre l'éthanol et le CO<sub>2</sub> liquide jusqu'à obtenir uniquement du CO<sub>2</sub> dans toute l'enceinte et l'échantillon. Une fois l'échantillon complètement purgé de l'éthanol et donc rempli de CO<sub>2</sub> liquide, quand la température atteint 31,1°C et la pression à 73,8 bars, il se produit un changement d'état en fluide supercritique. Le CO<sub>2</sub> supercritique est évacué par dépressurisation très lente (pour préserver la structure) de l'autoclave, on obtient alors un échantillon solide se présentant sous forme d'aérogel.

## *C. Lyophilisation*

La lyophilisation est également un procédé basé sur le séchage mais cette fois-ci par sublimation d'un produit préalablement congelé. En règle générale, le solvant sublimé est de l'eau, mais il peut aussi être de l'alcool. On distingue trois phases majeures dans un cycle de lyophilisation :

- Congélation : dans une gamme comprise entre 0°C à -80°C, l'eau se transforme en glace. On peut également fabriquer de la glace amorphe si celle-ci est congelée dans l'azote liquide (-195,79°C)*

- ❑ *Lyophilisation primaire qui permet de sublimer la glace libre (interstices) et qui doit se dérouler avec une pression partielle inférieure à la tension de vapeur de la glace. Plus cette température sera basse et plus le vide devra être poussé.*
- ❑ *Lyophilisation secondaire qui permet d'extraire par désorption les molécules d'eau piégées à la surface des matières sèches. Elle permet d'éliminer les dernières traces d'eau.*

On récupère par la suite un produit sec contenant entre 1 et 5% d'eau.

### **III. Techniques de caractérisation**

#### **A. Caractérisations morphologiques des échantillons**

La morphologie de la surface des échantillons est observée en utilisant la microscopie optique en contraste de phase et en fluorescence ainsi que la microscopie électronique à balayage (MEB).

##### **A.i. Microscopie optique en contraste de phase**

La surface des échantillons est observée à faible grossissement en microscopie optique avec un microscope optique *3DKeyence VHX-1000* (Variation de focus, x20, x5000, topographie 3D). Ce microscope à contraste de phase est un microscope optique qui transforme en niveaux de contraste les différences d'indices de réfraction entre les structures transparentes de l'échantillon. Elles se traduisent alors en différences de phase pour les ondes lumineuses les traversant. Pour cela, deux dispositifs (anneaux de phase) sont placés sur le trajet optique : l'un dans le condensateur (système optique qui focalise la lumière sur l'objet) et l'autre dans l'objectif. Quand le bord d'une structure produit une diffraction suffisante, la lumière qui le traverse subit un déphasage par rapport aux autres rayons lumineux. Les anneaux filtrent ces rayons déphasés et il en résulte sur l'image un contraste accentué de la structure.

##### **A.ii. Microscopie optique à fluorescence**

Cette technique utilise le fait que certaines molécules une fois exposées à une longueur d'onde d'excitation d'énergie spécifique, typiquement des photons de plus haute énergie, émettent à leur tour des photons détectables dans le visible (fluorescence). Certains échantillons sont fluorescents dans leur état naturel, comme par exemple la chlorophylle et certains minéraux. Il est également possible d'utiliser une molécule fluorescente appelé fluorophore comme par exemple l'isothiocyanate de fluorescéine (*FITC, fluorescein isothiocyanate* en anglais) en la couplant de façon covalente à la molécule d'intérêt non fluorescente ou encore le DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) qui quant à lui permet de marquer le noyau des cellules en s'intercalant entre les bases de l'ADN cellulaire.

On peut donc dissocier deux phénomènes qui sont :

- ❑ L'auto-fluorescence ou fluorescence primaire : les objets émettent naturellement de la lumière fluorescente.
- ❑ Fluorescence secondaire : une substance fluorescente est ajoutée pour permettre l'observation de l'objet considéré.

### a. Principe

Cette technique de microscopie repose sur la formation d'une image par détection d'une longueur d'onde spécifique. Lorsque que l'on excite une molécule avec une longueur d'onde adaptée celle-ci absorbe un photon qui lui permet d'accéder à un état excité (Fig.2-6(a)).

Lors des interactions de type collision inélastique entre une molécule et un photon incident, une longueur d'onde, supérieure à celle qui a permis l'excitation, est émise. Le phénomène en jeu est appelé, déplacement de Stokes (Fig.2-6(b)). Le déplacement de Stokes est la différence d'énergie entre la longueur d'onde incidente (excitatrice) et la longueur d'onde émise. Donc, plus la différence entre la longueur d'onde absorbée par l'objet et émise est grande, plus il est facile d'observer la fluorescence.

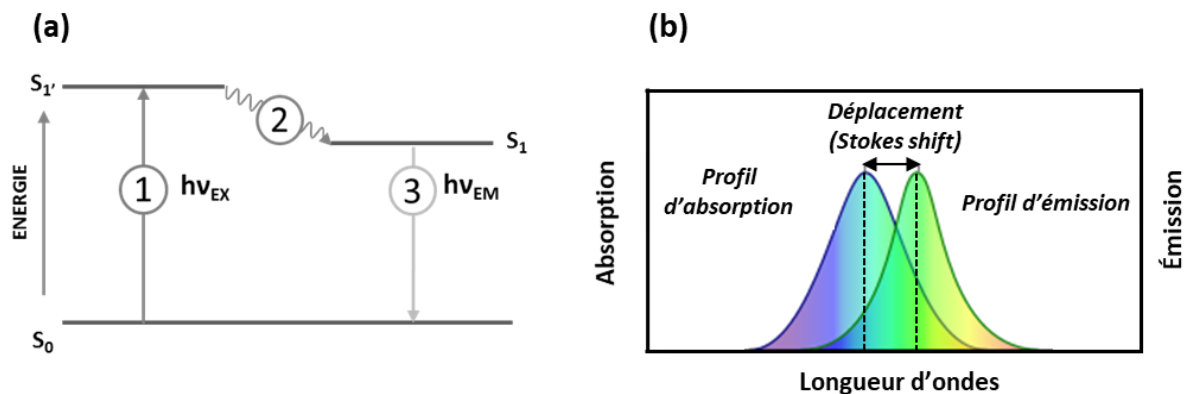


Figure 2-6 : (a) Diagramme d'énergie de fluorescence (Jablonski, inspiré de sagascience CNRS) ; (b) Diagramme des longueurs d'onde entre la lumière émise et la lumière incidente (inspiré de Eigenes Werk).

Le diagramme de Jablonski peut se dissocier en trois étapes interdépendantes (Fig.2-6(a)).

- ❑ Un photon d'énergie ( $h\nu_{EX}$ ) émis par la source est absorbé par le fluorophore créant ainsi le passage d'un électron ( $S_1'$ ) sur une orbitale d'énergie plus élevée
- ❑ L'état d'excitation ne dure qu'entre 1 et 10 nanosecondes. Pendant cette courte période, la molécule opère des changements de configuration et ainsi interagit avec son environnement moléculaire.
- ❑ L'émission de fluorescence se produit lorsque la molécule retourne à son état énergétique initial, un photon d'énergie  $h\nu_{EM}$  est émis. L'énergie étant dissipée durant l'état excité, le photon émis est moins énergétique (longueur d'onde plus grande) que

le photon incident. Cette différence d'énergie s'appelle la différence de Stokes (Fig.2- 6(b)).

Il peut également se produire le phénomène inverse, appelé déplacement Anti-Stokes qui signifie que la longueur d'onde incidente est supérieure à la longueur d'onde émise

### ***b. Instrumentation***

L'acquisition des images est effectuée à l'aide un "MacroFluo" microscope à fluorescence (Leica Microsystems SA, Rueil-Malmaison, France), équipé d'une caméra HQ Cool SnapHQ (Roper Scientific, Photometrics, Tucson, AZ, USA), au grossissement 2,5x, grâce au logiciel Metavue©.

### ***c. Les molécules fluorescentes***

Caractéristiques des fluorophores :

- Longueur d'onde : Correspond aux pics maximums des spectres d'excitation et d'émission.*
- Coefficient d'extinction molaire : Relie la quantité de lumière absorbée à une longueur d'onde donnée, à la concentration de la solution.*
- Rendement quantique : Définit la quantité de photons émis par rapport à la quantité de photons absorbés.*
- Durée de vie : Durée pendant laquelle les molécules sont excitées*
- Aptitude au photo blanchiment : phénomène résultant de réactions chimiques de la molécule lors de son excitation. Le fluorophore perd alors ses propriétés de fluorescence. L'excitation d'une solution de molécules fluorescentes provoque également la dégradation d'une partie d'entre elle. Ainsi à chaque instant, l'intensité de fluorescence diminue.*

### ***A.iii. Microscopie électronique à balayage (MEB)***

L'observation topographique par MEB repose sur le balayage d'un faisceau d'électron sur une surface de préférence conductrice. Les électrons sont accélérés à une tension d'accélération comprise entre 3 et 30 KV, l'échantillon exposé réémet des électrons d'énergies différentes (*électrons secondaires, rétrodiffusés, Auger, Rayons X*) rapportant des informations différentes sur la nature et la topographie de surface de l'échantillon. Cette méthode est très souvent utilisée pour l'étude topographique des matériaux. Les observations de surface d'échantillon de différentes structures Polymère / nanotubes par MEB ont été effectuées à l'aide d'un microscope MEB-FEG JEOL JSM 7800F Prime – EDS. Celui-ci est particulièrement destiné à l'observation d'objets à très haute résolution (0,8 nm) ainsi qu'à faible tension d'accélération (entre 1 et 3kV), ce qui permet de faciliter l'observation d'échantillons à caractère isolant.

## B. Techniques spectroscopiques

### B.i. Spectroscopie à fluorescence

#### a. Principe

La spectroscopie à fluorescence s'appuie sur le phénomène de la luminescence. Les molécules excitées par une onde électromagnétique émettent un rayonnement puis retournent à leur état d'énergie inférieur par désexcitation. La luminescence est divisée en 2 catégories selon la nature de l'état excité : la fluorescence et la phosphorescence.

Le principe de fonctionnement est le suivant (Fig.2-7) : la source d'excitation est généralement une lampe au Xénon. Celle-ci irradie une cuvette en quartz (transparente entre 200 et 2500 nm) contenant une solution fluorescente. Le spectre d'émission continue du Xénon a une intensité quasi constante entre 230 et 1700 nm. Une fois la solution exposée, les molécules sont excitées et émettent à leur tour un photon, détecté à un angle de 90° par rapport au faisceau incident. Entre l'échantillon et le détecteur, un filtre ou un monochromateur est positionné pour sélectionner la longueur d'onde ou la fenêtre de longueur d'onde à observer.

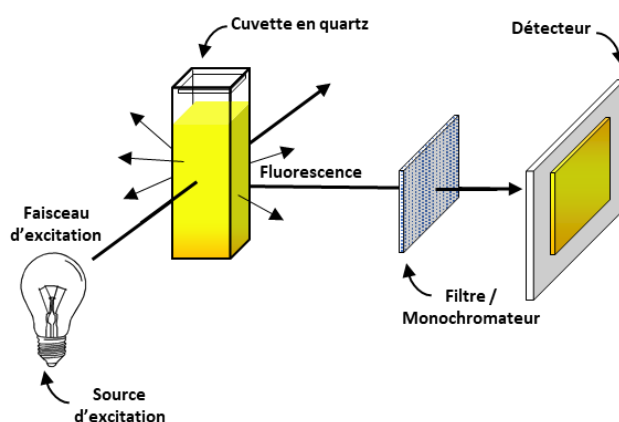


Figure 2-7 : Illustration présentant le schéma de principe d'un spectromètre à fluorescence (inspiré de B.M Tissue 2001).

Dans ce travail de thèse, les mesures de relargage de nos différents échantillons ont été effectuées à l'aide d'un Spectromètre *Edimburg FLSP920*, ayant une puissance de 450 W et un domaine de longueur d'onde compris entre 230 et 1700 nm. Les paramètres d'excitation associés à la lampe Xénon lors des expériences sont fonction de la longueur d'onde d'absorption maximale du *FITC*, soit 490nm (bande passante 0,8 nm) et le monochromateur du détecteur est paramétré sur la longueur d'onde d'émission maximale à 515 nm (bande passante 1 nm).

Nous nous proposons donc d'étudier le comportement de notre dispositif dans la sueur reconstituée <sup>261</sup>. Nous avons choisi des conditions expérimentales (extrêmes) dans lesquelles



le dispositif est complètement immergé dans une solution de sueur artificielle et les mesures sont relevées à intervalle de temps régulier. Pour mimer au mieux le contact dispositif / peau (fluide corporel), il serait nécessaire d'étudier comment le dispositif et les sécrétions de la peau interagissent.

### b. L'isothiocyanate de fluorescéine

La molécule fluorescente utilisée pour ces travaux est de l'isothiocyanate de fluorescéine (*FITC*) (Fig.2-8(a)). Cette molécule une fois excitée à 490 nm émet un rayonnement à 515 nm (Fig.2-8(b)), ce qui permet par microscopie à fluorescence ou par spectroscopie à fluorescence, d'observer et de mesurer la présence du *FITC*. La masse molaire de cette molécule est de 390 gr.mol<sup>-1</sup>. Celle-ci est aujourd'hui largement utilisée dans le domaine de la biologie ainsi que de l'électroporation<sup>235,262</sup>.

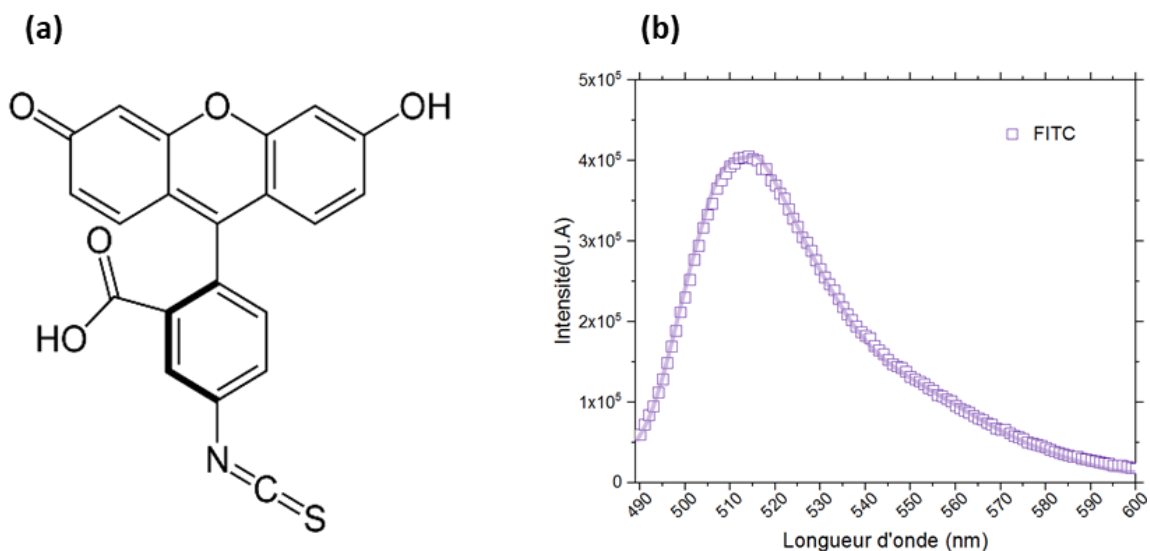


Figure 2-8 : (a) Molécule d'isothiocyanate de fluorescéine ; (b) Spectre d'émission du FITC entre 490 et 600nm.

Nous avons choisi d'utiliser du *FITC Dextran* (*Dextran-FITC*) ayant une masse molaire comprise entre 3000 et 5000 g.mol<sup>-1</sup> de manière à s'approcher le plus possible de la masse molaire de l'insuline qui est de 5800 g. mol<sup>-1</sup>.

### c. Protocole de mesure

Pour évaluer le relargage de la molécule fluorescente, nous avons conçu et fabriqué un dispositif s'adaptant (Fig.2-9) à la cellule en quartz classiquement utilisée pour la spectroscopie à fluorescence. Le but est de permettre l'étude précise du relargage de notre dispositif pour un suivi en temps réel. L'ajout d'une nacelle dans la partie supérieure et d'un barreau aimanté dans la partie basse permet d'homogénéiser la solution et donc d'obtenir des profils de relargage précis en minimisant le taux d'erreur. La nacelle a été modélisée en 3D à l'aide du logiciel *Blender*®, puis imprimée au *FabLab* mis à la disposition des étudiants par l'*Université Paul Sabatier* sur une imprimante 3D *Makerbot*®*Replicator 2*. Le matériau utilisé

pour réaliser cette nacelle est constitué d'acide polylactique (PLA). La température de mesure est comprise entre 20 et 25°C.

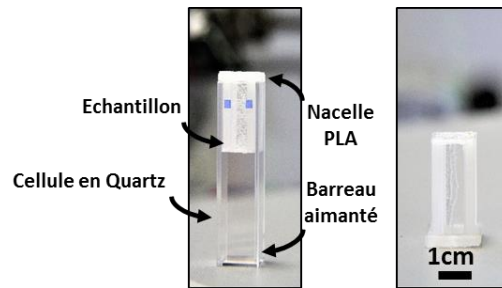


Figure 2-9 : Dispositif développé pour l'étude du relargage du Dextran-FITC en dynamique (a) Cellule en quartz classique comprenant la nacelle en PLA ; (b) nacelle en PLA.

Pour les études en mode dynamique, nous préparons une solution de *Dextran-FITC* à 1 mM qui est disposée dans des piluliers contenant les échantillons *CTRL-AG* et *DWNT-AG* déshydratés (préalablement mesurés) pendant 24h. Une cellule en quartz est remplie par 3,5 mL de solution de sueur artificielle. Un barreau aimanté est ajouté dans le bas de la cellule. La cellule est disposée sur le banc de mesure où se trouve un agitateur magnétique réglé à une vitesse de 400 tours/minutes. Après 24 h d'incubation, les échantillons sont prélevés de la solution *Dextran-FITC*, séchés à l'aide d'un papier microfibre pour enlever le surplus de matière présent sur les surfaces, puis introduits un par un dans la nacelle (Fig.2-10).

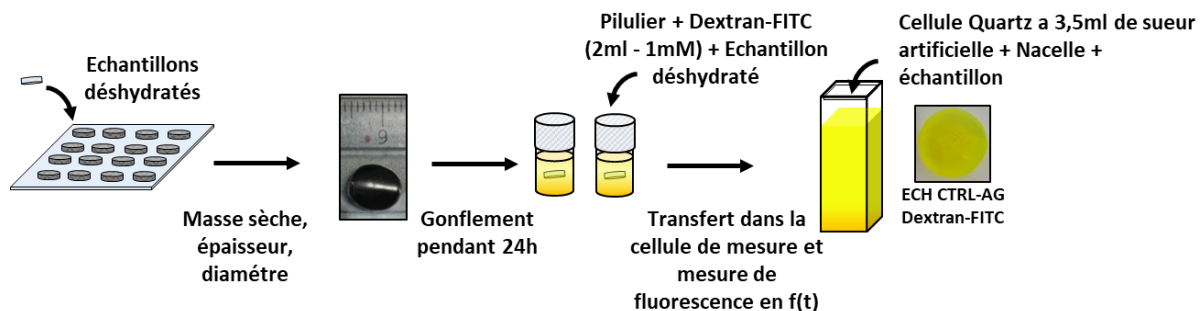


Figure 2-10 : Schéma représentant les différentes étapes du dispositif mis en place pour la préparation des échantillons *CTRL-AG* et *DWNT-AG* pour l'étude du relargage du Dextran-FITC en dynamique.

## B.ii. Spectroscopie Raman

### a. Principe

La spectroscopie Raman est une technique de spectroscopie moléculaire qui permet d'étudier les transitions vibrationnelles à partir d'un phénomène de diffusion de la lumière. C'est en 1928 que *Sir C.V Raman* s'est penché sur ce phénomène de diffusion particulière de la lumière<sup>263</sup>. En effet, lorsqu'un rayonnement est émis par des molécules irradiées, celui est dans 99.999% des cas de la même fréquence que le rayonnement incident mais dans 0.0001% des cas un photon sera émis à une fréquence différente. Cet effet se produit lorsque la molécule considérée est excitée de son état fondamental vers un état d'excitation électronique virtuel produit par le faisceau incident. Une fois la molécule excitée, celle-ci

revient à son état fondamental par l'émission d'un photon d'énergie différente qui est récupéré par le détecteur mesuré et confronté au signal d'origine. Cette diffusion est réalisable uniquement s'il y'a changement de polarisabilité (moment de charge électrique de l'atome) de la molécule.

### ❑ Propriétés Raman des NTC

Pour les NTC, ainsi que le carbone<sup>264-266</sup> de façon générale, les raies d'émission ont largement été étudiées et sont maintenant très bien connues. On discerne que pour les NTC, il existe quatre principaux modes de vibration caractéristique représentés en Figure 2-11.

#### ❑ RBM (Radial Breathing Mode)

Il s'agit d'un mode de vibration radiale, cette émission se produit aux petits nombres d'ondes (à basse fréquence), typiquement entre  $100$  et  $300\text{ cm}^{-1}$ . La position de chacune de ces bandes est directement reliée au diamètre ainsi qu'à la chiralité  $(n,m)$  des NTC considérés.<sup>267</sup>

#### ❑ Bande du Désordre (D)

Cette bande est caractéristique des défauts présents au cœur de la structure  $sp^2$ , celle-ci se trouve entre  $1320$  et  $1340\text{ cm}^{-1}$ . Cette bande permet de déterminer la qualité structurale d'un échantillon par le rapport  $\frac{I_D}{I_G}$ .

#### ❑ Bande du Graphite (G)

La bande G est spécifique de la structure hexagonale  $sp^2$ , du carbone.

#### ❑ La bande 2D (G')

Cette bande provient de la seconde harmonique de la bande « D ». La bande D est proportionnelle à la quantité de défauts au cœur de la structure, à contrario de la bande 2D qui n'est pas fonction de ce phénomène.

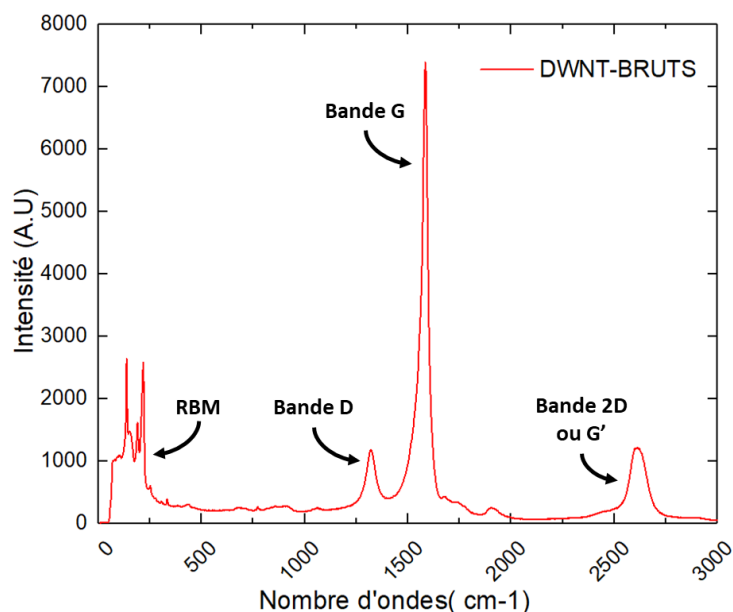


Figure 2-11 : Spectre Raman caractéristique des DWNT représentant la bande G, D, 2D ainsi que les RBM.

## ☐ Protocole d'évaluation de relargage de NTC en conditions extrêmes

Dans le cadre de ces travaux, les expériences en spectroscopie Raman ont été menées à l'aide d'un microscope confocal « *Raman Labram HR800 Horiba YvonJobin* ». Cet instrument a été utilisé pour permettre l'étude du relargage des NTC en solution de sueur artificielle et aux températures élevées. Pour les échantillons, il s'agit donc le plus souvent de solution de sueur artificielle filtrée sous vide à la surface d'une membrane en nitrate de cellulose disposée sur un fritté.

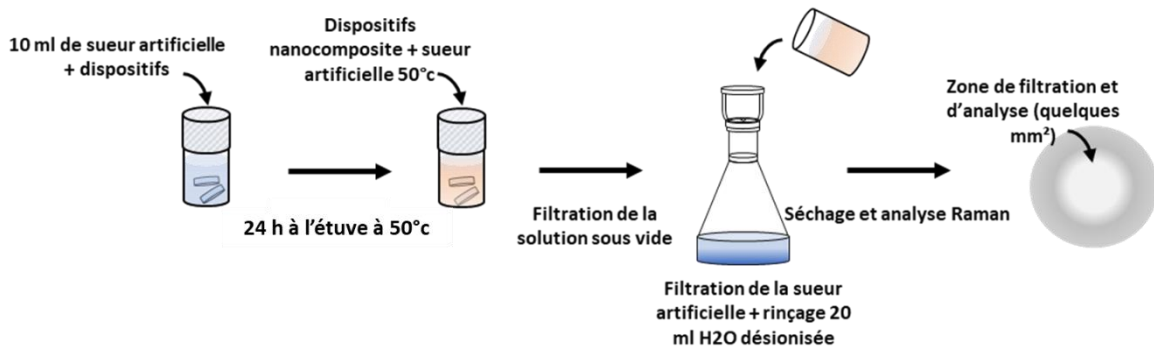


Figure 2-12 : Schéma représentant les différentes étapes permettant la détection potentiel des DWNT dans une solution de sueur artificielle après incubation.

Les dispositifs sont mesurés en termes de surface de contact avec l'extérieur, puis insérés dans un pilulier contenant de la sueur artificielle (Fig.2-12). Par la suite, l'échantillon est disposé à 50°C pendant 24 h. On récupère le pilulier pour le laisser refroidir à température ambiante, puis on prélève la solution de sueur artificielle pour la filtrer sur une membrane en nitrate de cellulose (Merk Millipore, 0,45  $\mu\text{m}$ ). La filtration s'effectue toujours au même endroit sur le filtre pour concentrer au maximum les DWNT sur une surface réduite. Pour éliminer les sels présents en surface de la membrane, on procède immédiatement à un rinçage avec 20 mL d'eau désionisée. On récupère la membrane puis on la fait sécher sous protection pendant plusieurs minutes.

Paramétrages expérimentaux :

- ☐ Laser  $\lambda = 633 \text{ nm}$
- ☐ Filtre : 10%
- ☐ Diamètre (trou) : 100  $\mu\text{m}$
- ☐ Réseau : 600 traits
- ☐ Acquisitions (à des positions différentes sur l'échantillon analysé) : 3-5
- ☐ Exposition : 5 s
- ☐ Accumulations : 5
- ☐ Fenêtre d'observation 10 à 4000  $\text{cm}^{-1}$

Cette technique obéit également aux mêmes lois physiques que la spectroscopie à fluorescence (Stokes-Anti Stokes/Diagramme de Jablonski).

### B.iii. Mesure de turbidité

Les suspensions d'un mélange DWNT/Polymère ont été étudiées à l'aide d'un turbiscan (Fig.2- 13), instrument permettant de mesurer la transmission d'un faisceau infrarouge (880 nm) en fonction du temps au travers d'une cellule de mesure contenant une suspension. En effet, la transmission du signal se trouve modifiée lorsque l'on insère diverses matières en suspension telles que des particules fines, des composés organiques, micro-organismes. Ceci nous permet de comprendre et d'observer quel type de déstabilisation se produit, dans la limite de détection de la technique. Nous avons donc effectué des mesures sur l'agarose et l'alginate de sodium, ainsi que sur la carboxyméthylcellulose, polymère très utilisé pour la dispersion des NTC<sup>268</sup>, qui servira de référence. Les courbes de sédimentation ainsi obtenues permettent d'évaluer très simplement la stabilité des suspensions.

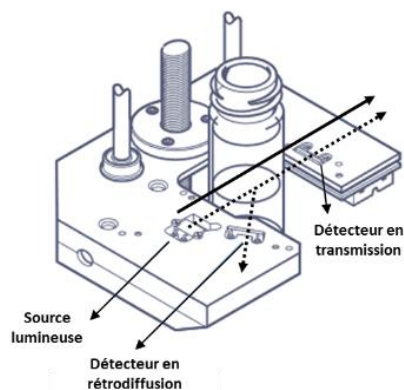


Figure 2-13 : (a) Représentation schématique d'une mesure de turbidité en transmission. (D'après Formulation)

## C. Caractérisations électriques

Dans ces travaux nous avons principalement effectué des mesures par spectroscopie d'impédance et en potentiométrie. Ces deux techniques permettent d'obtenir différentes informations quant aux propriétés électriques, notamment la conductivité électrique des matériaux étudiés mais également déterminer les mécanismes gouvernant la conduction.

### C.i. Spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE)

Le mot impédance provient du verbe anglais « *to impede* » signifiant retenir, en d'autres termes ce concept physique permet de mesurer l'opposition d'un circuit électrique appliquée sur le passage d'un courant alternatif sinusoïdal et nous permet d'extraire des composantes tel que l'induction, la résistance ou la capacité.

#### a. Principe

La spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) est une méthode transitoire permettant de déterminer la contribution des phénomènes chimiques et électrochimiques se produisant aux interfaces métal-solution, mais également celles de l'électrolyte compris dans l'espace

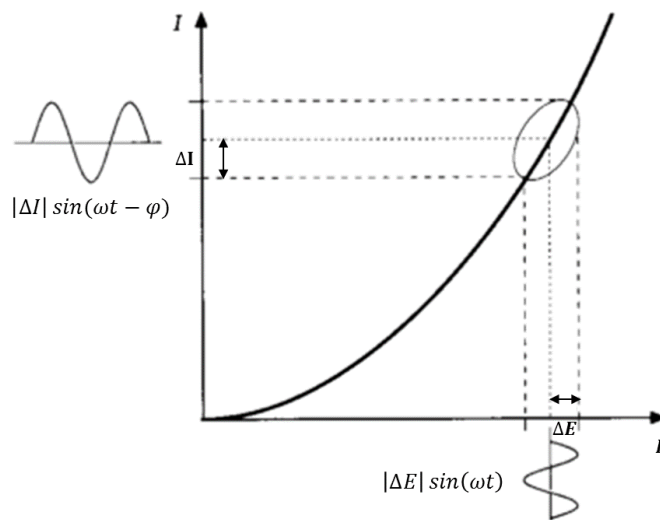
inter-électrodes. Sous application d'une modulation sinusoïdale de faible amplitude du potentiel  $\Delta E$  en fonction de la fréquence  $f$  on peut mesurer la réponse de l'électrode.

$$\rightarrow \Delta E = |\Delta E| \sin(\omega t)$$

Dans le cas ci-dessus  $\Delta E$  correspond à l'amplitude du signal d'entrée et  $\omega = 2\pi f$  à la pulsation. L'idée est d'appliquer un signal de faible amplitude, typiquement de l'ordre de 5 mV jusqu'à 100 mV, permettant de rester dans un domaine pseudo linéaire. La perturbation sinusoïdale du potentiel induit un courant sinusoïdal  $\Delta I$  qui se superpose au courant stationnaire et également déphasé d'un angle  $\varphi$  par rapport au potentiel imposé.

$$\rightarrow \Delta I = |\Delta I| \sin(\omega t - \varphi)$$

De ce fait, lorsque l'on trace les deux signaux, on obtient le cycle de Lissajous en *Figure 2-14*.



*Figure 2-14 : Graphique représentant l'intensité en fonction de la tension appliquée qui décrit une ellipse de Lissajous* <sup>269</sup>

L'impédance de ces systèmes est décrite par le rapport de ces deux composantes à savoir, la tension sinusoïdale imposée et le courant résultant. On peut exprimer ces éléments sous forme complexe :

$$\rightarrow Z = \frac{\Delta E}{\Delta I} = \frac{|\Delta E| e^{j\omega t}}{|\Delta I| e^{j(\omega t - \varphi)}} = |Z| e^{j\varphi} = |Z| \cos \varphi + j|Z| \sin \varphi$$

Donc :

$$\rightarrow Z = ReZ + jImZ$$

Egalement nous avons :

$$\rightarrow |Z|^2 = (ReZ)^2 + (ImZ)^2$$

$$\rightarrow \varphi = \tan^{-1} \frac{ImZ}{ReZ}$$

L'impédance  $Z$  peut ainsi être présentée sous forme de coordonnées polaires grâce à son module  $|Z|$  ainsi que sa phase  $\varphi$  par le diagramme de Bode (Fig.2-15(c, d)). Il est aussi possible de la représenter en coordonnées cartésiennes par sa partie réelle et sa partie imaginaire par le diagramme de Nyquist (Fig.2-15(b)). On remarque plusieurs phénomènes dépendant de la fréquence couramment observés. Sur le diagramme de Nyquist à haute fréquence, les ions ne se déplacent quasiment pas, effectivement l'impédance d'un système dépend de la résistance de l'électrolyte, mais également de la résistance des électrodes ( $R_E$ ). Lorsque la fréquence diminue, les ions peuvent se déplacer et donc la résistance augmente due à la diffusion des ions. Lorsque la fréquence diminue encore, on observe que la résistance atteint sa valeur maximum ( $R_T$ ). A très basse fréquence, on observe une courbe verticale ( $45^\circ$ ) correspondant à un phénomène capacitif (Warburg). Dans le cadre de ces études, nous nous intéressons principalement à la résistance de l'ensemble du matériau soit  $R_t$ . Ces différentes représentations permettent d'interpréter différents phénomènes de conduction, même si elles donnent les mêmes informations quant aux valeurs de conductivité électrique.

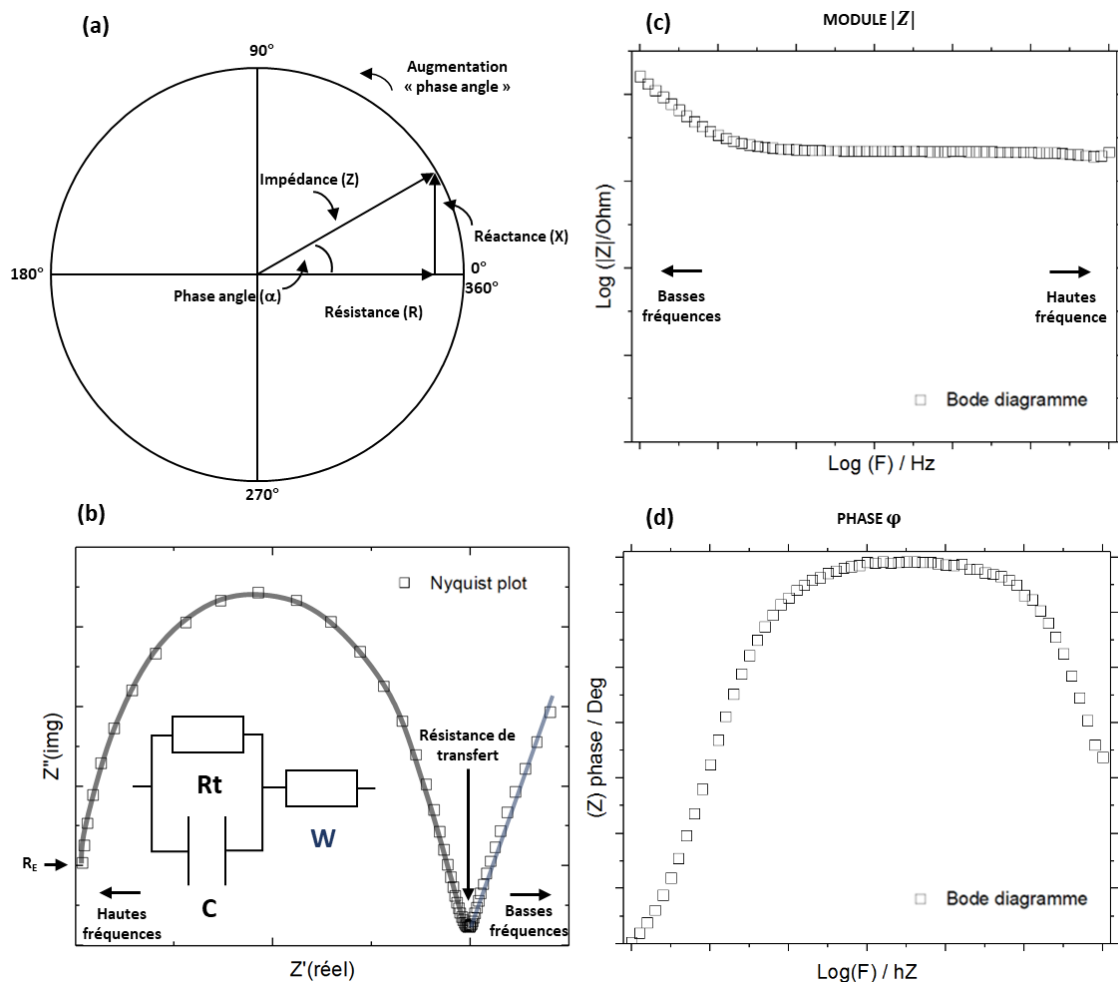
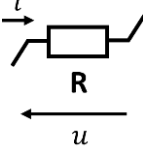
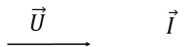
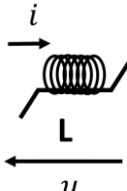
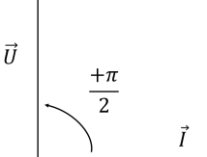
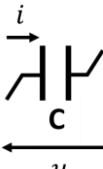
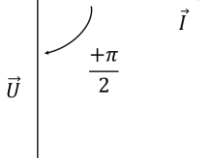


Figure 2-15 : (a) Composante réelle et imaginaire du vecteur d'impédance dans le plan complexe ; (b) représentation de Nyquist en coordonnées cartésiennes  $|Z|_{\text{img}}$  en fonction de  $|Z|_{\text{réel}}$  dans le cas d'un phénomène capacitif et résistif.

Le diagramme de Bode et la représentation de Nyquist permettent tous deux de traduire la

variation de l'impédance "Z" en fonction de la fréquence "f". Les données obtenues par SIE sont analysées et simulées. En ajustant les paramètres électriques servant de modèle au système, on peut décomposer le signal en circuit électrique équivalent (Tab.2-6).

La majorité des éléments électriques utilisés pour modéliser ces phénomènes sont relativement simples comme les résistances, capacités ou encore inductances explicitées au Tableau 2-6. Le circuit ainsi modélisé est donc assemblé et permet de représenter le circuit électrique équivalent correspondant au système étudié. Bien sûr pour que ce modèle soit utile, il est nécessaire que les différents éléments ou groupes d'éléments aient une réalité physique construite à partir d'éléments simples.

Tableau 2-6 : Circuits équivalents permettant la modélisation des différents composants.		
Modèle	Impédance complexe	Représentation de Fresnel
<p><b>Résistance</b></p> 	$Z_R = R$	
<p><b>Inductance</b></p> 	$Z_L = jL\omega$ $= L\omega e^{+j\frac{\pi}{2}}$	
<p><b>Capacité</b></p> 	$Z_C = \frac{1}{jC\omega}$ $= \frac{1}{C\omega} e^{-j\frac{\pi}{2}}$	

### □ Protocole

Pour déterminer les propriétés électrochimiques de notre dispositif, la SIE semble être une méthode incontournable. L'impédance mètre (VMP3 potentiostat Bio-logic S.A, France) est un instrument de mesure utilisant le logiciel EC-LAB ; les paramètres de mesures sont décrits dans le Tableau 2-7.

Tableau 2-7 : paramètres de mesure d'impédance		
Amplitude du signal	Plage de fréquence	Points par décade
100 mV	1 Hz-1 MHz	10

Pour réaliser les mesures nous utilisons une cellule assemblée au laboratoire qui comporte plusieurs parties comme le montre la Figure 2-16. Avant chaque mesure, la cellule est placée



au bain à ultrasons dans un mélange eau DI/Ethanol pendant 5 à 10 minutes permettant son nettoyage. Après avoir déterminé son épaisseur l'échantillon est disposé entre deux électrodes métalliques en acier inoxydable. La longueur de la cellule est elle aussi mesurée à l'aide d'un pied à coulisse afin d'évaluer la déformation de l'échantillon lors de son insertion dans la cellule.

En mesurant l'épaisseur, le diamètre et à l'aide des données obtenues par spectroscopie d'impédance, il est possible de déterminer la résistance par le diagramme de Nyquist ou de Bode et ainsi d'obtenir la résistivité de l'échantillon par l'équation suivante :

$$R = \frac{\rho e}{S}$$

Pour en déduire la conductivité

$$\sigma = \frac{1}{\rho}$$

Avec "R" la résistance mesurée, "ρ" la résistivité, "e" l'épaisseur et "S" la surface. Dans le cadre de ces travaux l'épaisseur ou le diamètre sont restés constants.

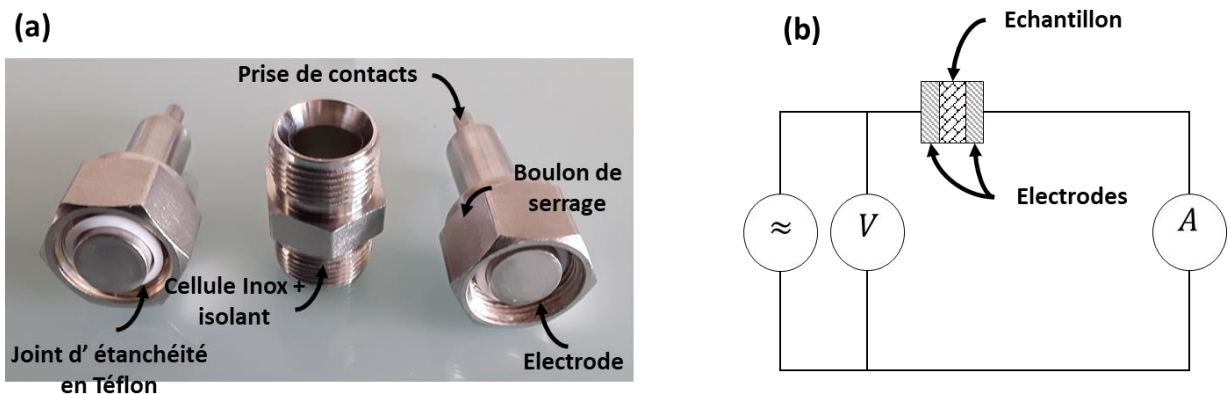


Figure 2-16 : (a) Cellule de mesure ; (b) Schéma représentant la mesure d'un échantillon à deux électrodes.

### C.ii. Mesures tension/courant

La littérature semble assez floue sur le sujet concernant l'identification des phénomènes de conduction électrique de ce type de matériaux, les travaux ont permis de développer un autre protocole de mesure électrique permettant cette fois-ci de travailler à des tensions continues supérieures à la tension précédemment utilisée en SIE.

On applique aux bornes de l'échantillon une tension qui permet de mesurer le courant qui traverse le système. Pour ce faire, on utilise un *Keitley 2410*, instrument servant de source de tension ayant une gamme comprise entre 0 et 1100V, équipé d'un ampèremètre de calibre  $10^{-9}$  A à 150 mA. Cette source est pilotée via un logiciel nommé *Labtracer 2.0*. Ce logiciel

permet le balayage en tension par application consécutive de différents échelons de tension, et enregistre le courant traversant notre matériau, mesuré par l'ampèremètre (Fig.2-17(a)). Les paramètres de mesures se sont étalés de 50 mV à 1,3 V en prenant 1 point tous les 200 mV. L'échantillon est ensuite déposé sur une plaque d'acier servant de contre électrode recouverte d'une électrode circulaire de platine. Le contact est effectué à l'aide d'une pointe auto-rétractable (pression constante) entre le platine et les pinces « crocodile », une autre pointe est placée en contact avec la plaque d'acier inoxydable (Fig.2-17(b)).

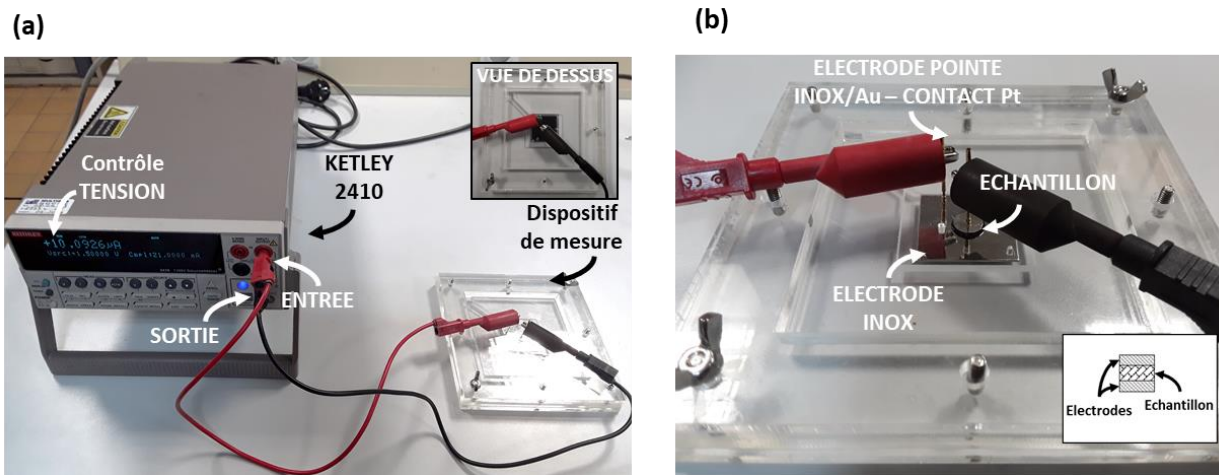


Figure 2-17 : (a) Dispositif expérimental de mesure électrique Courant/Tension.( mesures effectuée au laboratoire Laplace) ; (b) cellule de mesure.

## IV. Electroporation

### A. Matériels expérimentaux

#### A.i. Générateur

L'étude et le développement de matériaux d'électrodes a permis d'effectuer des tests *ex vivo* sur peau de souris. Pour ce faire, un générateur dédié à la génération de champs électriques pulsés en « vague carrée » ('ELECTRO cell B10 HVLV' (High Voltage-Low Voltage)) a été utilisé.

Le générateur d'impulsions électriques comporte deux condensateurs internes pouvant être chargés indépendamment à des tensions programmables et différentes. Une fois les condensateurs chargés, il est possible d'appliquer le nombre d'impulsions nécessaire en maîtrisant parallèlement la durée des impulsions positives et négatives ainsi que la période de répétition.

Description des différentes variables (Fig.2-18) :

- ❑ Amplitude des impulsions positives et négatives de 0V à  $\pm 1000V$ , noté  $U_{Positif}$  ou  $U_{Négatif}$
- ❑ Durée des impulsions positives ou négatives configurables de  $5\mu s$  à  $50000\mu s$ , notée  $T_{Positif}$  et  $T_{Négatif}$
- ❑ Délai entre les impulsions successives configurable de  $5\mu s$  à  $50000\mu s$ , notée  $T_{Intermédiaire}$
- ❑ Période des impulsions, configurable de  $80\mu s$  à  $9,9995s$ , noté  $P$
- ❑ Nombre de répétitions de l'impulsion, configurable de 0 à 10000, noté  $R$

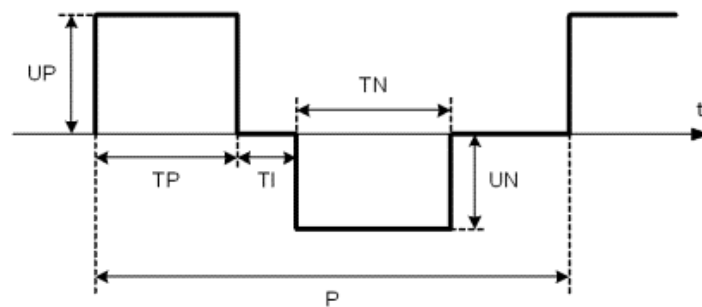


Figure 2-18 :Représentation typique d'un signal carrée.

#### ❑ Molécules utilisées

Lors de ces travaux, et pour permettre d'étudier une molécule susceptible d'être délivrée au travers de la peau via notre dispositif, notre choix s'est porté sur l'insuline qui a une taille de l'ordre de  $5,8\text{ kDa}^{270}$ . Pour réaliser les tests en conditions expérimentales, nous avons utilisé de l'insuline fluorescente (marqué FITC) provenant de Sigma Aldrich « *Insulin-FITC labeled human* » (*recombinant, expressed in yeast, lyophilized powder 5,8 kDa*) mais également et surtout du *Dextran-FITC* de poids moléculaire compris entre 3 et 5 kDa. Cette molécule de Dextran est fonctionnalisée par une molécule de FITC servant de traceur fluorescent et de masse proche de l'insuline.

Le *Dextran-FITC* est solubilisé dans une solution tampon de Phosphate Buffer Saline (Fig.2-19) à une concentration de  $10^{-3}\text{ mol.L}^{-1}$  ( $0,002\text{-}0,020$  molécules de FITC par mol de Dextran).

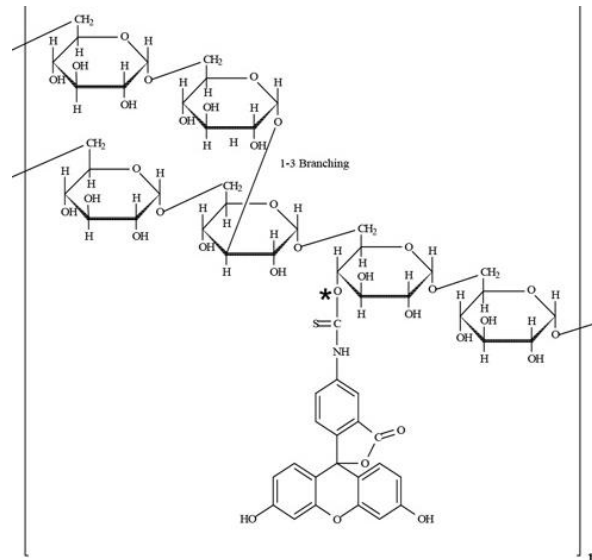


Figure 2-19 : Molécule de FITC greffée sur une molécule de Dextran (Dextran-FITC). (Sigma-Aldrich)

## B. Expériences ex vivo

### B.i. Modèle de peau

Le modèle utilisé pour étudier la pénétration de molécules médicamenteuse au travers de la peau est le plus souvent la peau de cochon et plus précisément celle des oreilles. Cependant pour des raisons de faisabilité des expériences, et pour rendre les tests préliminaires plus accessibles, nous avons choisi la peau de souris, ces dernières étant utilisées comme modèle à l'IPBS. Les souris utilisées sont des souris Nude (Fig.2-20). Le phénotype de ces souris est l'absence de poil ce qui est un avantage certain pour l'application des dispositifs lors des tests puisque la peau peut être utilisée telle quelle sans traitement préalable.



Figure 2-20 : Souris de catégorie Nude (Source : National Cancer Institute)

Pour permettre de prélever la peau des souris avec précaution, celles-ci sont tout d'abord endormies à l'aide d'un anesthésique couramment utilisé appelé IsoFlurane. Une fois l'animal endormi, il est tué avec minutie par dislocation des cervicales. La peau de l'animal est immédiatement découpée du bas de la colonne vertébrale jusqu'à son cou. On obtient environ

une surface d'environ 8 cm<sup>2</sup> de peau, que l'on dispose directement sur le dispositif expérimental.

## ***B.ii. Dispositif expérimental***

Le dispositif expérimental développé aux cours de ces travaux et permettant d'effectuer les premiers tests est présenté sur la *Figure 2-21*. Au cours des travaux celui-ci a évolué. C'est pour cela que nous avons développé trois protocoles :

### **□ Protocole 1**

Le protocole 1 est la première version utilisée principalement pour des expériences de contrôle avec des électrodes classiquement mise en œuvre à l'*IPBS*<sup>271</sup>. La *Figure 2-21* décrit le protocole expérimental de base développé pour permettre de tester différents type d'électrodes.

La *Figure 2-21(a)* illustre une cellule de Franz fabriquée en Teflon, constituée d'un compartiment donneur où seront disposées la surface de la peau et les électrodes. La surface utile est d'environ 6 cm<sup>2</sup>. Le compartiment receveur contient du PBS frais d'un volume d'environ 12 cm<sup>3</sup>. La *Figure 2-21(b)* présente la peau de souris (prélèvement dorsal) disposée sur une compresse imprégnée de PBS, pour être ensuite disposée sur la cellule prise en sandwich entre les compartiments donneur et receveur (*Fig.2-21(c)*). La *Figure 2-21(d)* met en évidence la présence des vaisseaux sanguins sur la face interne de la peau, face qui sera en contact avec le PBS. La *Figure 2-21(e, f)* illustre le générateur de tension continue ainsi que l'ensemble du dispositif d'électroporation comprenant la position des électrodes sur la peau et l'insertion de la solution de *Dextran-FITC* ou l'insuline *FITC*. Le compartiment donneur est fixé avec des vis qui permettent de tendre et de maintenir la peau lors de l'expérience d'électroporation. La *Figure 2-21(g)* présente la surface de la peau une fois les électrodes retirées. La *Figure 2-21(h)* représente une illustration de la position et de la forme des électrodes en surface de la peau.

Une fois le champ électrique appliqué, les électrodes sont retirées, la peau est laissée couverte d'un film aluminium pendant 30 minutes, puis le liquide contenant la molécule fluorescente (*Dextran*) est absorbé à l'aide de papier microfibre pour permettre une observation en microscopie a fluorescence.

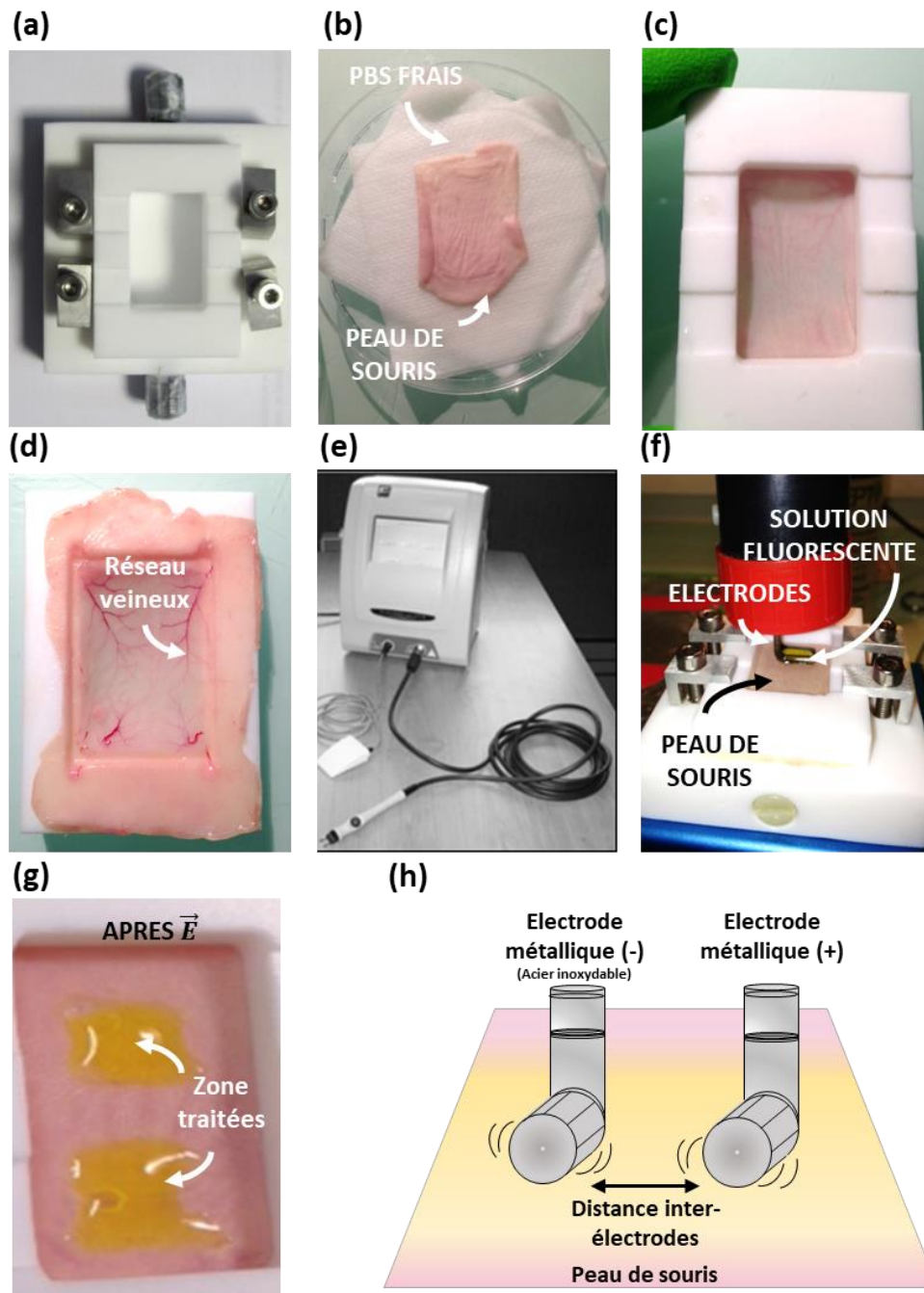


Figure 2-21 : Protocole expérimental d'électroporation utilisant des électrodes cylindriques en acier sur peau de souris (a) Cellule de Franz en Téflon ; (b) Peau de souris disposée sur des compresses imprégnées d'un tampon PBS ; (c) Surface de la peau de souris ; (d) Face interne de la peau de souris comprenant les vaisseaux sanguins et les tissus adipeux situés dans l'hypoderme ; (e) Générateur de tension continue ; (f) Mise en place des électrodes sur le dispositif ; (g) Solution de Dextran-FITC après application du champ ; (h) illustration de la position et la forme des électrodes métallique sur la peau de souris.

Pour la réalisation de ces expériences, le paramétrage du générateur est une étape capitale, en effet les impulsions électriques appliquées à la peau vont définir la potentielle perméabilisation. Le *Tableau 2-9* exprime les paramètres utilisés lors des expériences et ceux pour tous les protocoles décrits ici.

Tableau 2-9 : Paramètres électriques utilisés lors des expériences ex vivo

Tension $U_p / U_n$	0 V / 1000 V
Temps $T_p / T_n$	0 ms / 20 ms
Durée $T_i$	1s
Période	10
Répétitions	1 - 20

Ces paramètres en fonction du matériau d'électrode utilisé peuvent varier et présenter des effets, des résultats différents en termes de perméabilisation de la peau.

### ☐ Protocole 2

La Figure 2-22(b) illustre la configuration expérimentale utilisée dans le cadre du test de nos dispositifs. La peau de souris prélevée est placée sur le dispositif de Franz (Fig.2-21(c)) contenant du PBS. Le générateur de tension continue (Fig.2-21(e)) est configuré selon les paramètres préalablement cités (Tab.2-9). Les hydrogels, sont préalablement disposés pendant 24 h dans du Dextran-FITC à la concentration de 1 mM dans du PBS (Fig.2-22(a)). L'excès de liquide est brièvement enlevé à l'aide d'un papier absorbant. Ici, une fine électrode en cuivre est placée sur nos matériaux afin d'améliorer le contact électrique entre l'électrode de contact reliée au générateur de tension et l'hydrogel nanocomposite. Le montage final est décrit en Figure 2-22(b). La Figure 2-22(c) illustre la position des électrodes sur la peau de l'animal.

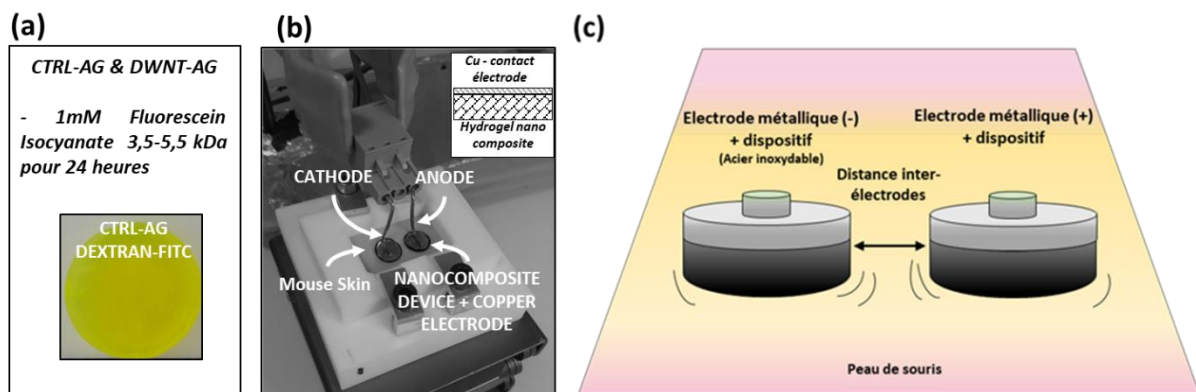


Figure 2-22 : Protocole expérimental d'électroporation utilisant les hydrogels nanocomposites développés sur peau de souris ; (a) illustration d'un échantillon CTRL-AG regonflé dans une solution de Dextran-FITC/PBS pendant 24 heures ; (b) Mise en place des hydrogels nanocomposites sur le dispositif d'électroporation ; (c) Surface de la peau de souris ; (c) illustration de la position et la forme des électrodes métalliques sur la peau de souris

### □ Protocole 3

Ce protocole (Fig.2-23(a)) nécessite d'ajouter des prises de mesure à l'entrée et en sortie mais également une pince ampèremétrique reliée à la sortie du générateur pour permettre la mesure du courant. Les électrodes sont des tiges cylindriques en inox équipées de ressorts permettant d'appliquer la même force à l'anode et à la cathode via un porte électrode en polymère (Fig.2-23(b)). La Figure 2-23(c) illustre le circuit électrique équivalent de l'ensemble du dispositif. La peau d'animal est déposée sur une compresse imprégnée de PBS frais (Fig.2-21(b)). L'assemblage de ces différents éléments est illustré par la Figure 2-23(b).

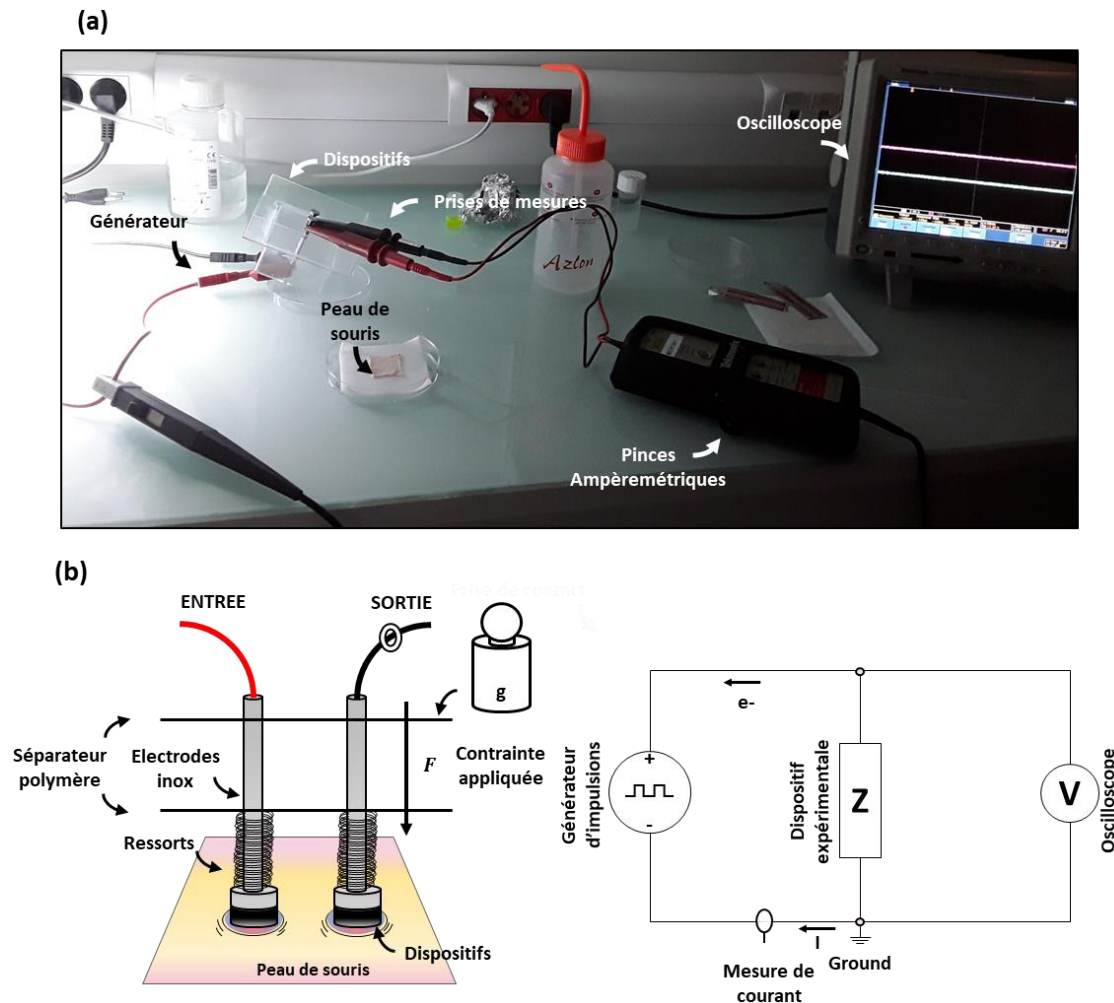


Figure 2-23 : Protocole expérimental d'électroporation utilisant les hydrogels nanocomposites développés sur peau de souris couplé à un dispositif de mesures (tension/courant) ; (a) image représentant le dispositif expérimental; (b) Représentation schématique de l'assemblage des différents éléments ; (c) Représentation du circuit électrique équivalent.

Ce dispositif expérimental permet de maintenir les électrodes parallèles à la surface de la peau durant l'application du champ électrique tout en mesurant le courant traversant la peau. Les paramètres expérimentaux utilisés concernant le champ électrique, la distance inter-électrodes, la concentration en Dextran-FITC, sont les mêmes que pour les expériences précédentes.





## CHAPITRE 3

# CHOIX ET MISE EN FORME DU MATERIAU



# INTRODUCTION

Le chapitre bibliographique met en lumière le caractère pluridisciplinaire de la thèse regroupant plusieurs domaines comme la science des matériaux et la science du vivant. Dans le but de mieux répondre aux exigences concernant la fabrication d'un tel dispositif, des domaines comme la Sociologie et le Droit ont permis de forger une autre vision de notre projet. En effet, la compréhension d'une maladie, d'un point de vue humain ainsi que des besoins et des attentes des malades sont des enjeux majeurs de notre société. Par exemple pour la fabrication de ce matériau et le développement d'un dispositif ayant pour but la délivrance transdermique, celui-ci pourrait appartenir d'un point de vue juridique à deux catégories : en effet si le matériau contient la molécule d'origine, on parle alors de médicament ; si celle-ci est ajoutée, on parle alors de dispositif médical.

Pour cela plusieurs techniques ont été développées afin de déterminer leur faisabilité, ainsi que leur potentiel, pour répondre aux critères fixés par le cahier des charges. La *Figure 3- 1* illustre les trois éléments de départ puis les différentes techniques de mise en forme de matériaux envisagées. Le matériau a pour fonction la délivrance d'un médicament, ayant pour vocation d'être intégré en tant que dispositif médical. Pour réaliser ce dispositif, trois matériaux d'origines différentes incluant une matrice en polymère, des nanotubes de carbone bi-parois, et une molécule pharmacologique ont été choisis. Le polymère devra être biocompatible et permettre l'encapsulation des *DWNT* afin d'empêcher toute interaction avec le patient. De plus, il devra posséder des propriétés de rétention, en termes de capacité à stocker une molécule pharmacologique (cf. cahier des charges). Les *DWNT* apportent une fonction électrique et mécanique et présentent une grande surface spécifique<sup>272</sup>. L'insertion de nanoparticules telles que les *DWNT* apportera d'autres fonctionnalités potentielles au matériau<sup>96</sup>. La molécule pharmacologique pouvant être incorporée au matériau peut être assez variable, dépendant des propriétés du matériau final fabriqué et de l'utilisation de ce dispositif médical. Les briques élémentaires étant constituées, il faut également déterminer par quel moyen le matériau peut être mis en forme. Le procédé de mise en forme devra permettre de fabriquer un matériau contenant le polymère, les *DWNT* ainsi que la molécule pharmacologique.

Le matériau est prévu pour permettre le stockage ainsi que le relargage de molécules, il devra donc présenter une porosité ouverte. C'est pour ces raisons que la mise en forme d'hydrogel en voie supercritique ou encore par lyophilisation peut répondre à ce type d'approche. En effet, le matériau issu d'un séchage d'hydrogel par voie supercritique est très poreux. Par ailleurs l'approche par lyophilisation permet uniquement l'obtention de macropores est donc potentiellement moins efficace pour retenir la solution. Les matériaux de ce type sont communément appelés aérogels. La préparation des matériaux sous forme d'hydrogel par différentes méthodes de mise en forme sera décrite dans la suite de ce chapitre.

Enfin une toute autre approche également développée consiste à mettre en forme le matériau par électrospinning. Cette technique, de par sa grande flexibilité, permet de mettre en forme des matériaux à la fois fibreux et poreux si toutefois les conditions expérimentales sont réunies

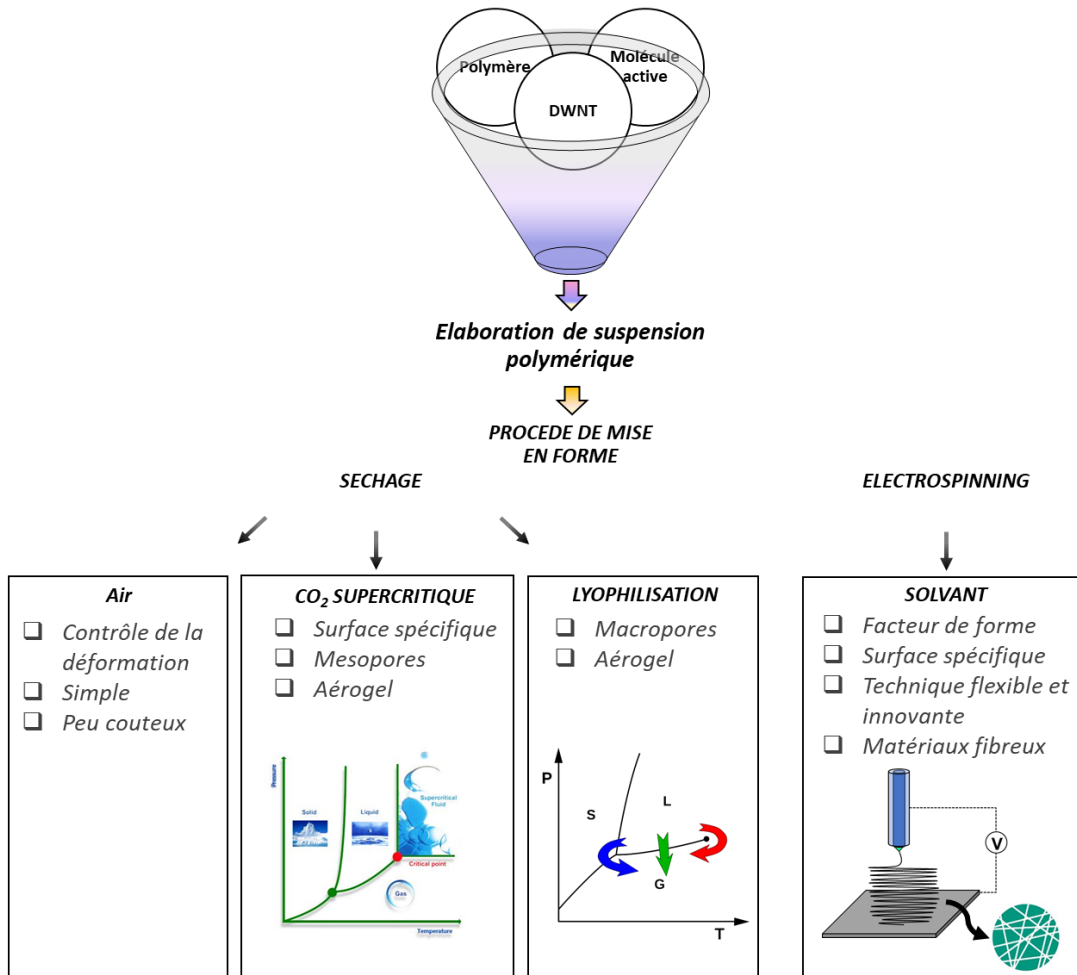


Figure 3-1 : (a) Schéma illustrant les différents éléments ainsi que les différentes méthodes de mise en forme étudiés.

Dans un premier temps, une identification des polymères ainsi que leurs possibilités de mise en forme a été réalisée. Une des options choisies pour la fabrication d'un gel est d'éviter au maximum de l'utilisation de solvant organique potentiellement toxique pour l'homme. C'est pour cela que la fabrication en voie aqueuse a été privilégiée (exception pour l'électrospinning), notamment pour la fabrication d'hydrogels, en raison de sa non toxicité, de son grand pouvoir de solubilisation et de son coût limité.

# I. Electrospinning

La mise en forme par électrospinning permet d'obtenir un matériau fibreux et de forme cylindrique. Dans ces travaux, l'intérêt porté à cette technique de mise en forme est de pouvoir réaliser un matériau combinant de multiples fonctions. En effet, l'objectif est de développer un matériau d'électrode pouvant être intégré à un dispositif.

L'idée était donc de fabriquer une fibre ayant une structure « Core-Shell » (*cœur-coquille*, Fig.3-2(a)), comprenant au cœur la molécule active encapsulée par une coquille extérieure formée de polymère et de NTC (Fig.3-2(b)). Par ailleurs, pour permettre le relargage de la molécule, la présence de pores de part et d'autre de la fibre est indispensable. Cependant, la réalisation d'une telle structure « tout-en-un » comprend de nombreux aspects assez complexes, notamment par rapport à l'uniformité de la fibre. En effet, la fibre doit présenter une continuité électrique ainsi qu'un remplissage effectif, tout en maintenant la solution au cœur de la fibre pour que celle-ci ne soit relarguée que lors de l'application d'un stimulus électrique externe.

Cette partie de chapitre effectue un état des lieux des possibilités et de la faisabilité de mise en forme par électrospinning afin de définir les tenants et les aboutissants dans l'objectif de fabriquer une électrode destinée à la diffusion transdermique.

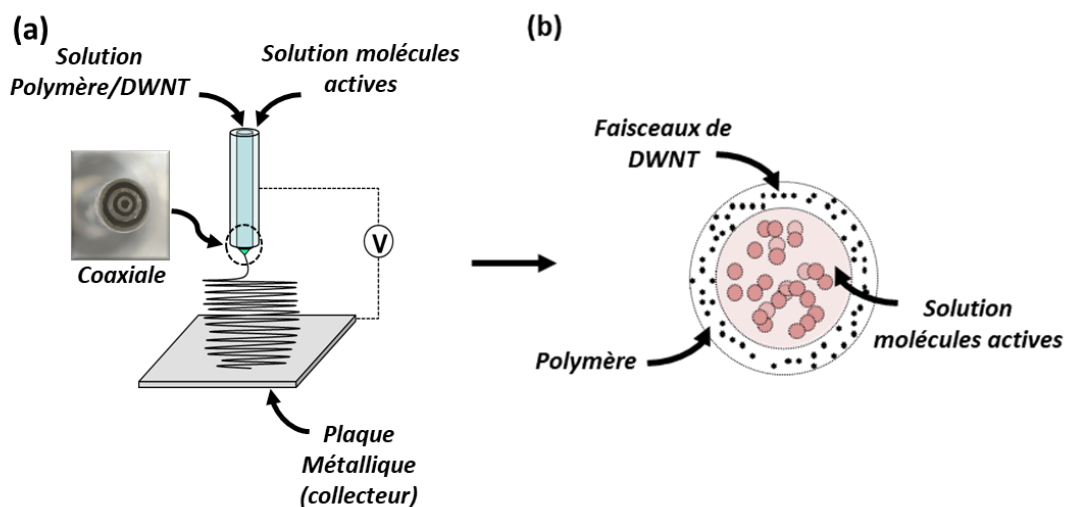


Figure 3-2 : (a) Dispositif de fabrication (électrospinning) de fibres en utilisant une buse coaxiale ; (b) Vue en coupe d'une fibre polymère/DWNT fabriquée (buse coaxiale) contenant une solution de molécules actives

La complexité liée à la fabrication de ce type de dispositif par électrospinning provient d'une part de la structure cœur-coquille mais également du point de vue des paramètres expérimentaux, dépendant de nombreux facteurs comme la viscosité, le débit, la DDP appliquée, le solvant, la distance inter-électrodes, la conductivité de la solution, la volatilité des solvants ou encore l'atmosphère de travail. Pour ce faire, nous avons dans un premier

*temps utilisé des polymères d'origine synthétique couramment utilisés dans la littérature. Cette étude permet d'effectuer un état de l'art de ce type de matériau et de montrer les possibilités et les limites pour le développement d'une électrode de ce type.*

## **A. Choix du polymère**

### **A.i. PMMA**

Des études préliminaires ont permis de déterminer la faisabilité de mise en forme d'un polymère largement étudié dans la littérature, à savoir le PolyMéthacrylate de Méthyle (PMMA)<sup>273</sup>. De nombreux papiers rapportent l'utilisation de ce polymère d'origine synthétique pour la fabrication de fibres poreuses<sup>251,274</sup>, de nanocomposites à base de NTC<sup>251,275-277</sup> et enfin de structures cœur-coquille<sup>251,278</sup>, ce qui souligne la grande malléabilité de l'électrospinning et du PMMA.

#### **a. Préparation de la solution**

Le PMMA peut être facilement dissout en utilisant différents solvants comme l'acétone et le diméthylacétamide (DMAC), le tétrahydrofurane (THF) ou encore le N, N-Diméthylformamide (DMF).

Des expériences préliminaires ont permis de déterminer la concentration adéquate pour permettre le filage dans les conditions adéquates du PMMA. En effet, des essais réalisés en collaboration à l'université libre de Berlin en début de thèse ont montré qu'avec une concentration en polymère inférieure à 7,5% massique, il était impossible de fabriquer des fibres mais plutôt des nano sphères en PMMA, phénomène dû à une viscosité trop faible de la solution. La viscosité étant un paramètre fondamental pour la fabrication de fibre par électrospinning.

Une solution composée de 61%*m* de DMAC et 31,5%*m* d'acétone en ajoutant 7,5%*m* de PMMA de masse molaire de 350 000 gr.mol<sup>-1</sup> a donc été préparée. La solution est disposée sous agitation magnétique jusqu'à atteindre la solubilisation complète du PMMA (solution blanchâtre). La solution est récupérée puis placée dans les seringues d'injection de l'électrospinning. Après optimisation des paramètres de filage et une durée d'expérimentation de plusieurs minutes, on récupère quelques grammes de matière fibreuse sur un substrat de papier sulfurisé. *Les paramètres pour la fabrication des fibres sont : DDP de 8 kV et un débit d'injection 1 mL.h<sup>-1</sup>, à une distance inter-électrodes de 17 cm (T°C : 24°C).*

#### **b. Analyse de la microstructure**

La Figure 3-3(a, b) présente respectivement une image optique et une image en microscopie électronique à balayage de l'échantillon obtenu. On discerne clairement une multitude de fibres entremêlées de façon multidirectionnelle formant un réseau tridimensionnel

désordonné de fibres. La Figure 3-3(b) illustre quelques phénomènes caractéristiques. En effet, la flèche verte présente la formation de fibres de PMMA normalement constituées, uniformes ne présentant pas de défauts apparents. Les marquages par les flèches blanches indiquent des malformations appelées perles (*beads en anglais*) qui sont caractéristiques d'une viscosité de la solution trop faible pour permettre la fabrication d'une fibre continue et uniforme.

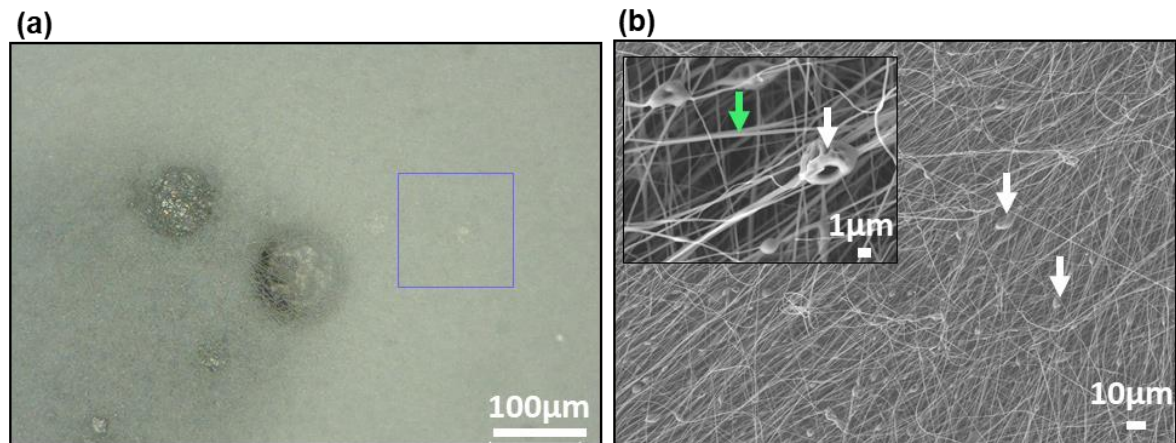


Figure 3-3 : (a) Image optique de l'échantillon PMMA7,5% après électrospinning, le carré représente la zone observée par microscopie électronique à balayage sur la Figure 3-3(b) ; (b). Image en microscopie électronique à balayage à représentant la morphologie des fibres fabriquées l'encadrée représente un agrandissement des malformations (perles). Paramètres : DDP de 8 kV et un débit d'injection  $1 \text{ mL.h}^{-1}$ , à une distance inter-électrodes de 17 cm ( $T^{\circ}\text{C} : 24^{\circ}\text{C}$ ).

Les malformations des fibres se manifestent sous forme de perles et entravent à l'obtention d'un matériau uniforme. Cependant, ces perles ne sont pas forcément un problème. En effet, elles pourraient potentiellement intervenir dans le stockage de la molécule, jouant ainsi le rôle de réservoirs médicamenteux supplémentaires. Ces malformations ont été étudiées et sont précisément décrites dans la littérature<sup>244,274,279</sup>. Par ailleurs, il semblerait que la formation de ces perles soit liée au diamètre des fibres. En effet, plus le diamètre des fibres est petit et plus la distance entre deux perles est petite. La microstructure des fibres est donc liée à la viscosité de la solution, à la densité de charges ainsi que la tension de surface de la solution.

Par exemple, l'accroissement de la concentration en polymère favorise la formation de fibres uniformes, de même l'augmentation de la densité de charge permet de réduire le nombre de ces objets tout en maintenant un diamètre de fibre petit. Enfin, une faible tension de surface de la solution permet habituellement d'éviter la présence de perles<sup>279</sup>.

Cette première étape met en évidence la facilité de fabrication de fibres en PMMA. Cependant, l'uniformité des fibres reste assez aléatoire est influencée par les nombreux paramètres agissant sur la configuration des fibres en polymère. Dans les études suivantes, la viscosité (paramètre intrinsèquement lié à la concentration<sup>280</sup>) de la solution a été optimisée (10% massique de PMMA) pour améliorer l'uniformité des fibres.



## B. Composite PMMA/DWNT

Après avoir ajusté la concentration en polymère, l'étape suivante consiste à ajouter les DWNT à notre mélange. La fabrication de fibre nanocomposite aura pour conséquence d'améliorer les propriétés mécaniques mais également électriques de la fibre<sup>251</sup> fabriquée. Néanmoins il est nécessaire de vérifier si le filage de ce composite est réalisable.

### □ Préparation de la suspension PMMA/DWNT

La préparation de cette suspension comprend différentes étapes, dont l'une des plus importantes est la dispersion des NTC, ici en phase organique. La Figure 3-4 schématise les étapes de préparation des échantillons.

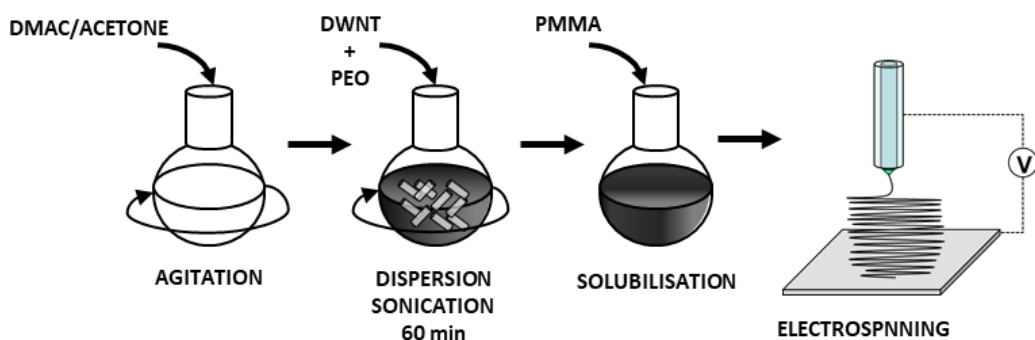


Figure 3-4 : Illustration du procédé de préparation établi pour la fabrication de fibres composites DWNT-PMMA

La préparation de la dispersion débute par l'insertion d'acétone (28% massique) et de DMAC (56% massique), auxquels on ajoute 1% massique de DWNT (bruts) par rapport au polymère (PMMA) ainsi que du Polyéthylène glycol à hauteur de 5% massique<sup>281</sup>. L'étape suivante consiste à disperser les DWNT par traitement à la sonde US pendant 30 min (1 sec on/1 sec off, ce qui revient à une heure au total - 30% puissance max,  $\Phi_{sonde} = 12$  mm). Pour terminer on ajoute le PMMA à hauteur de 10% massique sous agitation jusqu'à complète solubilisation. Une fois la solubilisation du PMMA terminée, la suspension est placée dans la seringue d'injection. Les paramètres pour la fabrication des fibres varient selon la composition ici on applique une DDP de 7 kV et un débit d'injection 1 ml/h, à une distance inter-électrodes de 13 cm ( $T^{\circ}C : 24^{\circ}C$ ).

Certaines publications démontrent que l'ajout d'objets tels que les DWNT a pour effet d'augmenter la viscosité de cisaillement du mélange et donc de diminuer l'élasticité du polymère<sup>251,275</sup>. Toutefois cette viscosité est déterminée pour des vitesses de cisaillement assez grandes, indiquant un comportement rhéofluidifiant (alignement des DWNT). Il semble peu probable que les DWNT en sortie de buse de l'électrospinning possèdent la même conformation rhéologique qu'à cet état « contraint ». Quoiqu'il en soit ces études semblent montrer que les valeurs de viscosité (haut cisaillement) mesurées augmentent avec l'ajout de NTC<sup>275</sup>.

## B.i. Analyses morphologiques des fibres PMMA/DWNT

### a. Analyses Macro/Microstructurale

#### □ Microscopie optique

L'observation du matériau par microscopie optique, montre sur la *Figure 3- 5(a, b)* des tâches noires qui s'apparentent à des agglomérats de DWNT. L'apparition de ces agglomérats semble également très ponctuelle au travers du matériau étudié comme précédemment observé avec les perles. Ces protubérances, à priori carbonées, peuvent provenir d'une mauvaise dispersion des DWNT lors de la préparation, ou encore d'une agglomération des DWNT lors de la procédure de filage. Néanmoins, ces agglomérats peuvent également être tout simplement du carbone désorganisé (provenant de l'étape de synthèse des NTC). Ces étranglements de par leurs formes provoquent un point de contrainte au niveau de la fibre pouvant éventuellement apporter une certaine fragilité au matériau mais également provoquer une perte de matière. Cette perte peut potentiellement entraîner des défauts d'interconnexions des NTC au travers des fibres composites et provoquer la perte de connectivité électrique par exemple.

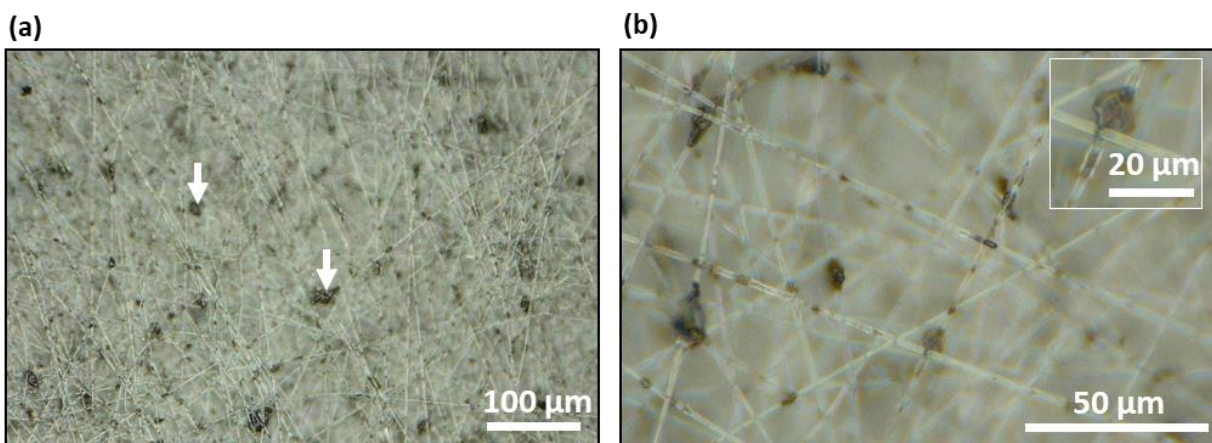


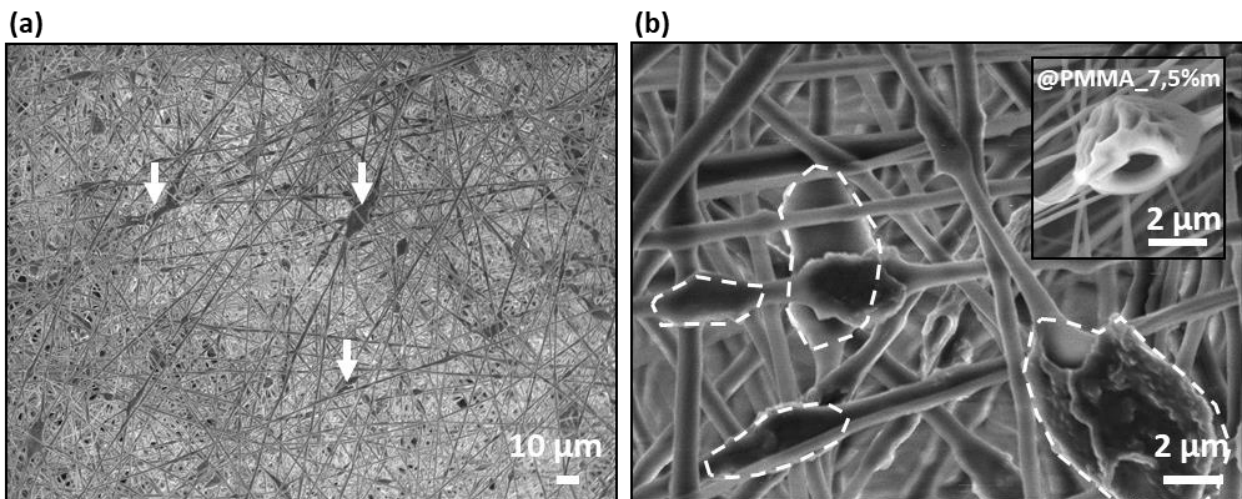
Figure 3-5 : (a) Microscopie optique de l'échantillon DWNT-PMMA (PMMA10% / DWNT 1%); (b) agrandissement de l'image (a) présentant plus précisément ces agglomérats carbonés le long des fibres.

Ces observations montrent la présence de nombreuses malformations au cœur des fibres qui, à priori, ressemblent à des perles mais n'en possèdent pas les mêmes caractéristiques. L'observation par des techniques plus précises permet de répondre à cette question de manière plus directe.

#### □ Microscopie électronique à balayage

La *Figure 3-6(a, b)* montre des agglomérats semblables morphologiquement à des perles précédemment observées (*Fig.3-3(b)-encadré Fig.3-6(b)*) mais qui n'en possèdent pas les caractéristiques. En effet, plusieurs études décrivent la formation de ces agglomérats engendrés par la présence des NTC enchevêtrés et noués, au cœur des fibres en PMMA<sup>275</sup>. Ce

phénomène a également été observé sur des fibres nanocomposite *Polyuréthane/SWNT*<sup>282</sup>. Les fibres fabriquées semblent plus rugueuses et plus denses que ce que l'on a précédemment observé pour l'échantillon *PMMA7,5%*m**. Par ailleurs, on remarque que le diamètre moyen des fibres semble avoir augmenté, augmentation qui semble être liée à la présence des *DWNT* au cœur de la fibre et de ces agglomérats de matière carbonée. L'encadré dans la *Figure 3-6(b)* ne montre pas de différence de morphologie significative entre les perles précédemment observées (encadré *Fig.3-6(b)* - *PMMA7.5%*m**) et les agglomérats engendrés par la présence des *DWNT* dans l'échantillon *DWNT-PMMA*.



*Figure 3-6 : (a) Image par MEB de l'échantillon DWNT-PMMA ; (b) agrandissement de l'image montrant la morphologie des fibres composites et précisant l'allure des agglomérats formés de l'échantillon DWNT- PMMA l'encadrement montre une image présentant les perles de l'échantillon PMMA7.5%*m* (Fig.3-3(b)).*

*Comme précédemment évoqué dans le chapitre 1, la dispersion des NTC est une étape capitale et souvent difficile à optimiser selon le polymère et le procédé de fabrication utilisé. De façon à mieux comprendre l'influence de l'ajout des DWNT sur la morphologie des fibres, nous avons réalisé une étude statistique afin de mettre en évidence la variation de diamètre entre les fibres en PMMA et les fibres nanocomposites PMMA/DWNT.*

### *b. Etude de la distribution en diamètre des PMMA et PMMA/DWNT*

La *Figure 3-7* représente une étude statistique montrant l'influence des *DWNT* sur le diamètre des fibres. Il est clair que la présence des *DWNT* affecte significativement la forme et la distribution en diamètre des fibres. Pour l'échantillon *PMMA10%* (*Fig.3-7(a)*) la distribution est plutôt uniforme et centrée autour de 300 nm de diamètre. A l'inverse, la distribution en taille est beaucoup plus étendue pour le composite *DWNT-PMMA* (*Fig.3-7(b)*). En effet, on peut constater un diamètre des fibres compris entre 650 et 1750 nm centrée autour de 1000 nm de diamètre (*effet également reporté dans la littérature*<sup>275</sup>). Cette étude illustre donc bien

l'influence des DWNT sur la structure des fibres et plus précisément leurs tailles ( $p = 0,026 < 0,5$  statistiquement différent).

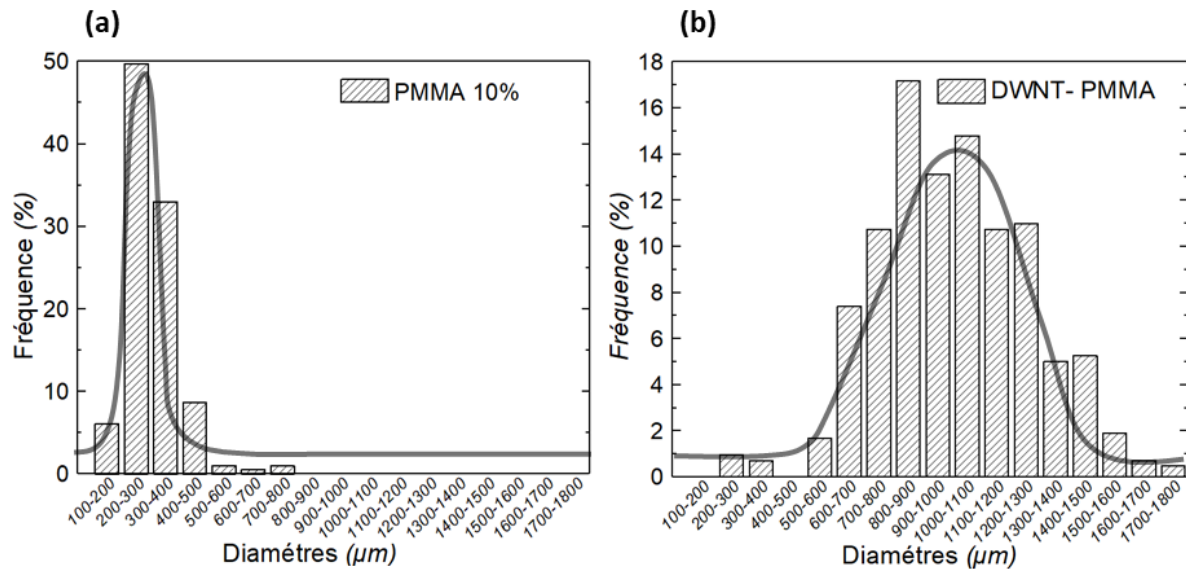


Figure 3-7 : (a) Distribution du diamètre des fibres de l'échantillon PMMA10% (b) Distribution du diamètre des fibres de l'échantillon DWNT-PMMA (1% massique de DWNT par rapport au PMMA). (Etudes réalisées sur respectivement 200 et 400 fibres) - Paramètres PMMA 10% : DDP de 8 kV / débit d'injection 1 mL.h<sup>-1</sup> / distance inter-électrodes de 17 cm / DWNT-PMMA : DDP de 7 kV / débit d'injection 1 mL.h<sup>-1</sup> / distance inter-électrodes de 13 cm (T°C : 24°C).

Cette étude démontre l'effet des DWNT sur la distribution en diamètre des fibres. Des analyses plus détaillées par microscopie électronique à transmission et à balayage pourraient apporter des informations concernant l'arrangement ou l'organisation des DWNT dans les fibres.

### c. Conformation des DWNT au cœur de la fibre

Les clichés MET sur la Figure 3-8(a, b) illustrent une zone de l'échantillon révélant a priori un faisceau de DWNT longeant la fibre. Ce faisceau sort et rentre à nouveau dans la fibre, démontrant l'interconnexion des DWNT, toutefois il est difficile d'affirmer que le faisceau soit présent tout au long de la fibre. Le grossissement effectué en Figure 3-8(b) montre très distinctement qu'il s'agit de NTC sous forme de faisceau. Néanmoins celui-ci semble se trouver à l'extérieur et non au cœur de la fibre. Les images MEB (Fig.3-8(c, d)) montrent deux fibres en composite DWNT-PMMA dans lesquelles on discerne trois faisceaux de DWNT interconnectés. L'encadré de la Figure 3-8(d) illustre une autre fibre où l'on observe également le même comportement. Les NTC semblent également émerger de la fibre en se positionnant a priori essentiellement sur les bords. Cependant certaines études<sup>251</sup> décrivent la fabrication de fibre nanocomposite en PMMA/MWNT démontrant l'interconnexion des MWNT au cœur de la fibre.

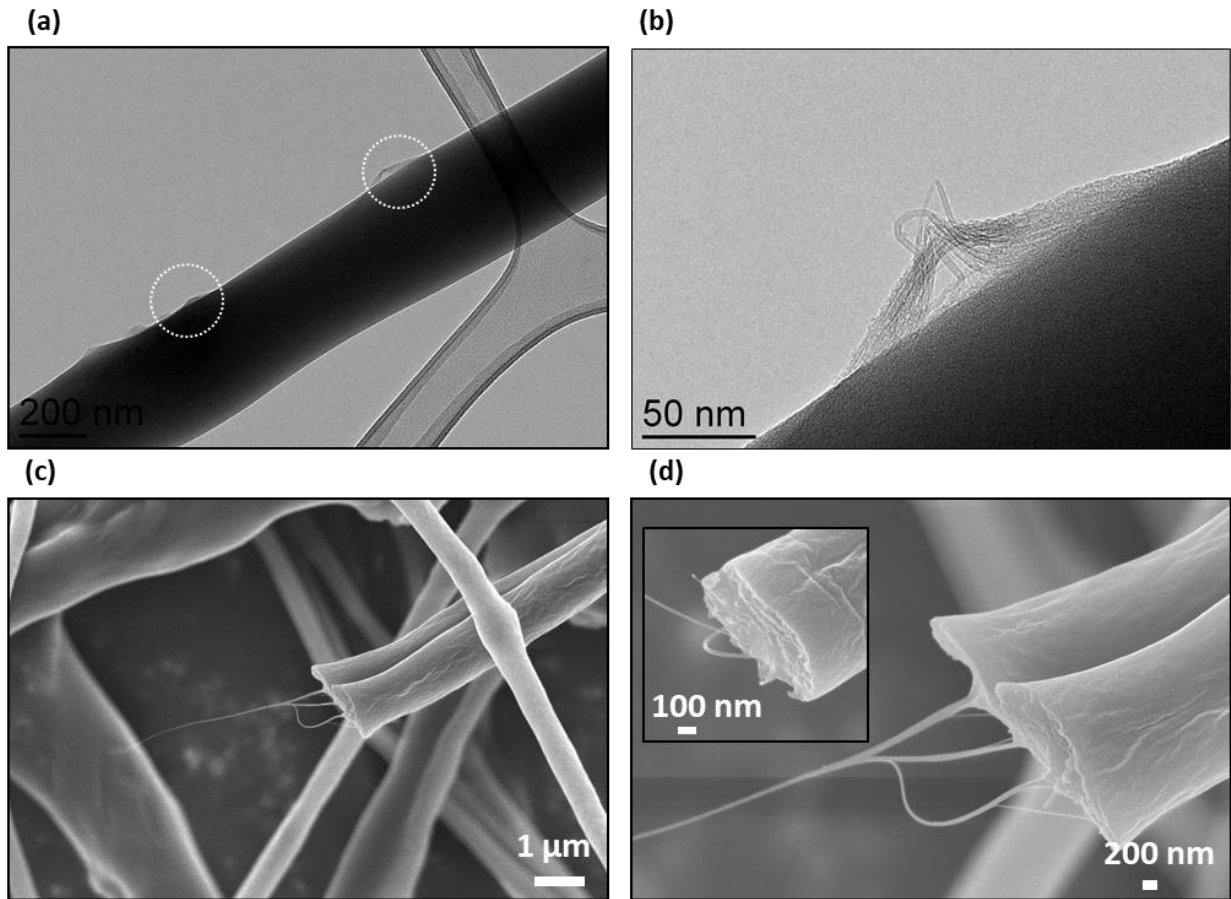


Figure 3-8 : (a) Image MET de l'échantillon DWNT-PMMA illustrant plusieurs objets en surface de la fibre (b) un grossissement d'une des zones observées en Fig.(a) présentant la structure de ces objets (faisceaux DWNT). (c, d) Image MEB (différents grossissement) du même échantillon (DWNT-PMMA) illustrant la présence de DWNT à l'apex de fibres fracturées.

Ces études préliminaires illustrent le potentiel et la faisabilité de fabriquer des fibres nanocomposites Polymère/DWNT par électrospinning.

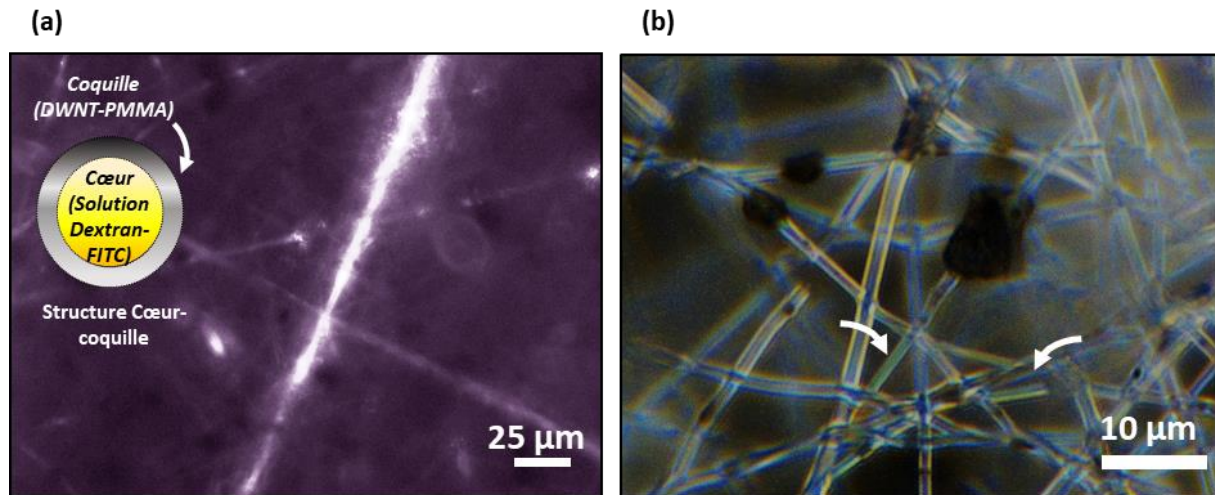
### C. Structure Cœur-coquille PMMA/DWNT

La suite de l'étude consiste à fabriquer une fibre en structure *cœur-coquille*, suivant la même procédure de dispersion des DWNT précédemment réalisée. La conformation coaxiale permet de former une goutte à l'apex de la buse contenant une solution aqueuse contenant du *Dextran-FITC* à 0,5 mM et une « solution » externe composée d'une dispersion de PMMA/DWNT (comme précédemment décrite) (paramètres: DDP = 7 kV / débit = 1 mL.h<sup>-1</sup> - débit 2= 0,1 mL.h<sup>-1</sup> / distance inter-électrodes de 13 cm (T°C : 24°C)).

#### a. Observation optique

Pour vérifier la présence du *Dextran-FITC*, le matériau ainsi fabriqué est observé en microscopie à fluorescence Figure 3-9(a). Il apparaît clairement une fluorescence, principalement localisée le long de certaines fibres. On remarque également de la

fluorescence sur les fibres sous-jacentes, moins intense, dû au point de focalisation de l'objectif du microscope. La *Figure 3-9(b)* présente une image en microscopie optique classique de ces mêmes fibres, où l'on peut discerner des fibres transparentes mais également certaines de couleur jaune fluorescente pouvant correspondre au *Dextran-FITC* (couleur du *FITC* dans le visible).



*Figure 3-9 : (a) Image en microscopie à fluorescence de l'échantillon DWNT-PMMA-Dextran-FITC(cœur-coquille) (b) Image en microscopie optique classique de l'échantillon DWNT-PMMA-Dextran-FITC mettant en évidence la présence de Dextran-FITC.*

*Au vu des agrégations observées au cours de l'expérience, le marqueur fluorescent se trouve probablement à la fois à la surface et à l'intérieur de la fibre. De plus les NTC pourraient éventuellement créer des chemins d'accès entre les surfaces interne et externe de la fibre.*

### ***b. Observation de la buse d'injection***

La *Figure 3-10* montre une image optique de l'agrégation localisée du polymère au niveau de la buse, due à l'interaction *DMAC/ACETONE/PMMA* avec la solution fluorescente dissoute dans l'eau (échantillon *PMMA@DWNT\_DEXTRAN-FITC*). En effet, le *PMMA* n'étant pas soluble dans l'eau et étant donné la miscibilité des solvants organiques dans l'eau, il se produit une agrégation du *PMMA* à l'apex de la buse. Ceci provoque irrémédiablement le bouchage de cette dernière et donc l'arrêt du filage, et ce quels que soient les paramètres expérimentaux. Cet effet d'agrégation survient quelques minutes après le début du filage, ce qui limite la fabrication à seulement quelques grammes de matériau. L'encadré dans la *Figure 3-10* présente une image où l'on peut observer la formation d'un cône de Taylor, indiquant la stabilité de fabrication de la fibre.

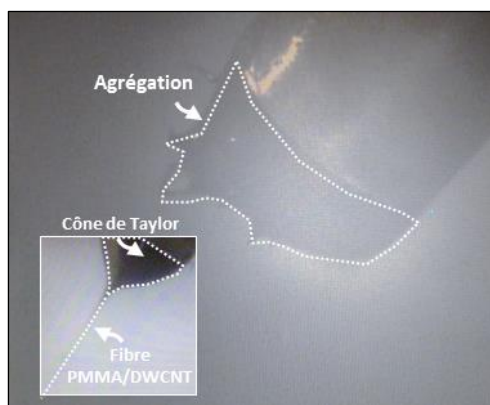


Figure 3-10 : Image illustrant le phénomène d'agrégation en structure cœur-coquille de l'échantillon DWNT- PMMACS-Dextran-FITC survenant quelques minutes après le commencement du filage. L'encadré présente une image illustrant la formation d'un cône de Taylor lors de la fabrication du composite DWNT-PMMA.

Ces résultats confirment l'insertion partielle d'une solution de Dextran-FITC au cœur des fibres. Toutefois, les problèmes rencontrés par rapport à la faisabilité, due à l'agrégation du polymère, entravent fortement la reproductibilité du procédé. De plus, il semblerait que la faible quantité de solution contenue dans les fibres soit potentiellement un frein au développement de l'application visée.

Pour permettre le relargage de la molécule, il serait nécessaire que le matériau soit poreux. L'ajout de cette contrainte augmente fortement la complexité du procédé de fabrication. Néanmoins cette structure semble réalisable en jouant sur différents paramètres comme la température d'évaporation des solvants<sup>283</sup>, le taux d'humidité<sup>255,274,284</sup> ou encore la conformation de l'électrospinning<sup>254</sup> et bien sûr la nature du polymère.

Les investigations ont été poursuivies sur la fabrication de fibres en PMMA, en utilisant des masses molaires, des solvants, ainsi que différentes configurations de la buse. Toutefois, ces études n'ont pas permis de déterminer un procédé stable et permettant la réalisation d'une telle structure notamment en structure cœur-coquille et ne sont pas décrits dans ce manuscrit.

## □ Conclusion

L'essentiel de cette partie concernant l'électrospinning était de mettre en avant les larges possibilités qu'offre cette technique pour la fabrication de nanocomposite Polymère/DWNT. Cependant, il apparaît difficile d'imaginer, au vu des difficultés rencontrées, la réalisation d'un dispositif combinant le PMMA et les DWNT. En effet, les problèmes liés aux solvants et notamment à leur miscibilité entraînent l'agrégation et donc l'arrêt du processus de filage dans le cas des structures cœur-coquille. De plus, un risque de dégradation de la molécule existe : le contact solvant organique / molécule active pourrait potentiellement modifier/dégrader celle-

*ci. La suite des études par électrospinning se limitera aux polymères biosourcés permettant l'utilisation de l'eau comme solvant. Ces polymères sont solubles dans l'eau et permettent d'en retenir une grande quantité. L'idée est de fabriquer un matériau fibreux et sec pour permettre, par la suite, de l'imprégner avec n'importe quelle solution aqueuse. La présence naturelle de pores lors de la fabrication du gel leur confère donc un plus par rapport aux polymères synthétiques comme le PMMA. Ces expériences ont été réalisées en utilisant différents polymères comme l'oxyde de Polyéthylène, l'alginate, l'agarose ou le chitosane. Ces expériences ont permis d'apporter d'autres idées et d'autres approches potentiellement viables pour la fabrication de ce type de matériaux, toutefois celles-ci ne seront pas décrites dans ce manuscrit de thèse.*

## **II. Hydrogels**

Les hydrogels, comme décrits dans le chapitre bibliographique, possèdent un large panel de propriétés et peuvent être préparés par de nombreuses méthodes de mise en forme qui permettent la fabrication de pores. Après avoir recensé différents polymères aux origines et aux propriétés différentes, l'agarose et l'alginate de sodium ont été retenus. Le cahier des charges imposant la biocompatibilité du matériau, les polysaccharides répondent très favorablement à cette contrainte. Toutefois, pour favoriser la dispersion des *NTC*, il est utile de vérifier comment les chaînes de polymères interagissent avec les *NTC* et affectent leur dispersion au sein d'un liquide. Des travaux préliminaires ont permis d'étudier la dispersion des *DWNT* par mesure de turbidité dans une solution contenant différents polymères.

### **A. Etude des dispersions *DWNT*/polymère**

#### **a. Suspension *DWNT*/polymère**

L'approche est donc de vérifier l'état de stabilité des *DWNT* soumis à un procédé comprenant une étape de dispersion puis de stabilisation par l'ajout de différents polymères. Le procédé de dispersion illustré en *Figure 3-11* se déroule en plusieurs étapes. Dans un premier temps, on dissout 50 mg de polymère (*Agarose, Alginate de sodium, Carboxyméthylcellulose (faisant office de témoin)*) dans 50 mL d'eau désionisée. Puis, on ajoute 50 mg de *DWNT* dans 50 mL d'eau désionisée à la solution de polymère (*0,1%*m* polymère et 0,1%*m* *DWNT**). Le tout est placé aux ultrasons pendant 60 min (*1 sec on/1 sec off - 30% puissance max,  $\Phi_{sonde}=12$  mm*). Pendant cette étape, les nanotubes sont dispersés dans la solution contenant le polymère. Une fois la suspension obtenue, on prélève quelques millilitres que l'on insère directement dans la cellule de mesure (*Turbiscan décrit en Chapitre 2*). Différents profils peuvent être observés selon l'interaction entre les différentes parties, comme la sédimentation, le crémage, ou encore la floculation. Dans le cadre de ces travaux de thèses, uniquement les 60



premières minutes seront présentées et commentées. En effet, lors de la fabrication des matériaux les solutions préparées ne resteront pas plus de 5 min sans agitation.

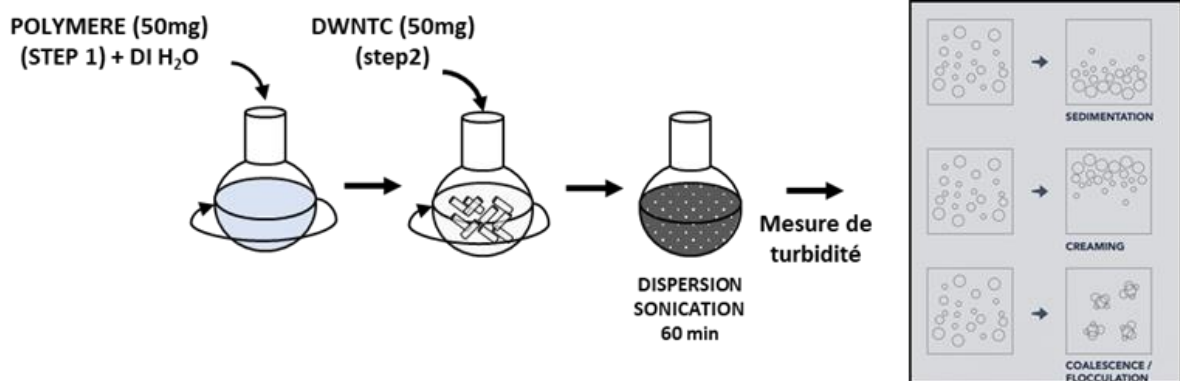


Figure 3-11 : Illustration représentant les étapes de préparation à la dispersion DWNT/Polymères.

Cette technique de dispersion suivie d'une étude de la stabilité permet de rapidement déterminer l'interaction entre les DWNT et le polymère utilisé.

### b. Turbidité des suspensions DWNT/polymères

Pour tester la stabilité, nous avons réalisé des mesures en transmission sur les différentes suspension *polymère/DWNT*. La Figure 3-12 décrit la transmission en fonction de la hauteur du pilulier, à différents intervalles de temps, des différents systèmes étudiés, à savoir l'Agarose-DWNT (DWNT-AG), l'Alginate de sodium-DWNT (DWNT-ALG), ainsi que la Carboxyméthylcellulose-DWNT (DWNT-CMC). On peut clairement identifier, pour les différents échantillons, différents temps/propriétés de déstabilisation. Ainsi, le signal de transmission de l'échantillon DWNT-AG (Fig.3-12(a)) augmente significativement au-delà de 30 min, passant de 8% à une oscillation avoisinant les 30-35% de transmission. L'image de l'échantillon DWNT-AG (Fig.3-12(d)) met en évidence des agglomérats sous forme de « pelotes » très filandreuses. Par ailleurs, entre 0 et 15 min (Fig.3-12(a')), il semble ne pas y avoir de changement très significatif, ce qui indique une stabilité temporaire du système.

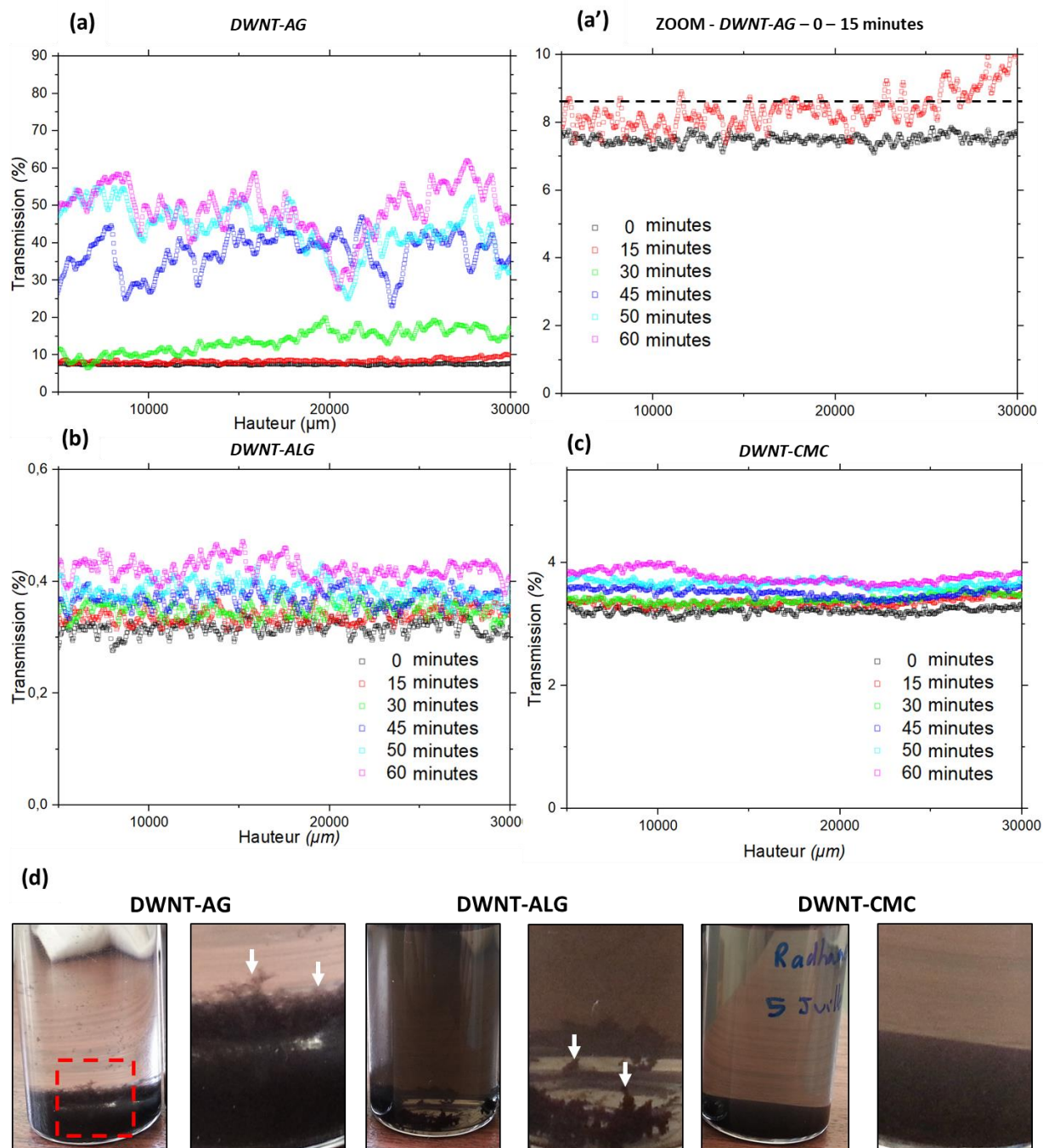


Figure 3-12 : (a) Figure représentant la transmission du signal de l'échantillon en fonction de la hauteur dans la cellule de mesure (gamme 0,5cm à 30 cm) à intervalle de temps différents ; (a') Zoom de (a) entre 0 et 15 min ; (b) Echantillon DWNT-ALG ; (c) Echantillon DWNT-CMC ; (d) Image illustrant l'état de sédimentation (à l'équilibre  $t > 24$  h) des différents échantillons DWNT-AG, DWNT-ALG, DWNT-CMC. (0  $\mu\text{m}$  est le bas de la cellule et 30000  $\mu\text{m}$  le haut)

Si on compare les valeurs de transmission pour les différents échantillons, on note que pour les échantillons DWNT-ALG et DWNT-CMC respectivement, la variation du signal est bien moindre que celle de l'échantillon DWNT-AG et ce, même à 60 min (*inférieure à 4% de transmission*). Ces résultats traduisent une bonne stabilité pour les échantillons DWNT-ALG et DWNT-CMC. En effet, dans le cas de l'échantillon DWNT-ALG, on peut observer une

transmission très faible, inférieure à 0,4%. Néanmoins, si on compare *DWNT-ALG* et *DWNT- CMC* (Fig.3-12(d)), il est clair que ceux-ci montrent des comportements différents en termes de stabilité de la suspension. En effet, pour l'échantillon *DWNT-ALG*, les agglomérats formés dans le fond du pilulier sont distinctivement séparés, ressemblant aux agglomérats formés par l'échantillon *DWNT-AG* en moins « filandreux ». De plus, on peut remarquer que la suspension est encore trouble, ce qui traduit la présence de *NTC* encore en suspension. La Figure 3- 12(d) correspondant à l'échantillon *DWNT-CMC* montre clairement un sédiment uniforme au fond du pilulier ainsi qu'un léger voile noir indiquant la présence de *DWNT* en suspension. La stabilité de la suspensions *DWNT-ALG* > *DWNT-CMC*>*DWNT-AG*. Toutefois cette stabilité ne veut pas uniquement dire que les *DWNT* sont correctement dispersé, elle met simplement en évidence un état de dispersion stable.

*Ces mesures pourraient être plus approfondies en effectuant par exemple des mesures de potentiel ZETA, afin de mieux comprendre les phénomènes mis en jeu. De plus, des observations en microscopie électronique à transmission permettraient de préciser la morphologie de ces agrégats. Cependant, ces mesures complémentaires ne sont pas forcément nécessaires pour poursuivre le développement de notre procédé de fabrication d'hydrogel. Ces études montrent que les interactions DWNT/Polymère sont principalement gouvernées par l'affinité polymère/DWNT, et ce même si les concentrations en Polymère/DWNT utilisées pour cette étude sont loin des conditions expérimentales d'une situation réelle. Concernant la faisabilité, il se trouve que chacun de ces polymères possède des avantages et des inconvénients.*

*La fabrication d'hydrogel à base de CMC se fait généralement par réticulation chimique à l'aide de complexes comme d'épichlorohydrine<sup>285</sup>, de glutaraldéhyde<sup>286</sup>, ou la génipine<sup>287</sup>. L'utilisation de ces différents réticulants coûteux et pour certains toxiques<sup>288-290</sup> nécessiterait de laver les hydrogels plusieurs fois à l'eau désionisée afin de purifier le réseau de toute trace de ces molécules. Pour ces différentes raisons, la CMC (malgré une bonne stabilité) ne semble pas un candidat adapté d'un point de vue des risques cytotoxiques ainsi que de la spécificité des réticulants utilisés. Toutefois, des recherches complémentaires sur le sujet permettraient éventuellement d'identifier un autre type de réticulation potentiellement plus appropriée.*

*L'étude de l'alginate au cours de ces travaux de thèse a permis de comprendre la difficulté de mise en forme et les limites de stabilité (pH) de ce matériau. En effet, la réticulation de ce biopolymère est principalement effectuée par des sels (cations) de différentes origines (cinétique de gélification gouvernée par la diffusion des ions), ce qui induit une cinétique de gélification pouvant être lente selon la concentration en polymère. De plus l'alginate de sodium réticulé par l'ion calcium se déstructure à pH basique (pH >7)<sup>120</sup>, ce qui limite donc son utilisation à une gamme de pH définie. Par ailleurs, il est également concevable que l'application d'un stimulus électrique puisse entraîner potentiellement la rupture des liaisons dans le réseau provoquant le relargage des réticulants. L'ion calcium est de surcroît toxique pour les cellules, en effet son effet cytotoxique a plusieurs fois été rapporté<sup>291-293</sup>.*

En ce qui concerne l'agarose, celle-ci présente une stabilité en solution moindre que l'alginate de sodium ou la CMC. Cependant son principe de gélification lui confère une certaine souplesse d'un point de vue mise en forme. En effet, le fait qu'il s'agisse d'un gel physique permet de s'affranchir de l'addition de molécule chimique à caractère potentiellement toxique. C'est pour ces raisons que les études présentées dans la suite de ce manuscrit seront développées avec l'agarose.

## B. Préparation des nanocomposites agarose/DWNT

Le mélange agarose/ DWNT requiert différentes étapes fondamentales pour obtenir un matériau homogène. La Figure 3-13 représente le protocole développé afin de réaliser des nanocomposites hydrogels dans l'objectif de les mettre en forme par différentes méthodes de séchage.

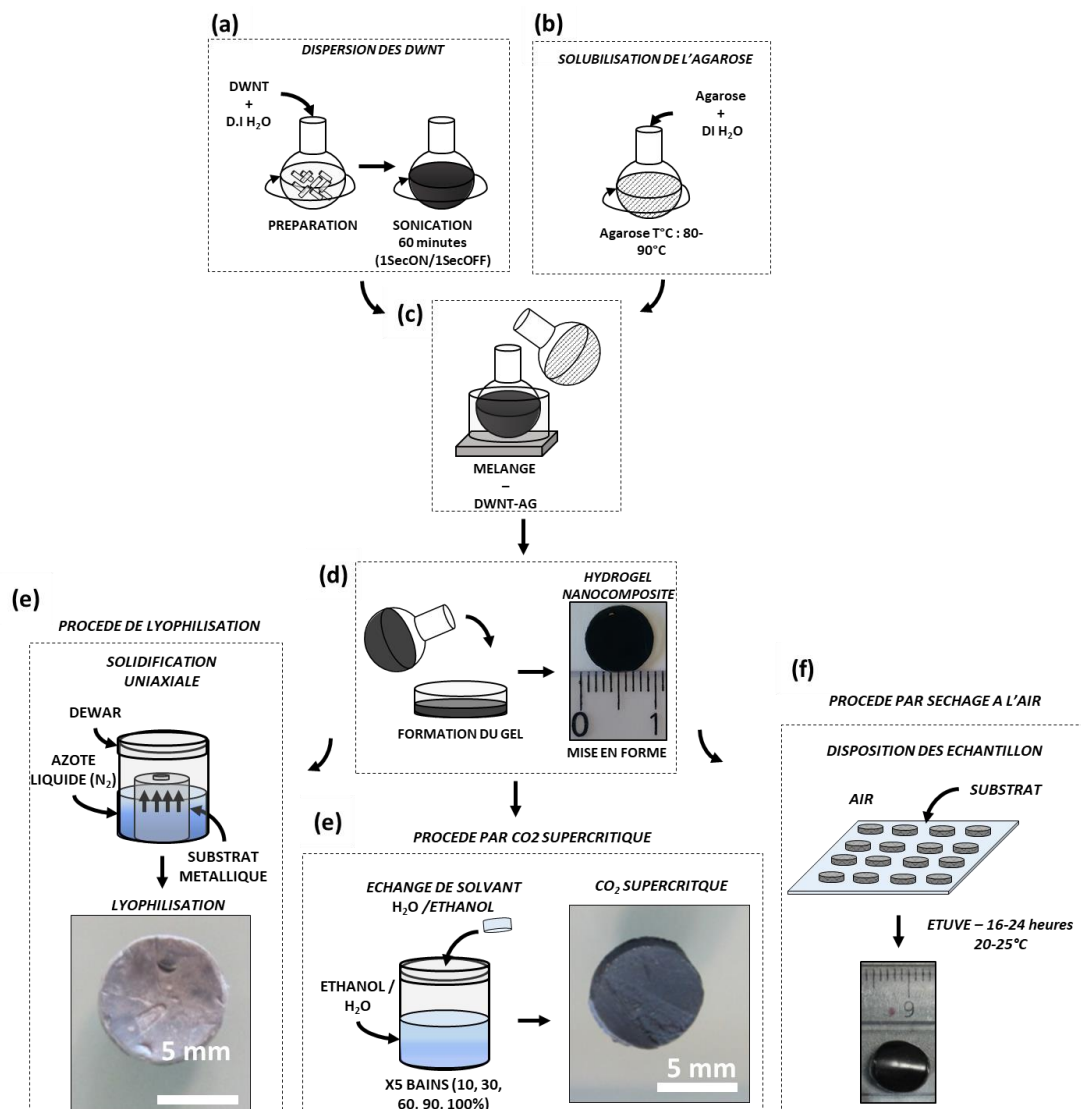


Figure 3-13 : Procédés de fabrication d'un hydrogel nanocomposite Agarose/DWNT et les différentes étapes de séchage possible. (a) Dispersion des DWNT ; (b) Solubilisation de l'agarose ; (c) mélange des DWNT et de l'agarose à une température de 85-90°C ; (d) Mise en forme du matériau en boîte de pétri ; (e) Procédé de séchage par lyophilisation ; (f) Procédé de séchage par CO<sub>2</sub> supercritique ; (g) Procédé de séchage à l'air

Dans un premier temps, les *DWNT* sont dispersés à hauteur de 1% massique par rapport à la masse en polymère (*seuil auquel la percolation est atteinte d'après les travaux antérieurs du CIRIMAT dans le cas des nanocomposites époxy*<sup>58</sup>). Un traitement à la sonde ultra-sonique est effectué pendant 1 heure (*1 sec on/1 sec off - 30% puissance max,  $\Phi_{sonde}=12$  mm*) dans 50 mL d'eau désionisée (*Fig.3-13(a)*). En parallèle, on dissout 2,5 g d'agarose dans 50 mL d'eau désionisée sous agitation magnétique (*500 RPM*) à 90°C jusqu'à complète solubilisation du polymère(*Fig.3-13(b)*). Une fois ces deux étapes terminées, on mélange rapidement les *DWNT* à la solution de polymère à 90°C sous agitation magnétique jusqu'à obtenir un mélange homogène (*5 min*) (*Fig.3-13(c)*). Puis on procède à la gélification en disposant le mélange dans une boîte de pétri (*T°C ambiante*). La gélification est atteinte après quelques minutes, on obtient alors un réseau tridimensionnel polymère/*DWNT* contenant majoritairement de l'eau. Le gel est ensuite découpé à l'emporte-pièce de 10 mm de diamètre et environ 2 mm d'épaisseur(*Fig.3-13(d)*). Pour la fabrication de l'échantillon témoin, le procédé reste le même hormis l'addition des *DWNT*.

Le séchage représente une étape fondamentale de la mise en forme du matériau. Les 3 méthodes que nous avons testées sont la lyophilisation, le  $CO_2$  supercritique et le séchage à l'air.

### ***B.i. Séchage par lyophilisation***

Une fois l'hydrogel obtenu et la mise en forme réalisée à l'emporte-pièce, les matériaux fabriqués sont ensuite séchés par lyophilisation. La préparation de l'échantillon par lyophilisation nécessite de développer un protocole afin de permettre une solidification uni-axiale par congélation à l'azote liquide ( $N_2$ , -193°C). Des expériences réalisées précédemment ont montré que la solidification par congélation ( $\approx -5$ , -10°C) laisse l'opportunité aux cristaux de glace de croître et donc de favoriser lors de la lyophilisation l'apparition de pores plus larges<sup>294</sup>. C'est la raison pour laquelle nous effectuons une congélation très rapide de nos échantillons à l'azote liquide, cette méthode permet d'obtenir de la glace dite amorphe et empêche la croissance de cristaux.

D'autre part, la solidification uni-axiale (échantillon disposé sur un substrat métallique baignant dans l'azote liquide (*Fig.3-13(e)*)) permet de contrôler la direction de solidification de l'eau. D'autres expériences préliminaires ont montré que lorsque l'on procède à la solidification multidirectionnelle (échantillon intégralement immergé), cela conduit à la formation d'un matériau fortement contraint engendrant sa déstructuration lors de la lyophilisation. Après lyophilisation, on récupère un matériau sec ayant perdu environ 97% de sa masse dû à la sublimation de l'eau. Dans cette partie nous étudions la morphologie des matériaux ainsi que leurs microstructures respectives à différentes concentrations, typiquement 15/25/50 g.L<sup>-1</sup> (*CTRL-AG*) et également avec 1% massique en *DWNT* (*DWNT-AG*). Le but d'étudier le séchage d'hydrogel d'agarose par lyophilisation est d'obtenir un matériau ayant une tenue mécanique adaptée à l'application d'un champ électrique ainsi qu'une capacité de stockage conséquente.

## B.ii. Etudes comportementales d'imprégnations agarose et agarose/DWNT

L'un des premiers aspects que nous avons entrepris d'étudier est la capacité de rétention des matériaux ainsi que leur comportement mécanique lorsque ceux-ci se retrouvent entièrement immergés dans une solution aqueuse. Le matériau que nous préparons devra en effet présenter un taux d'imprégnation maximum et un minimum de déformation.

Les mesures d'imprégnation (normalisées par la masse) du matériau nous permettent de déterminer le taux d'imprégnation en fonction du temps en gramme d'eau par gramme de matière sèche. L'échantillon est pesé à l'état initial, déshydraté, puis réimprégné. L'équation ci-dessous permet de mesurer l'imprégnation des échantillons à différents temps (0 et 24 h).

$$m(g.g^{-1}) = \frac{m_t - m_0}{m_0}$$

Avec  $m_t$ ,  $m_0$  représentant respectivement la masse de l'hydrogel au temps «  $t$  » et la masse de l'hydrogel déshydraté.

### □ Mesures d'imprégnation et observations optiques

Pour ce faire, nous avons réalisé plusieurs expériences en faisant varier la concentration en agarose de 15 ; 25 et 50  $g.L^{-1}$ , à 1% massique de NTC par rapport à l'agarose et déterminer le taux de gonflement en gramme d'eau par gramme de matière sèche en fonction du temps (Fig.3-14(a)). On peut ainsi observer, pour les trois concentrations étudiées, une augmentation significative de la masse en eau durant les 60 premières minutes, jusqu'à atteindre un palier indiquant la fin du phénomène d'imprégnation. On peut clairement observer une variation de masse d'eau imprégnée en fonction de la concentration en polymère. En effet, plus la concentration en polymère augmente, plus le taux d'imprégnation diminue. De plus il semblerait que pour la concentration en agarose la plus faible, et uniquement dans ce cas, la présence de nanotubes de carbone (DWNT) (Figure 3-14(a) (AG-CTRL@15  $g.L^{-1}$  et DWNT-AG@1% $m/15 g.L^{-1}$ )) permette a priori d'augmenter l'insertion de l'eau dans le matériau. La Figure 3-14(b) illustre le comportement d'imprégnation du matériau pendant les 4 premières minutes. On observe qu'approximativement 70% de la masse maximale d'imprégnation des échantillons est atteinte, ce qui traduit donc une insertion de la solution très rapide au travers des pores du matériau. La Figure 3-14(c, d) démontre clairement le changement de morphologie des différents échantillons avec et sans DWNT lors de l'imprégnation de l'eau. La concentration en polymère influence l'imprégnation mais également la structure macroscopique. On remarque que l'échantillon CTRL-AG @15  $g.L^{-1}$  est déformé à l'état hydraté (avec ou sans DWNT) mais paradoxalement permet une insertion significative de l'eau comparativement aux autres échantillons. On observe un comportement similaire pour l'échantillon CTRL-AG@50  $g.L^{-1}$  à la différence que son taux d'imprégnation est très inférieur. On remarque que l'échantillon CTRL-AG @25  $g.L^{-1}$  est moins déformé par comparaison aux échantillons CTRL-AG@15  $g.L^{-1}$  et CTRL-AG @50  $g.L^{-1}$ . Cet effet de

déformation dans le cas de l'échantillon CTRL-AG @50 g.L<sup>-1</sup> est probablement dû au fait que plus la concentration augmente et plus la taille des pores du réseau formé diminue. Il est également possible que lorsque l'eau s'insère dans le réseau (rempli d'air), les contraintes liées aux forces de capillarité provoquent la déformation du réseau en polymère.

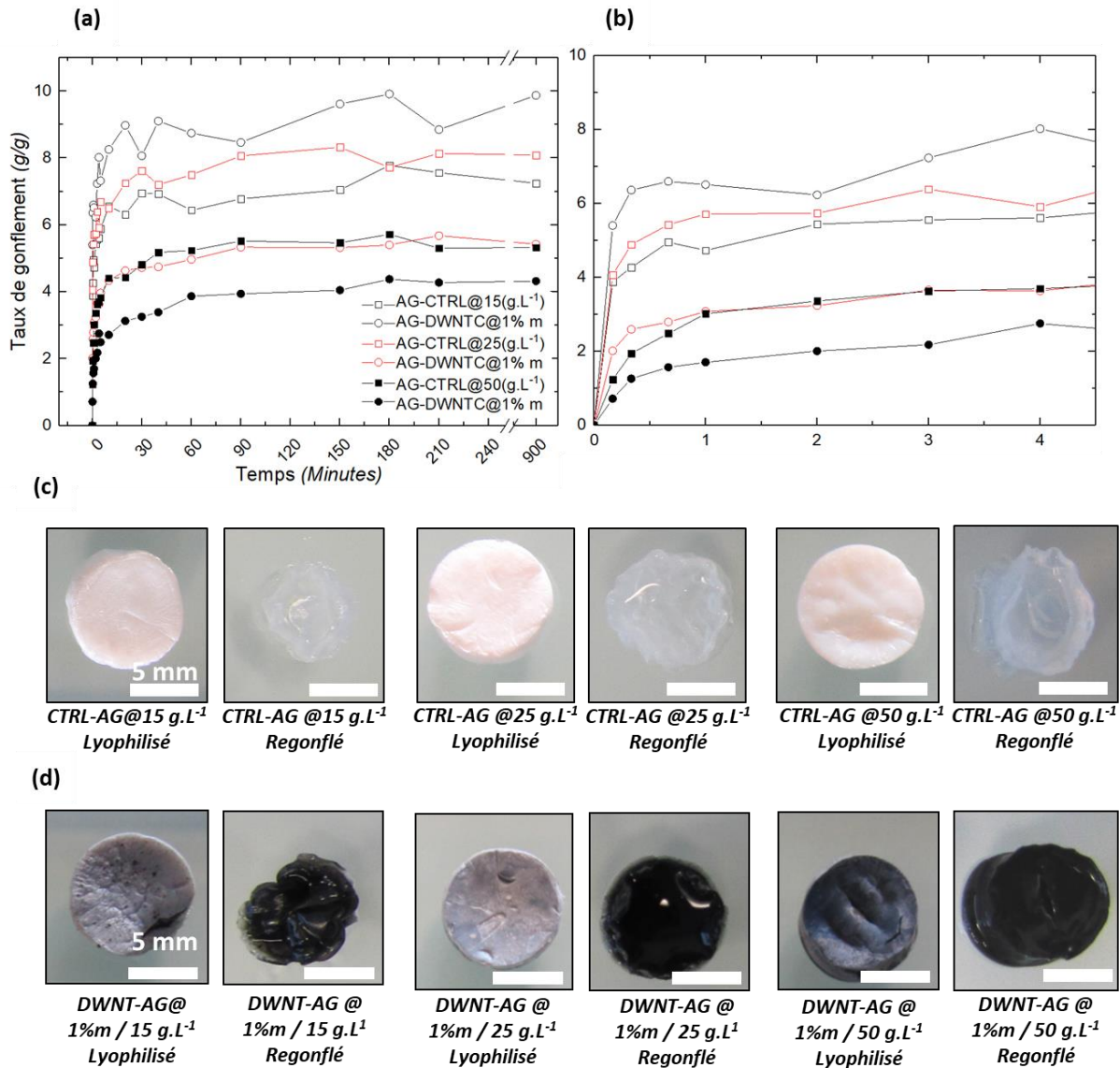


Figure 3-14 : (a) Taux de gonflement des échantillons avec et sans DWNT (1% massique par rapport à l'agarose) fabriqués à différentes concentrations en agarose (b) zoom dans la zone comprise entre 0 et 4 min des échantillons avec et sans DWNT. (c) échantillon CTRL-AG à différentes concentrations en agarose avant et après imprégnation (24 h) dans l'eau désionisée. (d) échantillon DWNT-AG1% m par rapport à l'agarose à différentes concentrations en agarose avant et après imprégnation (24 h) dans l'eau désionisée (barre d'échelle 5 mm).

En revanche (Fig.3-14(d)), pour certaines concentrations, l'addition de NTC dans le réseau semblerait améliorer la tenue mécanique du matériau si toutefois la concentration en polymère est adéquate. En effet on peut observer que l'échantillon DWNT-AG@1% m/15g.L<sup>-1</sup> a le même comportement morphologique que l'échantillon CTRL-AG @15g.L<sup>-1</sup> à savoir un effondrement du réseau sur lui-même. En revanche l'augmentation de concentration en polymère ce qui permet au matériau de mieux absorber les contraintes et ainsi moins se

déformer lors de l'imprégnation par l'eau (*CTRL-AG @25g.L<sup>-1</sup>* & *DWNT-AG@1%*m*/25g.L<sup>-1</sup>*). Toutefois, on peut remarquer qu'à l'état lyophilisé, l'échantillon *DWNT-AG@1%*m*/50g.L<sup>-1</sup>* est très contraint, en effet une fissure se forme au travers du matériau discernable à l'état sec également. D'un autre côté, aucune fissure n'est observée pour l'échantillon *CTRL-AG @50g.L<sup>-1</sup>*.

#### *a. Analyse microstructurale DWNT-AG@x g. L<sup>-1</sup>*

L'analyse structurale apporte de nombreuses informations quant à la structure interne de notre matériau. La *Figure 3-15* illustre la microstructure des différents échantillons préparés. On remarque que la densité apparente de nos matériaux est fonction de la concentration en polymère. L'image, à faible grandissement, de l'échantillon *DWNT-AG@1%*m*/50g.L<sup>-1</sup>* montre une topographie de surface plutôt lisse comparativement aux échantillons *DWNT-AG@1%*m*/15g.L<sup>-1</sup>* et *DWNT-AG@1%*m*/25g.L<sup>-1</sup>* qui semblent beaucoup plus aérés. De plus, la microstructure de l'échantillon *DWNT-AG@1%*m*/50g.L<sup>-1</sup>* est quant à elle beaucoup plus fine que celle des échantillons *DWNT-AG @1%*m*/15g.L<sup>-1</sup>* et *DWNT-AG @1%*m*/25g.L<sup>-1</sup>*. On observe la présence de cratères (présenté en pointillés) au milieu de la structure de tous les échantillons présentés (*Fig.3-15(a, b, c X50-X200)*). Ces cratères proviennent de l'étape de préparation et de gélification de l'agarose et sont semblables à des bulles d'air. En effet, lors du mélange Agarose/*DWNT* et de l'homogénéisation de la solution, la température de la solution est alors d'environ 90°C, température proche du point d'ébullition de l'eau. Cette température provoque l'apparition de bulles disparaissant au fil du temps et de l'agitation. Cependant, lorsque la solution est coulée en boîte de pétri (*Fig.3-13(d)*), quelques bulles d'air restent encore piégées au cœur du réseau lors de la gélification. L'étape de lyophilisation permet de sublimer l'eau, et laisse donc place à une région vide au cœur du matériau. Il est remarquable que l'échantillon *DWNT-AG@1%*m*/50g.L<sup>-1</sup>* piège des bulles de diamètre supérieur à ceux des deux autres échantillons, phénomène dû principalement à la viscosité très élevée de la solution, ne permettant pas aux bulles de s'échapper du liquide. Les structures microscopiques des échantillons *DWNT-AG@1%*m*/15g.L<sup>-1</sup>* et *DWNT-AG@1%*m*/25g.L<sup>-1</sup>* sont très semblables mais ne présentent toutefois pas les mêmes caractéristiques d'imprégnations, du point de vue de la capacité de remplissage et du comportement mécanique.



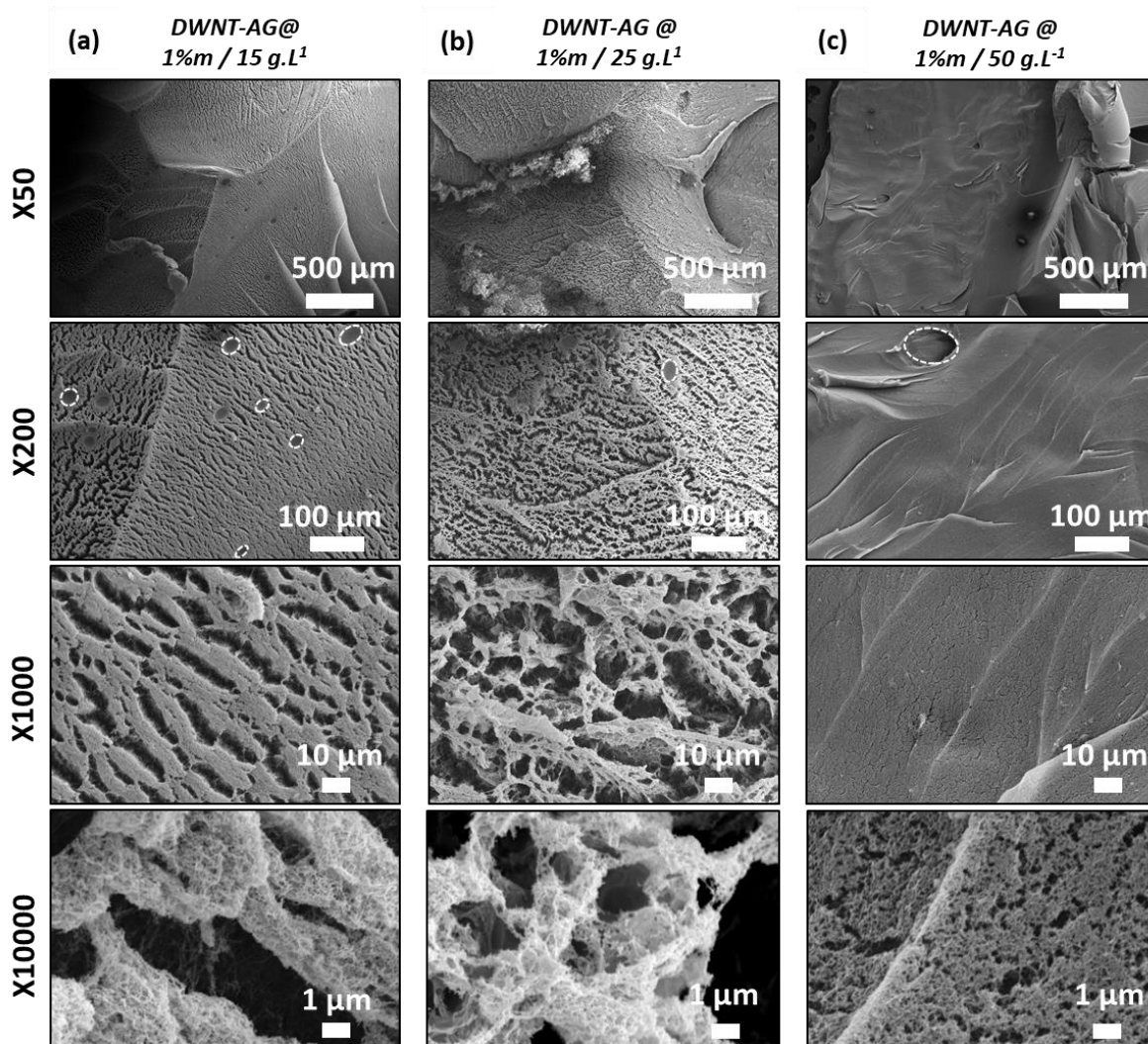


Figure 3-15 : (a) Images MEB de l'échantillon DWNT-AG@1%/15g.L<sup>-1</sup> ; (b) Images MEB de l'échantillon AG-DWDWNT@1%/25g.L<sup>-1</sup>; (c) Images MEB de l'échantillon AG-DWDWNT@1%/50g.L<sup>-1</sup>.

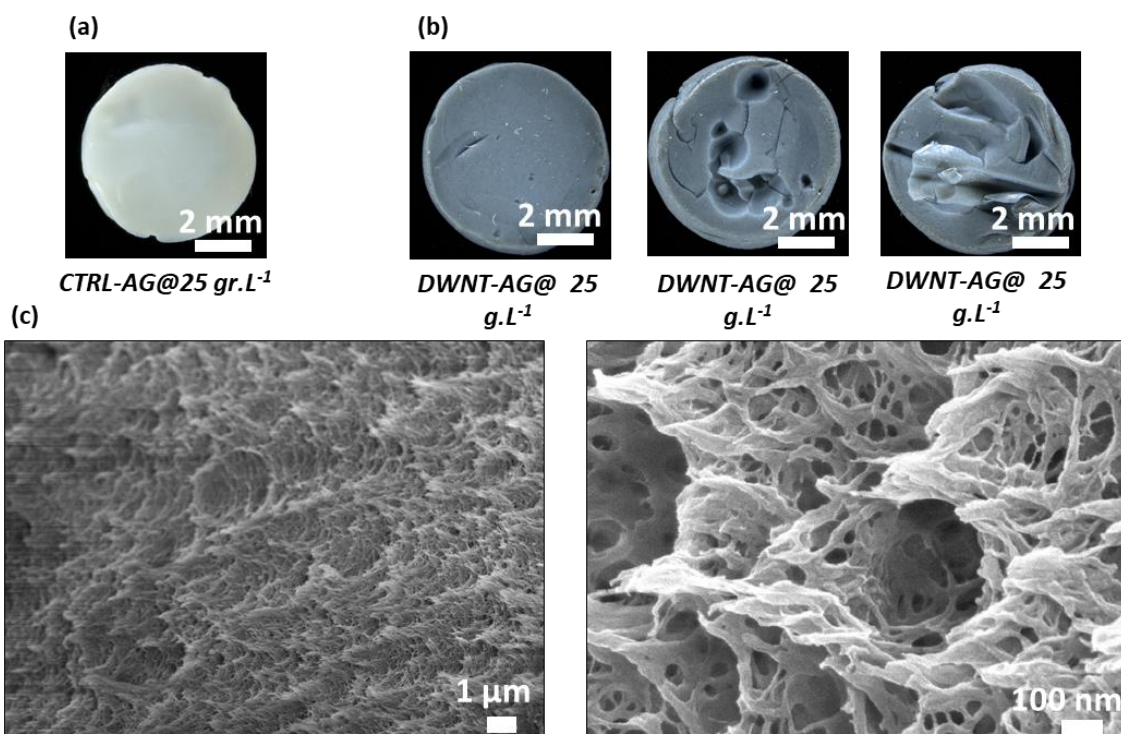
Le séchage par lyophilisation permet, avec la teneur massique en polymère, de préparer une large palette de matériaux. Cependant cette voie de séchage n'est probablement pas la plus intéressante pour un potentiel de développement industriel.

### B.iii. Séchage par CO<sub>2</sub> supercritique

Le CO<sub>2</sub> supercritique est une autre manière de sécher les hydrogels. Cette technique nécessite également des étapes de préparation bien définies qui requièrent un échange de solvants. En effet pour réaliser le séchage supercritique, nos échantillons sont insérés dans des bains à différentes concentrations en éthanol, jusqu'à obtenir un alcoogel. La structure finale obtenue est assez similaire à celle des échantillons séchés par lyophilisation, mis à part que l'échantillon a subi une variation géométrique assez importante (*diminution du diamètre de 10 mm à 6 mm*). Des analyses et des tests réalisés en amont ont permis de mettre en évidence la faisabilité de fabrication d'un matériau séché par voie supercritique. Dans ce cas nous avons travaillé à une concentration de 25 g.L<sup>-1</sup> en agarose.

La *Figure 3-16* illustre la morphologie des différents échantillons après séchage supercritique dont les conditions opératoires sont décrites au *chapitre 2*. L'observation optique de l'échantillon *CTRL-AG* (*Fig.3-16(a)*) montre une déformation prononcée dans toutes les directions de l'espace et ce pour la plupart des échantillons fabriqués. En revanche l'addition de *DWNT* conduit, pour la plupart des échantillons fabriqués, à une déformation géométrique dans toutes les directions de l'espace, mais également à des malformations déstructurant le matériau. Cette déstructuration peut apparaître lors de la dépressurisation de l'enceinte. En effet, la dépressurisation peut engendrer l'évacuation trop rapide du  $CO_2$  au cœur du matériau entraînant sa déformation. La *Figure 3-16(c)* illustre la microstructure de l'échantillon *AG- DWNT*, où l'on peut clairement observer des pores ainsi qu'une certaine stratification de l'échantillon probablement due à la déformation. De plus, le réseau polymère semble assez dense, les valeurs de surface spécifique de ces échantillons sont inférieures à  $10 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$  ce qui laisse supposer une porosité très faible.

Néanmoins il est possible que le procédé de séchage par voie supercritique ne soit à ce stade pas au point, concernant par exemple les temps de rinçage par le  $CO_2$  pouvant laisser à cœur de l'éthanol ou encore du temps dépressurisation engendrant des défauts au cœur du réseau.



*Figure 3-16 : (a) Image illustrant un échantillon d'agarose séché par voie supercritique. (b) Images de plusieurs échantillons DWNT-AG séché par voie supercritique. (c) imagerie en microscopie électronique à balayage des échantillons DWNT-AG séchés par voie supercritique a différents grossissements.*

*Cependant, des tests d'imprégnation (non présentés) ont permis d'observer un phénomène surprenant de « sur-imprégnation » engendrant la déstructuration du matériau. Ce phénomène assez remarquable provient du fait que le matériau imprègne au cœur de son réseau plus de solution qu'il peut en retenir, ce qui a pour conséquence l'obtention d'un matériau très contraint et fragile. Le séchage par  $CO_2$  supercritique est assez similaire au séchage par lyophilisation du point de vue de la microstructure, mais également du fait que*

*l'on obtient dans les deux cas un aérogel. De plus, tous deux comportent la même problématique à savoir des propriétés mécaniques qui lors de l'imprégnation ne semblent pas répondre aux exigences que nous nous sommes imposées pour la réalisation de ce matériau. Toutefois les phénomènes de gonflement sont très différents les uns les autres. C'est pour ces raisons que le séchage supercritique, malgré une étude de faisabilité réalisée, ne sera pas d'avantage développé dans le cadre de ces travaux.*

#### **B.iv. Séchage à l'air**

Le séchage est une étape fondamentale pour permettre le contrôle de la déformation géométrique du matériau, la procédure de séchage n'étant pas encore optimisée à ce stade des travaux. Après le séchage par lyophilisation au CO<sub>2</sub> supercritique, nous avons testé pour comparer un simple séchage à l'air dans différentes conditions.

Comme précédemment trois concentrations en polymère 15 ;25 et 50 g.L<sup>-1</sup> ont été étudiées. Ces expériences permettent d'évaluer la faisabilité du procédé de séchage ainsi que le comportement du matériau lors de cette étape pour les trois concentrations.

##### **a. Etudes du séchage et du regonflement**

###### **□ Observations optiques**

La Figure 3-17 illustre le comportement morphologique des échantillons CTRL-AG et DWNT-AG en fonction du séchage puis du regonflement. A l'état hydraté (*initial*) (Fig.3-17(a, b)) les échantillons ne présentent pas de différence malgré leurs concentrations respectives à savoir @15, 25 ou 50 g.L<sup>-1</sup> à 1%*m* en DWNT par rapport à l'agarose. En revanche, lorsque les échantillons sont séchés (Fig.3-17(a', b')), on peut constater que les CTRL-AG@25/50 g.L<sup>-1</sup> et DWNT-AG @25/50 g.L<sup>-1</sup> semblent subir une déformation assez uniforme tant sur l'épaisseur que sur le diamètre et maintenir plus fidèlement leurs formes circulaires d'origine.

Dans ce cas, les échantillons sont déposés sur une plaque d'acier inoxydable recouverte de parafilm et insérés dans une étuve sous vide à 200 mBar à une température de 50°C pendant 12 h. Les échantillons @15/25/50 g.L<sup>-1</sup> contiennent à l'état hydraté respectivement 98,5 ; 97,5 et 95% d'eau au cœur du réseau. L'échantillon @15 g.L<sup>-1</sup> avec et sans NTC montre clairement une influence du séchage (Fig.3-17(a', b')) sur la géométrie et l'apparition de contraintes déformant l'échantillon de façon assez conséquente, l'effet étant bien moins marqué sur les échantillons CTRL-AG@25/50 g.L<sup>-1</sup> et DWNT-AG@25/50 g.L<sup>-1</sup>.

Par ailleurs, lors de la réhydratation des échantillons (Fig.3-17(a'', b'')), on peut observer un comportement à mémoire de forme. En effet, les échantillons exposés à une solution tendent à reprendre leurs formes d'origines. Néanmoins, il semble impossible pour les hydrogels de retrouver intégralement leurs dimensions initiales ceci étant probablement dû à la présence majoritaires des chaînes d'agarobiose, constituée majoritairement de chaînes à caractère hydrophobe (CH<sub>2</sub>-O), empêchant l'eau d'accéder à tout le matériau (*faible en radicaux hydrophiles ; sulfate*)<sup>123,295</sup>. L'échantillon @15g.L<sup>-1</sup> avec ou sans NTC montre clairement une

déformation au séchage non uniforme et une conservation de cet état déformé après réhydratation. Il apparaît clairement que les échantillons plus concentrés en agarose répondent mieux à ce phénomène de déformation. En effet, les échantillons CTRL-AG@25/50 g.L<sup>-1</sup> montrent une récupération de la géométrie d'origine assez significative. Les échantillons contenant de DWNT semblent également avoir un comportement au séchage similaire aux échantillons sans DWNT.

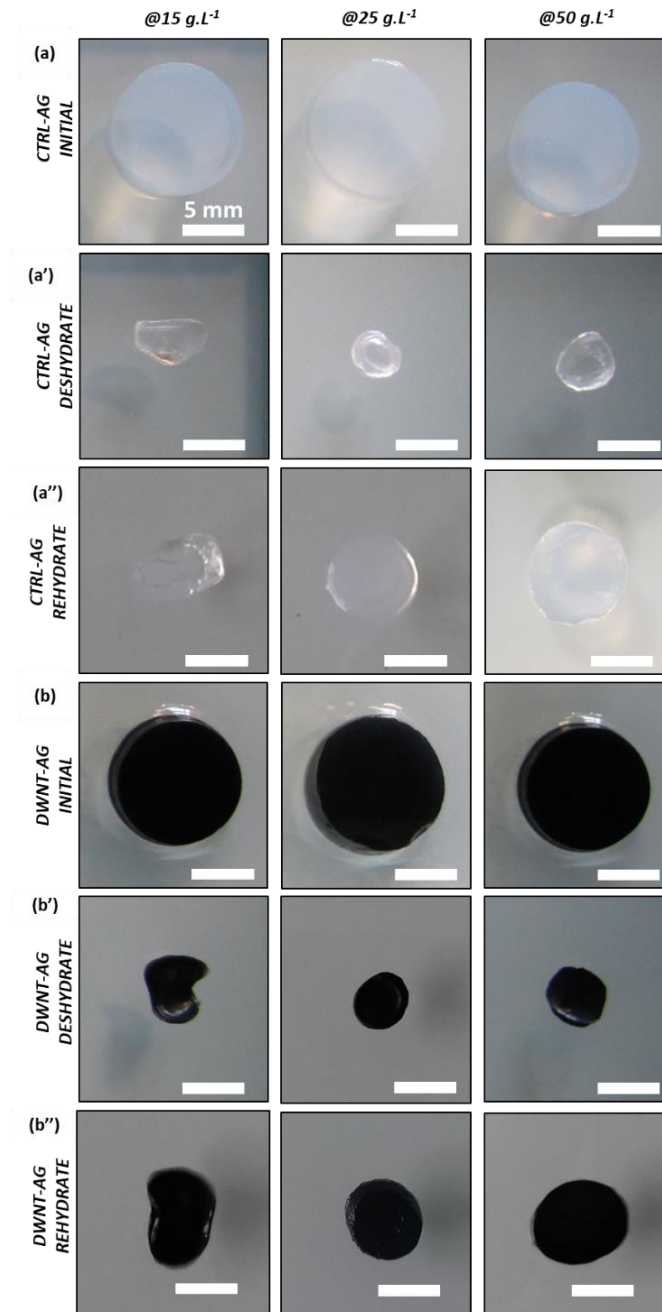


Figure 3-17 : Echantillon hydrogel seul et hydrogel nanocomposite a différentes concentrations a l'état initial, déshydraté et réhydraté ; (a) Echantillon CTRL-AG (15/25/50g.L<sup>-1</sup>) à l'état initial (a') Echantillon CTRL-AG (15/25/50gr.L<sup>-1</sup>) à l'état déshydraté (a'') Echantillon CTRL-AG (15/25/50g.L<sup>-1</sup>) à l'état regonflé (réhydraté). (b) Echantillon DWNT-AG (15/25/50gr.L<sup>-1</sup>) à l'état initial. (b') Echantillon DWNT-AG (15/25/50g.L<sup>-1</sup>) à l'état déshydraté(sec) (b'') Echantillon DWNT-AG (15/25/50g.L<sup>-1</sup>) à l'état regonflé (réhydraté). La teneur en DWNT est de 1% massique par rapport à l'agarose pour tous les essais réalisés (barre d'échelle = 5 mm).

D'un point de vue du procédé de fabrication du matériau, certains problèmes peuvent apparaître, notamment pour l'échantillon @50 g.L<sup>-1</sup>. D'une part, sa complète solubilisation est difficile à atteindre, à cause de la viscosité de la solution beaucoup plus importante que celle des échantillons @15 g.L<sup>-1</sup> et @25 g.L<sup>-1</sup>. Cette viscosité plus grande peut également provoquer des problèmes de dispersion des NTC lors du mélange agarose/NTC. De plus comme précédemment évoqué, plus la concentration d'agarose augmente et plus la taille des pores tend à diminuer<sup>296</sup>. Cet aspect pourrait poser problème lors du relargage de la molécule comme par exemple un relargage trop lent. A l'inverse, l'échantillon @15 g.L<sup>-1</sup> montre des difficultés à récupérer sa forme initiale avec ou sans NTC, celui-ci étant très peu concentré et donc moins dense que les autres.

### □ Mesure de gonflement

La Figure 3-18 représente le taux de gonflement en g d'H<sub>2</sub>O/g de matière sèche en fonction du temps. On observe pour les trois échantillons un comportement de regonflement similaire, se produisant principalement dans les 60 premières min après immersion des échantillons. Il semble ne pas y avoir de différence significative entre les différents cas, mis à part pour l'échantillon DWNT-AG@1% m 15 g.L<sup>-1</sup> regonfle moins que les autres. On peut remarquer que le gonflement atteint 78% de la masse finale en 300 min ce qui démontre une large différence au regard des échantillons lyophilisés qui eux atteignaient cette valeur en quatre minutes (Fig.3-14(a)). On peut donc conclure que, dans ces conditions expérimentales, la concentration ne joue pas de rôle significatif sur le taux de gonflement des échantillons.

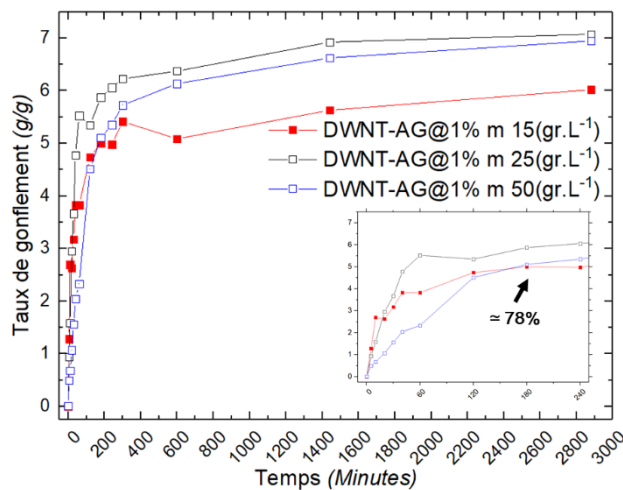


Figure 3-18 : (a) Graphique représentant le taux de gonflement en fonction du temps pour les échantillons DWNT-AG @15, 25, 50 gr. L<sup>-1</sup> à 1% massique en DWNT par rapport au polymère.

Les échantillons DWNT-AG @15 g.L<sup>-1</sup> et DWNT-AG @25 g.L<sup>-1</sup> sont les concentrations qui semblent les plus adaptés à une mise en forme correcte du matériau (l'échantillon DWNT-AG@50 g.L<sup>-1</sup> présente une viscosité trop élevée). En revanche, d'un point de vue de la structuration à l'état hydraté de l'échantillon @15 g.L<sup>-1</sup>, celui-ci ne convient pas aux exigences que nous nous sommes fixées.

Etant donné les déformations observées lors des tests, il était intéressant de développer une méthode de séchage permettant de contrôler la déformation des échantillons.

### b. Optimisation des conditions de séchage sous air

Nous avons développé une méthode permettant cette fois-ci de maintenir constante la déformation sur l'axe  $x$  et l'axe  $y$ , en d'autres termes de maintenir le diamètre du matériau constant. La *Figure 3-19* illustre le protocole de séchage qui a été développé pour réaliser l'étude. Dans un premier temps, on prélève des échantillons dont on mesure la masse et l'épaisseur ( $\pm 0,1\text{mm}$ ). On dispose ensuite ces échantillons (Agarose(CTRL-AG) et Agarose/DWNT (1% massique par rapport à l'agarose – noté DWNT-AG)) sur des substrats aux propriétés de surface différentes, puis on insère les échantillons à l'étuve à  $20^\circ\text{C}$  pendant 24 h à pression atmosphérique afin de procéder à un séchage lent.

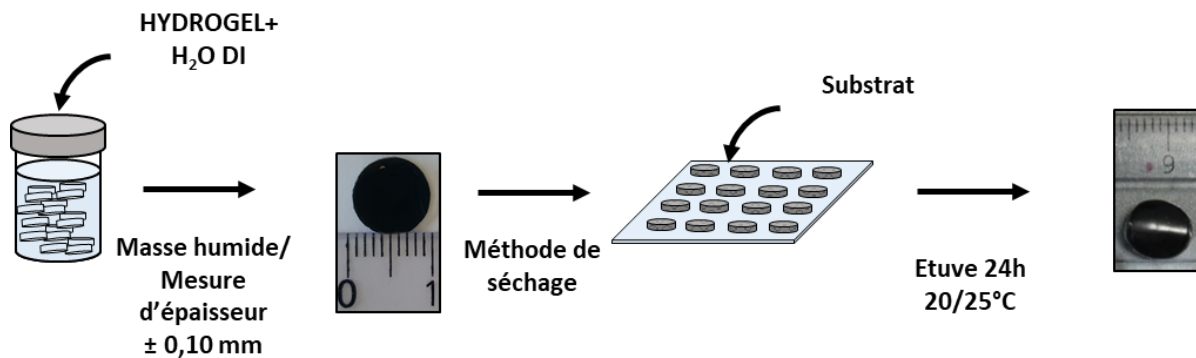


Figure 3-19 Procédure de séchage développée pour les échantillons CTRL-AG et DWNT-AG.

#### b.i. Paramètres morphologiques

Lors de la mise en forme du matériau par découpe à l'emporte-pièce (*Fig.3-13(d)*), on observe que l'hydrogel présente une géométrie non uniforme, plutôt tronconique (*Figure 3-20(a)*). En effet, la pression appliquée lors du poinçonnage n'étant pas uniforme, l'échantillon obtenu est non cylindrique et légèrement déformé. De plus, lorsque l'on effectue le séchage des échantillons, on s'aperçoit que la face du gel en contact avec le substrat est primordiale pour le contrôle de la déformation. Effectivement, comme l'illustre la *Figure 3-20(b)*, le maintien du diamètre est plus ou moins efficace selon la face exposée à l'air. Le séchage des échantillons présenté en *Figure 3-20(b)* a été réalisé sur une plaque en acier inoxydable (INOX309) selon les paramètres établis plus haut. Il semblerait que le comportement observé provienne de l'état de surface de nos échantillons. En effet, lors de la gélification la face en contact avec l'air (Face A) et la face en contact avec la boîte de pétri (Face B) présentent un comportement différent, donc une adhésion au substrat différente. La *Figure 3-20(b)* montre que la face A est déformée et présente un diamètre  $< 5\text{ mm}$ , d'un autre côté la face B est uniforme et non déformée et présente un diamètre  $> 5\text{ mm}$ . Il semble donc que l'adhésion

substrat/échantillon soit capitale pour permettre de contrôler le séchage, du moins pour maintenir le diamètre constant.

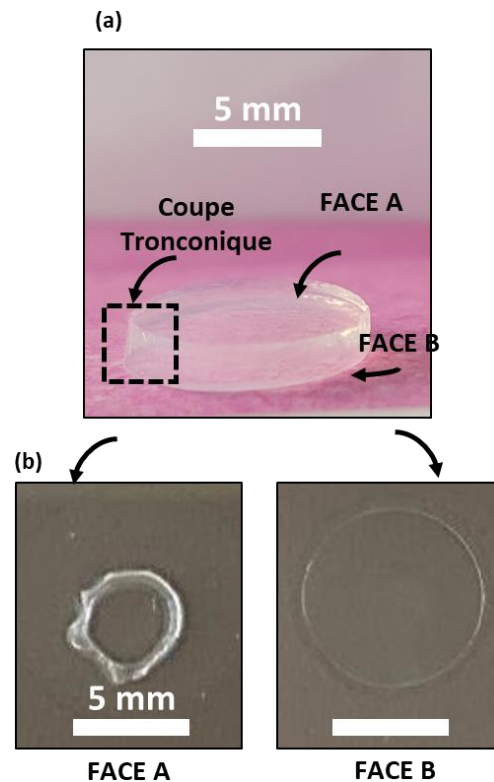


Figure 3-20 : (a) Photographie illustrant les différentes faces du gel, ainsi que la forme tronconique liée à la mise en forme à l'emporte-pièce des échantillons ; (b) Images illustrant l'importance de la face de l'échantillon en contact avec la plaque métallique lors du séchage.

### *b.ii. Choix du substrat de séchage*

La Figure 3-21(a) présente l'angle de mouillabilité en degrés° (angle) en fonction des différents substrats étudiés. La Figure 3-21(b) illustre le comportement morphologique au séchage des échantillons sur ces différents substrats. On peut remarquer que la déformation semble être dépendante de la mouillabilité. En effet, plus l'angle de contact entre la goutte et la surface augmente, plus l'interaction goutte/substrat est faible. Ceci traduit un comportement de déformation morphologique pour les échantillons. Toutefois, cette tendance n'est pas valable pour tous les échantillons et les substrats présentés. Par exemple, le cuivre, le verre ou encore le Polyéthylène ont un comportement différent. On peut remarquer que le substrat de séchage permettant de minimiser la déformation des échantillons est l'INOX309, présentant un angle de  $93^\circ$ , à la limite entre un comportement hydrophile et hydrophobe. Ce substrat INOX semble être le plus adéquat pour limiter la déformation des échantillons sans que ceux-ci n'adhèrent trop à la surface (ce qui rend leur récupération difficile, voire dans certain cas impossible ex. Polycarbonate (PC)).

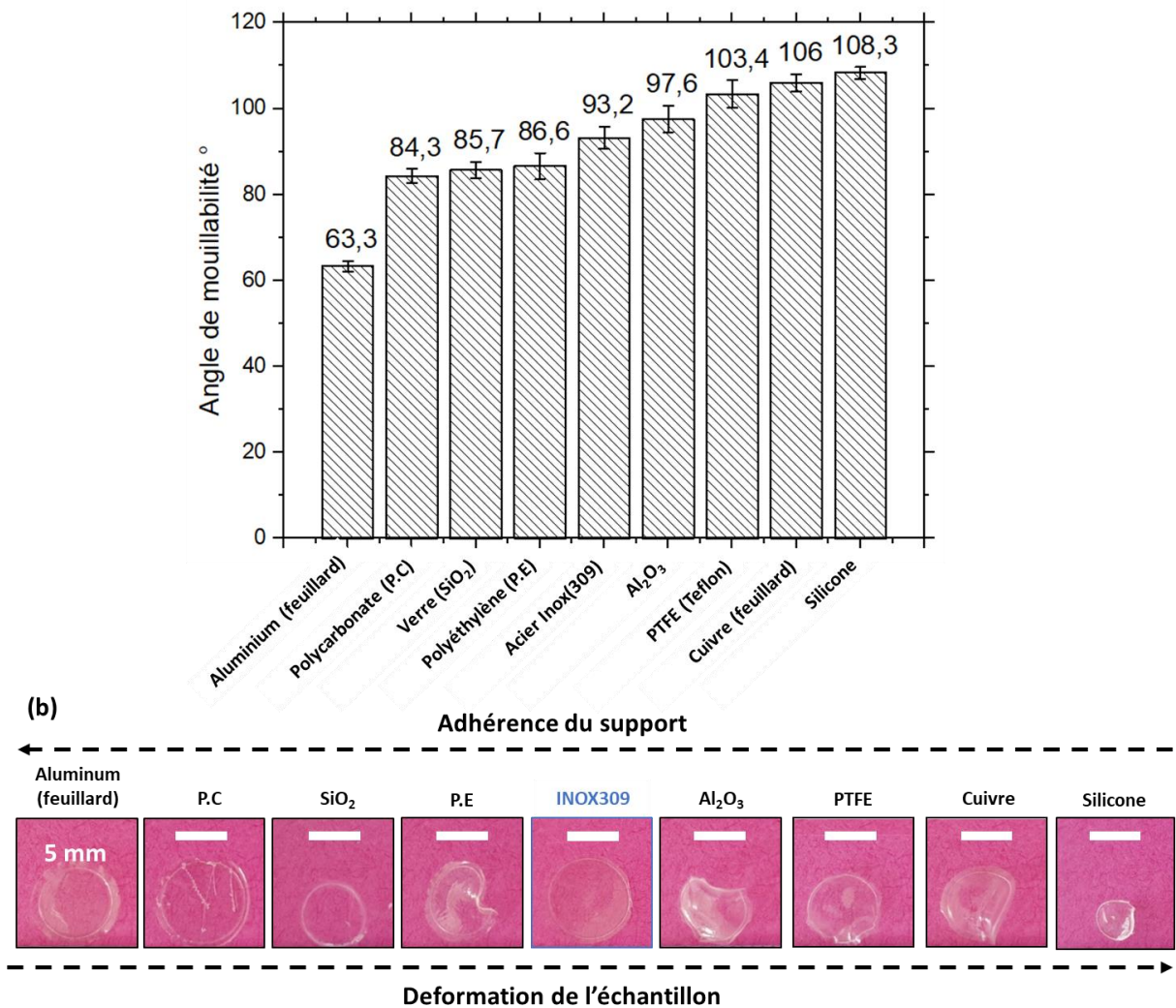


Figure 3-21 : (a) Mesure d'angle de mouillage en fonction de différents substrats (technique de la goutte) (b) Images illustrant le comportement des échantillons CTRL-AG au séchage sur ces différents substrats (barre d'échelle 5mm).

De larges différences sont notées pour l'angle de mouillage, en fonction du substrat utilisé. Toutefois, les mesures d'angle de contact sont à considérer avec précaution. En effet, l'hétérogénéité de surface, la température et la rugosité des solides sont sujet à grande variabilité. Ainsi pour permettre une mesure correcte, il est nécessaire d'avoir une surface lisse homogène, propre, isotrope et plane. Ces différentes variables peuvent éventuellement expliquer les variations de comportements pour certains substrats. Néanmoins la littérature reporte des valeurs d'angle de contact significativement proches concernant le PTFE(100°)<sup>297</sup>, P.C (84°)<sup>298</sup>, P.E(90°)<sup>299</sup>.

Pour permettre de mieux comprendre le phénomène et nous faire une idée de l'état de surface de ce substrat, l'analyse surfacique par interférométrie permet d'amener quelques informations supplémentaires. Un scan de 1750 μm X 1321 μm avec un point tous les 1,2μm a été réalisé et sera décrit plus loin.



### □ Effet de la température

La Figure 3-22 illustre l'importance du contrôle de la température sur le séchage. Effectivement, il semblerait qu'à température élevée, l'échantillon à 80°C (@80°C) sèche plus vite (30 min), mais possède un aspect final très déformé. On peut remarquer un diamètre extérieur et un diamètre intérieur montrant l'effet du poinçonnage à l'emporte-pièce. De plus l'adhésion au substrat est très forte. Décoller l'échantillon de la surface est très difficile et peut causer sa détérioration. Cet effet est très prononcé dans ce cas, en comparaison avec les échantillons à 20°C (@20°C) et à 30°C (@30°C) qui eux présentent une vitesse de séchage plus lente (8-16 h) et également cette bordure, cependant nettement moins visible.

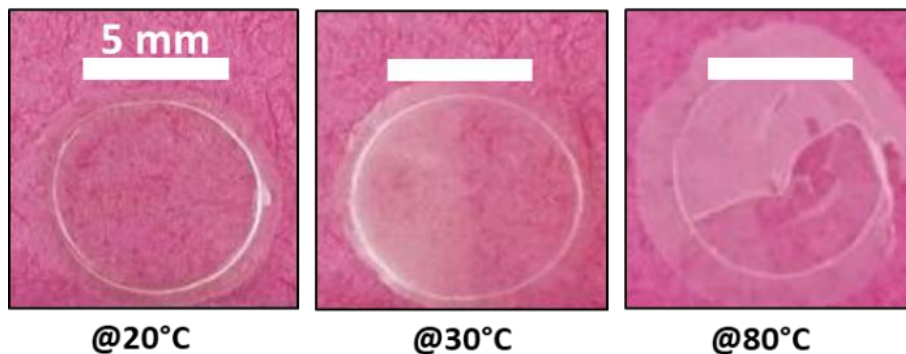


Figure 3-22 : Images des échantillons CTRL-AG séchés à l'étuve à différentes températures, respectivement 20/30/80°C (barre d'échelle 5 mm).

La température et l'atmosphère (pression) sont donc des paramètres essentiels pour le contrôle des propriétés morphologiques du matériau. On peut remarquer que l'échantillon @20°C présente un facies très uniforme limitant la déformation ainsi que la présence de la bordure extérieure. Les tests suivants consistent à démontrer la corrélation entre la déformation des échantillons et la nature du substrat de séchage ainsi que de son état de surface (mesure de l'angle de mouillage entre une goutte d'eau et la surface).

#### b.iii. Analyse de surface du substrat de séchage

Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un Interféromètre (lumière blanche Zygo) permettant d'évaluer l'état de surface et la rugosité d'un substrat. La Figure 3-23 montre deux zones choisies aléatoirement à la surface de deux plaques d'INOX309 présentant différents aspects de surface. La Figure 3-23(a) illustre la topographie de surface d'un INOX309 à l'aspect de surface « miroir » (INOXMIRROR). La Figure 3-23(b) illustre un INOX309 à l'aspect de surface striée. Les valeurs mesurées sont sensiblement similaires et montrent un Ra (Rugosité : moyenne des écarts à la moyenne) relativement petit, typiquement de l'ordre de  $\pm 0,08 \mu\text{m}$ . Par ailleurs, la valeur moyenne Rp définissant la profondeur (rugosité : écart du profile moyen et de la valeur maximale) moyenne de l'échantillon est pour l'échantillon INOXMIRROR de 0,1  $\mu\text{m}$  contre 0,35  $\mu\text{m}$  pour l'autre inox. Ces deux images présentent également une morphologie

de surface significativement analogue. En effet, on peut remarquer une certaine « orientation » des stries à la surface des substrats, alternant entre des zones dites « profondes » et des zones « hautes ». Les écarts étant faibles, ces surfaces peuvent être considérées comme relativement planes. Il est envisageable de penser que, lors du séchage, l'eau présente à la surface de l'hydrogel s'introduit dans les interstices de la surface métallique. Il se produit alors un effet d'adhésion assez fort qui permet au gel de maintenir sa forme tout au long de la procédure de séchage, tout en permettant à une partie de l'eau de s'évaporer.

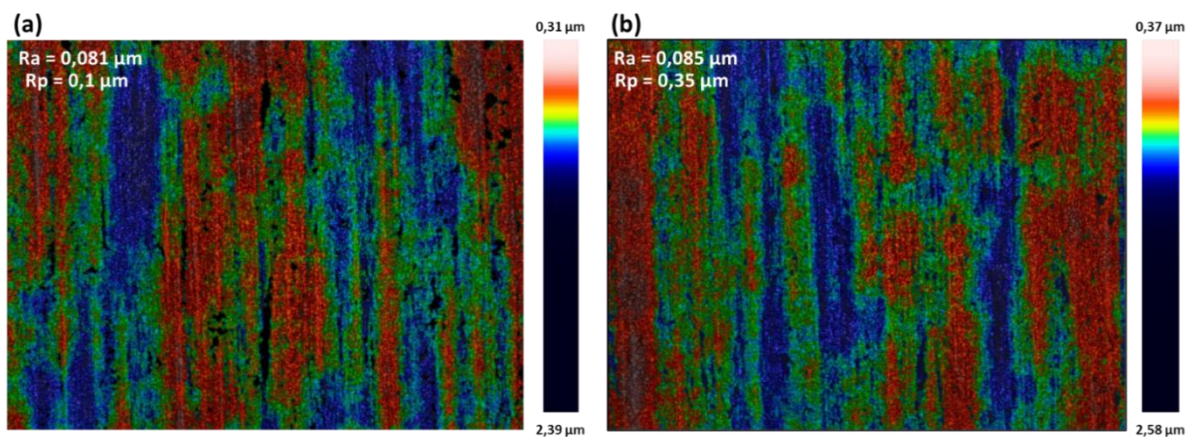


Figure 3-23 : (a) Topographie de surface d'une plaque INOX309 aspect MIROIR (b) Topographie de surface d'une plaque INOX309 aspect striée.

Dans cette étude, on remarque que la nature mais également l'état de surface des matériaux utilisés pour le séchage sont des paramètres importants à prendre en compte. En effet l'interaction hydrogel/substrat doit être assez forte pour permettre le maintien de la forme géométrique, mais assez faible pour que celui-ci s'en détache facilement une fois sec. Dans le cas de l'INOX 309, l'état de surface semble tout à fait adéquat pour limiter la déformation. D'autres tests ont également été réalisés sur un INOX309, qui présente une densité de stries bien supérieure. La valeur de Ra mesurée est de 0,050 µm, l'échantillon séché sur ce substrat présentait une déformation quasi nulle mais le décollage de l'échantillon était impossible sans l'endommager.

### □ Mécanisme de séchage

Du point de vue du mécanisme d'évaporation de l'eau, il semblerait que celui-ci se dissocie en plusieurs étapes. La Figure 3-24 illustre le mécanisme de séchage de l'hydrogel une fois disposé sur le substrat. En effet l'eau s'évacue d'abord par les surfaces (Face A) et sur les côtés de l'échantillon, jusqu'à atteindre la dernière couche d'eau se situant entre la plaque métallique et l'hydrogel. Dans un premier temps, l'eau peut circuler librement au travers du réseau pour rejoindre l'interface liquide/air. Néanmoins une fois que les premières couches de surface de l'échantillon sont déshydratées (Figure 3-24(b)), il semblerait que l'évacuation se fasse préférentiellement par les côtés. En effet, la superposition des couches de surface engendre la formation de feuillets, augmentant donc la densité locale du matériau et de ce

fait réduisant la taille des pores de l'hydrogel (*en surface*). Il devient donc difficile pour l'eau de s'extraire du réseau par la surface, et l'évaporation de l'eau par les bords du gel est favorisée.

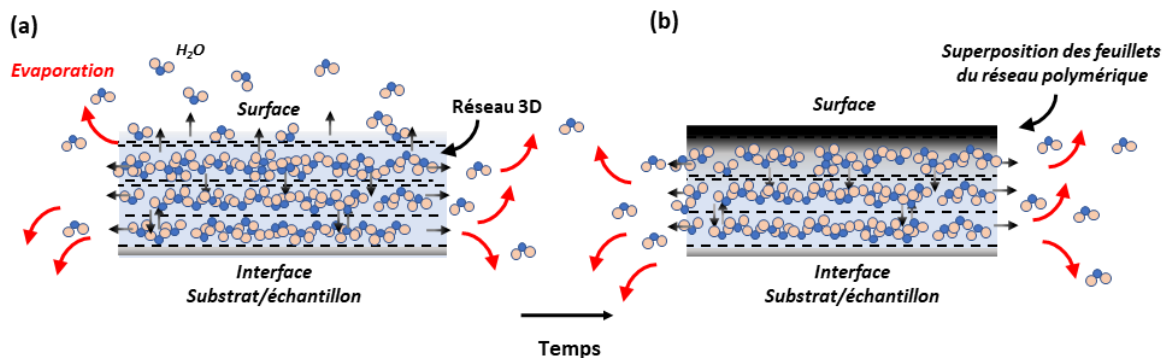


Figure 3-24 : (a) Illustration représentant le mécanisme de séchage au niveau de la surface de l'hydrogel dans les premières minutes suivant la mise à l'étuve (b) Illustration représentant le mécanisme de séchage en surface de l'hydrogel après plusieurs minutes.

D'autres paramètres (température, humidité) doivent aussi jouer principalement sur la cinétique de séchage.

#### b.iv. Etude de déformation des échantillons lors du séchage sur substrat INOX309

Parallèlement, des études de déformation des échantillons ont été effectuées pour l'agarose (CTRL-AG) ainsi que pour les nanocomposites *agarose/DWNT1% massive par rapport à la masse d'agarose* (DWNT-AG). La Figure 3-25 illustre la variation de perte en pourcentage (%) du diamètre, de l'épaisseur ou encore de la masse des échantillons d'hydrogels. Ces mesures ont été réalisées avant et après séchage sur l'INOX309 à l'aide d'une règle graduée, d'une balance de précision ainsi que d'un pied à coulisse (*micromètre- Kafer - résolution 0,001 mm*). Le diamètre après séchage de l'échantillon CTRL-AG est nettement différent de celui de DWNT-AG. En effet, pour CTRL-AG, on observe 28,3% de diminution du diamètre contre 16,6% pour l'échantillon DWNT-AG. Ces résultats confirment que la méthode de séchage est adaptée aux échantillons comprenant les NTC, mais également que leur présence affecte la déformation géométrique. En ce qui concerne l'épaisseur de l'échantillon CTRL-AG, on constate une diminution de 88,4% contre 92,2% pour DWNT-AG. Il semble raisonnable d'affirmer que la faible diminution du diamètre accentue la diminution de l'épaisseur finale. En effet, comme nous l'avons évoqué précédemment, les échantillons séchés sous vide ont montré un comportement de séchage multidirectionnel engendrant une déformation exagérée de l'échantillon notamment sur l'épaisseur et sur le diamètre. Par ailleurs, la mesure de masse montre la grande quantité d'eau que le réseau peut contenir. En effet, l'échantillon CTRL-AG perd jusqu'à 97% d'eau contre 96,7% pour l'échantillon DWNT-AG. Ces valeurs montrent qu'il peut rester quelque résidus d'eau au cœur de la matrice en polymère, piégée

lors de l'étape de séchage. En effet, l'échantillon CTRL-AG contient 2,5%*m* de polymère, théoriquement il devrait rester 97,5% si l'échantillon était complètement sec. Il en va de même pour l'échantillon DWNT-AG qui contient 2,5%*m/v* de polymère et 1%*m* de DWNT par rapport au polymère ce qui correspond à 0,025% de la masse totale. Ces essais montrent l'effet du séchage sur les deux matériaux, et mettent en évidence l'effet modéré des DWNT.

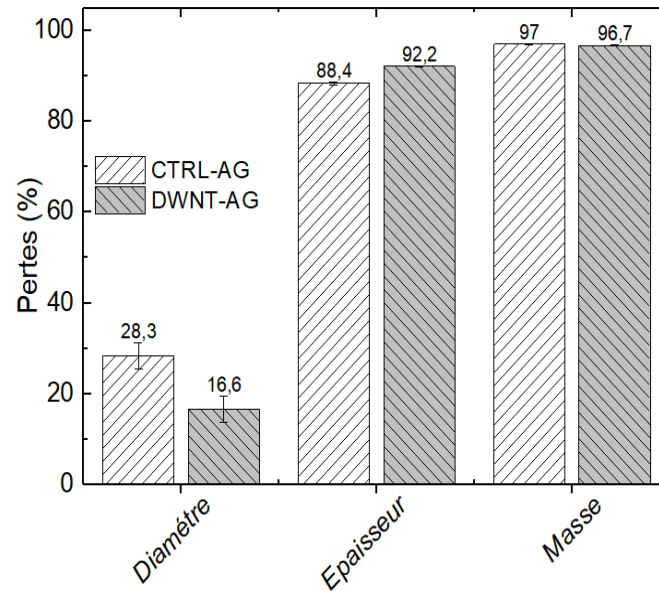


Figure 3-25 : (a) Mesure de déformation du diamètre et de l'épaisseur et de la perte de masse des échantillons CTRL-AG et DWNT-AG (mesures sur 3 échantillons)

Cette partie de l'étude présente les arguments sur lesquels la suite des travaux s'est principalement axée sur les hydrogels et notamment ceux à base d'agarose. Par ailleurs, le caractère mou de l'agarose, son élasticité, ainsi que sa capacité de rétention de l'eau semblent être des atouts par rapport à l'interaction entre le dispositif et la surface de la peau et ainsi favoriser le contact. Ce matériau a été sélectionné parmi d'autres polymères bio-sourcé (alginate de sodium, Carboxyméthylcellulose) pour son caractère biocompatible et peu coûteux. Ainsi, il répond favorablement à de nombreux critères fixés par le cahier des charges.

# CONCLUSION

*Ce chapitre a présenté de nombreux essais réalisés au cours de ces travaux utilisant différentes techniques de mise en forme pour sélectionner un matériau polymère approprié aux besoins de l'application. De plus, nous avons présenté une description de la stratégie de mise en œuvre permettant la dispersion des NTC au travers de l'hydrogels, ce qui constitue une étape clé du procédé.*

*Les recherches effectuées sur l'électrospinning permettent d'entrevoir une suite ainsi que des investigations plus approfondies sur le sujet notamment sur la mise en forme d'hydrogels par cette technique. L'atout majeur de l'électrospinning réside sans aucun doute dans sa grande polyvalence. De plus, une large gamme de polymères peut être mise en forme par cette technique. Il convient donc de dire qu'un approfondissement des investigations concernant cette technique de mise en forme, permettrait de fabriquer des nanofibres d'hydrogels ce qui pourrait potentiellement répondre aux attentes d'un tel dispositif.*

*En ce qui concerne la voie aérogel par séchage au CO<sub>2</sub> supercritique, cette technique assez complexe du point de vue de sa mise en œuvre et de la préparation des échantillons ne semble malheureusement pas adaptée au cahier des charges que nous avons fixé. En effet, le non maintien de la structure lors de l'imprégnation par une solution ou encore la rugosité de surface ne semblent pas adaptés aux exigences imposées. Cela semble également le cas pour la mise forme par lyophilisation.*

*Enfin, l'hydrogel séché à l'air paraît plus adapté et de plus semble satisfaire aux contraintes fixées par le cahier des charges et également du point de vue de la faisabilité. En effet, son caractère mou et élastique devrait permettre d'atteindre un contact peau/dispositif optimal. Les mesures de déformations montrent que nous sommes parvenus à une limitation de la réduction du diamètre des échantillons au cours du séchage. L'approche développée pour la fabrication des hydrogels semble donc être un excellent compromis au regard de nos objectifs. Le développement d'un tel matériau permet également de rester dans le domaine d'un dispositif médical et non d'un médicament, dispositif que l'on viendrait imprégner d'une solution médicamenteuse avant application de celui-ci sur la peau.*





## CHAPITRE 4

# CARACTERISATION ET EVALUATION DES PROPRIETES DU DISPOSTIF





# INTRODUCTION

*Le chapitre précédent nous a permis d'explorer plusieurs méthodes ainsi que plusieurs matériaux pour la réalisation d'un dispositif de délivrance transdermique. Ainsi nous avons pu déterminer quels matériaux et quelle méthode de mise en forme seraient les plus appropriés pour atteindre nos objectifs.*

*Les nanocomposites à base de polymère et notamment les hydrogels nanocomposites répondent favorablement au développement de ce type de dispositif. En effet leur capacité à retenir l'eau, à se déshydrater et regonfler servant donc de réservoir, constituent des points forts de ce type de matériau. De plus, leur morphologie est tout à fait adaptée au contact avec la peau, ce paramètre est également pertinent pour permettre de délivrer correctement des substances médicamenteuses.*

*Nous avons donc décidé de développer ce dispositif en utilisant l'agarose qui remplit de nombreux critères de sélection, tels que la biocompatibilité, l'encapsulation des DWNT, ou encore sa capacité à retenir un liquide. Par ailleurs, ses propriétés de gélification sont très intéressantes. En effet, lorsqu'il est chauffé à une température de 90°C, le gel d'agarose est capable de se liquéfier pour reformer par la suite un gel ce qui lui confère des propriétés thermo réparables<sup>121</sup>.*

*Aussi, le chapitre 4 présente les résultats obtenus par différentes techniques de caractérisation dédiés à l'étude des hydrogels. Ce chapitre a donc pour but de décrire les caractéristiques des hydrogels nanocomposites fabriqués comportant des quantités variables de DWNT.*

*Ce chapitre a donc pour but de comprendre le fonctionnement et les limites de l'agarose qui définiront la potentielle future application de ce dispositif.*

# I. Caractérisation des hydrogels nanocomposites

## A. Procédé d'élaboration

### A.i. Hydrogel nanocomposite

Afin d'améliorer la maîtrise du procédé, des modifications ont été apportées au protocole d'élaboration (*Traitement ultra-Turrax, chauffage des DWNT*) de l'hydrogel nanocomposite précédemment développé au chapitre 3. La Figure 4-1 illustre schématiquement le procédé établi pour la fabrication d'hydrogel à base d'agarose et de DWNT.

La Figure 4-1(a) présente le protocole de dispersion des DWNT. Nous commençons par introduire les DWNT dans 50 ml d'eau désionisée ( $pH 5,5$ ), puis nous procédons à un traitement à l'Ultraturax pendant 20 min à température ambiante. La suspension est ensuite placée aux ultrasons (*1sec on/1sec off - 30% puissance max,  $\Phi_{sonde} = 12mm$* ) pendant 60 minutes afin d'augmenter l'état de dispersion.

En parallèle, l'agarose ( $25 \text{ g.L}^{-1}$ ) est solubilisée dans 50 ml d'eau désionisée (Fig.4-1(b)), puis placée dans un bain d'huile à  $90^\circ\text{C}$  pendant environ 1h sous agitation magnétique jusqu'à atteindre la solubilisation complète.

La dispersion de DWNT est placée dans un bain d'huile à  $90^\circ\text{C}$  sous agitation pendant environ 5 minutes (jusqu'à atteindre  $80-85^\circ\text{C}$ ), puis la solution d'agarose est mélangée aux DWNT (Fig.4-1(c)). La préparation se termine par une homogénéisation du mélange à l'Ultraturax pendant 20 min (Fig 4-1(d)). La suspension est laissée sous agitation magnétique pendant quelques minutes pour permettre l'évacuation des bulles d'air présentes sur le pourtour du ballon.

La suspension DWNT-AG est ensuite coulée en boîte de pétri à température ambiante, la gélification se produit en une dizaine de minutes ( $T^\circ\text{C gélification} = 35-37^\circ\text{C}$ ). Une fois la gélification terminée, on procède au poinçonnage des échantillons à l'emporte-pièce ( $\approx 2 \text{ mm d'épaisseur}$ ,  $10 \text{ mm de diamètre}$ ) (Fig.4-1(e)). La masse et l'épaisseur des échantillons sont mesurées. Le matériau est ensuite disposé soit dans de l'eau désionisée pour stockage, soit sur une plaque métallique pour séchage (Fig.4-1(f)).

Ce procédé d'élaboration d'hydrogel nanocomposite à base de DWNT est assez simple et facile à réaliser, notamment grâce à l'agarose et ses propriétés de gélification particulières. L'un des paramètres essentiels est la température, ici  $90^\circ\text{C}$ , qui permet de solubiliser l'agarose mais aussi de conférer une certaine viscosité de la suspension, permettant une bonne dispersion des NTC. Au refroidissement, l'agarose gélifie aux alentours de  $37^\circ\text{C}$ , et donc de  $90^\circ\text{C}$  à  $37^\circ\text{C}$  l'apparition d'un gradient thermique provoque l'augmentation de la viscosité du mélange au fur et à mesure que la température diminue jusqu'à atteindre son point de gélification<sup>300</sup>. La suspension à l'état de fusion est assez fluide, malgré la présence de NTC.

D'autre part, la gélification de l'agarose est initiée par un mécanisme de nucléation et de croissance. En effet, la diminution de température provoque l'apparition d'un point d'amorçage où les chaînes d'agarose s'organisent entre elles pour former un réseau gélifié stable. L'activation de la gélification est rendue possible par la présence de germes favorisant

ou non la réaction de nucléation et la croissance. Plus la diminution de température est importante et moins la taille des pores du réseau formés sera grande <sup>128</sup>. Il est donc raisonnable de penser que l'apparition d'un gradient thermique entre les différentes surfaces (*verre-suspension, air-suspension*) crée également une variation des propriétés locale du gel. Des mesures rhéologiques pourraient apporter plus de compréhension quant à la variation de la viscosité du mélange en fonction de la température avec et sans la présence des DWNT.

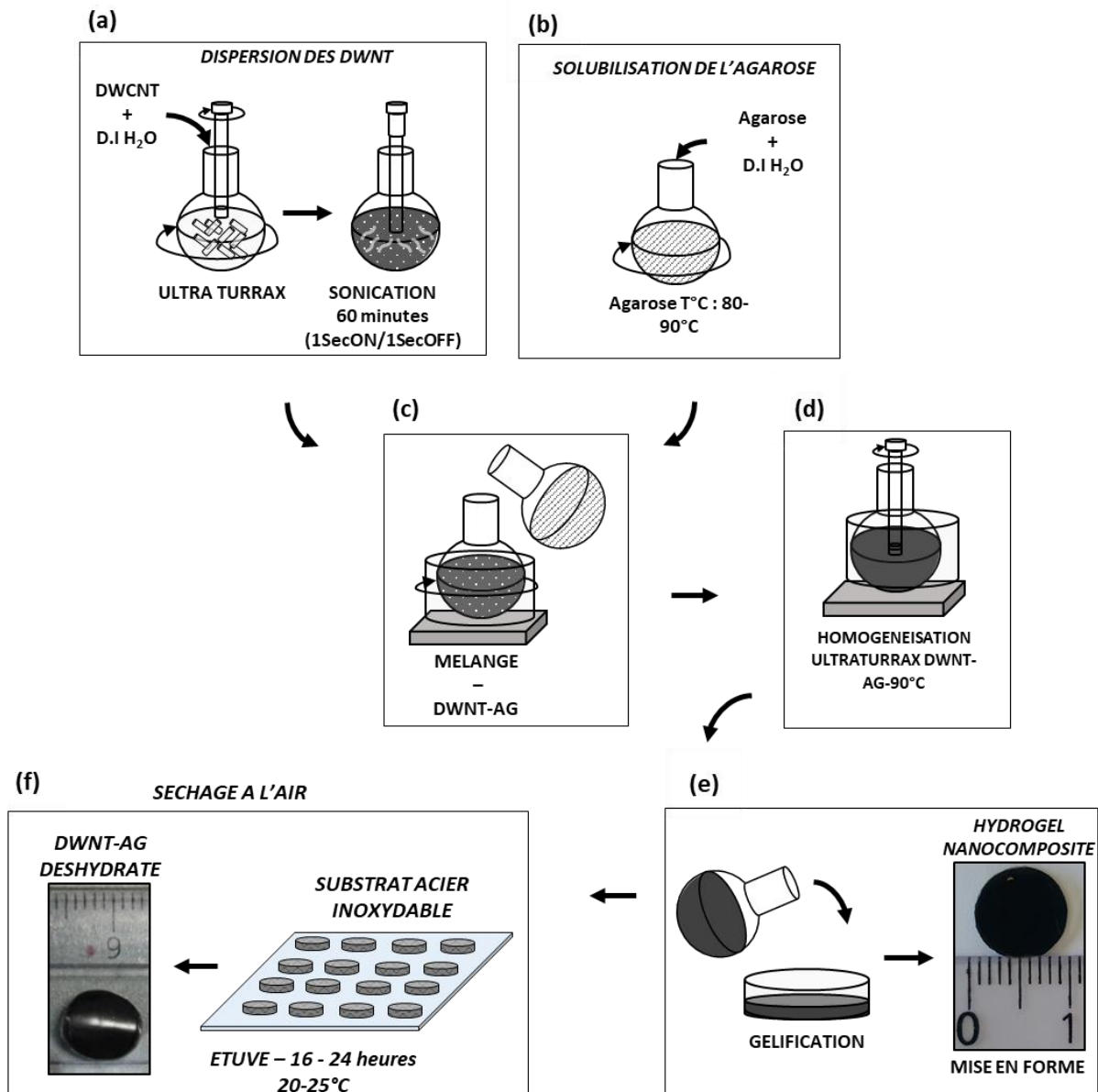


Figure 4-1 : Illustration schématique du procédé d'élaboration des hydrogels nanocomposites DWNT-AG. (a) Dispersion des DWNT par un traitement ultraturrax et ultrasons. (b) Solubilisation de l'agarose. (c) Mélange Agarose - DWNT. (d) Homogénéisation de la suspension par traitement ultraturrax. (e) Coulage de la suspension en boîte de pétri et mise en forme. (f) Séchage des échantillons sur une plaque d'acier (INOX309).

De plus amples études seraient nécessaires pour comprendre correctement les mécanismes d'assemblage entre les chaînes en polymères et les DWNT. En effet, l'enchevêtrement hélicoïdal des chaînes de polymère entre elles permet la formation d'un réseau

tridimensionnel. La question est de savoir si les DWNT se retrouvent au cœur de cet enchevêtrement ou à l'extérieur. On peut penser que les DWNT se retrouvent piégés entre les chaînes d'agarose formant les doubles hélices (cf. chapitre 1). Il est également possible que les DWNT forment des agglomérats, ces derniers pouvant servir de germes lors de la gélification et ainsi favoriser la nucléation. Une analyse microstructurale (MEB) pourrait confirmer cette hypothèse ou apporter des éléments de réponse à ces questions.

### a. Préparations à différentes concentrations

Dans l'objectif de mieux étudier le mélange Agarose / DWNT nous avons élaboré plusieurs préparations de matériaux à différentes concentrations (0 ; 0,25 ; 0,5 ; 1% DWNT) ces pourcentages étant exprimés en masse par rapport au polymère. La Figure 4-2 montre des images, en microscopie optique, de la variation de transparence en fonction de la concentration en DWNT.

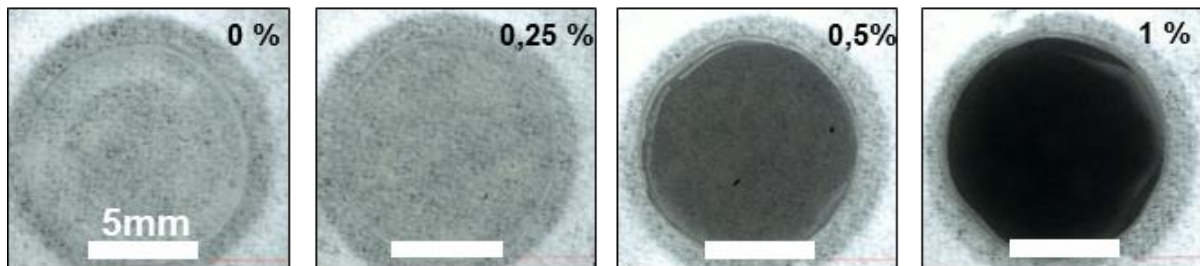


Figure 4-2 : Images réalisées par microscopie optique représentant les matériaux après fabrication en fonction de la concentration en DWNT (0, 0.25, 0.5, 1% massique par rapport à l'agarose). (Barre d'échelle 5mm) L'agarose dans ce cas représente 2.5% massiques de l'hydrogel.

Etant donnée l'opacité variable de ces échantillons, nous nous sommes intéressés au plus opaque contenant 1% massique de DWNT ainsi qu'à l'échantillon le moins opaque ne contenant pas de DWNT (agarose seule). En effet à 1% en DWNT, l'opacité du matériau semble très forte, ce qui semblerait indiquer une bonne dispersion des DWNT, toutefois il nous reste à confirmer par différentes méthodes expérimentales si la dispersion et la percolation est belle et bien effective au cœur du réseau d'agarose. L'expansion du réseau due à la présence d'eau favorise l'éloignement des DWNT entre eux, celle-ci joue donc un rôle prépondérant sur l'organisation des DWNT dans le réseau, comparativement à un état déshydraté qui lui ne contient que deux phases différentes.

## B. Etude du séchage et gonflement des échantillons

Le séchage comme précédemment évoqué est une étape primordiale concernant la législation et en particulier la classification possible du dispositif en tant que médicament ou en tant que dispositif médical. Cette étape consiste à positionner les échantillons sur une plaque en acier inoxydable (*INOX309*) puis à les sécher à l'étuve à température ambiante pendant 24 heures.

### □ Variations dimensionnelles

La *Figure 4-3* présente la morphologie des échantillons en fonction de leurs états respectifs, initial (*après gélification*), déshydraté (*après séchage à l'étuve*), regonflé (*dans une solution ionique (PBS)*). Les images démontrent bien la différence d'aspect à chaque étape illustrant l'influence du séchage sur le regonflement du matériau.

En s'appuyant sur les études effectuées dans le *chapitre 3*, nous nous sommes penchés sur la caractérisation géométrique des échantillons aux cours du séchage et du regonflement. L'objectif étant de minimiser la déformation des échantillons sur le diamètre afin de favoriser le maintien de la surface de contact entre les échantillons et la peau. La *Figure 4-3(b)* illustre la variation des dimensions au cours du séchage (perte par rapport à l'état initial ( $((m_{t(Initial)} - m_{t(Déshydrate)}) / m_{t(Initial)}) \times 100$ ) (*Fig.4-3(a)*) déjà présentée au *chapitre 3*. La *Figure 4-3(c)* présente la variation dimensionnelle (récupération par rapport à l'état initial ( $(m_{t(\infty)} / m_{t(Initial)}) \times 100$ ) après regonflement dans une solution de *PBS* après 24 heures. Les mesures des échantillons *CTRL-AG* retrouve 77% de leurs diamètres initiale contre 87% pour les échantillons *DWNT-AG*. L'épaisseur après regonflement représente 44% pour *CTRL-AG* contre 34% de la valeur initiale pour *DWNT-AG*, ce qui est en accord avec la variation de diamètre qui est plus faible pour les échantillons *DWNT-AG*. Du point de vue de la masse on peut remarquer que les échantillons *CTRL-AG* & *DWNT-AG* perdent jusqu'à 97% d'eau après séchage. La récupération pour les échantillons *CTRL-AG* n'est que de 22% contre 21,4% pour *DWNT-AG* et donc les *NTC* n'ont pas ici d'effet limitant. Le modeste regonflement des échantillons est probablement dû à la nature hydrophobe des chaînes d'agarose gélifié, séché, puis regonflé. Ces observations montrent la difficulté du matériau à regonfler intégralement et ce même pour des temps longs ( $t > 24h$ ).

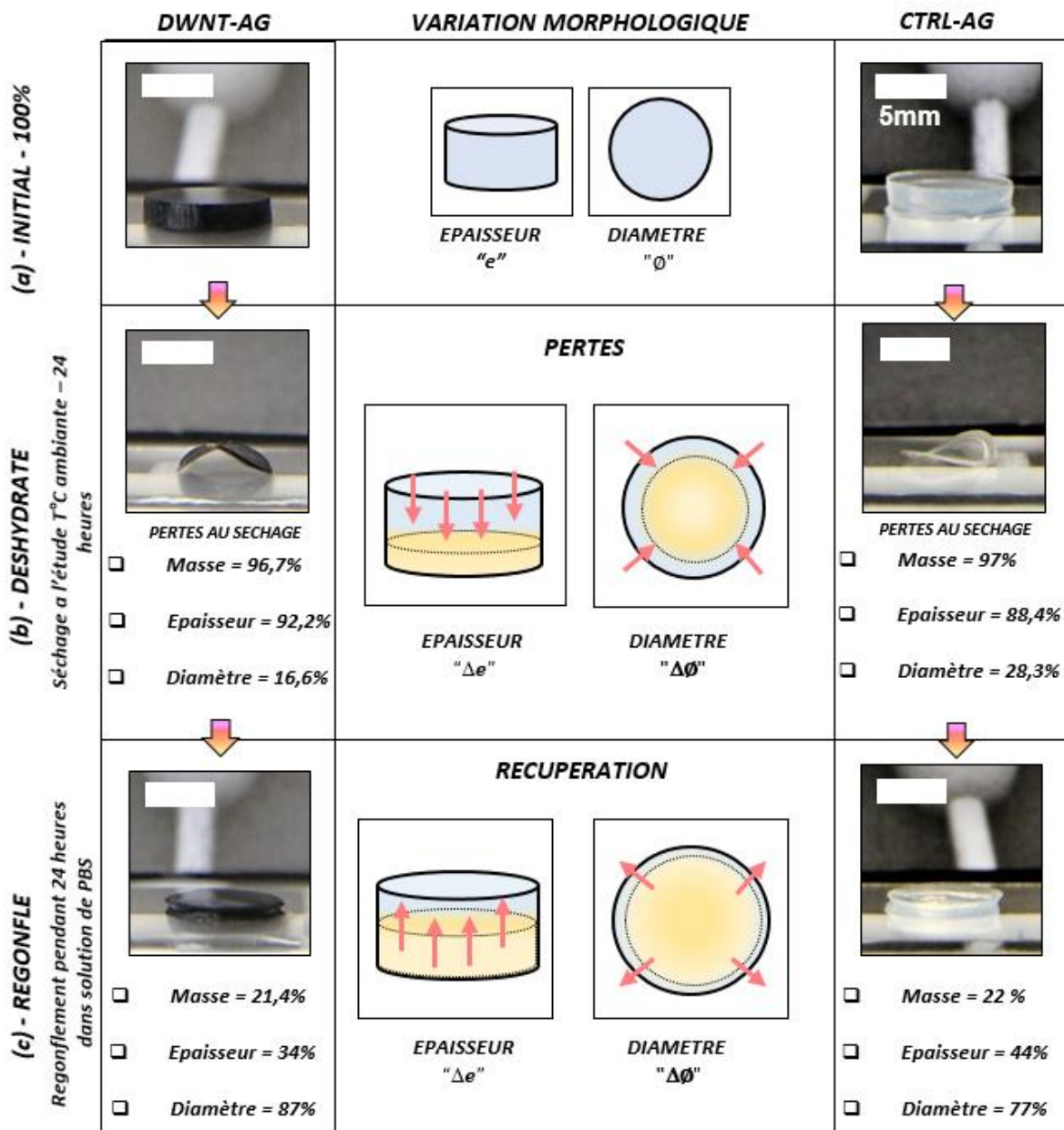


Figure 4-3 : Images illustrant la variation de morphologie des matériaux en fonction de leur état INTIAL, DESHYDRATE, REGONFLE (a) Echantillon CTRL-AG et DWNT-AG à l'état INTIAL illustrant leur morphologie. (b) Variation dimensionnelle des échantillons CTRL-AG et DWNT-AG 1%*m* après séchage à l'étuve (DESHYDRATE) avec l'illustration concernant leurs variations géométriques (c) Variation dimensionnelle des échantillons CTRL-AG et DWNT-AG 1%*m* après regonflement dans le PBS pendant 24 heures (REGONFLE) avec l'illustration concernant leurs variations géométriques (barres d'échelles = 5 mm)

Le contrôle du séchage et du gonflement sont des aspects du cahier des charges (cf. Chapitre 1). En effet, ces paramètres vont conditionner la quantité de molécules que le dispositif est capable de retenir au sein du matériau après séchage et regonflement.

La coopération entre différents domaines dans le cadre du projet Nanoderm a permis de mettre en regard la façon de fabriquer le matériau avec la législation ce qui peut s'avérer capital pour le développement industriel d'un tel dispositif. Par ailleurs, la coopération d'un

*point de vue sociologique (entretiens avec les diabétologues), nous a permis de mieux comprendre la pathologie du diabète.*

## **B.i. Cinétique de gonflement des échantillons CTRL-AG & DWNT-AG**

L'étude du gonflement des échantillons d'hydrogel avec et sans DWNT nécessite dans le cadre du projet d'être étudiée afin de mesurer leur capacité de stockage.

### **a. Mécanismes**

Il semble intéressant de développer l'aspect concernant le phénomène de gonflement des hydrogels à l'état déshydraté et à l'état regonflé. Plus généralement, lorsqu'un polymère se retrouve en présence d'un solvant<sup>301</sup>, il ne se produit pas seulement une pénétration du solvant dans le polymère mais également un gonflement, de plus l'interaction entre le liquide et le polymère gonflé peut évoluer en fonction du temps. L'absorption du liquide peut s'accompagner d'un changement morphologique pouvant conduire lors du gonflement à l'apparition de contraintes internes pouvant provoquer des fissures<sup>302</sup>. Le gonflement est induit par une séparation des chaînes permettant à l'eau de diffuser<sup>303</sup> au sein du matériau. Le phénomène de diffusion peut donc présenter différents mécanismes de transport.

Ces mécanismes de transport de molécules ont été établis et ceux-ci se dissocient en quatre principaux<sup>304</sup>:

- Diffusion Pseudo Fickienne*
- Diffusion Fickienne (diffusion classique)*
- Diffusion non-Fickienne (Anormale)*
- Transport « Cas 2 »*

La *Figure 4-4* illustre le mécanisme de gonflement d'un hydrogel déshydraté à différents degrés d'hydratation. L'étape **(1)** représente la diffusion des molécules d'eau au travers du réseau polymérique. En **(2)** on observe la relaxation des chaînes de polymères, engendrée par l'hydratation du réseau et enfin en **(3)** l'expansion du réseau polymérique dans le milieu périphérique réhydraté. Ce mécanisme de gonflement peut varier en fonction de l'étape prédominante. On peut donc selon le mécanisme déterminer le phénomène de diffusion présenté ci-dessous.

#### *Diffusion pseudo-Fickienne (deux étapes)*

Le comportement *Pseudo-Fickien* présente une courbe avec un petit domaine linéaire assimilable au transport *Fickien*, en revanche l'absorption du solvant continue de façon (temps longs) très lente. Ce phénomène est peu décrit dans la littérature et ne semble pas être très bien défini.<sup>305,306</sup>



### □ Diffusion Fickienne

Dans ce cas la relaxation des chaînes en polymère peut être soit beaucoup plus rapide que la diffusion soit beaucoup plus lente.

Si la relaxation des chaînes en polymère (Fig.4-4) ne se produit pas, les étapes (2) et (3) (précédemment décrites) sont négligeables par rapport à la diffusion de l'eau qui devient le facteur dominant. La quantité totale d'eau imprégnée par diffusion augmente proportionnellement avec la racine carrée du temps ( $\sqrt{t}$ ) (temps très courts).

### □ Diffusion non-Fickienne

Le cas de diffusion *non-Fickienne* apparaît lorsque la vitesse de diffusion des molécules de solvant est comparable à la vitesse de relaxation des chaînes en polymère, l'insertion du solvant devient plus difficile et la cinétique d'absorption dévie en fonction de la loi en  $\sqrt{t}$  (*Transport Fickien*) et illustre donc un transport *non-Fickien*.<sup>307</sup>

### □ Transport Cas 2

Un dernier cas établit que si la vitesse de diffusion est plus rapide que la vitesse de relaxation des chaînes en polymère, alors le processus de relaxation devient l'étape prédominante. Ceci conduit à l'obtention d'une interface entre les régions gonflées (surfaces et sur les côtés) et les zones denses au cœur du matériau. L'interface se déplace de l'extérieur vers l'intérieur du matériau tant que le solvant peut diffuser. Ce mécanisme est appelé « *Cas-2 transport* »<sup>308,309</sup>. Contrairement à la diffusion *Fickienne*, la quantité absorbée est proportionnelle au temps ( $t$ ). Ce phénomène a été décrit dans la littérature dans le cas du poly (méthylméthacrylate) dans du méthanol et du poly(éthylène-co-vinylalcool) dans du butanol<sup>310,311</sup>.

L'équation<sup>312,313</sup> suivante permet de déterminer de quelle nature est la diffusion de l'eau au travers de l'hydrogel (à noter que dans ce cas les paramètres dimensionnels de l'échantillon ne sont pris en compte dans cette étude).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K t^n$$

Ici  $M_t$  et  $M_\infty$  représentent la quantité d'eau diffusée au travers de l'hydrogel à un temps  $t$  et à un temps infini (équilibre),  $K$  est une constante dépendante de la structure du réseau et  $n$  est l'exposant caractéristique du mode de transport considéré<sup>314</sup>. Cette loi est valable uniquement dans le cadre de l'approximation à des temps faibles, c'est-à-dire dans les premiers temps d'immersion, pour un rapport de gain en masse d'eau inférieur à 60 %<sup>315</sup>. Le tableau ci-dessous recense les différents mécanismes et la valeur des coefficients correspondant au mécanisme de transport. Cette équation ne s'applique qu'au transport unidimensionnel, isotherme, du transport de l'eau dans un échantillon de polymère mince.

Tableau 4-1 : Mécanismes de transports <sup>301,309</sup>		
Exposant $n$	Type de transport	Dépendance du temps
$<0.5$	Pseudo Fickien	$f(t^{n-1})$
$0.5$	Diffusion Fickienne	$f(t^{-\frac{1}{2}})$
$0.5 < n < 1.0$	Diffusion Non Fickienne (anormale)	$f(t^{n-1})$
$1.0$	Transport Case 2	Indépendant du temps

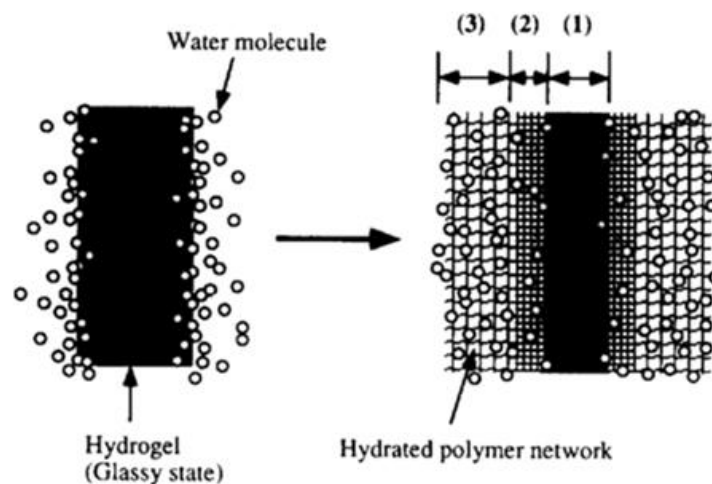


Figure 4-4 : Illustration de l'insertion de l'eau au travers de l'hydrogel initialement déshydraté<sup>316</sup> correspondant à divers mécanismes.

De nombreux autres facteurs influencent le gonflement des hydrogels comme par exemple le taux ou encore la nature<sup>317</sup> du réticulant utilisé pour la formation de l'hydrogel, le cas échéant. Le gonflement est donc défini par la concentration en réticulant par rapport au nombre de moles de polymère. Plus le taux de réticulation est élevé et plus la quantité d'agent réticulant au cœur du réseau augmente. En d'autres termes, plus le réseau est réticulé et moins il gonflera. Par ailleurs, la nature chimique du polymère considéré a également un rôle très important dans la mécanique de gonflement. En effet, les chaînes aux propriétés hydrophiles auront un haut degré d'hydratation, contrairement aux chaînes à caractère hydrophobe. C'est pour cela que les polymères à caractère hydrophile forment des hydrogels capables de retenir beaucoup plus d'eau que leurs homologues hydrophobes.

### **b. Caractérisation du regonflement des échantillons CTRL-AG et DWNT-AG**

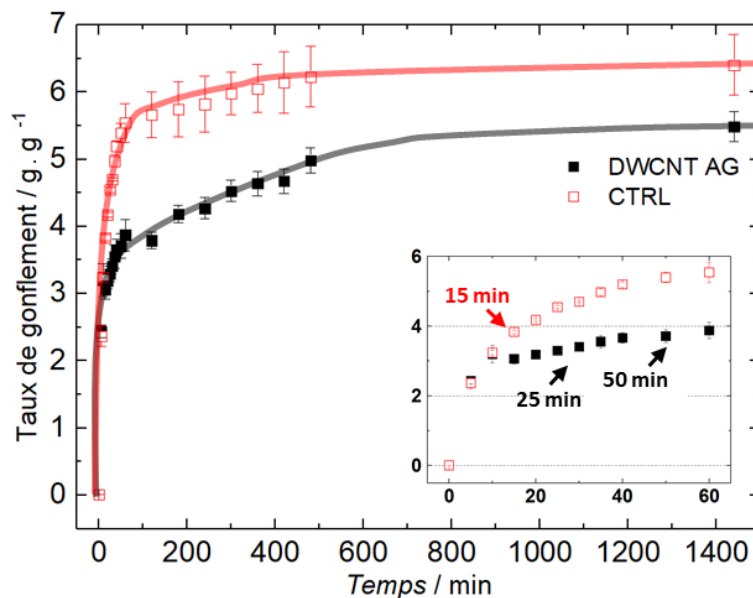
Les mesures de regonflement (normalisées par rapport à la masse) du matériau nous permettent de déterminer (Fig.4-5) le taux de gonflement en fonction du temps en gramme

d'eau par gr de matière sèche. Les mesures sont effectuées de la même manière que précédemment décrites dans le *chapitre 3 (cf. : Etude comportementale d'imprégnation Agarose et Agarose/DWNT)*. L'échantillon est pesé à l'état initial, déshydraté, et regonflé. L'équation ci-dessous permet de mesurer le regonflement des échantillons à différents temps (0 et 24 h).

$$m(g.g^{-1}) = \frac{m_t - m_0}{m_0}$$

Avec  $m_t$ ,  $m_0$  représentant respectivement la masse de l'hydrogel au temps «  $t$  » et la masse de l'hydrogel déshydraté. Cette équation nous permet de tracer la *Figure 4-5*.

La *Figure 4-5* illustre un comportement de regonflement en fonction de l'échantillon assez similaire en présence ou non des *NTC à 1% $m$  / Agarose*. En effet le regonflement est très rapide durant les 50 premières minutes puis ralentit. A partir de 15 minutes l'échantillon *CTRL-AG* a déjà atteint 60 % de sa capacité maximum, tandis que l'échantillon *DWNT-AG* atteint ces 60% en 25 min. L'échantillon *CTRL-AG* atteint 6,4 gr d'eau / gramme de matière sèche contre 5,5g d'eau / g de matière sèche pour l'échantillon *DWNT-AG* au bout de 24 h. Il est également remarquable qu'à partir de 10 min, les deux échantillons suivent une vitesse de gonflement différente. En effet, l'échantillon *CTRL-AG* continue de gonfler après 10 min alors que le gonflement de l'échantillon *DWNT-AG* est déjà ralenti. Le caractère hydrophobe des *DWNT* tout comme les chaînes d'agarose ne favorise pas l'augmentation du taux de gonflement ce qui pourrait expliquer cette différence. D'autre part, la présence des *NTC* est aussi susceptible de limiter la mobilité des chaînes de polymère, ce qui engendre le même effet.



*Figure 4-5 : Taux de gonflement en g de PBS par g de matière sèche (agarose) des échantillons CTRL-AG & DWNT-AG 1% $m$  en fonction du temps dans une solution de PBS à température ambiante. L'encadré présente un agrandissement de la courbe aux temps courts ( $t < 60\text{min}$ ).*

Ces résultats permettent donc de déterminer le volume de solution que le dispositif est capable de retenir au cœur du réseau en gramme de liquide (eau) par gramme d'agarose. D'autre part, le taux de gonflement atteint par l'agarose est assez faible, comparé aux données de la littérature. En effet, à titre d'exemple certaines études décrivent la fabrication d'hydrogels (à base de carboxyméthylcellulose) super absorbants permettant une insertion bien supérieure en eau dans le réseau<sup>318</sup> du fait des propriétés très hydrophiles de la CMC. Toutefois, cette valeur aussi faible qu'elle soit est suffisante pour justifier la poursuite du développement du matériau dans le contexte de nos travaux. Les mesures de relargage seront effectuées et expliquées dans la suite du manuscrit afin de mettre en évidence la capacité de stockage du matériau dans l'optique de l'application visée.

### c. Détermination du mécanisme

La variation de masse de nos matériaux en fonction du temps permet de vérifier s'il s'agit d'un mécanisme de diffusion *Fickienne*. La Figure 4-6 montre la variation de masse ( $\frac{m_{H_2O}(t)}{m_{H_2O}(\infty)}$ ) (24 heures) en fonction de la racine carré du temps. On remarque que l'allure de la courbe initiale (Fig.4-6) est linéaire et très similaire aux temps courts (< 25 minutes). D'après Daoud<sup>302</sup>, la zone (taux de regonflement inférieurs à 0,6) dans laquelle on doit observer un domaine linéaire permet d'identifier si il s'agit d'un mécanisme de diffusion *Fickienne* ( $\sqrt{t}$ ).

L'obtention d'une droite dans cette gamme de valeur correspond à un phénomène de diffusion *Fickienne* ou encore *pseudo-Fickienne*. Il s'agit dans ce cas du remplissage par l'eau de la porosité du matériau.

Pour les temps longs (> 25 minutes), nous observons un écart à la linéarité. Ce phénomène est habituel dans le cas des polymères à caractère hydrophobe pour lesquels l'eau à l'impossibilité de pénétrer entre les chaînes (relaxation des chaînes de polymère). Dans notre cas, la prise de masse se poursuit, même si elle est très ralentie, ce qui est caractéristique de la faible proportion de domaines hydrophiles présents dans l'agarose (forte quantité de radicaux hydrophobes ( $CH_2-O$ ) mais aussi de la présence d'une faible quantité de radicaux hydrophiles ( $SO_3^-$ )), et qui permet cependant l'insertion d'une petite quantité d'eau supplémentaire entre les chaînes.

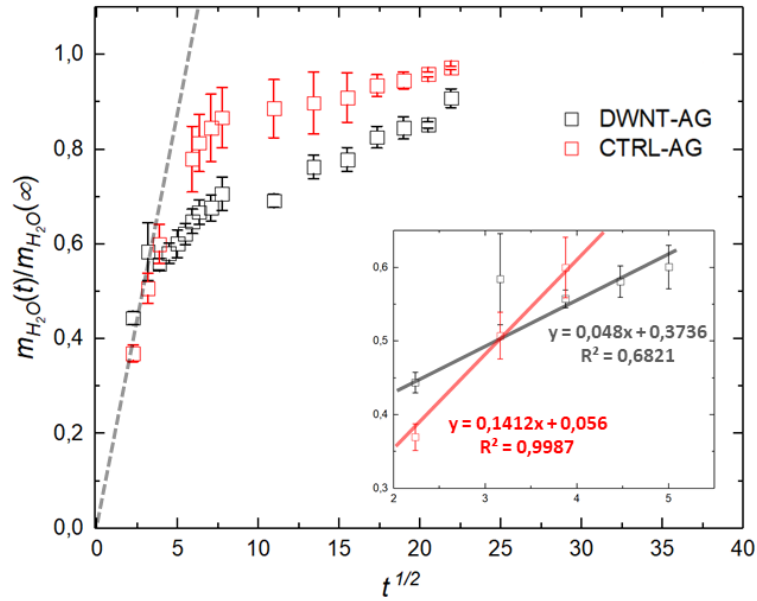


Figure 4-6 : Représentation graphique de la variation de masse au temps (t) sur la masse à t (∞) en fonction de la racine carrée du temps des échantillons CTRL-AG et DWNT-AG. L'encadré représente un agrandissement de la zone concernant les valeurs comprises entre 0,3 et 0,6 (zone linéaire).

Toutefois si l'on veut valider nos hypothèses, il nous reste à estimer le coefficient  $n$  en traçant la fonction suivante issue de l'équation précédemment évoquée :

$$\text{Log} \left( \frac{M_t}{M_\infty} \right) = \text{Log}(K) + n \text{Log}(t)$$

La Figure 4-7 illustre cette équation et sa linéarité pour les valeurs inférieures à 0,6<sup>319,320</sup>. Grâce à ces droites, on peut donc remonter à la valeur de  $n$  et donc déterminer précisément le mécanisme de transport qui gouverne notre matériau. Les valeurs de  $n$  sont respectivement de 0,44 (valeur très proche d'une diffusion Fickienne) pour les échantillons CTRL-AG et 0,19 pour les échantillons DWNT-AG. Les valeurs de  $n$  nous orientent donc vers un mécanisme de diffusion Pseudo-Fickienne<sup>305,306</sup>.

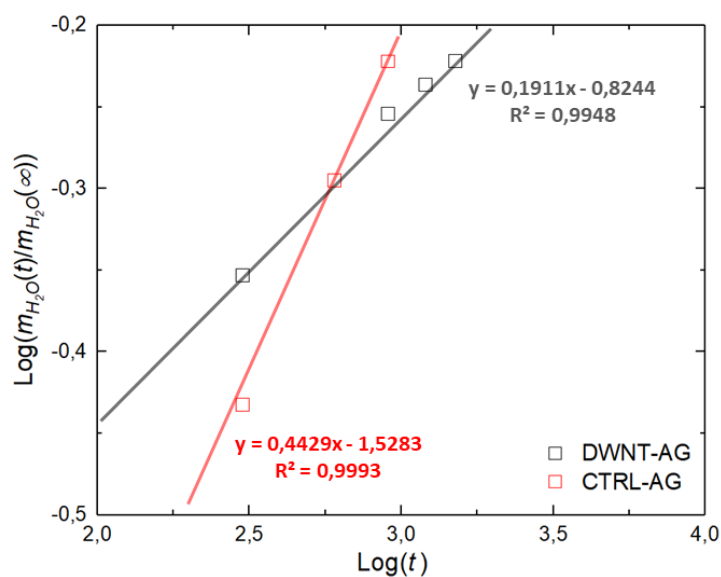


Figure 4-7 : Graphique représentant le logarithme de la variation de masse au temps ( $t$ ) sur la masse à  $t(\infty)$  en fonction du logarithme du temps.

Le traitement des données de mesure a permis d'y voir plus clair sur le comportement de nos matériaux lorsque ceux-ci passent de l'état déshydraté à l'état regonflé. On peut clairement observer un effet des DWNT sur la cinétique de regonflement des échantillons comparativement à l'échantillon sans DWNT. Le mécanisme de diffusion semble dans les deux cas gouvernés par un mécanisme de diffusion Pseudo-Fickienne. Toutefois ces hypothèses nécessiteraient d'être vérifiées en effectuant des mesures complémentaires afin de déterminer les coefficients de diffusion ou encore d'augmenter le nombre de points de mesure pour les valeurs inférieures à 0,6 mais également en utilisant d'autres modèles.

### C. Relargage de la molécule Dextran-FITC

Pour quantifier correctement le nombre de moles insérées dans le réseau, nous nous proposons d'étudier le relargage de la molécule (*Dextran-FITC*) par spectroscopie à fluorescence. Les mesures de relargage sont réalisées dans un milieu reconstituant la sueur artificielle, en mode dynamique la préparation de cette solution est précisément décrite au chapitre 2 (cf. *Spectroscopie de fluorescence*).

#### C.i. Spectroscopie à fluorescence

La mesure de relargage des échantillons en fonction du temps nous permet d'une part de mesurer ce que contient chaque échantillon, mais également la cinétique de relargage. En effet, la Figure 4-8 illustre le comportement de relargage des échantillons CTRL-AG et DWNT-AG. On peut clairement observer que durant les 15 premières minutes, le comportement de relargage des deux échantillons est très semblable jusqu'à atteindre une cassure marquant un ralentissement. Les échantillons continuent de relarguer le *Dextran-FITC* mais en quantité plus

faible notamment pour l'échantillon *DWNT-AG*. Il semblerait qu'aux environs de 15 minutes, le relargage atteint 70% de la quantité de *Dextran-FITC* intégrée dans le réseau.

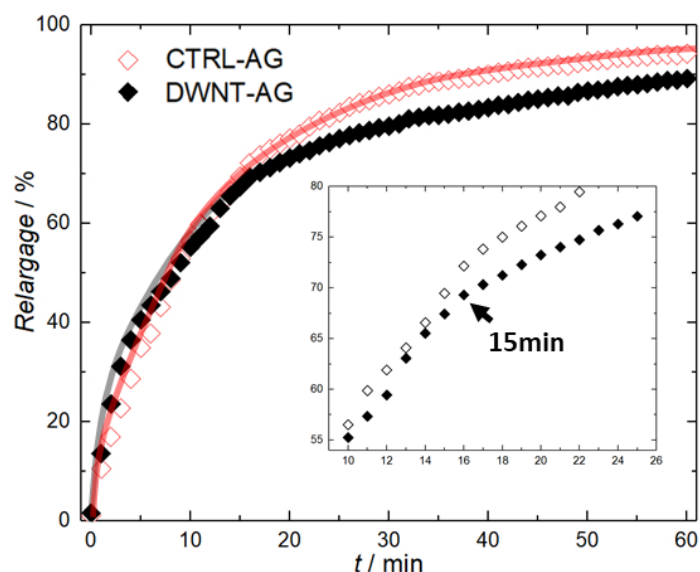


Figure 4-8 : Mesure de relargage du *Dextran-FITC* des échantillons *CTRL-AG* & *DWNT-AG* (1%*m* /agarose) par spectroscopie à fluorescence. Relargage en pourcentage (%) de matière relarguée en fonction du temps. L'encadré représente un agrandissement pour des valeurs de temps comprises entre 10 et 26 minutes.

Le *Tableau 4-2* reporte les valeurs de la quantité attendue de *Dextran-FITC* dans l'hydrogel, le nombre de moles relargués mesurés par spectroscopie à fluorescence, et enfin le pourcentage de relargage au bout de 60 minutes. On peut également remarquer que l'échantillon *CTRL-AG* retient pour un même temps un peu moins de *Dextran-FITC* que l'échantillon *DWNT-AG*. Ainsi, il semblerait que la présence des *DWNT* n'affecte que modestement le relargage dans ces conditions expérimentales.

*Tableau 4-2 : Calcul de la molarité après gonflement/relargage (spectroscopie de fluorescence) des échantillons CTRL-AG & DWNT-AG (1 mM Dextran-FITC)*

Echantillon	<i>N</i> (mol) (gonflement mesuré)	<i>N</i> (moles) (relargué)	% de relargage
<i>CTRL-AG</i>	$2,8310^{-8}$	$2,6610^{-8}$	94,24
<i>DWNT-AG</i>	$2,9310^{-8}$	$2,6110^{-8}$	89,25

*Cette étude permet de comprendre comment le dispositif soumis à un environnement extérieur extrême simulé par la sueur artificielle se comporte du point de vue du relargage.*

*Les échanges interdisciplinaires dans le cadre du projet « Nanoderm (Défi Nano CNRS) » et notamment avec des médecins diabétologues ont permis de connaître la quantité d'insuline journalière nécessaire à un patient pour permettre de réguler le taux de glucose. Le *Tableau 4-3* ci-dessous propose de mettre en regard les quantités actuelles administrées à des patients atteints de diabète et ce que le dispositif peut contenir.*

<i>Tableau 4-3 : Estimation de la capacité de stockage du dispositif.</i>	
<i>Relargage</i>	
<i>Quantité de Dextran-FITC relargué</i>	<i>2,61.10<sup>-8</sup>mol</i>
<i>Masse de Dextran-FITC relargué</i>	<i>106,4 µg</i>
<i>Correspondance</i>	<i>2,8 Unités / Dispositif</i>

*On remarque que nos dispositifs dans l'état actuel ne peuvent relarguer que 2,8 unités alors que les besoins quotidiens d'un enfant et d'un adolescent sont respectivement de 4 et 25 unités. L'insuline commercial contient généralement 100 unités / mL et 1 unité correspond à 37,5 µg d'insuline. Néanmoins, le but est d'obtenir un dispositif comprenant un réseau d'électrodes permettant chacune de contenir du principe actif. Il faudrait donc un réseau de 10 dispositifs ou encore deux électrodes de 1,5 cm de diamètre et 0,7 mm d'épaisseur (volume de 0,25 mL soit 25 unités) pour contenir la dose journalière que s'administre un adolescent en supposant que toute la solution est relarguée au travers de la peau sous l'effet du champ électrique. A ce stade des recherches, la dimension et la géométrie des électrodes dans le futur dispositif ne sont pas encore figées et nécessitent de plus amples investigations. La géométrie circulaire semble être la plus adaptée pour permettre d'éviter les effets de bord et ainsi contrôler le séchage des dispositifs*

#### ***D. Stabilité des hydrogels en fonction du pH***

Dans le cadre de ces travaux nous nous sommes intéressés à la gamme de stabilité des hydrogels d'agarose en fonction du pH. Le but de ces travaux est de déterminer quelle est la fenêtre d'utilisation d'un tel dispositif. Effectivement la gamme de stabilité (en pH) définira quels types de molécules pourront être utilisées pour la délivrance.

La *Figure 4-9* illustre le taux de gonflement des échantillons *CTRL-AG* et *DWNT-AG* en fonction du pH. On peut clairement observer une similitude de comportement de tous les échantillons mesurés. L'agarose est stable en terme de gonflement et ce quelle que soit la valeur du pH (3-7,4). En revanche, on peut remarquer que dans la majorité des cas, l'échantillon *CTRL-AG* atteint un pourcentage de récupération supérieur à l'échantillon *DWNT-AG*, typiquement entre 20 et 25% de sa masse initiale. Néanmoins, l'incertitude est assez importante et démontre bien la grande variabilité des échantillons *CTRL-AG*. Les barres d'erreurs de l'échantillon *DWNT-AG* sont beaucoup plus faibles. Le taux de récupération se situe entre 20 et 22%.

Il semblerait tout de même que dans le PBS (*pH 7,4*) et notamment avec la présence des ions, l'hydrogel sans *DWNT* regonfle légèrement moins que les autres. Ces mesures permettent d'apporter la vérification de la stabilité de l'agarose en fonction du pH dans une gamme encadrant les conditions d'utilisation pour l'application visée, mais également la



reproductibilité de gonflement de nos échantillons avec et sans *DWNT* dans une solution à pH variable.

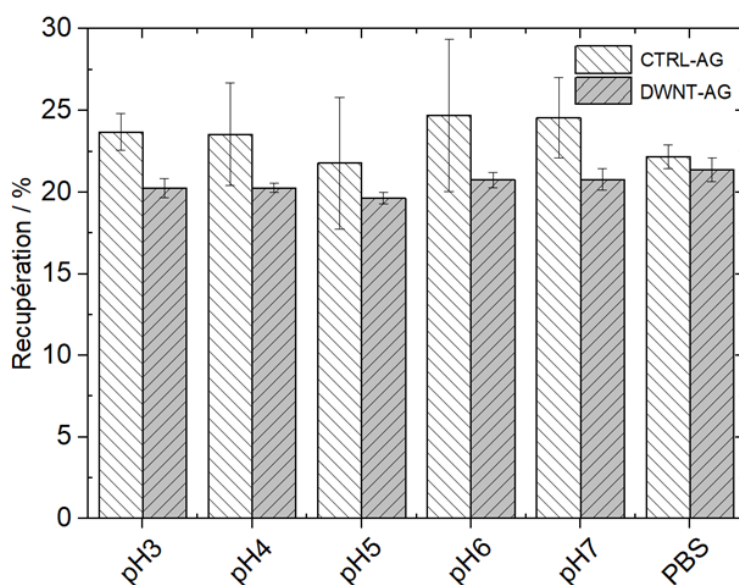


Figure 4-9 : Mesure de récupération par rapport à la masse d'eau au temps  $t$  et  $t_0$  ( $\frac{m_{H_2O}(t)}{m_{H_2O}(t_0)} \times 100$ ) en fonction du pH des échantillons CTRL-AG et DWNT-AG.

### E. Relargage des DWNT en conditions extrêmes

Le matériau étant à présent caractérisé et le procédé d'élaboration stabilisé, nous avons souhaité étudier le potentiel relargage des *NTC* dans une solution exposée à une température et une composition extrême du milieu. Comme décrit au *chapitre 2*, un protocole de vérification a été développé (cf. *Spectroscopie Raman*). Il consiste à placer les échantillons *DWNT-AG* dans une solution de sueur artificielle à différentes températures. Pour ce faire, nous avons préparé un matériau ayant une concentration bien plus importante de l'ordre de 40% massique de *DWNT* par rapport au polymère, afin de s'assurer de la détection des *DWNT* en spectroscopie Raman en cas de relargage.

Ces expériences ont pour but de mimer un contact entre l'échantillon *DWNT-AG* et la peau et plus précisément la sueur humaine et la température qui pourrait potentiellement jouer un rôle dans la dégradation du dispositif. Pour ce faire, nous avons effectué plusieurs mesures de contrôle permettant de connaître la réponse Raman des différents composants comme l'agarose, les *DWNT* ainsi que la sueur artificielle<sup>261</sup> dans une gamme de nombres d'onde comprise entre 1200 et 3000  $\text{cm}^{-1}$  et également plus largement dans une gamme de nombres d'onde étendue allant de 500 à 3000  $\text{cm}^{-1}$ .

## E.i. Détection de l'agarose et des DWNT par spectroscopie Raman

La Figure 4-10(a) présente le spectre Raman de l'agarose sur deux zones différentes de l'échantillon. On note la présence de pics, entre 1200 et 1500  $\text{cm}^{-1}$ , mais également à partir de 2900  $\text{cm}^{-1}$  qui semblent caractéristiques de l'agarose. L'origine de ces pics sera investiguée dans la suite de cette étude.

Le spectre Raman des DWNT <sup>266</sup>( $\lambda = 633 \text{ nm} / X100$ ) sur la Figure 4-10(a) montre que seul le pic de la « bande D » des NTC, à 1319  $\text{cm}^{-1}$ , est situé dans la zone de l'agarose (1200-1500  $\text{cm}^{-1}$ ). Néanmoins le pic le plus intense des NTC est situé à 1583  $\text{cm}^{-1}$  correspondant à la « bande G », hors du spectre de l'agarose et permet ainsi leur identification sans aucune hésitation.

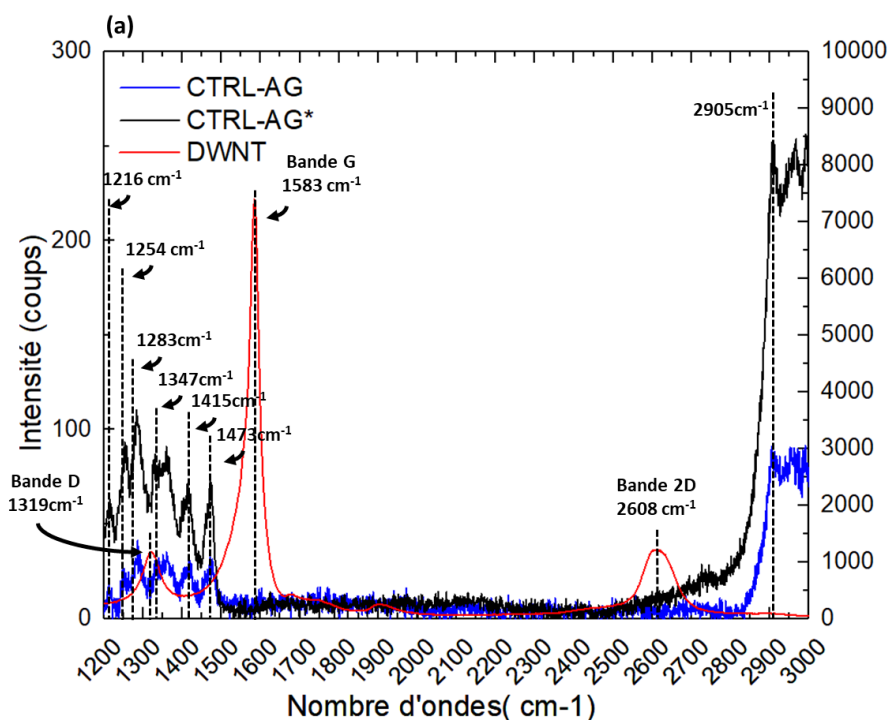


Figure 4-10 : (a) Spectre Raman ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ) d'un échantillon CTRL-AG déshydraté (CTRL-AG, et CTRL-AG\* correspondant à deux zones différentes) (échelle de gauche), et d'un échantillon de DWNT brut à l'état sec (échelle de droite).

Ces analyses préliminaires permettent de mieux connaître nos matériaux en termes de réponse en spectroscopie Raman. Ces données serviront de référence afin de vérifier la présence potentielle des DWNT dans le milieu d'exposition après incubation et filtration à l'aide d'une membrane en nitrate de cellulose.

### a. Spectre Raman de l'agarose

Certaines publications <sup>321-323</sup> décrivent les modes vibrationnels par spectroscopie Raman et infrarouge de l'agar ce qui permet de déterminer la nature des vibrations mesurées. La Figure 4-11 reprend le spectre Raman de la Figure 4-10(a) dans une gamme étendue de nombre d'onde, 500-1400 $\text{cm}^{-1}$ . Les pics identifiés, à 740, 772, 837, 890, 1050, 1280  $\text{cm}^{-1}$  coïncident avec les pics mesurés pour l'agarose. En effet, les pics 740, 772  $\text{cm}^{-1}$  ( $\beta$ -galactose) représentent le mode de vibration squelettique (ensemble atomique de la molécule) de l'agar et de l'agarose (*famille des galactans*). Les pics à 840, 891, 1079  $\text{cm}^{-1}$  correspondent à la déformation (*stretching*) des liaisons CH (CC, CO, COH).

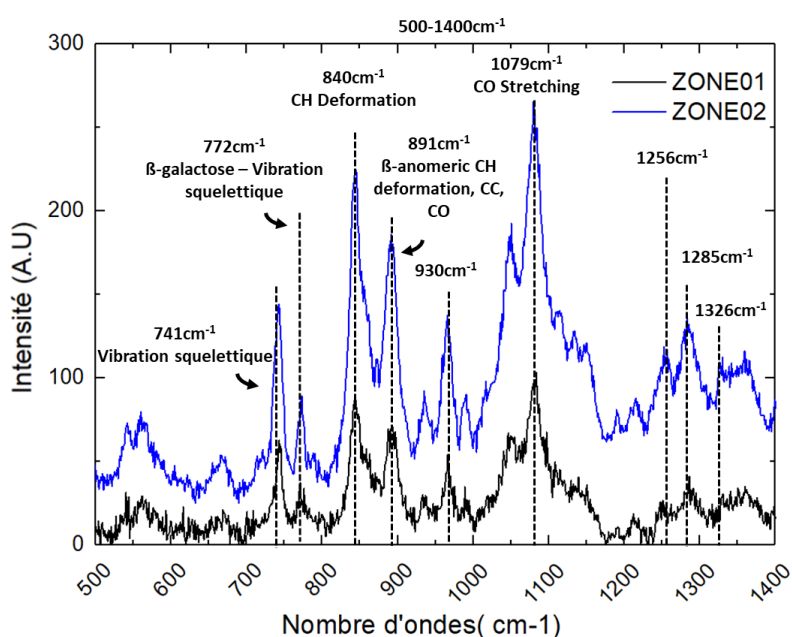


Figure 4-11 : Spectre Raman ( $\lambda=633\text{nm}$ ) d'un échantillon CTRL-AG (même échantillon que dans la figure 4-10) déshydraté effectué sur deux zones différentes dans la gamme 500-1400  $\text{cm}^{-1}$

### E.ii. Tests de relargage de l'échantillon DWNT-AG à 50 et 80°C

Nous nous intéressons maintenant aux échantillons DWNT-AG40%*m* imprégnés d'une solution de sueur artificielle et incubés à différentes températures, 50°C et 80°C pendant 24 h. Ces températures sont excessives dans le cadre de l'application envisagée mais permettent de tester le matériau en conditions réellement extrêmes. La Figure 4-12(a) montre le spectre Raman de la solution filtrée après incubation à 50°C d'un hydrogel contenant 40%*m* de DWNT/Agarose. Les images des différentes zones observées (mesurées en Raman) à la surface de la membrane en nitrate de cellulose illustrent des morphologies assez différentes. En effet, certaines zones (01 et 03) sont transparentes et d'autres sont noires (02), signe caractéristique de la présence des DWNT. Les zones 01-02 ne montrent aucune réponse en spectroscopie Raman. Le spectre Raman de la zone 03 met en évidence les mêmes pics que pour l'agarose seule et démontre l'absence de DWNT (*pic caractéristique du carbone à 1583  $\text{cm}^{-1}$  absent*).

L'encart dans la *Figure 4-12(a)* illustre la réponse du filtre composé en nitrate de cellulose nous servant de substrat et ne présentant aucun pic caractéristique.

L'expérience a aussi été réalisée à 80°C. Les résultats sont présentés sur la *Figure 4-12(b)*. Les images représentent différentes zones en surface de l'échantillon, semblables à des fibres teintées de noir potentiellement composées d'agarose et de DWNT. Rappelons qu'une température de 80°C est de l'ordre du point de fusion de l'agarose (87°C).

Les mesures réalisées en spectroscopie Raman de ces différentes zones ont été analysées, on peut observer deux pics très proches de la bande G (1583 cm<sup>-1</sup>) de l'échantillon témoin des DWNT bruts. Ces pics se situent à 1568 et 1599 cm<sup>-1</sup>, ce qui pourrait être la démonstration du relargage des DWNT encapsulés dans l'agarose.

Par ailleurs, on peut remarquer que les pics de l'agarose sont décalés, notamment entre 1211-1658 cm<sup>-1</sup>. Ce décalage pourrait être expliqué par une dégradation de l'agarose dans ces conditions expérimentales (24 heures à 80°C).

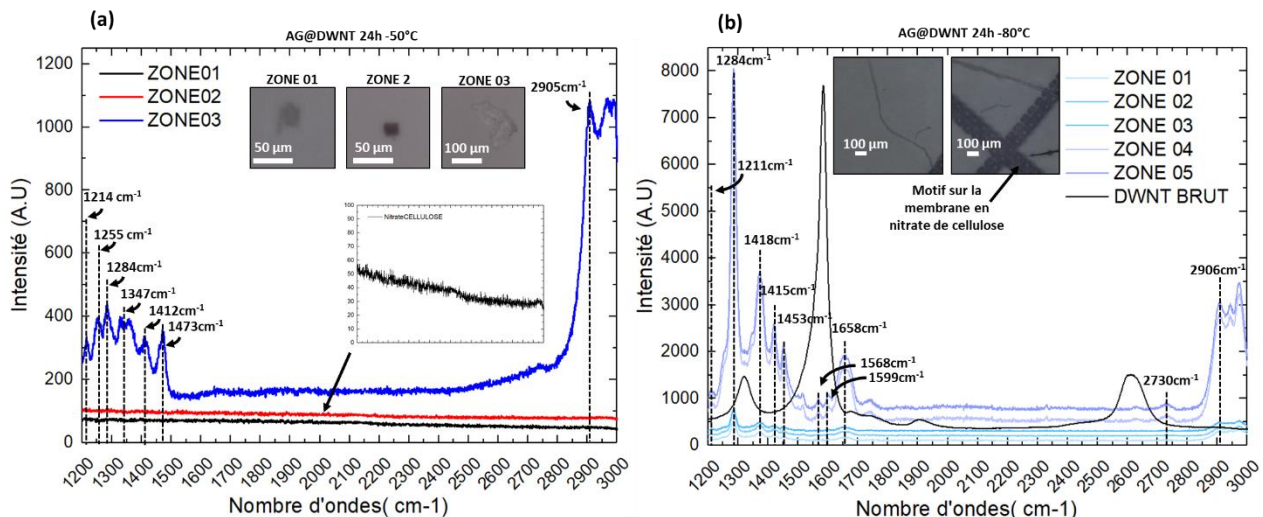


Figure 4-12 : (a) Spectres Raman ( $\lambda=633\text{nm}$ ) sur plusieurs zones de l'échantillon DWNT-AG40% incubé pendant 24 h à 50°C dans une solution de sueur artificielle, l'encart présente la réponse Raman de la membrane en nitrate de cellulose et les images représentent les différentes zones analysées en surface de la membrane (b) Spectres Raman sur plusieurs zones de l'échantillon DWNT-AG40% incubé pendant 24 heures à 80°C dans une solution de sueur artificielle, les images représentent les différentes zones analysées en surface de la membrane.

Le *Tableau 4-4* recense les mesures effectuées sur chaque composant de l'expérience comme les DWNT, l'échantillon CTRL-AG (agarose seul), la sueur artificielle, et les échantillons DWNT- AG50°C/80°C.

On peut observer que les échantillons CTRL-AG, DWNT-AG50°C sont sensiblement similaires ce qui illustre le fait que l'agarose n'est pas modifiée à une température de 50°C pendant 24 heures. En revanche, pour l'échantillon DWNT-AG80°C, il semble que certains pics par exemple 772 cm<sup>-1</sup> (pic caractéristique) soient absents. Ce pic provient de la vibration

squelettique de l'agarose, son absence permet donc de mettre en évidence une possible dégradation de l'agarose dans ces conditions expérimentales.

Le *Tableau 4-4* recense également les pics Raman de la solution de sueur artificielle séchée et réduite à l'état de poudre. On observe une multitude de pics, à priori caractéristiques des différents sels <sup>261</sup>en présence comme les chlorures de sodium, potassium, calcium, etc., qui ne correspondent dans aucun des cas à l'agarose ou aux DWNT ce qui illustre un bon rinçage des échantillons

*Tableau 4-4 : Recensement des pics observés pour les différents échantillons mesurés (gamme 500- 2600 cm<sup>-1</sup>)*

Nombre d'ondes (cm <sup>-1</sup> )				
CTRL-AG	DWNT-AG 50°C	DWNT-AG 80°C	DWNT	Sueur Artificielle
.....	Absent	628	.....	.....
.....	Absent	697	.....	.....
741	741 (Vibration squelettique)	741	.....	.....
.....	Absent	Absent	.....	758
772	772(Vibration squelettique)	Absent	.....	.....
891	891	898	.....	.....
.....	Absent	Absent	.....	916
937	937	Absent	.....	.....
.....	Absent	Absent	.....	1034
.....	Absent	Absent	.....	1045
.....	Absent	Absent	.....	1187
1256	1256	Absent	.....	.....
1285	1285	1286	.....	.....
.....	Absent	Absent	.....	1295
.....	Absent	Absent	1319	.....
.....	Absent	Absent	.....	1389
.....	Absent	Absent	.....	1404
.....	Absent	Absent	.....	1465
.....	Absent	Absent	.....	1543
.....	Absent	1568	.....	.....
.....	Absent	???	1583	.....
.....	Absent	1599	.....	.....
.....	Absent	Absent	.....	1639
.....	Absent	Absent	2608	.....

Aucun signal correspondant à des NTC n'a pu être détecté lorsque les échantillons ont été placés à 50°C pendant 24 h, ce qui confirme que les NTC sont bien piégés à l'intérieur de l'hydrogel. Toutefois, il semblerait que des temps d'immersion longs provoquent divers phénomènes liés à la dégradation de l'agarose dans cet environnement particulièrement agressif, bien que sa température de solubilisation dans l'eau soit de 87°C. Par ailleurs, la possible présence de DWNT a été détectée ce qui illustre la potentielle toxicité et les limites de l'agarose dans ces conditions expérimentales extrêmes.

## F. Caractérisations morphologiques

### F.i. Analyse MEB

Nous avons effectué une caractérisation morphologique de l'échantillon *DWNT-AG1% m*, afin d'observer la dispersion des *DWNT* au cœur et à la surface du matériau déshydraté.

La *Figure 4-13* montre des clichés MEB d'un échantillon *DWNT-AG* sur la surface et la tranche à différents grossissements. On observe sur la *Figure 4-13 (a, a', a'')* l'arrangement des *DWNT* et l'état de surface de l'échantillon.

La surface (*Fig.4-13(a)*) est relativement hétérogène avec une zone clairement différente des autres. En effet il semblerait que la surface de l'échantillon et le cœur soient de composition différente (voir l'encadré). Il se forme probablement une fine pellicule de polymère entre l'extrême surface de l'échantillon en contact avec l'air ambiant et le cœur de celui-ci gélifiant plus lentement que la surface. On peut penser que les *DWNT* se retrouvent exclus et repoussés vers l'intérieur, engendrant la formation de cette couche (*quelques nm*). Notons que cette couche peut modifier les propriétés électriques de notre matériau, en apportant une composante capacitive, créant ainsi une barrière résistive en surface.

La *Figure 4-13(a')* illustre un grossissement de la surface, sur la zone dépourvue de cette couche. On peut remarquer des formes de taille et nature différentes. Les flèches blanches indiquent des agglomérats constitués de carbone désorganisé mais également de *NTC*. A plus fort grossissement (*Fig.4-13(a'')*), on note la présence de faisceaux de *DWNT*, interconnectés entre eux, au travers de la surface.

La *Figure 4-13(b, b', b'')* montre des images de la tranche du matériau. La *Figure 4-13(b')* met en évidence une nette stratification du matériau, liée à l'étape de séchage. En effet, lors de l'étape de séchage, chaque couche du réseau se superpose pour ainsi former un empilement de feuillets. La *Figure 4-13(b'')* permet de mieux observer cet effet de stratification des feuillets d'agarose et également la présence de *DWNT* interconnectés entre eux formant des faisceaux comme observés à la surface du matériau (*Fig.4-13(a'')*). On peut également penser que lors du séchage, les *DWNT* pourraient s'orienter dans le plan des aux feuillets, ce qui pourrait engendrer une anisotropie de la conductivité électrique.

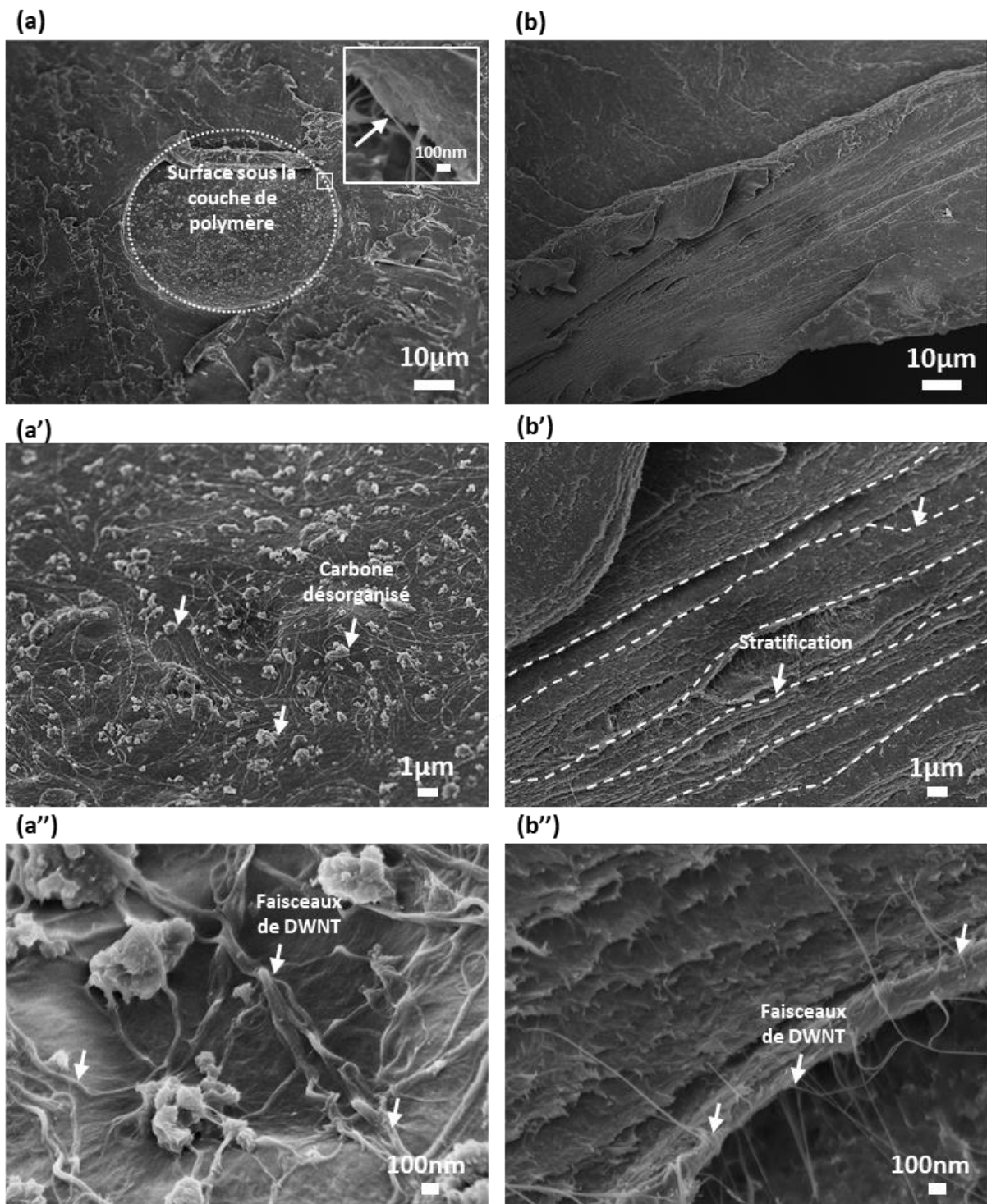


Figure 4-13 : (a, a', a'') Observations MEB à différents grossissements de la surface de l'échantillon DWNT-AG à l'état déshydraté. (b, b', b'') observations MEB à différents grossissements de la tranche de l'échantillon DWNT-AG à l'état déshydraté.

### a. Mécanisme d'assemblage

L'organisation des DWNT au sein de l'hydrogel peut évoluer au cours du séchage. Effectivement, la Figure 4-14(a) illustre le comportement des DWNT lorsqu'ils sont mélangés

aux chaînes d'agarose de la solution à une température de 90°C. A cette étape, les DWNT s'intercalent entre les chaînes de polymère formant ainsi une suspension *agarose/DWNT*.

Lorsque le mélange est disposé en boîte de pétri, la température diminue, ce qui a pour conséquence d'augmenter la viscosité jusqu'à la gélification du système. Au fur et à mesure que les chaînes de polymère s'enchevêtrent pour former le réseau, les DWNT s'alignent et suivent ces domaines formant ainsi des faisceaux, s'orientant de la même façon que les chaînes d'agarose enchevêtrées.

Il semblerait que lors du séchage les chaînes d'agarose provoquent l'apparition de feuillets empilés les uns sur les autres (*Fig.4-14(b)*) étant contraints mécaniquement, notamment du fait que la déformation s'opère essentiellement sur l'épaisseur. Le séchage (*Fig.4-14(c)*) provoque le rapprochement des chaînes mais également des DWNT. Les observations pourraient donc suggérer que lors du séchage les DWNT s'orientent préférentiellement dans le plan de l'échantillon.

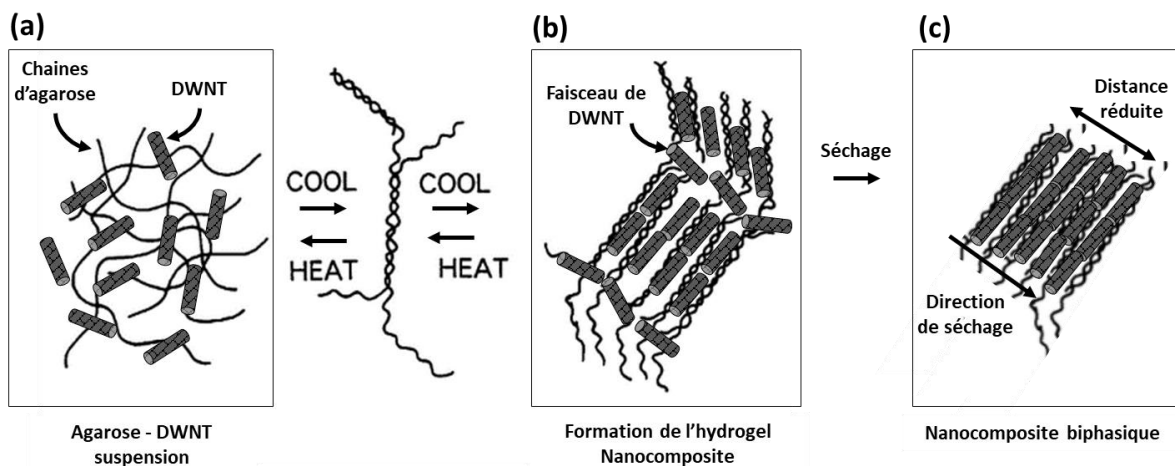


Figure 4-14 : Illustration de l'arrangement des DWNT selon l'étape de préparation (a), (b), (c).

L'étude de la microstructure des échantillons DWNT-AG a permis de mettre en évidence un état de dispersion « effectif » des DWNT dans le nanocomposite à l'état déshydraté. On observe également que les DWNT semblent se rétracter sous une pellicule de polymère provenant de l'étape de séchage ou de la gélification du matériau. Par ailleurs, il semblerait que le séchage laisse le temps aux DWNT de s'orienter selon la conformation qu'adopte l'agarose. En effet, les plans se superposent les uns les autres conduisant ainsi à une stratification du matériau.

## G. Caractérisations électriques

Des caractérisations électriques ont été effectuées à plusieurs niveaux. En effet, dans un premier temps, nous avons évalué les propriétés électriques de nos matériaux à l'état initial pour les échantillons CTRL-AG et DWNT-AG de 0 à 1% massique en DWNT. Les expériences



complémentaires ont nécessité d'augmenter la charge en *DWNT* afin de déterminer le seuil de percolation des *DWNT*. Le but de ces expériences est de démontrer par spectroscopie d'impédance la percolation des nanotubes au travers du réseau polymérique. La complexité de ce matériau réunissant 3 phases à savoir une phase liquide (eau ou l'eau ionisée) et deux phases solides, les *DWNT* ainsi que le polymère, conduit à une interprétation complexes des phénomènes de conduction électrique.

## G.i. Spectroscopie d'impédance

### a. Mesures sur les hydrogels et hydrogels nanocomposites

La caractérisation électrique des échantillons comprenant de 0 à 1% massique en *DWNT* (par rapport à l'agarose) a été effectuée dans l'eau désionisée (5 lavage à l'eau Di) mais également dans la solution utilisée pour les expériences *ex vivo* à savoir du PBS (5 lavage au PBS) composé d'une solution aqueuse d'ions (*NaCl – KCl*) afin d'observer les différents comportements caractéristiques de chaque étape. Nous avons effectué des mesures sur 4 échantillons différents pour chaque concentration, un balayage fréquentiel de 1 MHz à 1 Hz (100 mV) en prenant 10 points par décades (Chapitre 2 Spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE)).

La Figure 4-15(a) illustre un diagramme de Nyquist, représentant les mesures des échantillons *DWNT-AG* de 0 à 1% dans l'eau désionisée ainsi que le modèle électrique équivalent. Concernant l'influence des *DWNT*, on remarque que, quel que soit l'échantillon, la valeur de la résistance relevé est très proche. La valeur de la résistance correspond à l'intersection de la courbe de Nyquist avec l'axe des abscisses. Toutefois, pour être correct il faut prendre en compte l'épaisseur des échantillons, en effet si l'épaisseur varie alors la résistance varie également, c'est pour ces raisons que l'on se reportera uniquement aux valeurs de conductivité présentées dans le Tableau 4-5.

Toutefois, la courbe de Nyquist ne nous permet pas de mettre en évidence la percolation des *DWNT*. En effet, si tel était le cas nous devrions observer le phénomène capacitif traduit par un demi-cercle puis à l'intersection des abscisses une multitude de point traduisant la percolation des *DWNT* (cf : Chapitre 2) ce qui n'est pas le cas ici.

Néanmoins, nous devrions alors mesurer la conductivité de l'eau désionisée qui normalement ne conduit que très peu le courant (valeur de la conductivité d'approximativement de 0,0004 mS.cm<sup>-1</sup> par électro-conductimétrie). Les conductivités mesurées pour ces échantillons varient de 0,041 à 0,051 mS.cm<sup>-1</sup> (Tab.4-5), ce qui suggère qu'il ne s'agit pas de l'eau mais en fait de la présence en faible quantité d'ions provenant de l'agarose.

Les mesures d'impédance lorsque les échantillons sont imprégnés de solution ionique (PBS) illustré en Figure 4-15(b), montrent d'une part qu'il n'y a plus de demie cercle, signe significatif que la présence des ions influence les propriétés électriques de nos matériaux. En effet, le modèle du circuit équivalent n'est dans ce cas plus une résistance et une capacité en parallèle

mais uniquement une résistance (ionique) pure. On remarque également qu'en fonction de la concentration en nanotube de carbone, un décalage (très modéré) vers les valeurs de résistivité plus basses apparaît. Plus la concentration en DWNT augmente et plus la valeur de résistivité semble diminuer, on mesure une conductivité de  $12,2 \text{ mS.cm}^{-1}$  pour l'échantillon CTRL-AG contre  $14,4 \text{ mS.cm}^{-1}$  pour l'échantillon DWNT-AG1%. Les DWNT ne semblent pas dans ces conditions expérimentales agir sur les propriétés électriques du matériau, en effet la variation de conductivité n'est pas significative et ce dans les deux cas (*eau et PBS*) (les variations observées semblent liées à l'incertitude de mesure).

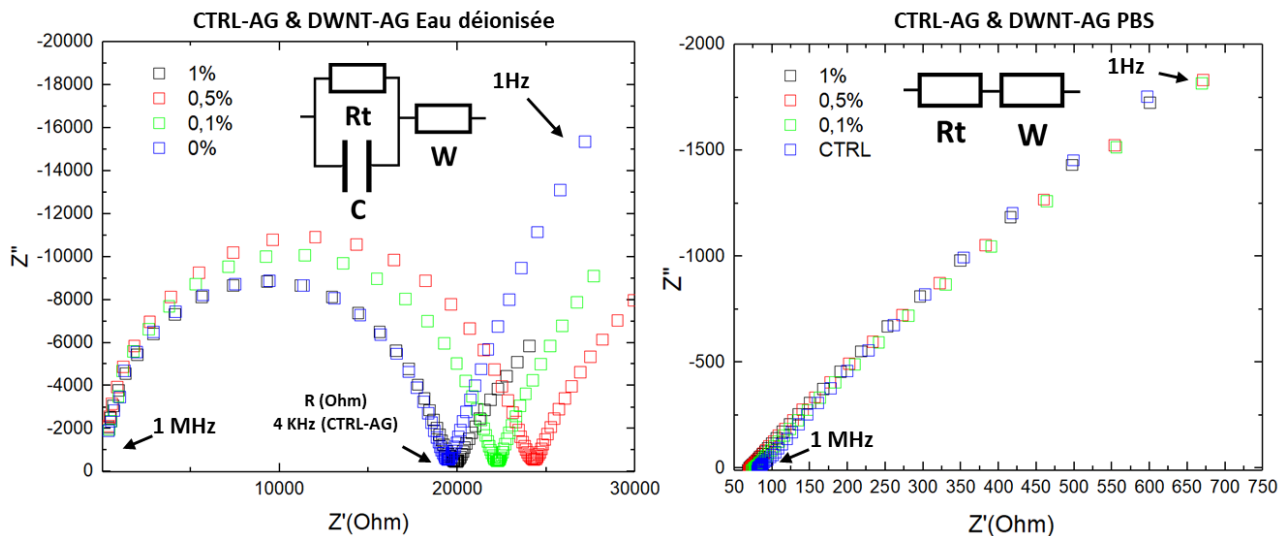


Figure 4-15 : (a) Spectres d'impédance électrochimique (Nyquist) des échantillons DWNT-AG de 0 à 1% massique de DWNT(agarose) dans l'eau Di ; (b) Spectres d'impédance (Nyquist) électrochimique des échantillons DWNT-AG de 0 à 1% massique de DWNT (agarose) dans une solution de PBS (à noter que ces résultats pourraient être exprimés en diagramme de BODE) – on applique une amplitude de 100 mV entre 1Hz et 1 MHz.

Tableau 4-5 : Valeur de résistivité/ conductivité en fonction des concentrations en DWNT et le milieu aqueux.

Echantillons	Concentration en DWNT	H <sub>2</sub> O Di	PBS
		Conductivité ( $\text{mS.cm}^{-1}$ )	Conductivité ( $\text{mS.cm}^{-1}$ )
CTRL-AG	0%	$0,051 \pm 0,0022$	$12,2 \pm 2$
DWNT-AG	0,1%	$0,044 \pm 0,0021$	$13,1 \pm 1,6$
DWNT-AG	0,5%	$0,041 \pm 0,0025$	$14,1 \pm 0,27$
DWNT-AG	1%	$0,05 \pm 0,0034$	$14,4 \pm 0,20$

La conduction électrique dans notre matériau soit dans ces conditions expérimentales gouvernées par le liquide et plus précisément par les ions présents qui proviennent de l'agarose. Ces mesures ne montrent pas un comportement de percolation des DWNT au travers

*de l'hydrogel mais illustrent un phénomène de conduction ionique que l'on observe très clairement en présence de PBS.*

### ***b. Mécanismes***

La conduction électrique dans les liquides et principalement les liquides isolants (eau désionisée) provient de la contribution de plusieurs phénomènes : électrique, électrochimiques, électro-hydrodynamiques, physico-chimiques.

On distingue deux zones à savoir le volume et l'interface électrode/liquide dans lesquels se produisent différents phénomènes. Dans le volume, il se produit une dissociation ou l'ionisation des molécules, le mouvement du fluide et enfin l'échauffement du fluide sous l'influence du champ électrique. Ces phénomènes apparaissent à différents champs électriques appliqués en fonction du matériau étudié. Les porteurs de charges au sein du liquide apparaissent par dissociation-recombinaison des molécules neutres engendrées par interactions moléculaire provenant de l'agitation thermique.

Aux interfaces liquide-solide, la conduction est gouvernée par les ions, il est difficile d'approximer les phénomènes d'injection des porteurs de charge par l'effet « *Schottky* » ou l'effet « *Fowler-Nordheim* », phénoménologie largement étudiée pour les matériaux solides. Pour permettre d'expliquer plus justement l'injection des porteurs de charges, il est préférable d'utiliser les théories électrochimiques comme la théorie de la double couche. Cette double couche est constituée de :

- ❑ *La couche compacte (caractéristique de l'épaisseur) qui provient du saut brusque de potentiel dans les couches en contact avec le solide (électrodes). Il se produit un arrangement des ions et des dipôles dans une couche de liquide adsorbé sur la surface solide.*
- ❑ *La couche diffuse qui est la différence de potentiel résultante entre la couche compacte et le liquide.*

La théorie de la double couche électrique permet de décrire la variation du potentiel électrique en regard d'une surface. Ce phénomène est principalement observé dans le cas de systèmes colloïdaux et pour les solutions liquides (même sans la présence d'un champ électrique). Les surfaces en contact avec un liquide (*Fig.4-16*) sont chargées positivement ou négativement (électro neutralité), ces charges proviennent de la dissociation des molécules de surface. Ces dissociations dépendent de nombreux facteurs comme la nature des espèces ou encore le pH.

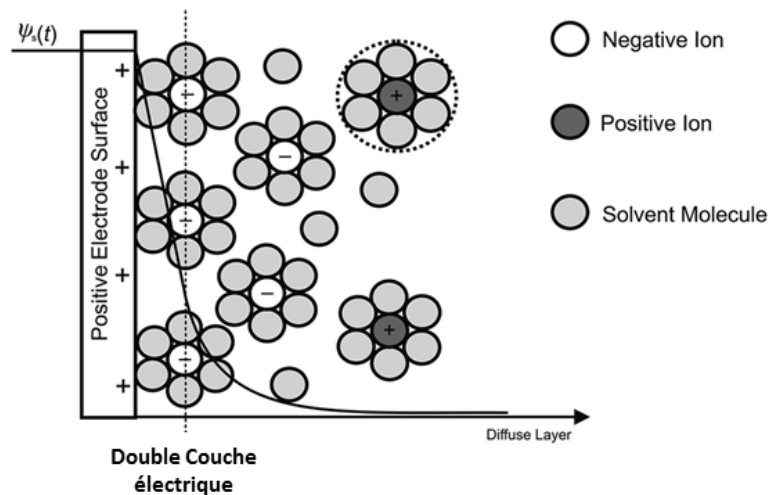


Figure 4-16 : Représentation usuelle de la double couche électrochimique à la surface d'un matériau solide.<sup>324</sup>

Les mesures présentées dans ces travaux permettent de préciser le comportement électrochimique de notre matériau soumis à un champ électrique de faible amplitude. Pour développer ces résultats et mieux comprendre les phénomènes de conduction un approfondissement des recherches est nécessaire. L'étude de la conductivité ionique nécessite de prendre en compte de nombreux paramètres tel que la concentration, le type d'ions en présence, la température ainsi que la géométrie des électrodes ou leurs natures. Dans notre cas, la question est plutôt de savoir s'il est possible d'atteindre la percolation des DWNT dans ce système triphasique, agarose-DWNT-eau.

### c. Mesure d'une solution d'agarose (en poudre)

La Figure 4-17 illustre la variation de conductivité ionique en fonction de la masse en agarose dans un volume de 100 mL d'eau désionisée. Rappelons que l'agarose n'est que peu dissoute dans ces conditions et sédimente pour l'essentiel au fond du récipient. On observe une évolution de la conductivité proportionnelle à l'ajout d'agarose dans la solution. A 2,5 g d'agarose ( $25 \text{ g.L}^{-1}$ ), la conductivité mesurée est de  $0,14 \text{ mS.cm}^{-1}$ . Cette valeur est plus élevée que celle mesurée précédemment en spectroscopie d'impédance qui était de  $0,051 \text{ mS.cm}^{-1}$ . Cette variation de conductivité provient du fait que dans un cas, les ions sont libres dans la solution aqueuse et peuvent donc se déplacer très facilement. Lorsque l'agarose est sous forme d'hydrogel, les ions sont également libres mais leurs déplacements est restreint/contraint par le réseau tridimensionnel formé.

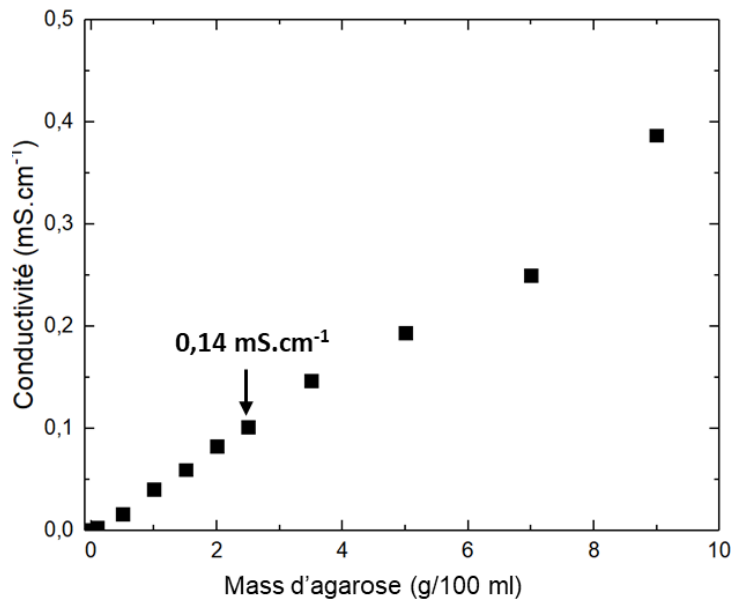


Figure 4-17 : Mesures conductimétriques illustrant la variation de la conductivité de l'eau (100 mL) à température ambiante en fonction de masse d'agarose ajoutée (rappelons que dans ces conditions, l'agarose n'est que très peu soluble).

Ces premières mesures électriques sur nos hydrogels nanocomposites illustre l'impossibilité de mettre en évidence la percolation électrique des DWNT. En effet il semblerait que soit la conductivité ionique prenne le dessus sur la conductivité des DWNT, soit que le taux de DWNT soit trop faible pour atteindre la percolation. Conductivité attribuée à la présence d'ion dans l'agarose et ceux même en procédant à des rinçages successifs.

#### d. Mesure des échantillons déshydratés puis regonflés

Le fait de déshydrater puis de regonfler les échantillons conduit à des variations de la concentration volumique en NTC. Puisque le matériau ne retrouve pas sa capacité de rétention initiale, cela revient à augmenter le % volumique des DWNT et donc de les rapprocher les uns les autres. En effet, à l'état initial la concentration de DWNT maximum est de 1% massique par rapport au polymère ce qui représente 0,025% de la masse totale de l'échantillon. Ainsi, les échantillons DWNT-AG ne récupèrent que 21% de leur masse initiale, ce qui revient à 0,1% massique de DWNT par rapport à la masse totale de l'échantillon regonflé. Le Tableau 4-6 recense les différentes valeurs de conductivité mesurées dans les mêmes conditions que précédemment pour les échantillons DWNT-AG1%*m* et CTRL-AG. On remarque que l'échantillon DWNT-AG possède une résistivité légèrement inférieure à l'échantillon CTRL-AG. Par ailleurs on peut observer une diminution de conductivité ionique des échantillons par rapport à l'état initial. En effet l'échantillon DWNT-AG présente à l'état initial une conductivité de 69,1 mS.cm<sup>-1</sup> contre 3,2 mS.cm<sup>-1</sup> pour l'échantillon DWNT-AG regonflé. Il en va de même pour l'échantillon CTRL-AG qui à l'état initial possède une conductivité de 81,5 mS.cm<sup>-1</sup> contre 2,7 mS.cm<sup>-1</sup> à l'état regonflé. Le séchage induit

l'augmentation du % volumique de nanotube dans le matériau mais ne permet pas d'observer la percolation des DWNT, et de plus n'influence que modérément les propriétés électriques du matériau à l'état regonflé.

Tableau 4-6 : Valeur de conductivité en fonction des concentrations en DWNT et le milieu aqueux.

Echantillons	Concentration en DWNT	PBS (Initiale)	PBS (Regonflé)
		Conductivité (mS.cm <sup>-1</sup> )	Conductivité (mS.cm <sup>-1</sup> )
CTRL-AG	0%m	12,26	2.7
DWNT-AG	1%m	14,40	3.2

Ces mesures démontrent l'effet du séchage sur les propriétés électriques des matériaux à l'état regonflé. En effet, il semblerait que la diminution de conductivité électrique provienne du fait que l'hydrogel en séchant forme comme précédemment évoqué une superposition de feuillets en polymère et ne regonfle pas intégralement. Ce phénomène induit donc un volume au cœur du réseau assez dense dans lequel les ions ne circulent plus aussi librement qu'à l'état initial. Il est envisageable de penser que les DWNT créent dans la partie dense des passages préférentiels aux ions permettant un gain modéré de la conductivité.

Si l'on compare les valeurs en pourcentage massique (%m) de DWNT dans un matériau biphasique (1%m seuil optimal de percolation CNT/Epoxy) et d'un matériau triphasique on s'aperçoit que le pourcentage en DWNT par rapport à la masse totale de nos matériaux est en fait très faible. Effectivement, la percolation des DWNT est gouvernée par leurs facteurs géométriques (facteur de forme) mais et également par leur capacité à se disperser en voie liquide. Dans le cas d'un hydrogel, la présence de l'eau répartie au travers des pores du réseau en polymère représente une surface de contact assez conséquente avec l'électrode. De plus, l'expansion du réseau provoque l'éloignement des DWNT entre eux. On peut imaginer que le courant aura tendance à emprunter le milieu liquide pour traverser le matériau plutôt que les DWNT enrobés de polymère et donc plus résistifs. On peut donc émettre l'hypothèse que pour observer une conduction électronique, l'énergie apportée au système doit être plus importante pour permettre aux électrons d'emprunter la voie des DWNT.

#### e. Recherche du seuil de percolation des DWNT (Sans séchage)

Les mesures précédentes mettent en évidence le fait que la concentration à hauteur de 1% massique en DWNT par rapport au polymère n'a pas ou peu d'influence sur la conductivité électrique. En effet, la littérature décrit bon nombres d'exemples concernant la variation du seuil de percolation en fonction du procédé de dispersion, de la nature des NTC mais également du polymère utilisé. Ces mesures ont donc pour but de déterminer le seuil de percolation d'un nanocomposite hydrogel Agarose/DWNT<sup>64</sup>. En effet, pour certains polymères et NTC la conductivité maximum peut être atteinte pour des concentrations très élevées de

l'ordre de 60% massique. A l'inverse, dans certain cas la conductivité maximum est atteinte dès 0,01% massique comme dans certains époxy<sup>64</sup>.

Les mesures des matériaux sont réalisées de la même façon que précédemment. On prépare plusieurs hydrogels nanocomposites à 0, 10, 20, 30, 40% massique en *DWNT* par rapport au polymère. On obtient approximativement les mêmes allures de courbes que celles présentées en *Figure 4-15(a, b)* à la différence que les valeurs de conductivité augmentent avec l'ajout de *DWNT*. En effet, la conductivité à 0% est de 0,07 mS.cm<sup>-1</sup> contre 0,27 mS.cm<sup>-1</sup> pour l'échantillon à 40% en *DWNT*. Cet effet est également observé lorsque l'on remplace l'eau par du PBS où l'on mesure respectivement pour les échantillons 0 et 40%, 15,4 et 32 mS.cm<sup>-1</sup>.

Ces valeurs montrent une augmentation de la conductivité ionique mais ne démontrent toujours pas la percolation des *DWNT* au cœur de l'hydrogel nanocomposite. En effet, si le seuil de percolation était atteint nous devrions observer la même valeur de résistance et ce quelle que soit la fréquence, ce qui n'est pas le cas ici. Dans l'étude comportant le *PBS*, il est possible que le chemin de conduction par voie ionique soit préférentiel aux *DWNT* du fait d'une conductivité plus élevée. Toutefois cela n'explique pas le comportement dans l'eau désionisée.

Tableau 4-6 : Valeur de conductivité en fonction des concentrations en *DWNT* et le milieu aqueux.

Echantillons	Concentration en <i>DWNT</i>	<i>H<sub>2</sub>O Di</i>	<i>PBS</i>
		Conductivité (mS.cm <sup>-1</sup> )	Conductivité (mS.cm <sup>-1</sup> )
<i>CTRL-AG</i>	0%	0,074 ± 0,008	15,4 ± 1,5
<i>DWNT-AG</i>	10%	0,071 ± 0.018	18,4 ± 2
<i>DWNT-AG</i>	20%	0,098 ± 0.017	23,7 ± 0,47
<i>DWNT-AG</i>	30%	0,122 ± 0.02	32,2 ± 6
<i>DWNT-AG</i>	40%	0,27 ± 0,04	32 ± 4

*La spectroscopie d'impédance impose un potentiel de très faible amplitude ce qui ne relate pas la réalité des expériences ex-vivo qui seront développées par la suite. Effectivement, l'électroporation est une technique qui utilise des tensions de l'ordre de 50 à 1300 V, ces tensions peuvent faire intervenir d'autres phénomènes de conduction non visibles par cette technique.*

*L'idée est donc de déterminer quel est le type de conduction électrique dans le volume de l'hydrogel et de mettre en évidence (ou pas) la contribution des *DWNT*.*

## **G.ii. Mesures de courant de polarisation et conduction**

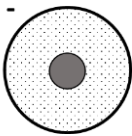
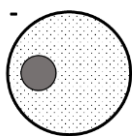

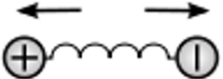

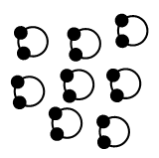
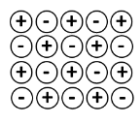
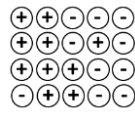
La suite de la caractérisation électrique de nos matériaux consiste à appliquer un champ électrique continu variable sur différentes préparations d'hydrogels. L'hydrogel

nanocomposite fabriqué possède trois phases à savoir l'eau, le polymère et les DWNT. Les expériences précédentes ont permis de déterminer la conductivité de l'électrolyte.

### a. Phénoménologie

Dans les matériaux à caractère isolant, la polarisation diélectrique décrit la capacité des éléments polaires (nuage électronique, molécules, ions) de ce matériau à s'orienter dans la direction du champ électrique imposé. Cet effet de polarisation est en décalage temporel avec le champ électrique. En effet, ce retard s'exprime par un déphasage en régime sinusoïdal, (déphasage absent en régime continu). Les éléments aux propriétés polaires présentent dans les matériaux différentes polarisabilités qui permettent donc d'être identifiées comme décrit dans le *Tableau 4-7*.

*Tableau 4-7 : Type de polarisation observée avec et sans champ électrique.*

Type de polarisation	Sans champ électrique	Avec champ électrique
<p><i>Electronique</i></p> <p><i>Déplacement orbital du nuage électronique par rapport au noyau</i></p>		
<p><i>Atomique</i></p> <p><i>Déplacement des atomes au sein de la molécule</i></p>		
<p><i>D'orientation</i></p> <p><i>Provient d'un moment dipolaire permanent (molécule polaire)</i></p>		
<p><i>De charge d'espace</i></p> <p><i>Charges partiellement liées qui se déplacent d'un piège à un autre</i></p>		

L'application d'un champ électrique aux bornes d'un matériau diélectrique fait intervenir les différents types de polarisations préalablement cités. Ces polarisations interviennent selon leurs temps de relaxation respectifs. En effet, dès que la fréquence augmente, on observe la contribution de ces différents phénomènes.

Par la suite, on cherchera à évaluer les mécanismes de conduction dans un matériau sous une polarisation continue. Dans notre cas, nous visualiserons donc la réponse d'un courant aux temps longs, nous aurons donc la représentation de la réponse à basses fréquences. A



contrario, les temps courts correspondent typiquement à une image de la réponse à haute fréquence.

Lorsqu'un matériau aux propriétés diélectriques est soumis à une tension continue, le courant résultant évolue en fonction du temps et il en résulte alors deux phénomènes distincts. Au temps courts, on observe un phénomène transitoire (Fig.4-18) qui se traduit par un pic de courant dépendant de la tension appliquée aux bornes de l'échantillon, mais qui est également sujet à la capacité à hautes fréquences du diélectrique considéré. Au fur à mesure du temps, une diminution du courant s'opère pour atteindre une valeur constante correspondant au phénomène de polarisation du matériau considéré mais aussi des interfaces matériau/électrode.

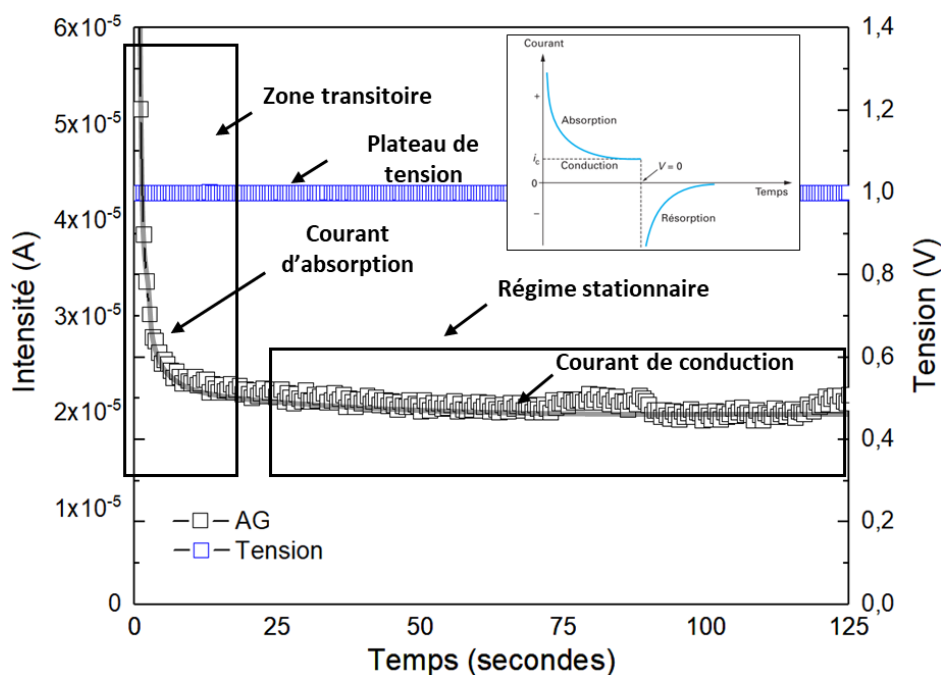


Figure 4-18 : Evolution du courant traversant un échantillon CTRL-AG en fonction du temps lors de l'application d'une tension continue aux bornes de l'échantillon. L'encadré représente la variation des courants d'absorption, de conduction et de résorption en fonction du temps dans un diélectrique solide soumis à un créneau d'une tension continue <sup>325</sup>.

Cette variation de courant au cours du temps peut mettre un temps très long avant de se stabiliser. Le courant de polarisation peut donc se décomposer en :

- ☐ Un courant d'absorption  $I_A$  qui correspond à la partie transitoire
- ☐ Un courant de conduction  $I_C$  qui lui correspond au régime stationnaire

En fait le courant d'absorption ( $I_A$ ) correspond au courant de charge ( $I_P$ ) auquel on soustrait le courant de conduction ( $I_C$ ).

$$I_A = I_P - I_C$$

Dans un matériau diélectrique, le courant d'absorption est intrinsèquement lié à l'orientation des dipôles dans le sens du champ électrique appliqué.

Au fur et à mesure du temps, les dipôles atteignent graduellement leurs positions d'équilibre, ainsi le courant provoqué par ces déplacements diminue. Une fois le régime stationnaire atteint, le courant de conduction est lié aux déplacements d'éléments libres au cœur de la matrice comme les électrons, les trous ou encore les ions. Ce régime détermine la conductivité intrinsèque du matériau.

Les matériaux à caractère diélectrique présentent plusieurs phénomènes de conduction :

- ❑ Mécanisme de conduction limité pas les interfaces (Schottky, effet tunnel (Fowler-Nordheim))

Les phénomènes d'injection des porteurs de charge d'un matériau liquide/solide par l'effet « Schottky » ou l'effet « Fowler-Nordheim » peuvent dans ce cas être utilisés.

- ❑ Mécanisme de conduction limitée par le volume

Les phénomènes de conduction volumique peuvent être de différentes origines à savoir ohmique, ionique, Poole-Frenkel ou encore charge d'espace.

### b. Mécanismes de conduction aux interfaces

Il existe plusieurs mécanismes limitants par les interfaces des matériaux (Fig.4-19). En effet, les matériaux diélectriques possèdent des propriétés de conduction sous champ électrique mettant en jeu l'injection de charges apportées par les électrodes dans la bande de conduction du diélectrique mais également un échauffement qui provoque un gain d'énergie thermique. Ces deux phénomènes permettent l'abaissement de la barrière de potentiel. Les courants de conduction dans ce cas sont limités par l'injection de charges. Effectivement, si l'injection de charges dans le matériau est faible, au regard de la mobilité de ces mêmes charges au sein du matériau diélectrique considéré, il y a limitation par les interfaces.

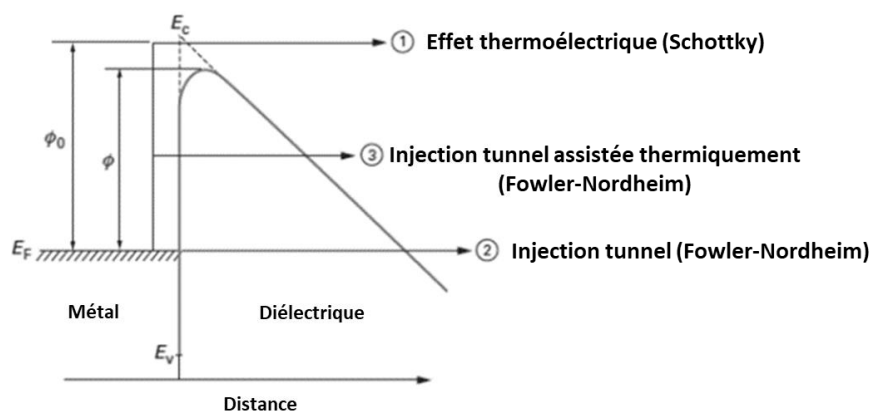


Figure 4-19 : Diagramme des bandes d'énergie à l'interface matériau/électrode (notée  $\phi_0$  hauteur de barrière a  $E=0$  /  $\phi$  hauteur de barrière a  $E>0$ ) <sup>326</sup>

Il existe trois principaux mécanismes d'injection de charge :

**1. Schottky :**

Par l'application du champ électrique, la barrière de hauteur  $\phi_0$  diminue pour permettre aux charges de franchir cette barrière plus facilement par activation thermique.

**2. L'effet tunnel :**

Les charges traversent la barrière à énergie constante

**3. L'effet tunnel / Fowler-Nordheim :**

Les charges pourront ici traverser la barrière de potentiel par absorption d'énergie thermique.

*Ces différents phénomènes liés au contact matériau/électrode sont fondamentaux dans l'injection de charge aux interfaces du matériau considéré et nécessitent dans notre cas d'être pris en compte.*

### *c. Mécanismes de conduction volumique*

Dans le cadre de ces travaux, nous étudierons principalement les mécanismes de conduction en volume.

**Conduction Ohmique**

Sous faible champ électrique, les matériaux à caractère diélectrique sont régis par la loi d'Ohm, la densité de courant circulant est fonction du champ électrique.

$$J = \sigma E$$

$J$  étant la densité de courant en  $A/cm^2$ , le champ électrique est notée  $E$  en  $V/m$  et  $\sigma$  la conductivité du matériaux en  $S/m$  et indépendante du champ électrique. Lorsque l'on trace la densité de courant  $J$  en fonction du champ électrique  $E$ , on doit donc observer une droite.

**Conduction ionique**

La conduction ionique s'anime par une série de sauts au-dessus des barrières de potentiel. De ce fait, les ions sont capables de se déplacer d'un état d'énergie à un autre.

Pour la densité de courant, on a :

$$J = J_0 \sinh \left[ \frac{q l_i E}{K_B T} \right]$$

Avec  $q$  la charge électrique,  $K_B$  la constante de Boltzmann,  $T$  la température,  $l_i$  la distance de saut ionique d'un puits de potentiel à un autre.

On observe alors deux cas :

- Si  $q l_i E \ll K_B T$ , le courant est proportionnel au champ électrique. On est donc dans le cas d'un comportement Ohmique.

- Dans l'autre cas typiquement pour des champs électriques plus forts :

$$J = J_0 e^{\left[\frac{\phi - q l_i E}{K_B T}\right]}$$

Lorsque l'on trace la représentation de conduction ionique  $\ln J = f(E)$  on doit alors observer une droite ayant une pente égale à  $-\frac{q l_i E}{K_B T}$ .

Ce phénomène se produit pour des états d'énergie et des sites relativement proches, permettant ainsi aux ions de sauter d'un puit de potentiel à un autre. L'énergie permettant le franchissement de la barrière est apportée par le champ électrique.

#### □ Conduction de type Poole-Frenkel<sup>327</sup>

Ce type de conduction est régi par le déplacement des porteurs provenant de bande de conduction qui sont entrainés par le champ électrique puis piégés dans un site de profondeur  $\phi_0$  (hauteur de barrière) (Fig.4-20). Ainsi pour contribuer au courant, le porteur doit s'extraire du piège en franchissant une hauteur de barrière  $\phi$ . Celui-ci doit donc acquérir l'énergie thermique  $K_B T$  pour franchir cette barrière.

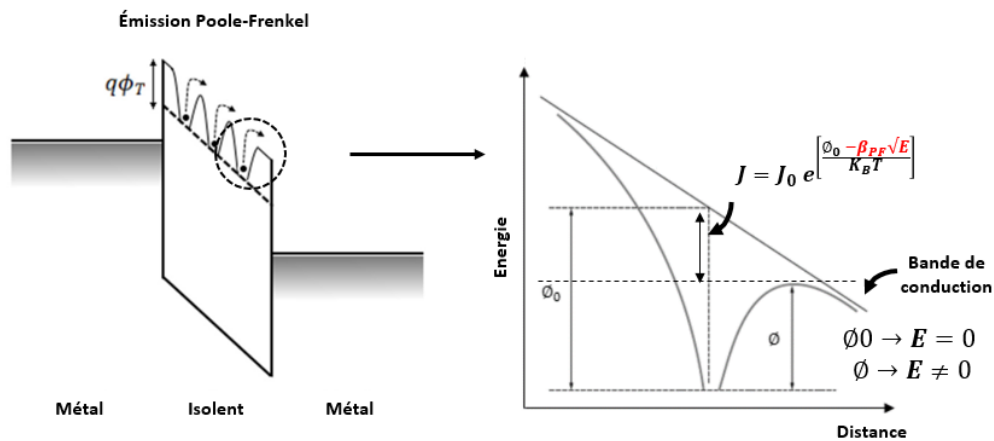


Figure 4-20 : Illustration présentant schématiquement à quoi correspond l'effet Poole-Frenkel<sup>326,328</sup>.

L'effet du champ électrique contribue au passage électrons du fait de la réduction de la barrière de potentiel d'une quantité :

$$\Delta\phi - \phi = \beta_{PF} E^{\frac{1}{2}}$$

La densité de courant s'exprimant par :

$$J = J_0 e^{\frac{\phi_0 - \beta_{PF} \sqrt{E}}{K_B T}}$$

Pour identifier ce phénomène il suffit de tracer  $\ln(j)$  en fonction de  $(E^{\frac{1}{2}})$  on observe alors une droite qui nous permet d'identifier le mécanisme de conduction volumique. Par ailleurs ce mécanisme est également analogue à l'effet Schottky (mécanisme de conduction interfaciale).

#### d. Mesures des échantillons DWNT-AG

##### □ Conduction ohmique

La Figure 4-21 présente les résultats des mesures de courant en fonction du champ électrique appliqué, pour différentes concentrations en DWNT. Cette courbe montre l'augmentation de la densité de courant en fonction de la concentration en DWNT. Les échantillons à 30 et 40% de DWNT présentent une augmentation significative de la densité de courant, respectivement au voisinage de  $8 \text{ V.cm}^{-1}$  et  $4 \text{ V.cm}^{-1}$ . Il n'y a pas de variation significative pour les échantillons de concentration inférieure, du moins pour les valeurs de champs électriques présentées.

Notons que le mécanisme de conduction n'est pas de type ohmique. En effet, celui-ci ne suit pas une forme de droite dans un tracé  $J(E)$ .

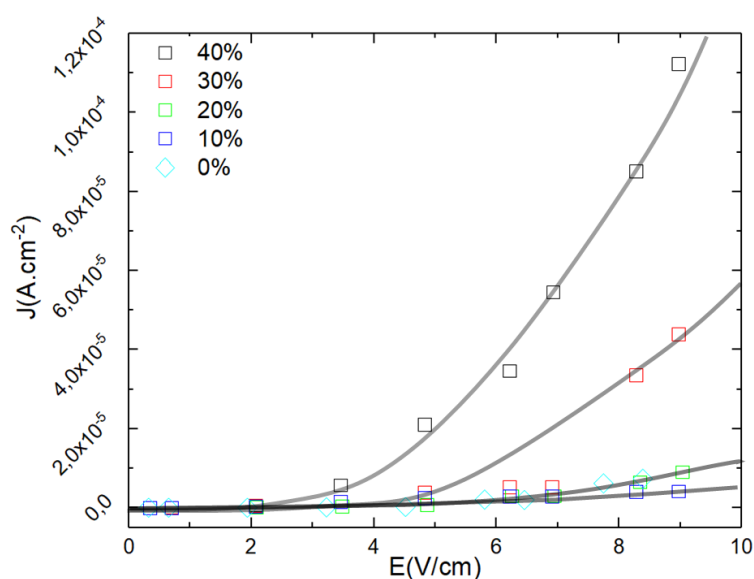


Figure 4-21: Graphique représentant la variation de densité de courant en fonction du champ électrique à différentes concentrations en DWNT. Cette représentation dans le cas où on obtient une droite, correspondrait à un mécanisme de conduction de type Ohmique.

Cette étude permet d'observer l'influence de la concentration en DWNT sur la densité de courant traversant l'échantillon. A présent, il est possible de tracer différents modèles de conduction préalablement cités, permettant de déterminer le mécanisme de conduction.

Néanmoins l'application de tensions de cet ordre de grandeur entraîne probablement une modification temporaire ou définitive du réseau polymérique.

##### □ Conduction Poole-Frenkel

Après avoir tracé les différents modèles évoqués précédemment, les échantillons comportant des DWNT forment une droite lorsque l'on trace  $\ln(J)$  en fonction de  $\sqrt{E}$  (Fig.4-22). On met en évidence un mécanisme de conduction de type Poole-Frenkel activé par le champ électrique appliqué. Le champ électrique appliqué aux bornes de l'échantillon a pour effet de diminuer la barrière de potentiel et ainsi de permettre le saut des électrons d'un puit de

potentiel à un autre. Néanmoins, la variation linéaire du logarithme de la densité de courant en fonction de la racine carré du champ électrique correspond également à un mécanisme de conduction de type *Schottky*<sup>329</sup>. Ce mécanisme décrit dans la suite de ce manuscrit est limitant par les interfaces du matériau.

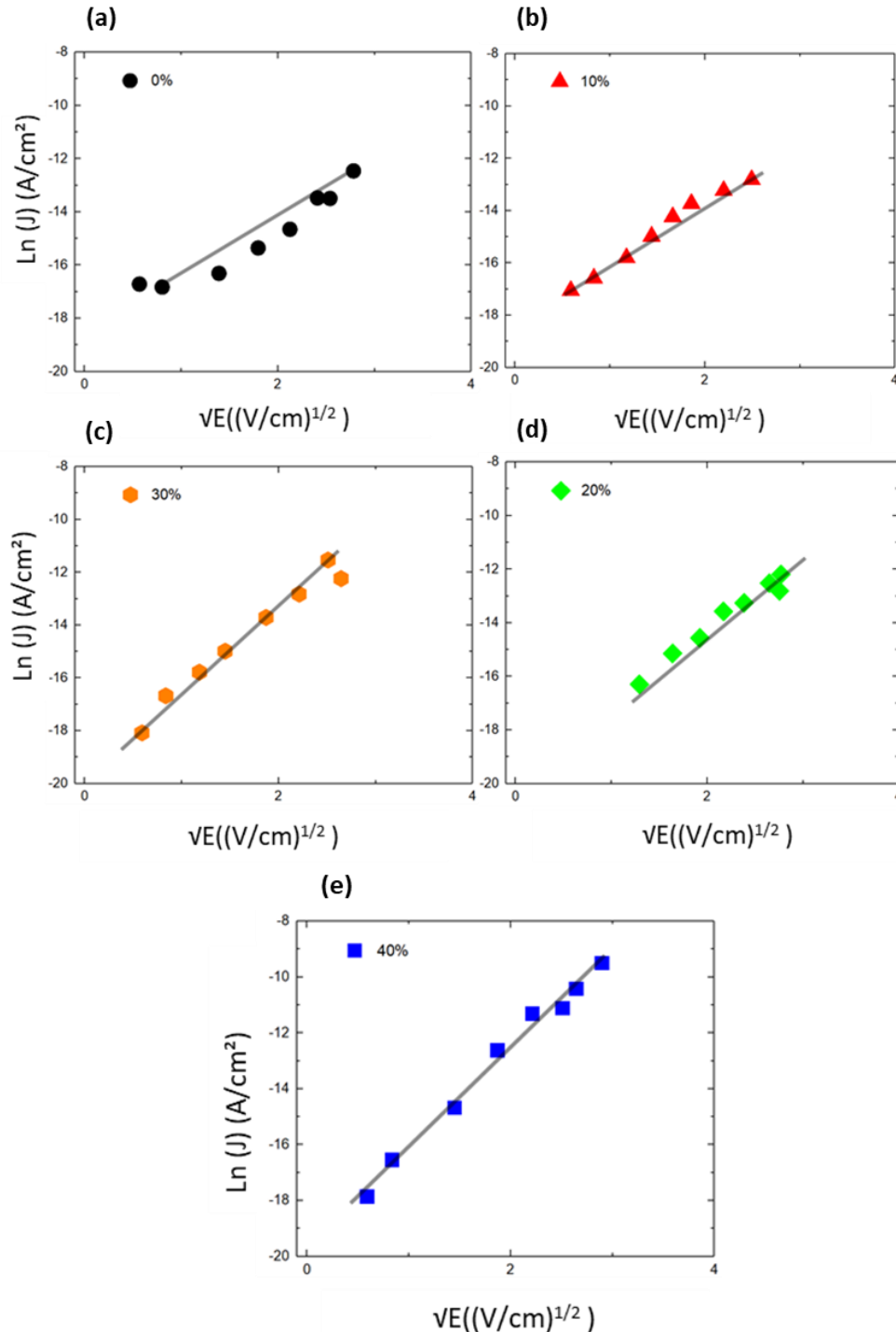


Figure 4-22 : Graphique représentant le logarithme de la densité de courant en fonction de la racine carrée du champ électrique a différentes concentrations en DWNT. Cette représentation linéaire illustre un mécanisme de conduction de type Poole-Frenkel ou Schottky ;(a) 0% en DWNT ; (b) 10% en DWNT ; (c) 20% en DWNT ; (d) 30% en DWNT ; (e) 40% en DWNT .

Ces mesures permettent de mettre en évidence quel mécanisme de conduction gouverne les hydrogels nanocomposites contenant des DWNT. La profondeur et la densité des puits sont plus ou moins élevées en fonction de la concentration en DWNT.

Néanmoins, ces résultats sont à interpréter avec précaution. En effet, les mécanismes Poole-Frenkel et Schottky (Thermoélectroniques) se confondent répondant tout deux par une droite lorsque l'on trace  $\ln(J) = f(\sqrt{E})$ , il est donc nécessaire d'approfondir les mesures. Effectivement, en faisant varier la température il est possible de mettre en évidence des lois des phénomènes thermiquement activés. L'effet Schottky étant très sensible à la température, la représentation de  $\ln\left(\frac{J}{T^2}\right) = f\left(\frac{1}{T}\right)$  doit se présenter sous la forme d'une droite. Ces mesures pourraient confirmer qu'il s'agit d'un phénomène d'injection de type Schottky. Le phénomène de conduction volumique, de type Poole-Frenkel (CNT) a déjà été rapporté dans la littérature<sup>330,331</sup>.

Au cours de ces travaux, ces mesures complémentaires n'ont pas pu être effectuées, faute de temps. L'hypothèse d'un mécanisme de conduction par effet Schottky reste donc à être démontré.

#### e. Mesures des échantillons CTRL-AG

##### □ Conduction ionique

Concernant les mesures électriques effectuées sur des échantillons sans DWNT, on peut observer que la variation de densité de courant en fonction du champ électrique ne suit pas un comportement ohmique.

En revanche, lorsque l'on trace  $\ln(j)$  en fonction de  $E$  (Fig.4-23) on observe une droite permettant de mettre en évidence un mécanisme de conduction gouverné par les ions. D'après les mesures réalisées sur ces mêmes échantillons (eau D.1 (0,0004 mS.cm<sup>-1</sup>)) par spectroscopie d'impédance (Tab.4-6), la valeur de conduction met en évidence la présence d'ions au cœur du réseau et ce même en très faible quantité, même si le champ électrique est bien plus faible (facteur 10). La Figure 4-25(a) illustre schématiquement le déplacement des ions au travers de l'échantillon CTRL-AG et DWNT-AG à différentes concentrations en DWNT sous l'effet d'un champ électrique. Les ions dans le cas de l'échantillon CTRL-AG peuvent se déplacer d'un puits de potentiel à un autre, acquérant par l'effet du champ électrique assez d'énergie pour se déplacer de site en site. Ceci permet aux ions de traverser le réseau de part en part. Néanmoins, il n'est pas exclu que le phénomène de conduction soit comme dans le cas précédent limitant par les interfaces électrode/matériau.

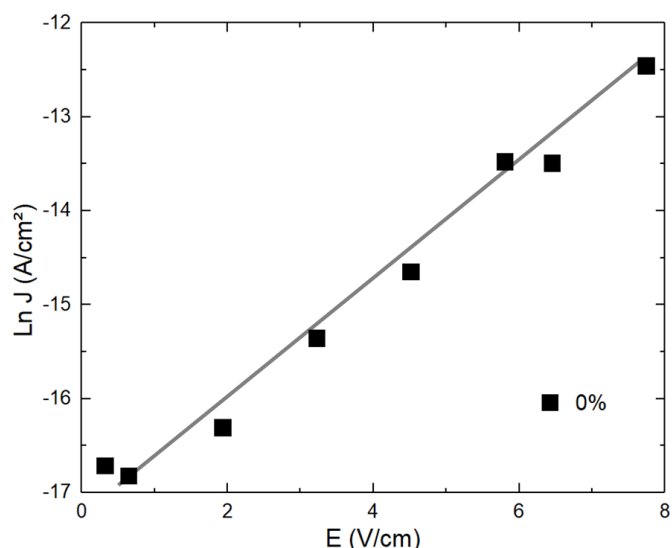


Figure 4-23 : Graphique représentant le logarithme de la densité de courant en fonction du champ électrique pour l'échantillon CTRL-AG. Cette représentation formant une droite illustre un mécanisme de conduction de type ionique.

#### ☐ Conduction Poole-Frenkel / Schottky

Le mécanisme de conduction volumique est de nature ionique, en revanche il est possible que les interfaces jouent également un rôle sur le mécanisme de conduction. Afin de vérifier que la conduction est gouvernée par les ions, il est impératif de vérifier  $\ln(J) = f(\sqrt{E})$  (Poole-Frenkel, Schottky). La Figure 4-24 illustre la fonction  $\ln(J) = f(\sqrt{E})$  qui correspond à un mécanisme de conduction gouvernée par les interfaces (Schottky). Comme précédemment pour vérifier si ce mécanisme (Schottky) gouverne la conduction il est nécessaire d'effectuer une étude en température en traçant  $\ln\left(\frac{J}{T^2}\right) = f\left(\frac{1}{T}\right)$ .

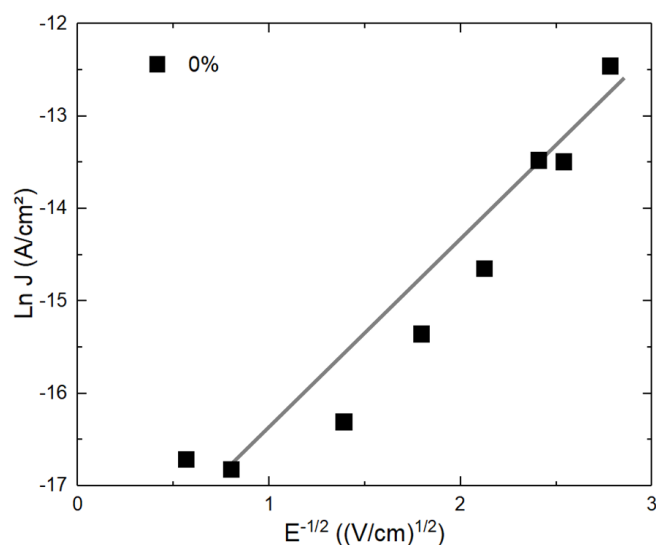


Figure 4-24 : Graphique représentant le logarithme de la densité de courant en fonction de la racine carrée du champ électrique pour l'échantillon CTRL-AG. Cette représentation formant une droite illustre un mécanisme de conduction de type Poole-Frenkel ou Schottky.



Ces projections différentes illustrent deux possibilités concernant le mécanisme de conduction. En effet, celui-ci pourrait être comme le montre la Figure 4-23 ionique et donc limitant par le volume ou encore (Fig.4-24) de type Schottky, limitant par les interfaces. Des mesures en température permettraient de vérifier si le phénomène de conduction est limitant par les interfaces.

### □ Représentation schématique des phénomènes observés

La Figure 4-25 illustre les différents mécanismes de conduction en fonction de la concentration en DWNT. L'échantillon CTRL-AG (Fig.4-23) semble suivre un mécanisme de conduction ionique illustré en Figure 4-25(a). L'ajout de DWNT provoque un changement de mécanisme à priori de type Poole-Frenkel (Fig.4-23(b)) illustré Figure 4-25(b). En effet, le champ électrique appliqué aux bornes de l'échantillon permet d'abaisser la barrière de potentiel des pièges repartis au travers du nanocomposite DWNT-AG. Ce phénomène permet aux électrons de sauter d'un puits à un autre entraînant ainsi le phénomène de conduction électrique. Plus la quantité de DWNT augmente (Fig.4- 25(c)) et plus la distance de saut diminue, et dès 30%*m* en DWNT il semble apparaître un phénomène que l'on pourrait qualifier de percolant.

En effet, plus le nombre de DWNT augmente et plus la distance entre les DWNT diminue. Sous l'effet du champ électrique, la distance diminue davantage jusqu'à atteindre la conduction électrique.

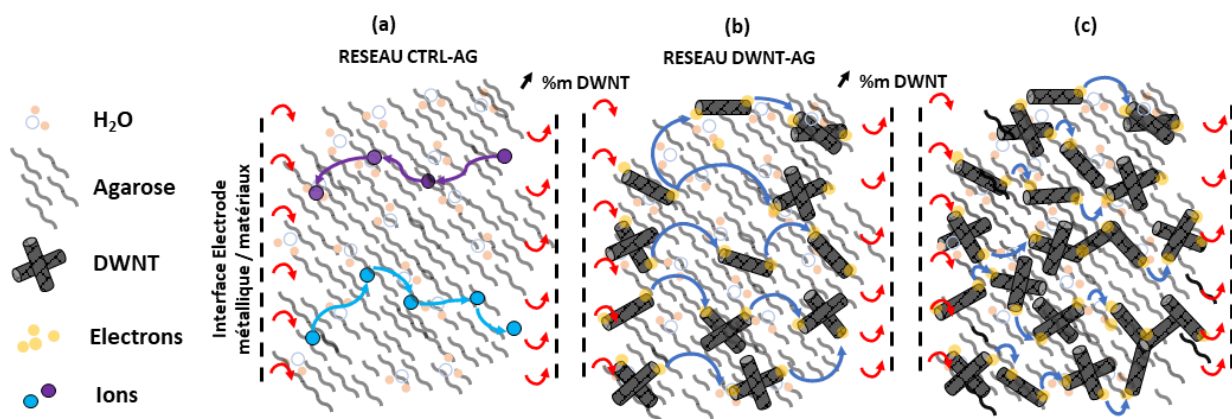


Figure 4-25 : Illustration représentant les différents mécanismes possibles de conduction mesurée en fonction de l'échantillon. (a) CTRL-AG illustrant un mécanisme de conduction ionique. (b, c) DWNT-AG illustrant un mécanisme de conduction de type Poole-Frenkel.

Cette illustration relate les phénomènes observés lors des mesures. Cependant, des expériences complémentaires sont nécessaires afin de déterminer si le mécanisme limitant concernant les échantillons DWNT-AG n'est pas de caractère interfacial et effectivement lié à l'effet Schottky.

*La quantité de DWNT semble assez élevée. Toutefois, n'oublions pas qu'il s'agit d'un réseau triphasique expansé par la présence de l'eau engendrant donc un chemin de conduction théorique plus long que pour les matériaux biphasiques contenant la même concentration massique en NTC.*

*De plus amples études sont nécessaires afin de préciser si le mécanisme de conduction est gouverné par effet Schottky.*

## CONCLUSION

*Les études concernant le séchage et le regonflement ont permis de contrôler la géométrie du dispositif mais également de déterminer le mécanisme de diffusion responsable du gonflement, d'évaluer la quantité de liquide que celui-ci peut retenir et donc la quantité de médicament pouvant être stockée au cœur de l'hydrogel.*

*La stabilité de gonflement en fonction du pH a également été étudiée tout comme le potentiel relargage des DWNT exposés à une solution de sueur artificielle et à une température élevée. Cette stabilité des échantillons DWNT-AG à différents pH permet une large fenêtre d'utilisation du dispositif et nous permet donc de travailler avec différents types de molécules, selon leur stabilité en solution.*

*Les images en microscopie électronique illustrent une bonne distribution des faisceaux de DWNT à l'état déshydraté, mais à contrario les mesures par spectroscopie d'impédance ne donnent aucun signe de percolation des DWNT à l'état hydraté. Cet effet peut présenter différentes origines, en effet la présence d'ions pourrait conduire à une conductivité électrique dominée par ces derniers, ce qui pourrait être le cas pour les échantillons en solution ionique (PBS) mais qui ne devrait pas l'être dans l'eau désionisée (même si elle possède elle-même des ions provenant de l'agarose). D'un autre côté, il est possible que le seuil de percolation ne soit pas atteint ce qui semble peu probable pour les échantillons très concentrés. Il semble donc que l'activation de la conduction électronique ne s'opère pas aux champs électriques faibles comme le suggèrent les expériences courant/tension à champs électrique élevés. Par ailleurs, le phénomène de conduction est observable à des concentrations très grandes en DWNT, qui semblerait être activé par le champ électrique appliqué. Toutefois, des études complémentaires demeurent nécessaires afin de déterminer précisément le mécanisme de conduction.*

*Néanmoins, il n'est a priori pas forcément nécessaire d'atteindre la percolation des DWNT pour la fabrication du dispositif. Pour permettre de répondre à cette question de nombreuses autres études demeurent nécessaires.*



# CHAPITRE 5

## EXPERIMENTATIONS *EX VIVO*



# INTRODUCTION

*Ce chapitre a pour but de démontrer la faisabilité d'utiliser les hydrogels nanocomposites pour la délivrance transdermique de molécules pharmacologiques. Après avoir caractérisé notre matériau d'un point de vue structural, morphologique, électrique et en termes de capacité de stockage d'une molécule, des tests préliminaires (ex vivo) ont donc été effectués dans le but de valider notre approche.*

*Ce chapitre développe donc les différents protocoles développés et testés ex-vivo sur peau de souris. Les observations par microscopie à fluorescence vont permettre d'observer le marquage à la surface de la peau par la molécule d'intérêt.*

*Par ailleurs, les caractérisations électriques effectuées dans le chapitre précédent ayant montré la complexité d'un tel matériau du point de vue des phénomènes de conduction, nous avons donc également réalisé des mesures de courant lors des expériences ex-vivo couplées à des observations par microscopie à fluorescence. Ces expériences ont pour but d'observer l'évolution du courant en fonction des impulsions appliquées. De plus ces mesures visent à mettre en évidence l'effet des nanotubes de carbone sur le courant traversant la peau et l'effet des stimuli électriques sur le relargage de la molécule considérée.*

# I. Tests ex-vivo des dispositifs

## A. Electrodes métalliques

Les expériences d'électroperméabilisation préliminaires ont été effectuées à l'aide d'électrodes classiques (cf. Chapitre 2 – Dispositif expérimental – Protocole 1) en acier inoxydable utilisées pour le transfert d'ADN dans le derme<sup>332</sup>. Ces expériences de contrôle sans et avec impulsions électriques ont servi de base afin de comparer le potentiel de nos matériaux sur la pénétration d'une macromolécule au travers de la peau et plus précisément au travers du stratum corneum.

### A.i. Tests de contrôle

Dans un premier temps, des expériences sans stimulations électriques ont été réalisées afin d'observer les niveaux de fluorescence et vérifier l'imperméabilité de la peau vis-à-vis des molécules de *Dextran-FITC*.

#### □ Observations en microscopie à fluorescence

La Figure 5-1 illustre l'observation en microscopie à fluorescence du marquage d'une peau de souris (cf : chapitre 2) par du *Dextran-FITC* (100  $\mu\text{L}$  à 1 mM (*Dextran*(3,5-5,5 kDa-FITC) dans du PBS). La solution est simplement déposée en surface de la peau pendant 30 min. Avant l'observation, un papier absorbant imbibé de PBS est doucement appliqué pour absorber la solution de *Dextran-FITC* en excès à la surface de la peau. Sur la Figure 5-1(a), on peut observer en surface de la peau, de nombreux poils intensément fluorescents imprégnés par du *Dextran-FITC*. La Figure 5-1(b) (plus fort grandissement) montre la surface de la peau et plus précisément le *stratum corneum* qui présente une fluorescence très faible (Fig.5-1(c)). Cependant, même si la forte intensité de fluorescence des poils ne permet pas d'observer en détail la surface de la peau (contraste très fort), il semble évident que la solution n'a pas pénétré au travers de la peau. Cette observation est en accord avec le fait que la diffusion passive à travers la barrière du *stratum corneum*, ne peut se produire que pour des molécules de petite taille (i.e. la nicotine (162 g.mol<sup>-1</sup>)) ce qui est impossible pour le *Dextran-FITC* qui a une masse molaire d'environ 4500 g.mol<sup>-1</sup> (4,5 kDa).

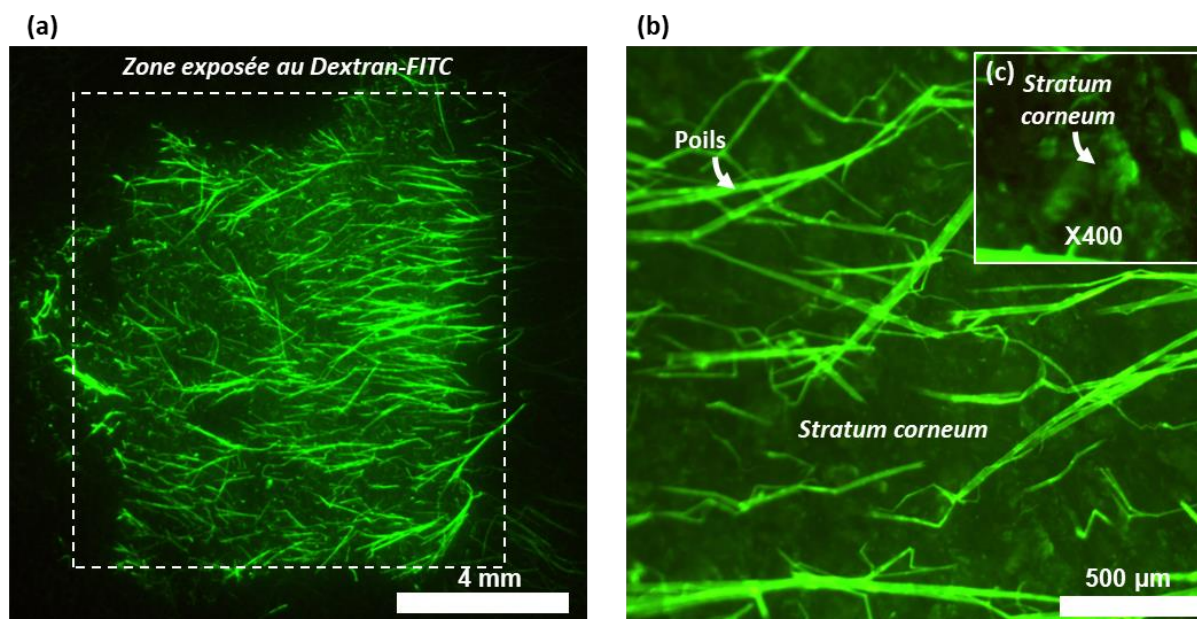


Figure 5-1 : Visualisation par microscopie à fluorescence à différents grossissements de la peau de souris Nude après 30 min de contact avec 100 μL de Dextran-FITC (1mM) sans stimulation électrique ; (a) Surface exposée ; (b) Agrandissement de la surface exposée ; (c) Zoom numérique X400 de (b).

Ces tests nous permettent de démontrer l'impossibilité à la molécule de Dextran-FITC, sans stimulus externe, de traverser le stratum corneum. Cette expérience illustre bien la très faible perméabilité de la peau, principalement gouvernée par le stratum corneum.

### A.ii. Tests d'électrostimulation

Les expériences suivantes ont consisté à appliquer un champ électrique entre deux électrodes métalliques (*acier inoxydable*, cf. Chapitre 2 – Protocole 1). Pour délivrer les impulsions électriques, les électrodes sont reliées à un générateur de tension tel que décrit dans le chapitre 2. Les électrodes sont distantes de 0,4 cm l'une de l'autre.

Deux expériences différentes ont alors été menées ; l'une consiste à appliquer le champ électrique en présence de la solution de *Dextran-FITC* déposée entre les électrodes, alors que dans l'autre, la solution de *Dextran-FITC* est ajoutée après l'application des impulsions électriques. Le tableau ci-dessous décrit les paramètres électriques utilisés pour les expériences d'électrostimulation.

Tableau 5-1 : Paramètres expérimentaux utilisés lors des expériences ex-vivo

$U$ (positif) volt	$U$ (négatif) volt	$T$ (positif) (ms)	$T$ intermédiaire (ms)	$P$ (seconde)	$R$	Distance Inter- électrode (cm)	Champ électrique (V/cm)
300	0	20	0,010	1	10	0,4	120



### a. Electrostimulation en présence de la solution de Dextran-FITC

La Figure 5-2 montre les résultats obtenus avec les paramètres électriques utilisés (voir tableau 5-1) lorsque la solution de Dextran-FITC est laissée en contact 30 minutes après l'électrostimulation. Avant l'observation en microscopie à fluorescence, un papier absorbant imbibé de PBS est doucement appliqué pour éliminer l'excès de solution de Dextran-FITC non adsorbée sur la peau.

#### □ Observations en microscopie à fluorescence

On peut observer (Fig.5-2(a)) un marquage fluorescent qui correspond à l'endroit où a été déposée la solution de Dextran-FITC. Au niveau de la cathode, on remarque une très légère marque laissée par l'électrode utilisée. De l'autre côté, à l'anode aucun changement significatif n'est observable ; le marquage n'est que très superficiel (seuls les poils sont marqués) comme en l'absence de champ électrique. La Figure 5-2(b) montre plus précisément la structure de surface de la peau coté cathode. En effet, outre les poils, on observe clairement que la molécule fluorescente révèle des amas fluorescents principalement constitués de peaux mortes superposées. On peut observer que la solution n'a pas ou très peu pénétré au travers du *stratum corneum* et que le marquage n'est que superficiel. De plus, il semblerait que dans cette configuration, il n'y ait pas d'altération significative de la peau (du moins visible en microscopie à fluorescence).

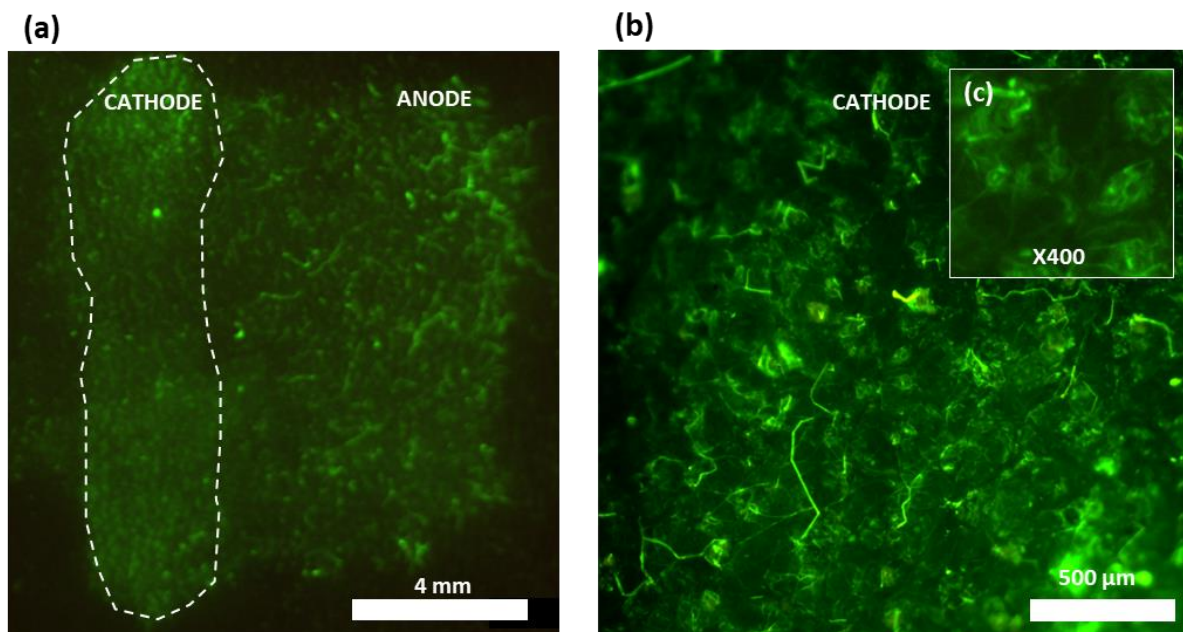


Figure 5-2 : Visualisation par microscopie à fluorescence à différents grossissements de la peau de souris Nude après 30 minutes de contact avec 100 µL de Dextran-FITC (1 mM) avec stimulation électrique ; (a) Image de la surface de la peau exposée au champ électrique (cathode et anode). (b) agrandissement en surface de la cathode ; (c) Zoom numérique X400 de la cathode.

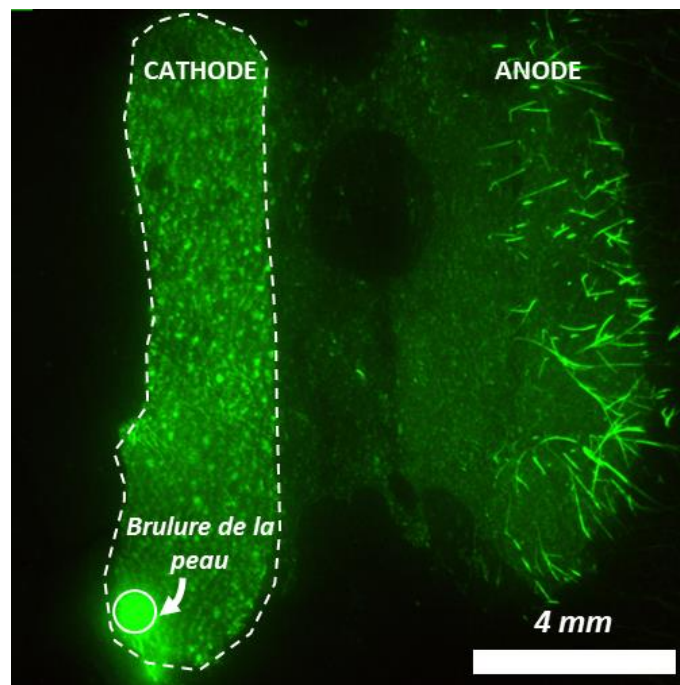
Dans cette configuration, la structure de la peau ne semble pas significativement modifiée ni même altérée. En effet, dans cette configuration expérimentale, le champ électrique passe préférentiellement à travers le liquide (PBS) et de ce fait n'interagit que très modérément avec la peau.

### b. Dépôt de la solution de Dextran-FITC après électrostimulation

Dans cette configuration, la solution de *Dextran-FITC* est déposée juste après l'application des trains d'impulsions (*Tab.5-1*), et laissée pendant 30 minutes comme précédemment. Avant l'observation en microscopie à fluorescence, un papier absorbant imbibé de PBS est doucement appliqué pour absorber la solution de *Dextran-FITC* en excès à la surface de la peau.

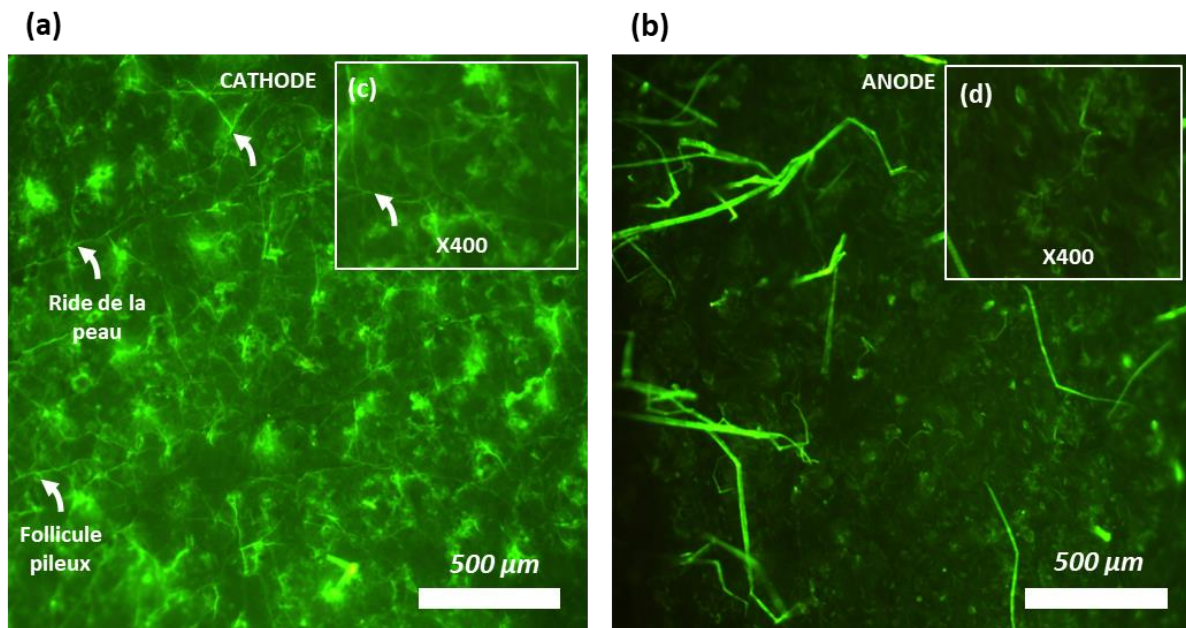
#### □ Observations en microscopie à fluorescence

La *Figure 5-3* présente des marquages fluorescents visibles au niveau de la peau de souris après électrostimulation. Ces marques sont présentes au niveau des électrodes et plus nettement au niveau de la cathode. Dans ce cas, l'empreinte laissée est très intense. De plus, la forme des électrodes est très distincte, ce qui montre l'effet plus prononcé du champ électrique sur la peau. On peut observer de nombreux points intensément fluorescents répartis sur toute la surface. En particulier, une zone très intense indiquant une potentielle brûlure causée par le courant probablement trop élevé (*effet de pointe – cf. Chapitre 2 (géométrie d'électrodes)*) dans cette configuration. La forte intensité de fluorescence à cet endroit semble due à l'introduction de la molécule fluorescente dans la lésion causée par le champ électrique. Par ailleurs, la surface où se situait l'anode ne met rien d'autre en évidence que l'imprégnation des poils par la solution fluorescente signe que l'anode ne provoque a priori aucun effet sur la peau.



*Figure 5-3 : Visualisation par microscopie à fluorescence de la surface de la peau exposée au champ électrique illustrant le marquage du Dextran-FITC notamment du côté de la cathode. Le champ électrique est appliqué, puis 100  $\mu$ l à 1 mM de Dextran-FITC sont déposés entre les électrodes.*

Les observations à plus fort grandissement de ces deux zones (*anode, cathode*), permettent de détailler la morphologie de surface de la peau (*Figure 5-4(a, b)*). On note la présence (cathode) d'amas cellulaires (cellules mortes observées précédemment), des rides ou sillons répartis à la surface de la peau, et certains follicules pileux (*base des poils*). La zone située sous l'anode illustrée en *Figure 5-4(b)* ne montre, comme précédemment, aucun signe distinctif de pénétration de la molécule fluorescente.



*Figure 5-4 : Visualisation par microscopie à fluorescence à différents grandissements illustrant le marquage du Dextran-FITC sous l'effet du champ électrique au niveau de la peau sous les électrodes : (a) à la cathode ; (b) à l'anode ; (c) zoom numérique X400 à la cathode; (d) zoom numérique X400 à l'anode.*

*Ces expériences nous permettent de mettre en évidence les limites d'utilisation de ce type d'électrodes pour la délivrance transdermique de molécules. Par ailleurs, des brûlures liées à forte intensité du champ électrique<sup>333,334</sup> peuvent être possibles<sup>332</sup>. Ces expériences préliminaires montrent que dans le cas d'électrodes métalliques et dans cette configuration expérimentale, un marquage plus prononcé se produit uniquement au niveau de la cathode.*

## ***B. Electrodes hydrogels nanocomposites***

Dans cette partie, les hydrogels d'agarose (*CTRL-AG*) et d'hydrogels nanocomposites (*DWNT-AG*) préalablement séchés ont été placés pendant 24 heures (regonflement) dans une solution de *Dextran-FITC 1 mM (3,5 – 5,5 kDa)*. Après regonflement, nos échantillons *CTRL-AG* et *DWNT-AG* ont été évalués. Les paramètres électriques précédemment utilisés sont conservés (*Tab.5-1*). Avant le positionnement des électrodes à la surface de la peau, l'excès de *Dextran-FITC* est absorbé à l'aide d'un papier absorbant.

### ***B.i. Sans stimulation électrique***

Le but de ces expérimentations est de vérifier que nos matériaux n'interagissent pas avec la peau sans stimulation électrique et en particulier qu'il ne se produit pas de relargage passif de la molécule conduisant à un marquage de la peau.

#### ***□ Observations en microscopie à fluorescence***

La *Figure 5-5* montre la surface de peaux de souris sur lesquelles les échantillons *CTRL-AG (Fig.5-5(a, a', a''))* ou *DWNT-AG1% (Fig.5-5(b, b', b''))* ont été placés pendant 30 min. Avant l'observation, un papier absorbant imbibé de PBS est doucement appliqué pour absorber la solution de *Dextran-FITC* non adsorbée sur la peau. On peut remarquer dans les deux cas (*Fig.5-5(a, b)*) que seulement certains "spots" sont fluorescents, correspondant à des poils ou des impuretés ou encore des rides en surface de la peau (*Fig.5-5(a', b')*). Cependant, l'intensité de fluorescence est très faible (*Fig.5-5(a, b)*). Ceci peut être mis en évidence par le faible contraste entre la zone exposée et l'auto fluorescence naturelle de la peau. Ces spots fluorescents sont attribués à la présence de *Dextran-FITC* présent sur la surface des échantillons, qui s'adsorbe spontanément et imprègne en partie la surface de la peau et les poils en particulier.

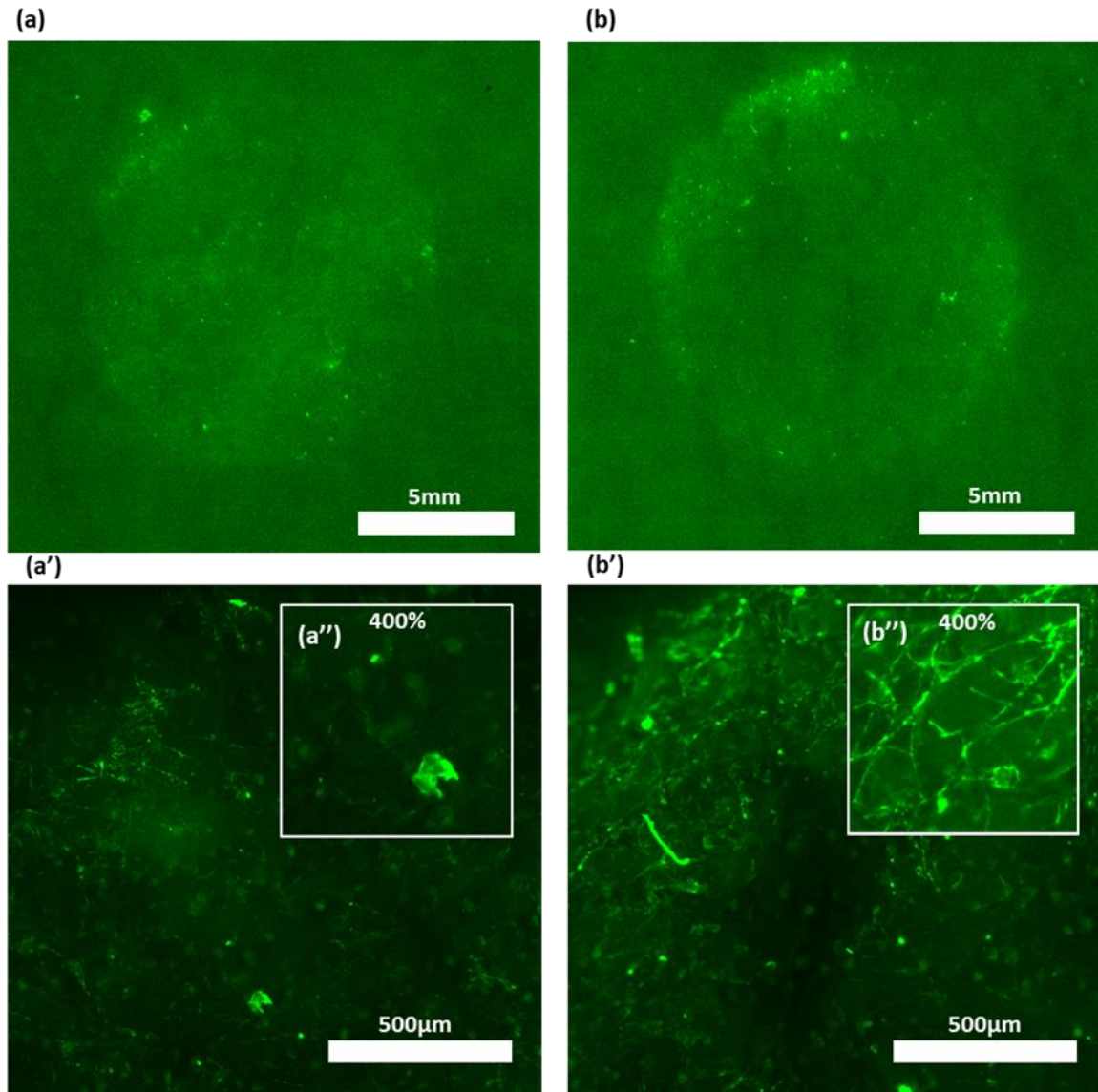


Figure 5-5 : Visualisation par microscopie à fluorescence à différents grossissements de la peau de souris Nude lorsque les échantillons contenant du Dextran-FITC sont déposés à la surface de la peau sans stimulation électrique pendant 30 min ; (a) Surface de la peau CTRL-AG ; (b) Surface de la peau DWNT-AG ; (a'') zoom numérique X400 CTRL-AG ; (b'') zoom numérique X400 DWNT-AG.

Ces expériences montrent qu'en l'absence de stimulation électrique, les hydrogels d'agarose et agarose nanocomposites ne provoquent pas un relargage spontané de la molécule fluorescente sur la durée malgré l'hydratation naturelle de la peau. Ce résultat était attendu, mais cette expérience de contrôle n'en était pas moins nécessaire.

Ces expériences montrent également que les molécules fluorescentes du matériau viennent teinter les poils en surface de la peau. Elles ne donnent cependant aucune indication quantitative au sujet de leur transfert depuis l'hydrogel mais l'on peut supposer qu'il ne s'agit que de ce qui reste en surface après avoir absorbé l'excès de Dextran-FITC juste avant sa mise en place sur la peau.

## B.ii. Avec stimulation électrique

Afin de vérifier que nos dispositifs permettent de perméabiliser la peau et également de délivrer la molécule d'intérêt, ils ont été soumis aux impulsions électriques (*précédemment décrites*) puis laissés pendant 30 min sur la peau avant la visualisation en microscopie à fluorescence. Comme précédemment, un papier absorbant imbibé de PBS est doucement appliqué pour absorber l'excès de *Dextran-FITC* déposé sur la peau.

### □ Observations en microscopie à fluorescence

La *Figure 5-6* présente des images illustrant le marquage du *Dextran-FITC* au niveau de la position des hydrogels. La *Figure 5-6(a, a', a'')* et la *Figure 5-6 (b, b', b'')* présentent respectivement les échantillons *CTRL-AG* et *DWNT-AG* et compare également les expériences avec ou sans champ électrique.

En absence de champ électrique, (*Figure 5-6 (a, b) identique à la Figure 5-5(a)*) mais étalonnée aux mêmes valeurs d'intensité de contraste de fluorescence que les expériences après électrostimulation (*Fig.5-6(a', b')*), aucune fluorescence n'est observée ce qui confirme nos résultats précédents ainsi que ceux de la littérature, démontrant que l'application d'un champ électrique est nécessaire pour la perméabilisation du *stratum corneum* (SC).

La *Figure 5-6 (a', b')* montre 2 marques circulaires fluorescentes correspondant respectivement à la cathode et à l'anode. Pour l'échantillon *CTRL-AG (Fig.5-6(b'))*, on remarque une marque intense au niveau de la cathode démontrant le relargage de la molécule depuis le matériau vers la peau. De plus, on peut observer une marque continue sur tout le pourtour du disque. Cette marque pourrait provenir des dentelures observées sur les bords de l'hydrogel lorsque celui-ci est découpé à l'emporte-pièce selon le protocole décrit au *chapitre 3*. Ces inhomogénéités amplifiées lorsque l'hydrogel regonfle peuvent provoquer un effet de pointe à ces endroits lorsque le champ électrique est appliqué. Il semblerait que ces effets favorisent la perméabilisation de la peau (*très localement*) et le relargage de la molécule sur le pourtour du dispositif.

On peut aussi remarquer que le centre du disque présente dans tous les cas une intensité de fluorescence bien inférieure à celle du pourtour notamment à certains endroits (*délimités en pointillés sur la Fig.5-6*). Ceci pourrait s'expliquer par un contact matériau/peau amoindri dans cette zone ou encore un champ électrique plus faible du fait des aspérités (ou renflements) de la peau. L'observation principale est que la fluorescence est absente du côté de l'anode.

En ce qui concerne l'échantillon *DWNT-AG (Fig.5-6(b'))*, on remarque que l'intensité de fluorescence est bien supérieure à celle de l'échantillon *CTRL-AG*. Effectivement, le disque fluorescent (*côté cathode*) est beaucoup plus prononcé également sur tout son pourtour mais également du côté en regard avec l'anode. Cette zone est située à l'endroit où le champ électrique est le plus intense et donc où le SC a le plus de probabilité d'être perméabilisé. De plus, on peut remarquer des sortes de plis de moindre fluorescence au niveau de l'anode,

indiquant soit un champ électrique moins élevé à certains endroits, soit des problèmes de contact à l'interface peau / hydrogel nanocomposite). Selon l'équation du champ électrique  $E=V/d$  (en  $V.cm^{-1}$ ), lorsque la distance inter-électrode diminue, l'amplitude du champ  $E$  augmente. Si  $E$  augmente, d'une part la surface perméabilisée des cellules augmente (et donc la surface de perméabilisation<sup>180,198</sup>) et d'autre part la force électrophorétique appliquée sur les molécules chargées augmente. Ainsi les molécules chargées pourront migrer plus facilement.

Les *Figures 5-6(a'', b'')* montrent un agrandissement sur une zone fluorescente de la surface de la peau. Les sillons et les follicules pileux sont très contrastés et facilement discernables. Par ailleurs, on peut également observer de nouvelles structures ayant une forme hexagonale (encadré en *Fig.5-6 (a'', b'')*), montrant l'insertion de la molécule fluorescente au travers du SC. Ces formes d'hexagones semblables à des nids d'abeilles à la surface de la peau représentent différentes strates lipidiques du SC formées de kératinocytes morts, dont le noyau est absent. Les mesures quantitatives de fluorescence effectuées sur la *Figure 5-6(a'', b'')* présentent un niveau de fluorescence moyen de 2400 *u.a.* (unité arbitraire) pour l'échantillon CTRL-AG contre 5000 *u.a.* pour l'échantillon DWNT-AG soit environ un facteur 2. A fort grossissement, il est visible que les molécules ne sont pas uniformément réparties (sont indiquées par des pointillés blancs les zones où le passage de molécules est défavorable). Ceci illustre bien l'inhomogénéité de la peau et la création de chemins préférentiels au travers du SC lors de l'application du champ électrique.

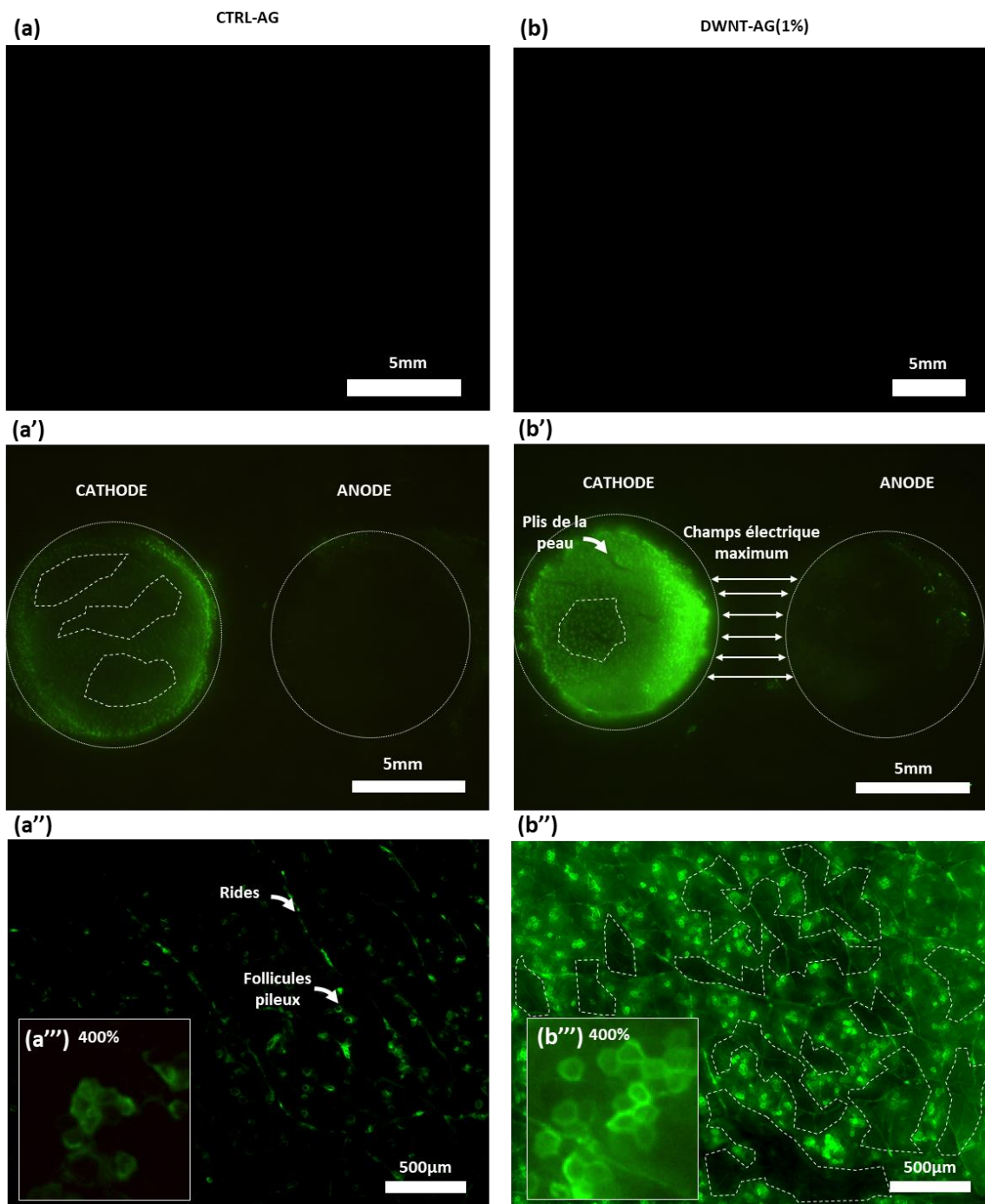


Figure 5-6 : Visualisation par microscopie à fluorescence à différents grossissements de la peau de souris Nude lorsque les échantillons contenant du Dextran-FITC sont déposés à la surface de la peau. ; (a, a', a'') concerne les hydrogels CTRL-AG et (b, b', b'') les hydrogels DWNT-AG. ; (a) et (b) représentent les hydrogels sans stimulation électrique au même niveau d'intensité que les images (a', b'') – (a', a'') et (b', b'') (filtre à 25% coté cathode) représentent les échantillons avec stimulation électrique, à deux grossissements différents ; (a'') zoom numérique X400 et (b'') zoom numérique X400.

Ces expériences démontrent donc la faisabilité de notre approche, mais également les difficultés auxquelles nous serons confrontés pour la suite des travaux afin de parfaire ces dispositifs. En effet, la possibilité d'utiliser des hydrogels nanocomposites contenant des nanotubes de carbone pour la délivrance transdermique de molécule semble être en partie



atteinte. Toutefois, ces résultats sont préliminaires et nécessitent encore de nombreux efforts et expériences complémentaires afin de mieux comprendre notre matériau et notamment les interactions dispositif/champ électrique/peau.

### a. Reproductibilité

Chaque souris possède une peau présentant des caractéristiques variables (*épaisseur, hydratation, pilosité,...*). Ainsi, la perméabilité de la peau peut varier en fonction de l'animal et de la zone mise en œuvre. De plus, l'animal peut se gratter, se battre avec ses congénères et avoir ainsi des lésions cutanées qui seront des zones plus sensibles que les autres. C'est pour ces raisons que de nombreuses expériences sur peau de souris sont nécessaires afin d'obtenir un nombre d'observations suffisant pour une étude statistique complète.

#### □ Observations en microscopie à fluorescence

La Figure 5-7 présente les tests d'électrostimulation concernant les échantillons CTRL-AG (Fig.5-7(a, a'')) et DWNT-AG (Fig.5-7(b, b'')) réalisés dans les mêmes conditions expérimentales que les précédentes. Nous confirmons les mêmes caractéristiques concernant l'intensité du signal de fluorescence (*intensité de fluorescence CTRL-AG < intensité de fluorescence DWNT-AG*). La Figure 5-7(a'', b'') illustre très clairement l'apparition des zones en nids d'abeille également observées lors de l'expérience précédente, montrant la pénétration de la molécule pharmacologique dans différentes strates du SC. On remarque également une meilleure homogénéité de la fluorescence du *Dextran-FITC* pouvant être attribuée à un meilleur contact entre le dispositif et la surface de la peau.

Il faut noter aussi que les marques fluorescentes de l'anode et la cathode sont plus rapprochées, contrairement aux expériences précédentes. Ceci est dû à la stimulation des muscles peauciers provoquant la contraction de la peau (*en survie*) et engendrant de ce fait le rapprochement des électrodes. Ce phénomène apparaît lors des stimulations électriques et s'accroît avec le nombre d'impulsions délivrées. Ce phénomène est directement relié à la contraction de la peau, qui dépend de l'intensité du champ électrique.

L'échantillon DWNT-AG présente également ce phénomène de contraction qui était moins visible sur les expériences précédentes. Dans tous les cas, les paramètres électriques doivent être adaptés de manière à prévenir toute mise en contact des deux électrodes. Ce contact provoque un court-circuit (*les lignes de champ ne passent plus dans la peau*). Les mesures quantitatives de fluorescence effectuées sur la Figure 5-7(a'', b'') présentent un niveau de fluorescence moyen de 2500 u.a. pour l'échantillon CTRL-AG contre 5000 u.a. pour l'échantillon DWNT-AG soit un facteur 2.

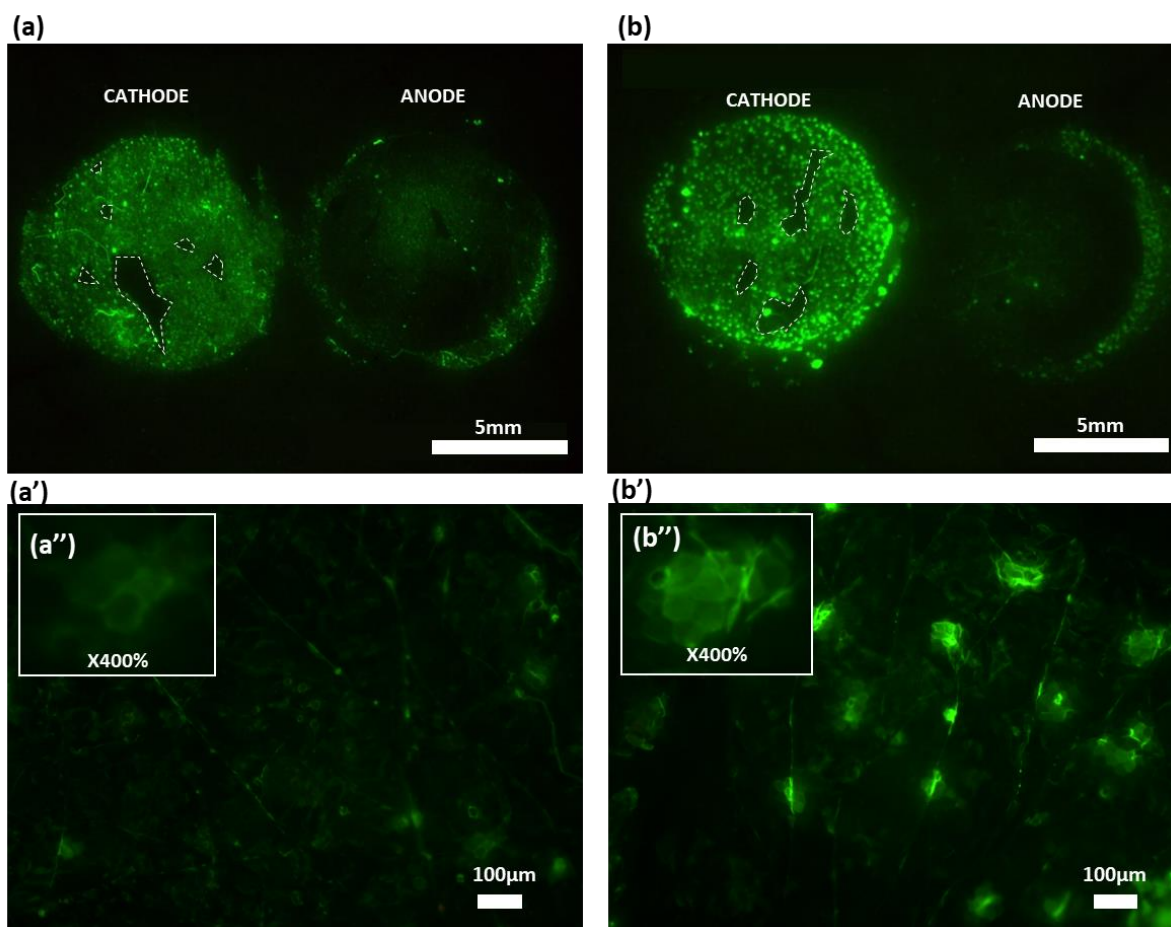


Figure 5-7 : Visualisation par microscopie à fluorescence à différents grossissements de la peau de souris Nude lorsque les échantillons contenant du Dextran-FITC sont déposés à la surface de la peau pour les échantillons CTRL-AG (a, a') et DWNT-AG (b, b') avec stimulation électrique - (a) et (b) représentent les échantillons à faible grossissement illustrant les marques à la cathode et à l'anode. (a', b') représente un agrandissement au niveau la cathode au même niveau d'intensité ; (a'') zoom numérique X400 ; (b'') zoom numérique X400.

*Vu le caractère exploratoire de cette étude, la mise en place de protocoles ou d'expériences permettant de quantifier le nombre de molécules fluorescentes diffusées ou encore de déterminer la profondeur de pénétration nécessitera de nombreux travaux supplémentaires notamment par des mesures sur des coupes histologiques. Les expériences réalisées dans cette étude n'ont jamais été décrites dans la littérature. Ainsi, nous ne disposons pas de références pour comparer nos résultats.*

*Par ailleurs, les paramètres sélectionnés pour ces expériences ne sont pas optimisés pour l'utilisation de ce dispositif. En effet, l'idée est de provoquer la perméabilisation temporaire de la peau, puis une fois cet état atteint, d'utiliser des tensions plus faibles permettant de favoriser l'électrophorèse. Typiquement, il conviendrait d'appliquer des trains d'impulsions de très fortes tensions de l'ordre du kV pendant des temps très courts, de l'ordre de la  $\mu$ s, puis de diminuer la tension à des gammes comprises entre 10 et 50 V et des durées plus longues (de l'ordre de la ms ou s) pour favoriser le régime électrophorétique de la macromolécule.*

### B.iii. Tests d'électrostimulation couplés aux mesures de courant

Afin de mieux comprendre et interpréter les résultats précédemment observés en microscopie à fluorescence, nous avons utilisé lors des expériences d'électroporation, un dispositif de mesure de courant permettant de suivre son évolution en fonction du temps lors au niveau de la peau de souris. (cf. Chapitre 2 - Dispositif expérimental (protocoles))

#### a. Mesures de courant et observations ex vivo

##### □ Echantillons CTRL-AG et DWNT-AG1%

Dans la continuité des expériences précédentes, on se propose maintenant de mesurer le passage du courant au travers de la peau de souris pour les échantillons CTRL-AG et DWNT-AG1% séché puis regonflés. La Figure 5-8 présente les mesures de courant en fonction du temps lors de la dixième impulsion appliquée (dernière impulsion de 20 ms). On peut remarquer que l'allure de la courbe suit une décroissance exponentielle. En effet, le courant atteint un pic de 1,09 A pour l'échantillon CTRL-AG contre 1,29 A pour l'échantillon DWNT-AG. Le courant diminue ensuite pour atteindre approximativement 0,6 A. Les niveaux de courant sont très élevés ce qui confirme en partie la perméabilisation de la peau. Dans ces conditions expérimentales, on remarque que le courant qui traverse la peau pour l'échantillon DWNT-AG est bien supérieur à celui de l'échantillon CTRL-AG. Ceci illustre bien l'effet des DWNT sur le passage du courant.

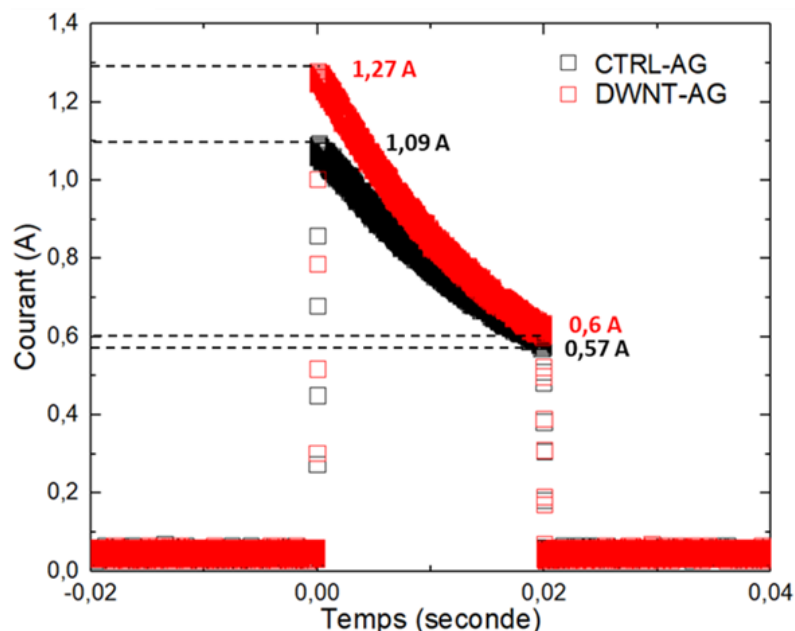


Figure 5-8 : Graphique représentant l'intensité du courant traversant la peau en fonction du temps lors de la dernière impulsion pour l'échantillon CTRL-AG et DWNT-AG dans les mêmes conditions expérimentales. (électrodes de contact en acier inoxydable).

Ces valeurs de courant sont relativement élevées et pourraient potentiellement entraîner une brûlure de la peau.

Toutefois, à ce stade de l'étude, il est difficile d'estimer, sans études approfondies, si la peau est modifiée de façon réversible ou irréversible. En effet, l'amplitude et le temps d'impulsions, ainsi que le nombre de répétitions sont des paramètres fondamentaux à prendre en compte afin d'établir une perméabilisation effective et réversible de la peau.

Par ailleurs, vu les valeurs de courant mesuré, il est possible d'atteindre dans ces conditions la fusion du stratum corneum (60°C) et de favoriser la croissance des LTR (*Local Transport Region*)<sup>160,335,336</sup>. Il est donc nécessaire de minimiser cet état de « fusion », étant donnée la non réversibilité de ce mécanisme<sup>337</sup>. La taille de ces LTR dépend de l'amplitude ainsi que de la durée des impulsions appliquées sur la peau. Ces régions caractéristiques ne sont observables que pour des hautes tensions appliquées<sup>338</sup>. Si le courant traversant ces régions augmente trop, il se produit alors la fusion du stratum corneum et une croissance des pores. Si les pores atteignent une taille critique, ils resteront ouverts, et ce même à température ambiante. Ils ne se refermeront alors que plusieurs heures après leur création<sup>218</sup> ceci pouvant engendrer l'entrée de bactéries dans les tissus. Toutefois, ces différentes hypothèses semblent encore controversées. En effet, la compréhension des mécanismes d'électroporation et d'échauffement du stratum corneum est encore un sujet activement étudié. Il est donc difficile de choisir un modèle pour nos électrodes qui intègrent des matériaux différents ainsi qu'une géométrie et une fonctionnalité différentes. L'interaction matériau/peau, ainsi que le profil du champ électrique traversant la peau peuvent en effet être modifiés par la présence des DWNT et engendrer différents effets. De plus amples investigations sont nécessaires pour décrire précisément ces phénomènes.

*La mesure de courant sur les échantillons déshydratés puis regonflés permettent de mettre en évidence l'effet des DWNT sur le passage du courant à travers la peau lors de la dixième impulsion.*

#### □ *Evolution du courant en fonction du nombre d'impulsions*

Les mesures relevées sur l'oscilloscope ont permis de tracer l'intensité maximale du courant en fonction de l'impulsion appliquée (*Figure 5-9*). Lors des premières impulsions, on observe une augmentation linéaire pour les échantillons. La pente de l'échantillon DWNT-AG présente une plus forte inclinaison. Le gain en courant est approximativement de 15% entre l'échantillon DWNT-AG et CTRL-AG. On peut remarquer que plus le nombre d'impulsions augmente et plus la perméabilisation de la peau est effective.

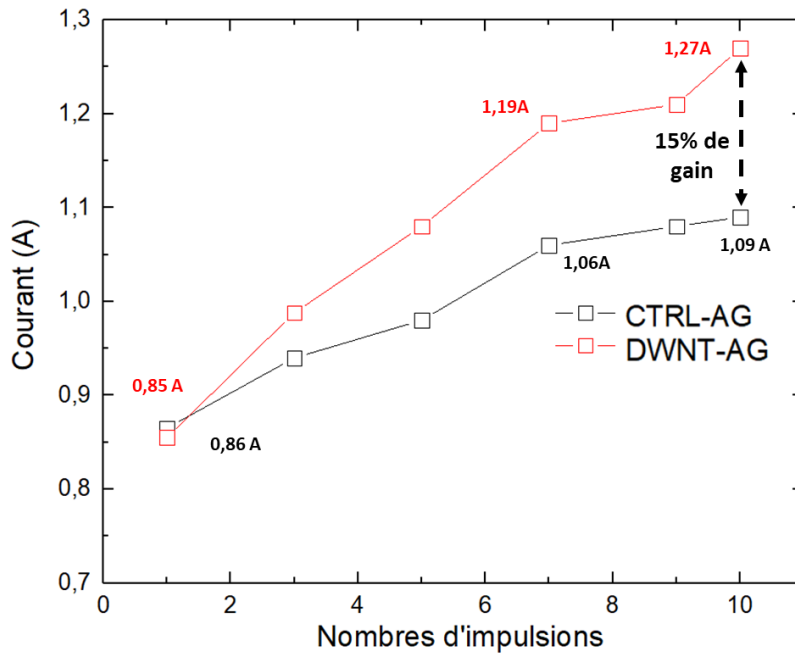


Figure 5-9 : Graphique illustrant l'évolution du courant au travers de la peau en fonction de l'impulsion (0 à 10) pour les échantillons CTRL-AG et DWNT-AG (électrodes de contact en acier inoxydable).

L'évolution du courant en fonction du nombre d'impulsions appliquées illustre l'effet du champ électrique sur la peau. Le passage du courant illustre l'état perméabilisé de la peau mais peut également traduire une certaine déstructuration si celui-ci est trop important ou augmente brutalement. Il semble que le courant augmente de façon linéaire avec le nombre d'impulsions, ce qui est en accord avec le fait que plus le nombre d'impulsions augmente et plus le courant augmente<sup>338</sup> (jusqu'à atteindre un seuil).

L'utilisation de l'hydrogel nanocomposite permet donc une augmentation de ce courant pour les mêmes paramètres électriques appliqués.

#### □ Observations en microscopie à fluorescence

L'observation de la surface de la peau souris a été effectuée selon le même protocole précédemment décrit. La Figure 5-10 montre la surface de la peau de souris aux niveaux des hydrogels et soumis au champ électrique. Les zones observées sont le côté de la cathode étant le plus proche de l'anode. Pour les deux échantillons, on observe une surface plus ou moins marquée par le *Dextran-FITC*. Néanmoins lorsque que l'on effectue en agrandissement, on s'aperçoit de la présence de structures hexagonales témoignant de la pénétration du principe actif dans le stratum corneum. Comme dans le cas précédent, le marquage de l'échantillon DWNT-AG est plus intense que pour l'échantillon CTRL-AG. Ces images appuient d'une part l'effet du champ électrique sur la peau mais également la pénétration du principe actif dans le SC. Les mesures quantitatives de fluorescence effectuées sur la Figure 5-10(a', b') présentent une intensité de fluorescence moyenne de 1000 u.a. pour l'échantillon CTRL-AG et de 1300 u.a. pour l'échantillon DWNT-AG. Bien que l'on ne retrouve pas le facteur 2 comme dans les expériences précédentes, ces mesures montrent une fluorescence plus importante

pour l'échantillon DWNT-AG et la présence du marquage en nid d'abeilles qui n'est pas ou peu présent pour l'échantillon CTRL-AG.

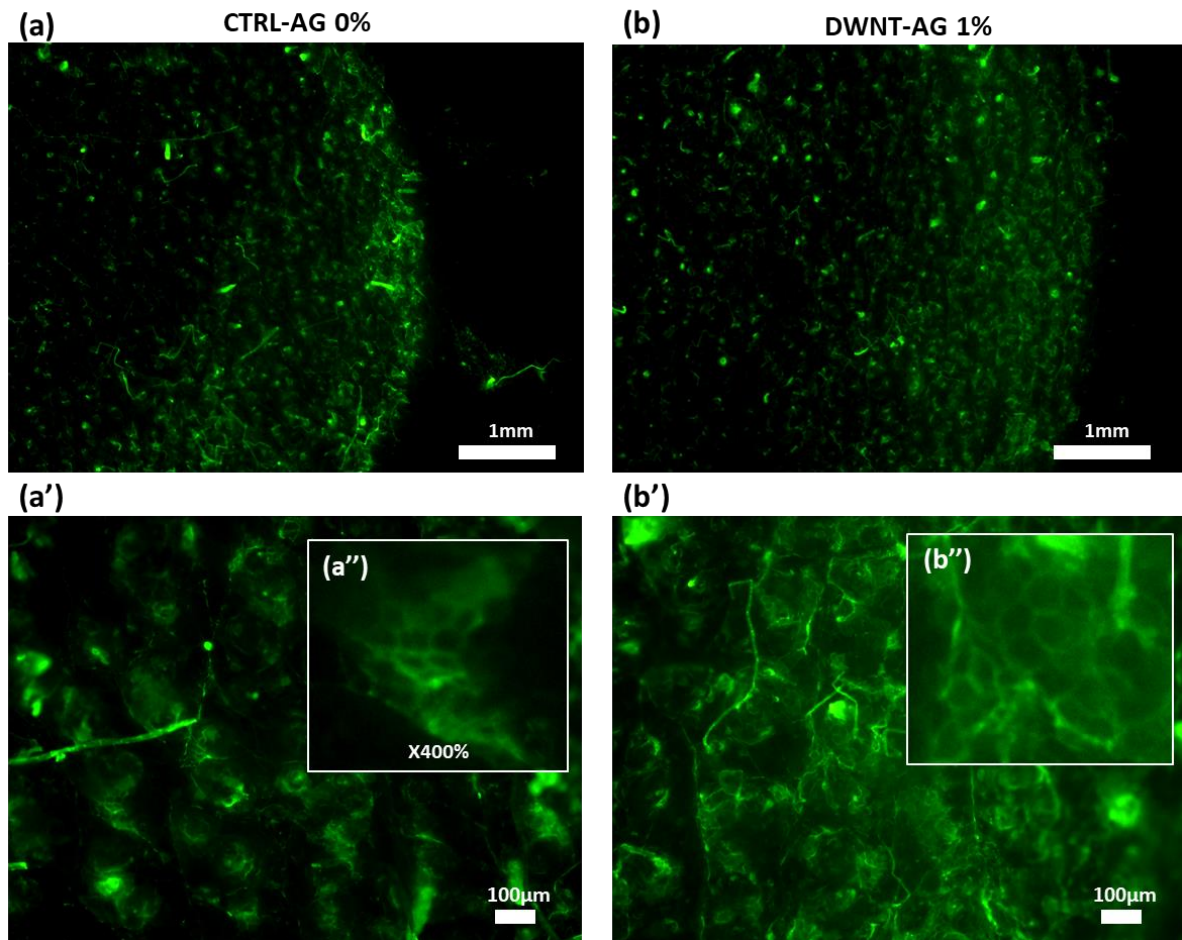


Figure 5-10 : Visualisation par microscopie à fluorescence à différents grossissements de la peau de souris Nude lorsque les échantillons contenant du Dextran-FITC sont déposés à la surface de la peau pour les échantillons CTRL-AG (a, a',) et DWNT-AG (b, b') avec stimulation électrique - (a) et (b) représentent les échantillons à faible grossissement illustrant les marquages fluorescents à la cathode où le champ électrique est maximum (distance inter électrode la plus faible). (a', b') représente un agrandissement au niveau la cathode au même niveau d'intensité ; (a'') et (b'') représente un zoom numérique X400 (électrodes de contact en acier inoxydable).

Ces résultats illustrent le potentiel de ce dispositif pour la diffusion transdermique de molécules, du point de vue des mesures électriques mais également du point de vue des observations microscopiques. Les mesures électriques en chapitre 4 ont montré qu'en augmentant le pourcentage massique en DWNT, il était possible d'améliorer significativement les propriétés électriques du dispositif à faible champ électrique. Pour cette raison, dans la suite de ce chapitre, nous avons donc d'effectué des tests sur peau de souris avec des pourcentages massiques de 10, 20, 30 et 40% en DWNT.

### C. Tests ex vivo couplés aux mesures de courant à différentes concentrations en DWNT

Ici les expériences consistent donc à évaluer le courant traversant le système (*Hydrogels/Peau*) ainsi que le relargage du dispositif lors des impulsions électriques (mêmes conditions expérimentales que précédemment) en faisant varier les concentrations en DWNT. Dans ces expériences, les échantillons hydrogels nanocomposites et hydrogel contrôle sont à l'état initial immergés dans un bain de *Dextran-FITC* 1 mM pendant 24 heures afin d'échanger l'eau désionisée présente dans le réseau par le *Dextran-FITC*. Ce choix est lié au fait que le séchage des hydrogels avec NTC à des concentrations importantes conduit à de fortes déformations du matériau, que nous avons souhaité éviter. Nous avons utilisé le même dispositif expérimental que précédemment décrit pour les 2 séries de tests effectués (cf. *Chapitre 2*).

#### □ Mesures du courant

Pour le test 01, on peut noter que l'intensité du courant mesuré augmente avec la concentration en DWNT. Le courant mesuré pour l'échantillon CTRL-AG est de 1 A. Cette valeur est quasi identique à celle obtenue précédemment. En revanche lors du test 02, le courant mesuré pour l'échantillon CTRL-AG est de 1,33 A ce qui est quasiment la valeur obtenue pour le test 01 à 20 et 30%. Cette valeur peut être en partie expliquée par le fait que les souris ont toutes une peau différente et un état surface différent plus ou moins homogène.

Hormis cette donnée, plus la quantité de DWNT augmente plus l'intensité de courant mesuré lors de la dernière impulsion augmente ce qui illustre bien l'influence des DWNT sur le passage du courant (*Tab.5-1(Test01)*). En revanche, les intensités obtenues sont plus faibles ou du même ordre que celles obtenues pour 1% en DWNT.

Tableau 5-2 : Mesures des intensités de courant maximales et minimales à la dernière impulsion associée pour les 2 tests.

CONCENTRATION	TEST 1		TEST 2	
	IMAX	IMIN	IMAX	IMIN
0%	1	0,27	1,33	0,97
10%	1,09	0,27	1,06	0,86
20%	1,12	0,28	1,31	0,9
30%	1,19	0,3	1,36	0,96
40%	1,3	0,3	1,54	1,06

## □ Evolution du courant en fonction du nombre d'impulsions

La Figure 5-11 (TEST02) présente les mesures de courant ( $I_{max}$ ) en fonction du nombre d'impulsion appliquée. Lors des premières impulsions, on observe une augmentation linéaire pour tous les échantillons. La pente de la droite pour l'échantillon DWNT-AG 40% est semblable à celles obtenues pour des concentrations inférieures en DWNT. On constate que tous les échantillons suivent une même tendance, à savoir une augmentation du courant en fonction de la concentration, excepté pour l'échantillon CTRL-AG, qui présente un  $I_{max}$  élevé, quelle que soit l'impulsion. Pour vérifier s'il s'agit bien de la nature de la peau utilisée, le test nécessite d'être répété plusieurs fois. Concernant les tests effectués avec les électrodes en acier inoxydable, on peut constater que le courant est très élevé et constant et ce dès les premières impulsions.

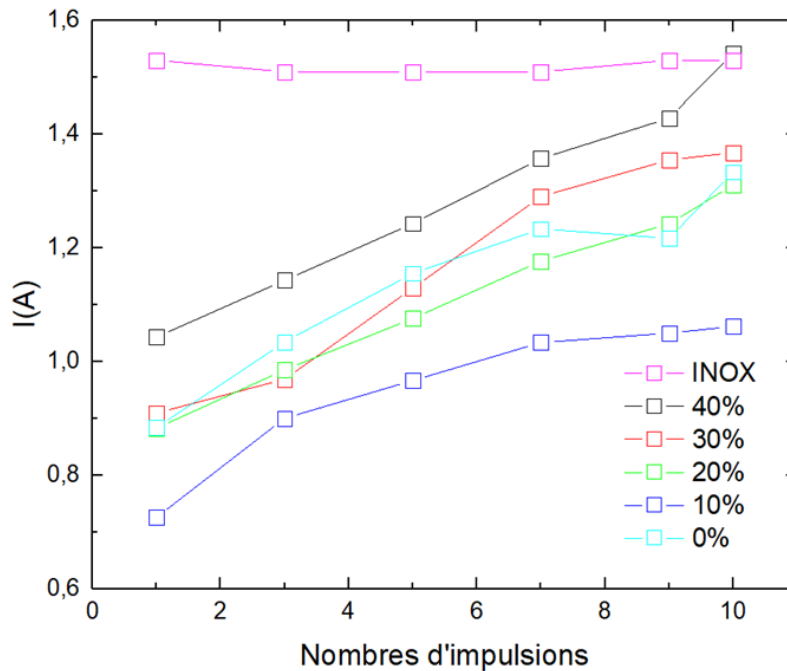


Figure 5-11 : Graphique illustrant l'évolution du courant au travers de la peau en fonction de l'impulsion (0 à 10) pour les échantillons CTRL-AG et DWNT-AG10, 20, 30, 40% massique. (données non acquises pour le Test 01) (électrodes de contact en acier inoxydable).

Ces expériences illustrent l'influence des DWNT sur le passage du courant. Toutefois, pour acquérir plus d'informations, il serait nécessaire de calculer la puissance dissipée pour chaque impulsion (donnée non acquise). En effet, le produit  $U \times I$  permet d'obtenir la puissance à un temps  $t$  et donc de calculer la puissance totale dissipée par ces 10 impulsions. Comme dans le cas précédent l'augmentation du courant induit à priori la perméabilisation de la peau et favorise la croissance des LTR (Local Transport région)<sup>221,335,336</sup>.



## □ Observations en microscopie à fluorescence

La Figure 5-12 présente des images en microscopie à fluorescence à différents grossissements correspondant à deux séries d'expériences réalisées pendant les mesures de courant avec les échantillons *CTRL-AG* et *DWNT-AG@10, 20, 30, 40%* massique. Les Figures 5-13 (a, b, c, d, e) montrent la surface de la peau exposée (Cathode, Anode). On n'observe pas de différence à ces grossissements mis à part pour les échantillons (ANODE) *CTRL-AG* et *DWNT-AG@10%* qui présentent des traces de fluorescence qui pourraient être attribuées à la présence de *Dextran-FITC* en excès en surface des échantillons (phénomène rarement observé dans ces travaux). Concernant la Figure 5-13(A, B, C, D, E), on observe un marquage plus ou moins intense selon l'échantillon. En revanche, l'échantillon *DWNT-AG@40%* (Fig.5-12(A)) présente une déformation assez conséquente du côté de l'anode, qui pourrait provenir du courant intense (1,5A) qui a traversé l'échantillon.

A plus fort grossissement (Fig.5-12(a', b', c', d', e')), du côté cathode, on peut observer que l'échantillon *DWNT-AG@40%* présente un marquage uniquement sur les poils à la surface de la peau et ne semble pas présenter de marquage analogue aux nids d'abeille comme précédemment observés bien que les mesures de courant ont permis de déterminer une intensité de courant maximum de 1,3 A.

Les échantillons *DWNT-AG@10, 20%* présentent également des formes en nid d'abeille mais en moins grandes proportions que pour l'échantillon *CTRL-AG*.

Lorsque la concentration en *DWNT* passe de 40 à 10%, il semble que l'on constate une diminution de la quantité de *Dextran* relarguée. Effectivement, l'échantillon *CTRL-AG* à fort grossissement (Fig.5-12(e')) montre de nombreuses marques fluorescentes sous forme de nids d'abeille illustrant la pénétration du *Dextran-FITC* dans le stratum corneum, alors qu'il présente une intensité maximale de courant mesurée de 1 A qui est plus faible que celles mesurées pour les échantillons *DWNT-AG@10, 20, 30, 40%*.

Il semblerait donc que la concentration en *DWNT* pourrait jouer un rôle sur le relargage de la molécule. Ainsi, il est possible qu'étant donnée la forte quantité de *DWNT*, le relargage du *Dextran-FITC* s'effectue de manière différente. On peut également imaginer que la densité de courant contraigne fortement le matériau empêchant tout relargage.

Concernant le test 02 (Fig.5-12(A', B', C', D', E')) on peut observer que la plupart des échantillons présentent des marquages fluorescents révélant des formes en nids d'abeille caractéristique du stratum corneum. On peut discerner que le nombre de ces structures semble diminuer en fonction de l'augmentation de la concentration en *DWNT*.

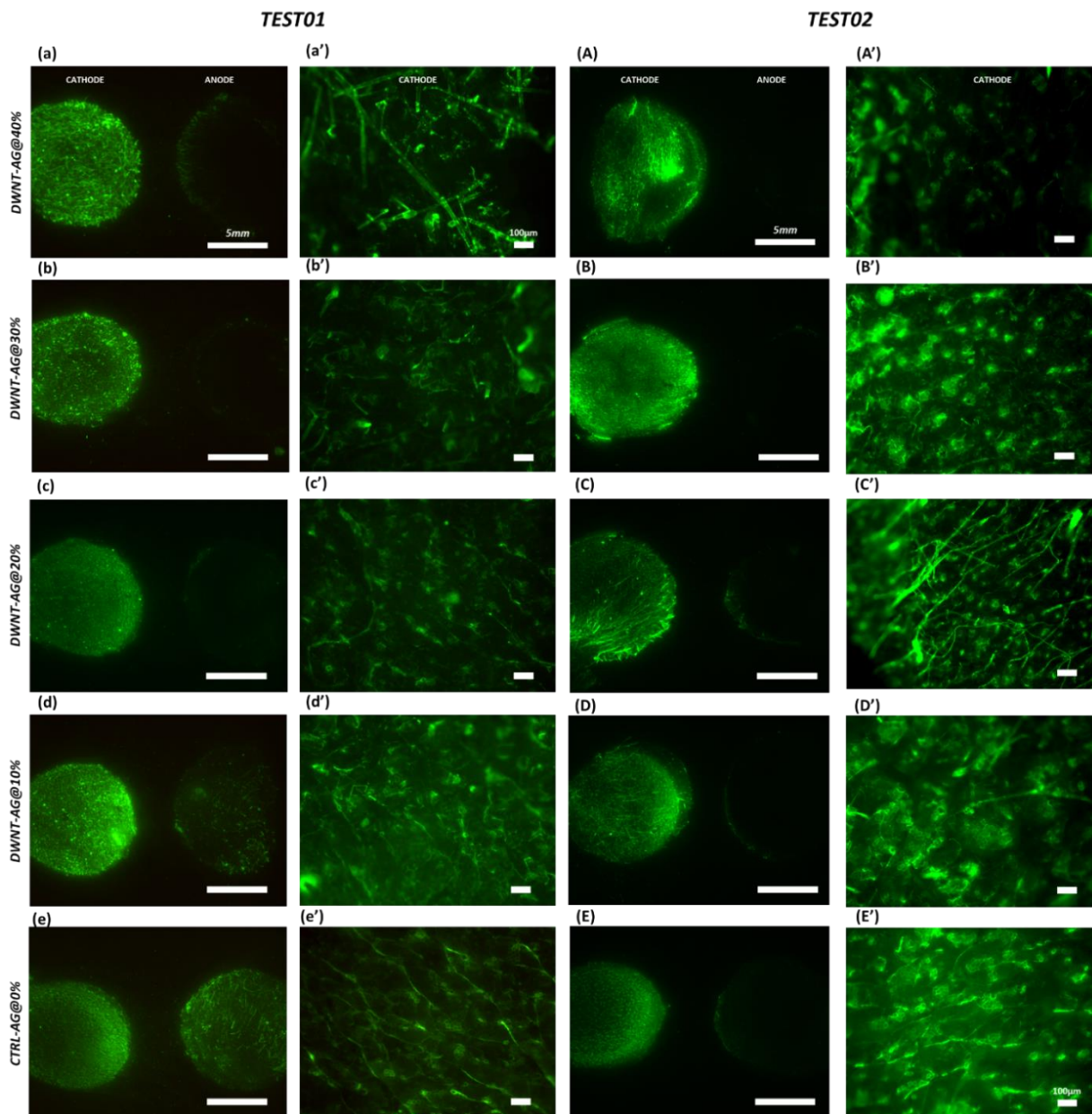


Figure 5-12 : Visualisation par microscopie à fluorescence à différents grossissements de la peau de souris Nude lorsque les échantillons contenant du Dextran-FITC sont déposés à la surface de la peau pour les échantillons CTRL-AG (e, e', E, E') et DWNT-AG (a, a' A, A' (40%*m*), b, b', B, B'(30%*m*), c, c', C, C'(20%*m*), d, d', D, D'(10%*m*)) avec stimulation électrique ; (a, A, b, B, C, c, d, D, e, E) représentent les images à faible grossissement au niveau de la cathode et de l'anode, les images (a', A', b', B', C', c', d', D', e', E') représentent à fort grossissement la zone coté cathode ayant la distance inter électrode la plus faible (champ maximum) (électrodes de contact en acier inoxydable).

Ces expériences nécessitent de plus amples investigations afin de comprendre plus précisément l'influence des DWNT sur la perméabilisation de la peau mais également sur le relargage de la molécule. En effet le champ électrique appliqué est déjà très élevé et il serait

*nécessaire de déterminer le seuil de perméabilisation de la peau avec les échantillons DWNT- AG et CTRL-AG en faisant varier la tension appliquée. De plus, les intensités de courant nous montrent que pour une même valeur, la perméabilisation ou du moins le transfert à travers du SC est diminué lorsque la quantité de DWNT augmente suggérant un relargage ou une capacité de stockage moins importante.*

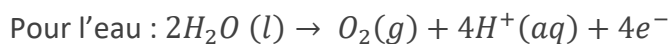
*Les expériences réalisées ont eu pour but de démontrer les potentialités d'hydrogels à base de nanotube de carbone concernant leur utilisation pour la délivrance transdermique. Le manque de temps ne nous a pas permis d'aller plus loin dans l'optimisation des paramètres électriques et la compréhension des phénomènes mis en cause (perméabilisation, diffusion à travers le SC, relargage stimulé,...).*

## **D. Observation topographique des échantillons**

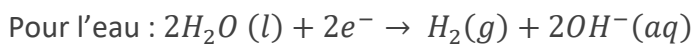
Au cours des expériences, (Fig.5-6, 5-7) nous avons détecté des modifications au niveau de l'électrodes de contact en cuivre mais aussi au niveau des hydrogels. Nous avons donc décidé de regarder ces modifications en partant de l'hypothèse que comme nous appliquons un courant continu, des phénomènes d'électrolyse et oxydo-réduction pouvaient se produire au niveau des hydrogels.

La tension minimale de décomposition de l'eau est de 1,3V (par rapport à une électrode de référence à hydrogène), ce qui correspond à l'équilibre thermodynamique de la réaction, l'ampérage lui détermine le flux de gaz produit. La tension minimale d'électrolyse est indépendante de l'électrolyte utilisé, en revanche la tension appliquée dépend de la nature des électrodes, de l'intensité du courant ainsi que de la température. Les réactions électrochimiques pouvant se produire sont :

### **☐ A l'anode (Oxydation) :**



### **☐ A la cathode (Réduction) :**



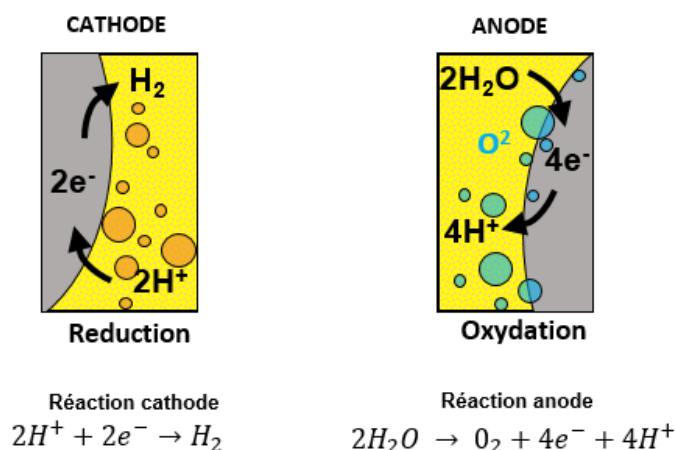


Figure 5-13: Réactions électrochimiques aux interfaces des électrodes dans la configuration où la solution est présente entre les électrodes pendant l'application du champ électrique (électrolyse de l'eau). (électrodes de contact en cuivre).

On devrait donc observer la corrosion du cuivre du côté de l'anode, et donc comme nous l'avons précédemment observé le relargage à la cathode. (Les observations proviennent des échantillons CTRL-AG et DWNT-AG1%*m* séché et regonflé)

### a. Analyses optiques

La Figure 5-14 représente l'échantillon CTRL-AG à l'anode et à la cathode uniquement car l'échantillon DWNT-AG est difficilement observable en microscopie optique étant donné l'opacité et la couleur noire du matériau. On peut remarquer deux états de surface différents. La cathode (Fig.5-14(a, a')) présente une surface relativement lisse avec certaines imperfections en surface ainsi que quelques bulles en faible quantité, si l'on compare à la l'anode. La Figure 5-14(b, b') illustre la morphologie de l'anode où l'on peut clairement identifier la formation d'une multitude de bulles, à priori initialement remplies d'oxygène. Cependant, la morphologie (surfaique) à un plus fort grossissement (Fig.5-14(b')) semble similaire à celle de la cathode.

Dans les encadrés de la Figure 5-14(a, b), sont montrées les surfaces respectives des électrodes en cuivre en contact avec l'hydrogel coté cathode et côté anode. La cathode ne présente pas de défauts majeurs de corrosion ou de dépôt. L'anode, elle, est largement corrodée et dégradée par l'électrolyse de l'eau. La corrosion du métal engendre donc la libération d'ions  $Cu^{2+}$  qui pourraient potentiellement interagir avec la peau s'ils parvenaient à diffuser au travers de l'hydrogel. Lors des expériences, nous avons également remarqué que le disque en cuivre reste collé à la surface de l'hydrogel uniquement du côté de l'anode, ce qui pourrait être lié soit à la corrosion de l'électrode, soit suggérer une augmentation au moins locale de température. Dans notre configuration, sans inversion de polarité des électrodes, l'anode ne permet pas le transfert de molécules au travers du SC. Les réactions électrochimiques semblent également engendrer la déstructuration du matériau à la l'anode.

Néanmoins, pour éviter ces phénomènes à priori majoritairement anodiques, il semblerait préférable d'utiliser des électrodes en métal inerte tel que le platine ou encore l'or.

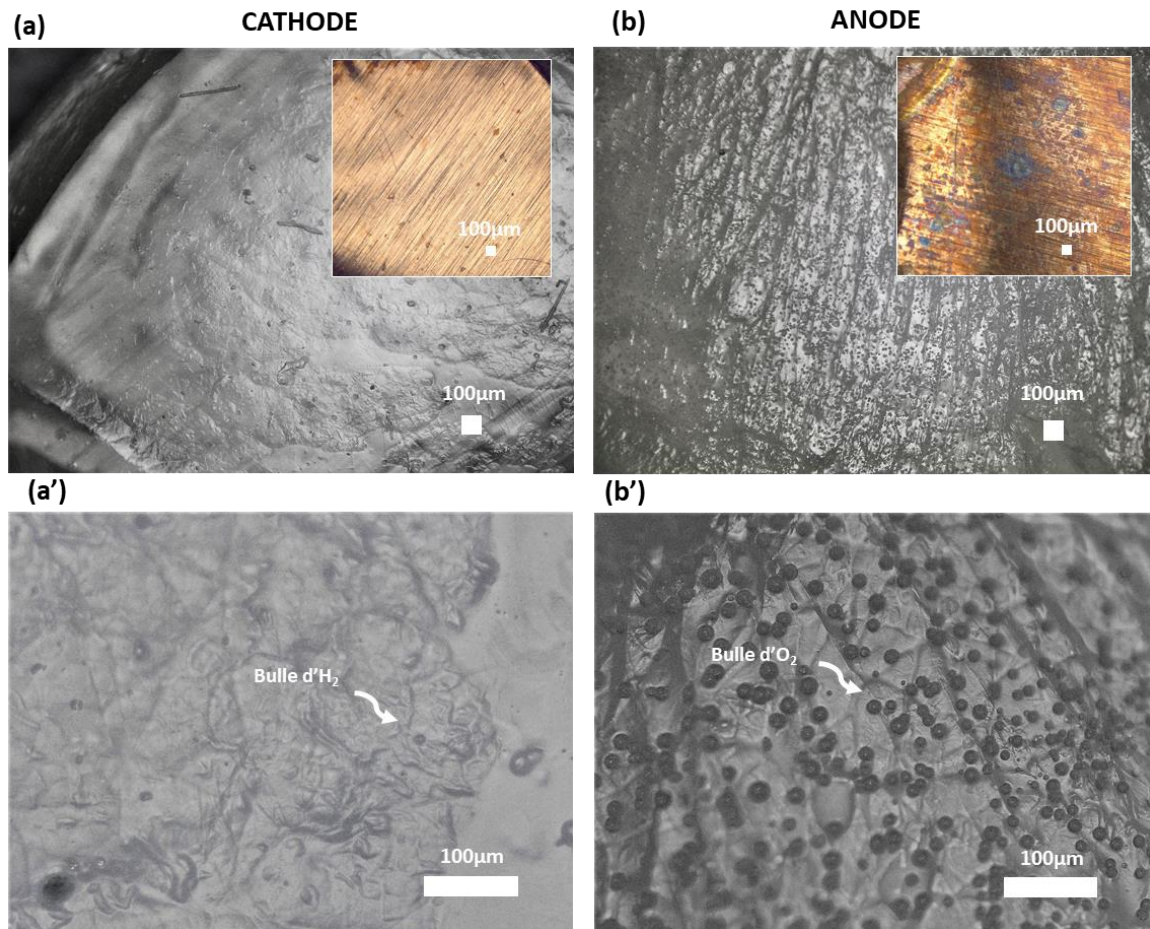


Figure 5-14 : Visualisation par microscopie optique à différents grossissements, des échantillons électrostimulés CTRL-AG coté électrode (a, a') et (b, b') illustrant la dégradation des échantillons.

L'électrolyse de l'eau produit normalement un volume de gaz à la cathode ( $H_2$ ) deux fois supérieur au volume de gaz produit à l'anode ( $O_2$ ), ce qui n'est pas vraiment le cas dans nos observations. Finalement, on peut penser que la distance inter électrode (qui modifie l'intensité du champ électrique) et la durée des impulsions jouent également un rôle.

Une piste intéressante que nous n'avons malheureusement pas eu le temps de tester pourrait consister à intervertir de manière régulière la polarité des électrodes. Cette inversion de polarité, devrait permettre de limiter la formation d'hydrogène et (principalement) d'oxygène aux interfaces des électrodes mais également de la corrosion des électrodes.

## *b. Observations au MEB*

Des analyses en microscopie électronique à balayage ont été effectuées sur les échantillons DWNT-AG mis en œuvre en cathode et en l'anode. Le matériau après électrostimulation est d'abord déshydraté dans les conditions usuelles de séchage (température ambiante). La figure 5-15(a', a'') illustre la morphologie et l'état de surface de l'échantillon à la cathode. On peut remarquer un état de surface (Fig.5-15(a)) uniforme et lisse. Cette uniformité est également présente à fort grossissement. On peut remarquer en comparant la Figure 5-15(a, a') à la Figure 4-15 (cf. Chapitre 4) qu'il n'y pas de différences évidentes en terme de morphologie. En revanche du côté de l'anode Figure 5-15(b), on remarque une multitude de formes sphériques qui apparaissent à fort grossissement comme ayant une morphologie en "rose des sables". Il y a également des sortes d'ondulations visibles. Ces déformations montrent une altération de l'hydrogel nanocomposite a l'anode.

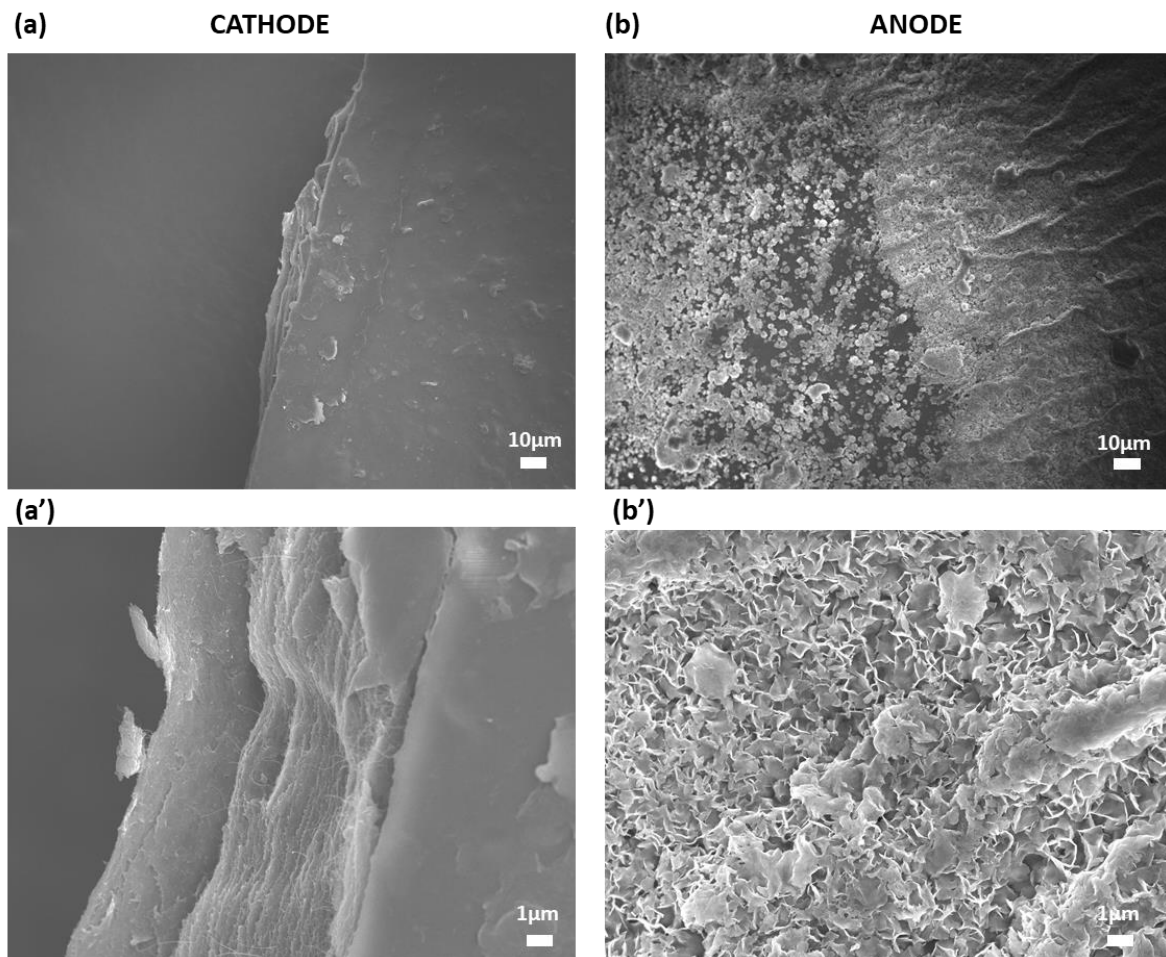


Figure 5-15 : Visualisation par microscopie électronique à balayage à différents grossissements des échantillons DWNT-AG à la cathode (a, a') et à l'anode (b, b') après électrostimulation.

*Cette expérience illustre l'état du matériau après électrostimulation. Il semble évident que celui-ci subit des modifications structurelles, notamment à l'anode siège de l'oxydation après l'application du champ électrique. Rappelons que les réactions électrochimiques à l'anode*

peuvent potentiellement provoquer l'échauffement du matériau au contact avec l'électrode en cuivre (dû au passage du courant), conduisant à sa déformation. Ces phénomènes pourraient cependant être limités, en adaptant les paramètres électriques (temps plus court), ou encore en intervertissant régulièrement la polarité des électrodes. Dans ce cas, la surface de transfert serait aussi doublée puisque les deux électrodes seraient efficaces.

## CONCLUSION

Les hydrogels et notamment les hydrogels nanocomposites ont des propriétés intéressantes et leur capacité de répondre aux stimuli externes en font des candidats de choix. La Figure ci-dessous propose une vision schématique de la réponse d'un hydrogel nanocomposite soumis à un champ électrique. Lorsque le courant électrique traverse le matériau, plusieurs mécanismes interviennent. Ainsi un gradient de contraintes est imposé par le champ électrique, la variation de pH (électrochimique), l'électroosmose ou encore l'électrophorèse agissent et confèrent au matériau la capacité de libérer une molécule hors de la matrice. La présence des nanomatériaux permet également d'améliorer la tenue mécanique du matériau, de mieux contrôler la régularité du relargage, mais également de modifier ses propriétés électriques.

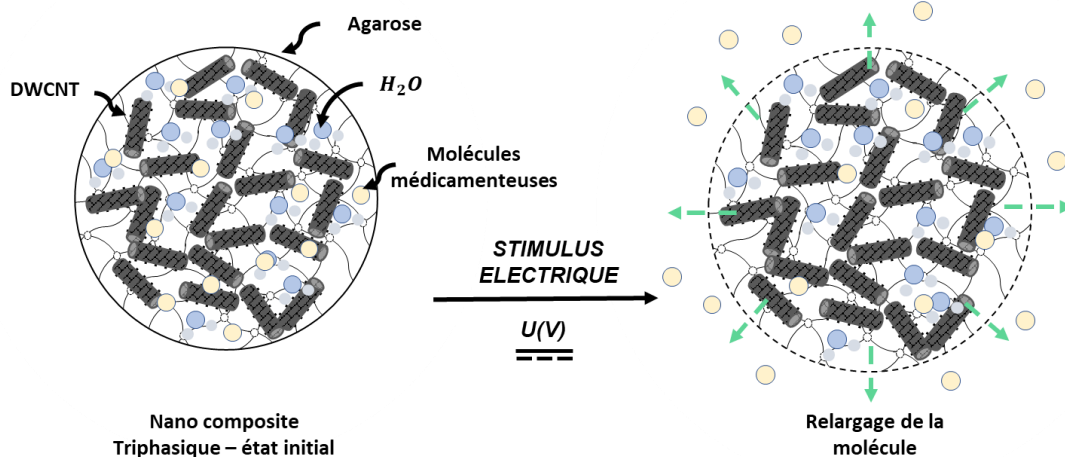


Illustration représentant le réseau d'un hydrogel nanocomposite à l'état initial et sous l'effet d'un stimulus électrique provoquant le relargage de molécules hors du réseau polymérique.

Une série d'expériences permettant de tester le dispositif sur la peau a été mise en place. Ces expériences ont été effectuées ex-vivo sur des peaux de souris « Nude ». Le principe était donc

de déposer nos matériaux à la surface de la peau et d'appliquer un champ électrique sous forme d'impulsions de tension continue.

La Figure suivante illustre le principe de l'expérience, lors de l'application du champ électrique entre nos dispositifs. Il est possible de perméabiliser et de déstabiliser par électroporation le stratum corneum en jouant sur les paramètres électriques comme l'amplitude du champ électrique, la répétition et la durée des impulsions. Lorsque la perméabilisation de la peau est effective, la molécule peut migrer sous l'effet des forces électrophorétiques tant que le champ électrique est appliqué. Après l'arrêt des impulsions, les molécules pourront diffuser vers les basses concentrations (selon la loi de Fick) tant que la peau est perméable.

Afin d'augmenter la quantité délivrée, on peut réduire l'amplitude du champ électrique appliqué et alors privilégier un régime électrophorétique. L'électrophorèse agit sur toutes les espèces chargées et permet d'entraîner la molécule au travers de la peau déjà perméabilisée dans le but de rejoindre les vaisseaux sanguins sans dégrader la peau.

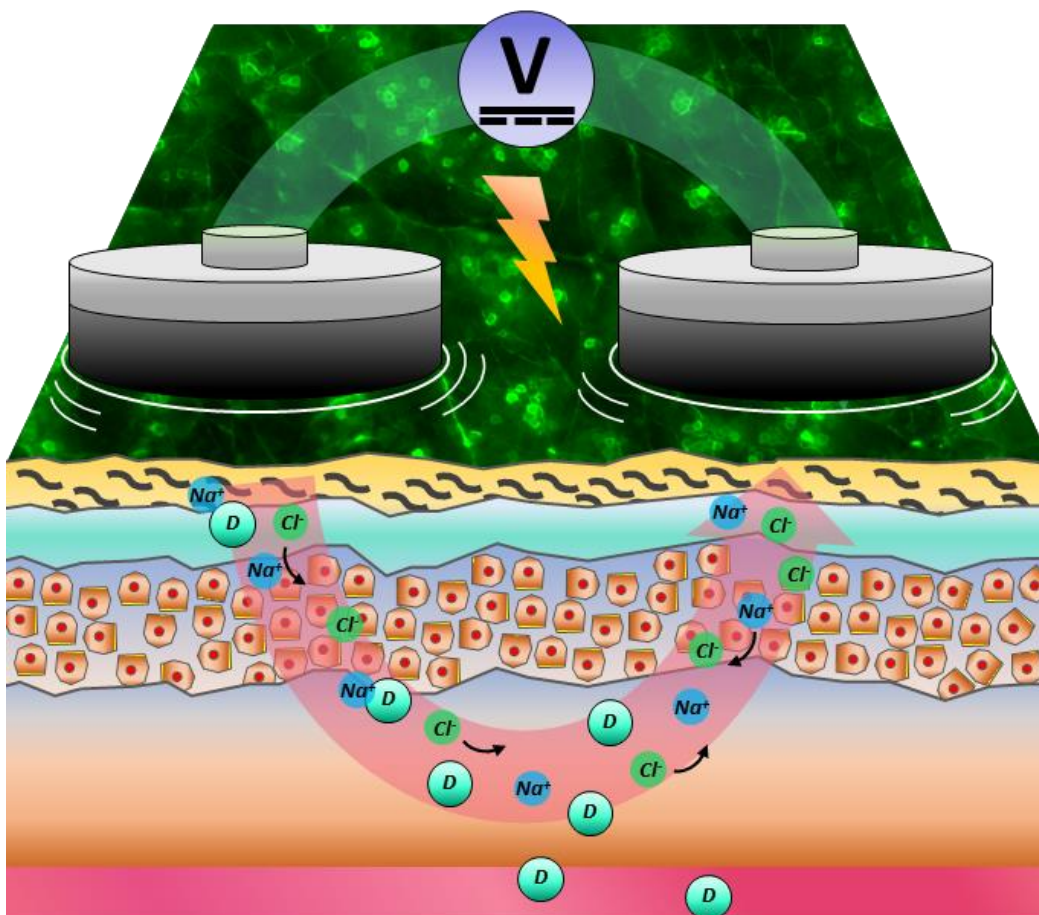


Schéma de principe d'un dispositif pour la délivrance transdermique de molécules pharmacologiques.

Le matériau réalisé au cours de ces travaux a permis de démontrer en partie son potentiel dans le but de développer un dispositif médical. En effet, les expériences ex-vivo ont montré que la



*pénétration du Dextran-FITC dans le stratum corneum avait lieu pour des champs électriques intenses. Par ailleurs, les mesures de courant réalisées montrent l'effet des DWNT sur le passage du courant au travers de la peau. Il semble logique que d'ajouter un régime électrophorétique permettra d'améliorer la pénétration de la molécule (après électroporation). Toutefois, il est évident que de nombreuses questions restent en suspens quant à la faisabilité d'utiliser un tel dispositif pour une application médicale. En effet, l'efficacité de délivrance, la profondeur de pénétration de la substance, l'optimisation des paramètres électriques, la tenue du dispositif dans le temps, etc ..., sont autant de points à éclaircir qui permettront de mieux comprendre l'interaction et la synergie peau / matériau et permettre de nous comparer à la littérature.*





## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

*L'objectif de ces travaux de thèse était de fabriquer un matériau à base de nanotubes de carbone (NTC) pour la délivrance transdermique de molécules pharmacologiques par électrostimulation. Le matériau nécessite donc de pouvoir stocker une molécule pharmacologique et ensuite de la relarguer sous l'influence d'un champ électrique. D'autre part, il est nécessaire que le matériau soit un bon conducteur électrique pour permettre la perméabilisation de la peau et la diffusion de la molécule au travers de ses différentes strates et notamment du stratum corneum. L'utilisation de NTC dans les nanocomposites avait pour but d'améliorer les propriétés intrinsèques (notamment électriques et mécaniques) de la matrice considérée. Ainsi le matériau nanocomposite devait présenter trois éléments ayant chacun leurs fonctionnalités, à savoir une matrice, les DWNT et la molécule active. La matrice devait être biocompatible, et posséder des propriétés de rétention d'une molécule d'intérêt à délivrer. Par ailleurs, la matrice devait aussi permettre l'emprisonnement des DWNT afin d'éviter tout relargage de ces derniers. Les DWNT apportent pour leur part la composante électrique associée à un renfort mécanique.*

*Dans un premier temps, différents matériaux ont été testés et plusieurs techniques de mise en forme ont été explorées dans le but d'évaluer la faisabilité d'un matériau nanocomposite répondant à ce cahier des charges. L'électrospinning, de par sa grande flexibilité, nous a permis d'obtenir rapidement et assez facilement des fibres PMMA/DWNT. Cependant, si l'idée de réaliser des structures cœur-coquille fibreuses dans lesquelles le principe actif est incorporé au cœur in situ pendant la synthèse fonctionne bien avec le PMMA, elle s'est avérée représenter un défi significatif dans le cas de polymères bio-sourcés et d'une mise en œuvre sans solvant organique. Ces essais nous ont toutefois permis d'explorer d'autres polymères qui présentent un potentiel pour la réalisation de ce matériau, et notamment les polysaccharides. D'autre part, un hydrogel d'agarose a pu être mis en forme par différentes techniques de séchage tel que le CO<sub>2</sub> supercritique et la lyophilisation. Malheureusement de nombreux critères, dont des morphologies inadaptées à notre cahier des charges, nous ont contraints à explorer d'autres voies de séchage.*

*Les hydrogels, qui répondent très favorablement à de nombreux critères du cahier des charges, se sont alors imposés et nous ont conduits à nous concentrer en particulier sur l'agarose. L'interdisciplinarité du projet NANODERM et notamment le point de vue juridique, nous a permis de comprendre rapidement les difficultés d'une potentielle future mise sur le marché dans le cas d'un "médicament" au sens de l'article L. 5111-1 du code de la santé publique (dans le cas où le dispositif est commercialisé avec le médicament déjà à l'intérieur) et a orienté nos travaux vers le séchage préalable de l'hydrogel, ainsi destiné à être incubé dans une solution de la molécule d'intérêt, par l'utilisateur final, préalablement à la mise en œuvre du dispositif. Dans ce cas, il ne s'agit "plus que" d'un dispositif médical (sachant que la présence de nanomatériaux le place cependant dans la catégorie la plus sévèrement contrôlée).*

*Nous avons développé sur ces bases la fabrication d'hydrogels nanocomposites contenant des NTC avec pour objectif une dispersion acceptable des NTC dans le nanocomposite. Nos résultats montrent que, s'il reste évidemment une marge de progrès, l'état de dispersion des NTC semble plus ou moins satisfaisant. Néanmoins de nombreuses questions restent en suspens quant à la configuration des DWNT au sein du réseau tridimensionnel. L'amorçage de la gélification (nucléation) provient de la présence de germes au sein de la solution qui, lorsque la température diminue (37°C), initient l'assemblage des chaînes entre elles pour construire un réseau tridimensionnel. Des études calorimétriques permettraient de mesurer l'influence de la présence des NTC sur les échanges énergétiques lors de la solubilisation et de la gélification de l'agarose. Enfin, pour compléter ces expériences, une étude en spectroscopie d'impédance permettrait d'évaluer le seuil de percolation des DWNT dans les nanocomposites à l'état déshydraté et ainsi de mieux comprendre l'influence de l'eau au sein de l'hydrogel lorsque ce dernier est regonflé. Un autre paramètre important concerne l'état initial des NTC avant mise en œuvre : ces derniers peuvent être utilisés secs (c'est le cas de la plupart de nos expériences), ou humides, c'est-à-dire non séchés après traitement de la poudre composite initiale. Dans ce cas, la redispersion est beaucoup plus facile, et conduit probablement à une dispersion plus homogène dans le matériau. Il serait intéressant d'appliquer cette approche de manière plus généralisée.*

*Les expériences concernant le séchage ont permis de déterminer une surface adaptée permettant de limiter la déformation lors du séchage des échantillons, surtout en la limitant à une variation d'épaisseur. Ce critère est important lorsque l'on se souvient que les nanocomposites doivent être connectés électriquement puisqu'une déformation limitée à une variation d'épaisseur permet de maintenir quant à elle la surface de contact la moins modifiée possible. Toutefois les expériences de regonflement ont illustré l'incapacité à l'agarose. Cette limitation semble provenir de la forte hydrophobie de l'agarose, qui en limite le regonflement. Cette hydrophobie pourrait cependant être modulée en intégrant dans la matrice des chaînes plus hydrophiles (en quantité modérée pour ne pas altérer significativement la gélification au cours du refroidissement). Par ailleurs dans le cadre des études interdisciplinaires et notamment du point de vue sociologique, les interactions directes avec les médecins diabétologues mais aussi indirectes avec des patients (association de parents d'enfants / adolescents diabétiques) nous ont permis d'identifier les besoins et attentes, et de les confronter à notre cahier des charges. Par exemple, le souhait souvent exprimé de rendre la prise d'insuline la plus discrète possible, nous a conduits à limiter autant que possible l'épaisseur du dispositif. La grande stabilité en pH de l'agarose permet de travailler avec des molécules d'origine différente, ce qui confère ainsi au dispositif une certaine versatilité.*

*La stabilité limitée de l'insuline sur des longues durées à température ambiante et le coût de l'insuline marquée par fluorescence nous ont orienté vers l'utilisation d'un polymère de masse molaire moyenne semblable, le dextran-FITC. L'étude du relargage dynamique de ce dernier a permis de déterminer la quantité que notre dispositif est capable de relarguer. Pour des hydrogels nanocomposites de 1 cm de diamètre initial, séchés et regonflés,*

*approximativement 2,8 unités sont relarguées, ce qui est faible comparativement aux besoins journaliers moyens d'un patient atteint de diabète insulino-dépendant. Cependant la surface utile des dispositifs peut facilement être augmentée (ainsi que leur épaisseur dans une certaine mesure), permettant d'augmenter considérablement la capacité de stockage et d'atteindre ainsi les quantités souhaitables. La géométrie des dispositifs peut aussi certainement être modifiée afin d'améliorer le profil des lignes de champ électrique, et améliorer ainsi l'homogénéité de la délivrance sur des surfaces plus importantes.*

*L'un des aspects indispensables du matériau était d'emprisonner durablement les DWNT au cœur de la matrice et les expériences effectuées ont permis de vérifier que même dans des conditions bien au-delà du champ d'application de notre dispositif (24 h à 50°C dans de la sueur artificielle), la libération de DWNT est des plus improbables. Toutefois pour aller plus loin et confirmer que les DWNT ne relarguent pas en situation réelle d'utilisation, c'est-à-dire sous l'application d'un champ électrique, il serait intéressant d'effectuer des mesures Raman en surface des peaux de souris.*

*Les caractérisations électriques ont été abordées sous différents angles permettant chacune un point de vue différent sur les propriétés électriques des hydrogels nanocomposites. La spectroscopie d'impédance, bien que réalisée dans une gamme de potentiel assez éloignée des conditions réelles de mise en œuvre, nous a permis d'étudier, à des concentrations diverses (0 à 40% m d'agarose), la conduction ionique dans les hydrogels. Par ailleurs, les mesures réalisées en courant-tension ont permis de travailler à des tensions électriques plus importantes et ainsi d'observer d'autres phénomènes non visibles par spectroscopie d'impédance. Le phénomène de conduction électrique semble être gouverné par un mécanisme de type Poole-Frenkel. Toutefois, les phénomènes de conduction de type Schottky gouvernés par les propriétés des électrodes ne peuvent pas être exclus. Si tel est le cas, l'étude devrait être complétée par des mesures avec des électrodes de nature différente. Il serait souhaitable de poursuivre les investigations et de pouvoir remonter précisément à la concentration en DWNT pour laquelle la densité de courant mesurée augmente significativement (mise en évidence d'un seuil de percolation lié à la présence des DWNT). Les possibilités importantes de variation de composition des hydrogels (teneur en agarose dans les hydrogels, concentration en DWNT dans l'agarose, taux de regonflement) rendent ce travail particulièrement long et fastidieux.*

*Enfin, les expériences réalisées ex vivo ont démontré la preuve de concept de la délivrance d'une molécule stockée dans les dispositifs sous électrostimulation et l'augmentation de cette délivrance lorsque les DWNT sont présents. Toutefois, cette pénétration n'est que superficielle (quelques  $\mu\text{m}$  sous la surface) et les paramètres électriques nécessitent d'être ajustés pour optimiser la perméabilisation ainsi que la délivrance du principe actif au travers de la peau. Par ailleurs, les mesures électriques réalisées ex-vivo ont également permis de mettre en évidence l'influence des DWNT sur le passage du courant au travers de la peau. Ces résultats illustrent que la perméabilisation de la peau est atteinte. Toutefois, les conditions de stimulation sont extrêmes par rapport à l'utilisation envisagée car elles sont susceptibles de*

*provoquer des contractions musculaires. Une des raisons pour lesquelles les NTC ont été choisis dans ces travaux est la possibilité qu'offrent ces derniers d'amplifier le champ et de permettre ainsi de diminuer la tension pour un résultat similaire. Bien que démontrés au niveau cellulaire par des travaux du CIRIMAT et de l'IPBS antérieurs à ces travaux de thèse, cette hypothèse reste à démontrer dans notre cas précis. Pour ce faire, il aurait été intéressant de déterminer le seuil de perméabilisation de la peau vis-à-vis du courant mesurée en fonction de la tension appliquée. En effet, en appliquant des tensions d'intensités croissantes, il est possible de déterminer la valeur seuil pour laquelle on observe un transport de molécules au travers du stratum corneum et mettre ce transport en corrélation avec une augmentation du courant mesurée au niveau de la peau*

*Pour terminer, les hydrogels nanocomposites et notamment à base d'agarose répondent à de nombreuses questions quant à la faisabilité d'un tel dispositif. Les DWNT influencent de manière positive les propriétés électriques et mécaniques, tandis que la stabilité de l'agarose permet à la fois de contenir les DWNT mais également de stocker la molécule pharmacologique dans de bonnes conditions. Il existe bien entendu d'autres matériaux de matrice aux propriétés électriques potentiellement plus intéressantes tels que des polymères à caractère conducteur comme le PEDOT-PSS ou encore la Polyaniline dont le couplage aux DWNT pourrait permettre d'atteindre des propriétés électriques et mécaniques encore accrues (bien que le regonflement demeure à caractériser), en sacrifiant l'origine biosourcée du polymère.*

*Finalement, nous avons négligé ici les aspects "alimentation électrique" d'un tel dispositif, dont la miniaturisation représente aussi un critère décisif pour un développement réaliste. Cependant, nous avons également observé que des phénomènes d'électrochimie pouvaient avoir lieu. L'inversion de polarité pourrait diminuer ou amoindrir ces phénomènes. Ces aspects sont donc liés à l'optimisation des conditions d'électrostimulation (diminution de la tension maximale, inversion de polarité, couplage de différents phénomènes de perméabilisation / migration de la substance d'intérêt, etc.) qu'il était malheureusement prématuré d'étudier au*



*cours de ces travaux. Finalement, pour le rendre autonome, il faudrait encore coupler une mesure de la glycémie afin de permettre au dispositif de libérer de l'insuline en fonction des besoins, en temps réel. Dans un idéal encore très lointain, ce dispositif pourrait peut-être éventuellement être intégré dans un bracelet afin de faciliter le suivi du traitement et*

*d'améliorer la qualité de vie des patients. D'autre part, ce dispositif pourrait éventuellement servir à la délivrance d'autres molécules pharmacologiques.*





# REFERENCES

1. Monthioux, M. in *Carbon Meta-Nanotubes: Synthesis, Properties and Applications* 7–39 (Springer Berlin Heidelberg, 2011).
2. Kroto, H. W., Heath, J. R., O'Brien, S. C., Curl, R. F. & Smalley, R. E. C60: buckminsterfullerene. *Nature* **318**, 162 (1985).
3. Iijima, S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* **354**, 56–58 (1991).
4. Zhang, R., Zhang, Y., Zhang, Q., Xie, H., Qian, W., & Wei, F. Growth of Half-Meter Long Carbon Nanotubes Based on Schulz–Flory Distribution. *ACS Nano* **7**, 6156–6161 (2013).
5. Geim, A. K. & Novoselov, K. S. The rise of graphene. *Nat. Mater.* **6**, 183–191 (2007).
6. Jackson, P. *et al.* Bioaccumulation and ecotoxicity of carbon nanotubes. *Chem. Cent. J.* **7**, 154 (2013).
7. Iijima, S. & Ichihashi, T. Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. *Nature* **363**, 603–605 (1993).
8. Krätschmer, W., Lamb, L. D., Fostiropoulos, K. & Huffman, D. R. Solid C60: a new form of carbon. *Nature* **347**, 354–358 (1990).
9. Bethune, D. S., Kiang, C. H., De Vries, M. S., Gorman, G., Savoy, R., Vazquez, J., & Beyers, R. Cobalt-catalysed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layer walls. *Nature* **363**, 605–607 (1993).
10. Guo, T., Nikolaev, P., Rinzler, A. G., Tomanek, D., Colbert, D. T., & Smalley, R. E. Self-Assembly of Tubular Fullerenes. *J. Phys. Chem* **99**, 10694–10697 (1995).
11. Guo, T., Nikolaev, P., Thess, A., Colbert, D. T. & Smalley, R. E. Catalytic growth of single-walled nanotubes by laser vaporization. *Chem. Phys. Lett.* **243**, 49–54 (1995).
12. J W Seo, A Magrez, M Milas, K Lee, V. L. and L. F. Catalytically grown carbon nanotubes: from synthesis to toxicity. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **40**, (2007).
13. Rodriguez, N. M. A review of catalytically grown carbon nanofibers. *J. Mater. Res.* **8**, 3233–3250 (1993).
14. Dai, H., Rinzler, A. G., Nikolaev, P., Thess, A., Colbert, D. T., & Smalley, R. E. Single-wall nanotubes produced by metal-catalyzed disproportionation of carbon monoxide. *Chem. Phys. Lett.* **260**, 471–475 (1996).
15. Grüneis, A., Rummeli, M. H., Kramberger, C., Barreiro, A., Pichler, T., Pfeiffer, R., ... & Büchner, B. High quality double wall carbon nanotubes with a defined diameter distribution by chemical vapor deposition from alcohol. *Carbon N. Y.* **44**, 3177–3182 (2006).
16. Kumar, M. Carbon nanotube synthesis and growth mechanism. *Nanotechnol. Perceptions* **6**, 7–28 (2010).
17. Baker, R. T. K. Catalytic growth of carbon filaments. *Carbon N. Y.* **27**, 315–323 (1989).
18. Flahaut, E., Govindaraj, A., Peigney, A., Laurent, C., Rousset, A., & Rao, C. N. R. Synthesis of single-walled carbon nanotubes using binary (Fe, Co, Ni) alloy nanoparticles prepared in situ by the reduction of oxide solid solutions. *Chem. Phys. Lett.* **300**, 236–242 (1999).
19. Couteau, E., Hernadi, K., Seo, J. W., Thien-Nga, L., Mikó, C., Gaal, R., & Forro, L. *CVD synthesis of high-purity multiwalled carbon nanotubes using CaCO3 catalyst support for large-scale production. Chemical Physics Letters* **378**, (2003).
20. Hemadi, K., Fonseca, A., Nagy, J. B., Fudala, D. B. A. & Lu, A. A. Catalytic synthesis of carbon nanotubes using zeolite support. *Elsevier Sci. Inc.* **17**, 416–423 (1996).
21. Maruyama, S., Kojima, R., Miyauchi, Y., Chiashi, S. & Kohno, M. *Low-temperature synthesis of high-purity single-walled carbon nanotubes from alcohol. Chemical Physics Letters* **360**, (2002).
22. Flahaut, E., Bacsa, R., Peigney, A. & Laurent, C. Gram-scale CCVD synthesis of double-walled carbon nanotubes. *Chem. Commun. (Camb).* **0**, 1442–1443 (2003).
23. Flahaut, E., Govindaraj, A., Peigney, A., Laurent, C., Rousset, A., & Rao, C. N. R. Synthesis of single-walled carbon nanotubes using binary (Fe, Co, Ni) alloy nanoparticles prepared in situ by the reduction of oxide solid solutions. *Chem. Phys. Lett.* **300**, 236–242 (1999).
24. Aitken, R. J., Chaudhry, M. Q., Boxall, A. B. A. & Hull, M. Manufacture and use of nanomaterials: Current status in the UK and global trends. *Occup. Med. (Chic. Ill).* **56**, 300–306 (2006).
25. Iijima, S., Brabec, C., Maiti, A. & Bernholc, J. Structural flexibility of carbon nanotubes. *J. Chem. Phys.* **104**, 2089–2092 (1996).
26. Myriam RICAUD, Dominique LAFON, F. R. Les nanotubes de carbone : quels risques, quelle prévention ? *INRS* 43–57 (2008).
27. Barkoula, N.-M. Environmental Degradation of Carbon Nanotube Hybrid Aerospace Composites. *Solid Mech. its Appl.* **188**, 337–376 (2013).
28. Wei, B. Q., Vajtai, R. & Ajayan, P. M. Reliability and current carrying capacity of carbon nanotubes. *Appl. Phys. Lett.* **79**, 1172–1174 (2001).
29. Hong, S. & Myung, S. NANOTUBE ELECTRONICS: A flexible approach to mobility. *Nature* **2**, 207–208 (2007).

30. Flahaut, E., Peigney, A., Bacsa, W. S., Bacsa, R. R. & Laurent, C. CCVD synthesis of carbon nanotubes from (Mg,Co,Mo)O catalysts: influence of the proportions of cobalt and molybdenum. *J. Mater. Chem.* **14**, 646 (2004).
31. Seichepine, F., Flahaut, E. & Vieu, C. A simple and versatile method for statistical analysis of the electrical properties of individual double walled carbon nanotubes. *Microelectron. Eng.* **88**, 1637–1639 (2011).
32. Soto, M., Boyer, T. A., Biradar, S., Ge, L., Vajtai, R., Elías-Zúñiga, A., Barrera, E. V. Effect of interwall interaction on the electronic structure of double-walled carbon nanotubes. *Nanotechnology* **26**, 165201 (2015).
33. Ghedjatti, A., Magnin, Y., Fossard, F., Wang, G., Amara, H., Flahaut, E., Loiseau, A. Structural Properties of Double-Walled Carbon Nanotubes driven by ( Mechanical / Stress ) Interlayer Coupling . *ACS Nano* **11(5)**, 1–27 (2017).
34. Lu, F., Gu, L., Mezziani, M. J., Wang, X., Luo, P. G., Veca, L. M., Sun, Y. P. Advances in bioapplications of carbon nanotubes. *Adv. Mater.* **21**, 139–152 (2009).
35. Arkan, E., Saber, R., Karimi, Z., Mostafaie, A. & Shamsipur, M. Multiwall carbon nanotube-ionic liquid electrode modified with gold nanoparticles as a base for preparation of a novel impedimetric immunosensor for low level detection of human serum albumin in biological fluids. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **92**, 74–81 (2014).
36. Wang, S. , Zhang, Q., Wang, R. & Yoon, S. . A novel multi-walled carbon nanotube-based biosensor for glucose detection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**, 572–576 (2003).
37. Bédier, A., Seichepine, F., Flahaut, E., Loubinoux, I., Vaysse, L., & Vieu, C. Elucidation of the role of carbon nanotube patterns on the development of cultured neuronal cells. *Langmuir* **28**, 17363–17371 (2012).
38. Lovat, V., Pantarotto, D., Lagostena, L., Cacciari, B., Grandolfo, M., Righi, M., ... & Ballerini, L. Carbon nanotube substrates boost neuronal electrical signaling. *Nano Lett.* **5**, 1107–1110 (2005).
39. Mazzatenta, A., Giugliano, M., Campidelli, S., Gambazzi, L., Businaro, L., Markram, H., ... & Ballerini, L. Interfacing Neurons with Carbon Nanotubes: Electrical Signal Transfer and Synaptic Stimulation in Cultured Brain Circuits. *J. Neurosci.* **27**, 6931–6936 (2007).
40. Bianco, A. & Ménard-Moyon, C. Atténuation de la toxicité des nanotubes de carbone grâce à la fonctionnalisation chimique. *Tech. l'ingénieur* (2014).
41. Flahaut, E., Durrieu, M. C., Remy-Zolghadri, M., Bareille, R. & Baquey, C. Investigation of the cytotoxicity of CCVD carbon nanotubes towards human umbilical vein endothelial cells. *Carbon N. Y.* **44**, 1093–1099 (2006).
42. Firme, C. P. & Bandaru, P. R. Toxicity issues in the application of carbon nanotubes to biological systems. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **6**, 245–256 (2010).
43. Yan, L., Zhao, F., Li, S., Hu, Z. & Zhao, Y. Low-toxic and safe nanomaterials by surface-chemical design, carbon nanotubes, fullerenes, metallofullerenes, and graphenes. *Nanoscale* **3**, 362–382 (2011).
44. Lacerda, L., Soundararajan, A., Singh, R., Pastorin, G., Al-Jamal, K. T., Turton, J., Emfietzoglou, D. Dynamic Imaging of functionalized multi-walled carbon nanotube systemic circulation and urinary excretion. *Adv. Mater.* **20**, 225 (2008).
45. Georgin, D., Czarny, B., Botquin, M., Mayne-L'Hermitte, M., Pinault, M., Bouchet-Fabre, B., Dive, V. Preparation of 14 C-Labeled Multiwalled Carbon Nanotubes for Biodistribution Investigations. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 14658–14659 (2009).
46. Nel, A. E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E. M., Somasundaran, P., Thompson, M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nat. Mater.* **8**, 543–557 (2009).
47. M Kelly, C. Beyond Implications and Applications: the Story of ‘Safety by Design’. *Nanoethics* **3**, 79–96 (2009).
48. Callister, W. & Rethwisch, D. Materials science and engineering: an introduction. *Mater. Sci. Eng.* **94**, 266–267 (2007).
49. Sanchez, C., Ribot, F., Rozes, L. & Alonso, B. Design of Hybrid Organic-Inorganic Nanocomposites Synthesized Via Sol-Gel Chemistry. *Mol. Cryst. Liq. Cryst. Sci. Technol. Sect. A. Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **354**, 143–158 (2000).
50. Kelly, A. (Anthony), Cahn, R. W. (Robert W. . & Bever, M. B. (Michael B. *Concise encyclopedia of composite materials*. (Pergamon, 1994).
51. Ma, S. B., Nam, K. W., Yoon, W. S., Yang, X. Q., Ahn, K. Y., Oh, K. H., & Kim, K. B. Electrochemical properties of manganese oxide coated onto carbon nanotubes for energy-storage applications. *J. Power Sources* **178**, 483–489 (2008).
52. Azeredo, H. M. C. de. Nanocomposites for food packaging applications. *Food Res. Int.* **42**, 1240–1253 (2009).
53. Rajesh, Ahuja, T. & Kumar, D. Recent progress in the development of nano-structured conducting polymers/nanocomposites for sensor applications. *Sensors Actuators B Chem.* **136**, 275–286 (2009).
54. Beecroft, L. L., & Ober, C. K. Nanocomposite Materials for Optical Applications. *Chem. Mater.* **9(6)**, 1302–1317 (1997).
55. Alexandre, M. & Dubois, P. Polymer-layered silicate nanocomposites: Preparation, properties and uses of a new class of materials. *Mater. Sci. Eng. R Reports* **28**, 1–63 (2000).
56. Ajayan, P. M., Stephan, O., Colliex, C. & Trauth, D. Aligned Carbon Nanotube Arrays Formed by Cutting a Polymer Resin--Nanotube Composite. *Science (80-. J.)* **265**, 1212–1214 (1994).
57. Han, Z. & Fina, A. Thermal conductivity of carbon nanotubes and their polymer nanocomposites: A review. *Prog. Polym. Sci.* **36**, 914–944 (2011).

58. Barrau, S., Demont, P., Peigney, A., Laurent, C. & Lacabanne, C. Dc and ac conductivity of carbon nanotubes-polyepoxy composites. *Macromolecules* **36**, 5187–5194 (2003).
59. Thostenson, E. T., Ren, Z. & Chou, T.-W. Advances in the science and technology of carbon nanotubes and their composites: a review. *Compos. Sci. Technol.* **61**, 1899–1912 (2001).
60. Thostenson, E. T., Li, C. & Chou, T. W. Nanocomposites in context. *Composites Science and Technology* **65**, 491–516 (2005).
61. Flahaut, E., Laurent, C. & Peigney, A. Catalytic CVD synthesis of double and triple-walled carbon nanotubes by the control of the catalyst preparation. *Carbon N. Y.* **43**, 375–383 (2005).
62. Bourdiol, F., Mouchet, F., Perrault, A., Fourquaux, I., Datas, L., Gancet, C., Flahaut, E. Biocompatible polymer-assisted dispersion of multi walled carbon nanotubes in water, application to the investigation of their ecotoxicity using *Xenopus laevis* amphibian larvae. *Carbon N. Y.* **54**, 175–191 (2013).
63. Ma, P.-C., Siddiqui, N. A., Marom, G. & Kim, J.-K. Dispersion and functionalization of carbon nanotubes for polymer-based nanocomposites: A review. *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.* **41**, 1345–1367 (2010).
64. Bauhofer, W. & Kovacs, J. Z. A review and analysis of electrical percolation in carbon nanotube polymer composites. *Compos. Sci. Technol.* **69**, 1486–1498 (2009).
65. Ghanbarian, B., Hunt, A. G., Sahimi, M., Ewing, R. P. & Skinner, T. E. Percolation Theory Generates a Physically Based Description of Tortuosity in Saturated and Unsaturated Porous Media. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **77**, 1920 (2013).
66. Patel, A. & Mequanint, K. in *Biomaterials* **28**, 276–296 (2001).
67. Hoffman, A. S. Hydrogels for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 18–23 (2012).
68. Lin, C. C. & Metters, A. T. Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**, 1379–1408 (2006).
69. Chen, X., Martin, B. D., Neubauer, T. K., Linhardt, R. J., Dordick, J. S., & Rethwisch, D. G. Enzymatic and chemoenzymatic approaches to synthesis of sugar-based polymer and hydrogels. *Carbohydr. Polym.* **28**, 15–21 (1995).
70. Kashyap, N., Kumar, N. & Kumar, M. N. V. R. Hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **22**, 107–150 (2005).
71. Lee, K. Y. & Mooney, D. J. Hydrogels for tissue engineering. *Chem. Rev.* **101**, 1869–1879 (2001).
72. Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W. & Ichikawa, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **50**, 27–46 (2000).
73. Augst, A. D., Kong, H. J. & Mooney, D. J. Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromol. Biosci.* **6**, 623–633 (2006).
74. Kamath, K. R. & Park, K. Biodegradable hydrogels in drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **11**, 59–84 (1993).
75. Shi, Z., Gao, X., Ullah, M. W., Li, S., Wang, Q., & Yang, G. Electroconductive natural polymer-based hydrogels. *Biomaterials* **111**, 40–54 (2016).
76. Drury, J. L., & Mooney, D. J. Hydrogels for tissue engineering: Scaffold design variables and applications. *Biomaterials* **24**, 4337–4351 (2003).
77. Lee, K. Y. & Mooney, D. J. Hydrogels for Tissue Engineering Applications. *Chem. Rev.* **101**, 1869–1879 (2001).
78. Hoare, T. R. & Kohane, D. S. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer (Guildf).* **49**, 1993–2007 (2008).
79. Qiu, Y. & Park, K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 49–60 (2012).
80. Liu, Y., Hu, J., Zhuang, X., Zhang, P., Wei, Y., Wang, X., & Chen, X. Synthesis and Characterization of Novel Biodegradable and Electroactive Hydrogel Based on Aniline Oligomer and Gelatin. *Macromol. Biosci.* **12**, 241–250 (2012).
81. Wang, N. & Wu, X. S. Preparation and characterization of agarose hydrogel nanoparticles for protein and peptide drug delivery. *Pharm. Dev. Technol.* **2**, 135–142 (1997).
82. Wichterle, O. & Lím, D. Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature* **185**, 117–118 (1960).
83. Wichterle, O. Resharing a Xerogel By Mechanical Removal and Swelling To Form a Hydrogel Contact Lens. U.S. Patent No. 3,361,858. (1968).
84. Doycheva, M., Petrova, E., Stamenova, R., Tsvetanov, C. & Riess, G. UV-Induced Cross-Linking of Poly(ethylene oxide) in Aqueous Solution. *Macromol. Mater. Eng.* **289**, 676–680 (2004).
85. Kikuchi, A. & Okano, T. Pulsatile drug release control using hydrogels. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**, 53–77 (2002).
86. Kostarelou, K., Prato, M., Va, E., Merino, S. & Marti, C. Nanocomposite Hydrogels: 3D Polymer À Nanoparticle Synergies for On-Demand Drug Delivery. *Adv. Mater.* **27**, 4686–4697 (2015).
87. Gupta, P., Vermani, K. & Garg, S. Hydrogels: From controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug Discov. Today* **7**, 569–579 (2002).
88. Kozlovskaya, V., Kharlampieva, E., Mansfield, M. L. & Sukhishvili, S. A. Poly(methacrylic acid) hydrogel films and capsules: Response to pH and ionic strength, and encapsulation of macromolecules. *Chem. Mater.* **18**, 328–336 (2006).

89. Stabenfeldt, S. E., García, A. J. & LaPlaca, M. C. Thermoreversible laminin-functionalized hydrogel for neural tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **77A**, 718–725 (2006).
90. Schmaljohann, D. Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**, 1655–1670 (2006).
91. Podual, K., Doyle, F. J. & Peppas, N. A. Glucose-sensitivity of glucose oxidase-containing cationic copolymer hydrogels having poly(ethylene glycol) grafts. *J. Control. Release* **67**, 9–17 (2000).
92. Brahim, S., Narinesingh, D. & Guiseppi-Elie, A. Bio-smart hydrogels: co-joined molecular recognition and signal transduction in biosensor fabrication and drug delivery. *Biosens. Bioelectron.* **17**, 973–981 (2002).
93. Kang, S. II & Bae, Y. H. A sulfonamide based glucose-responsive hydrogel with covalently immobilized glucose oxidase and catalase. *J. Control. Release* **86**, 115–121 (2003).
94. Goenka, S., Sant, V. & Sant, S. Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering. *J. Control. Release* **173**, 75–88 (2014).
95. Schexnailder, P. & Schmidt, G. Nanocomposite polymer hydrogels. *Colloid and Polymer Science* **287**, 1–11 (2009).
96. C, A. K., Peppas, N. A. & Khademhosseini, A. Nanocomposite hydrogels for biomedical applications. *Biotechnol. Bioeng.* **111**, 441–453 (2014).
97. Cha, C., Shin, S. R., Annabi, N., Dokmeci, M. R. & Khademhosseini, A. Carbon-Based Nanomaterials: Multifunctional Materials for Biomedical Engineering. *ACS Nano* **7**, 2891–2897 (2013).
98. Servant, An. Electroresponsive Polymer-Carbon Nanotube Hydrogel Hybrids for Pulsatile Drug Delivery In Vivo Ania. *Adv. Healthc. Mater.* **22**, 4311–4316 (2012).
99. Yan, L. Y., Chen, H., Li, P., Kim, D. H. & Chan-Park, M. B. Finely dispersed single-walled carbon nanotubes for polysaccharide hydrogels. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **4**, 4610–4615 (2012).
100. Giri, A., Bhowmick, M., Pal, S. & Bandyopadhyay, A. Polymer hydrogel from carboxymethyl guar gum and carbon nanotube for sustained trans-dermal release of diclofenac sodium. *Int. J. Biol. Macromol.* **49**, 885–893 (2011).
101. Lima, M. D., Andrade, M. J., Skákalová, V., Bergmann, C. P. & Roth, S. Dynamic percolation of carbon nanotubes in liquid medium. *J. Mater. Chem.* **17**, 4846–4853 (2007).
102. Murdan, S. Electro-responsive drug delivery from hydrogels. *J. Control. Release* **92**, 1–17 (2003).
103. Yang, Y. & Engberts, J. B. F. N. Stimuli response of polysoap hydrogels in aqueous solution and DC electric fields. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **169**, 85–94 (2000).
104. Sutani, K., Kaetsu, I. & Uchida, K. The synthesis and the electric-responsiveness of hydrogels entrapping natural polyelectrolyte. *Radiat. Phys. Chem.* **61**, 49–54 (2001).
105. Servant, A., Methven, L., Williams, R. P. & Kostarelos, K. Electroresponsive polymer-carbon nanotube hydrogel hybrids for pulsatile drug delivery in vivo. *Adv. Healthc. Mater.* **2**, 806–811 (2013).
106. Servant, A., Leon, V., Jasim, D., Methven, L., Limousin, P., Fernandez-Pacheco, E. V., Kostarelos, K. Graphene-based electroresponsive scaffolds as polymeric implants for on-demand drug delivery. *Adv. Healthc. Mater.* **3**, 1334–1343 (2014).
107. Warren, H. Electrically conducting PEDOT : PSS - gellan gum hydrogels. *MRS Online Proc. Libr. Arch.* **1569**, 219–223 (2013).
108. Warren, H., Gately, R. D., O'Brien, P., Gorkin, R. & In Het Panhuis, M. Electrical conductivity, impedance, and percolation behavior of carbon nanofiber and carbon nanotube containing gellan gum hydrogels. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **52**, 864–871 (2014).
109. Le Ouay, B., Lau-Truong, S., Flahaut, E., Brayner, R., Aubard, J., Coradin, T., & Laberty-Robert, C. DWCNT-doped silica gel exhibiting both ionic and electronic conductivities. *J. Phys. Chem. C* **116**, 11306–11314 (2012).
110. Liu, X., Kruger, P., Maibach, H., Colditz, P. B. & Roberts, M. S. Using skin for drug delivery and diagnosis in the critically ill. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **77**, 40–49 (2014).
111. Adsul, M. G., Rey, D. a. & Gokhale, D. V. Combined strategy for the dispersion/dissolution of single walled carbon nanotubes and cellulose in water. *J. Mater. Chem.* **21**, 2054 (2011).
112. Skender, A., Hadj-Ziane-Zafour, A. & Flahaut, E. Chemical functionalization of Xanthan gum for the dispersion of double-walled carbon nanotubes in water. *Carbon N. Y.* **62**, 149–156 (2013).
113. Khotimchenko, Y. S., Kovalev, V. V., Savchenko, O. V. & Ziganshina, O. A. Physical-Chemical Properties, Physiological Activity, and Usage of Alginates, the Polysaccharides of Brown Algae. *Russ. J. Mar. Biol.* **27**, 53–64 (2001).
114. Saltmarsh, M. & Barlow, S. Essential guide to food additives. *R. Soc. Chem.* P1–P3 (2013).
115. Gidley, M. J. & Reid, J. S. G. Galactomannans and other cell wall storage polysaccharides in seeds. *Food Polysaccharides Their Appl.* 181–215 (2006).
116. Yang, J. S., Xie, Y. J. & He, W. Research progress on chemical modification of alginate: A review. *Carbohydr. Polym.* **84**, 33–39 (2011).
117. Haug, A. R. N. E., & Smidsrød, O. The effect of divalent metals on the properties of alginate solutions. *ACTA Chim. Scand.* **19(2)**, 341–351 (1965).

118. Jiménez-Escrig, A. & Sánchez-Muniz, F. J. Dietary fibre from edible seaweeds: Chemical structure, physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism. *Nutr. Res.* **20**, 585–598 (2000).
119. Datta, S., Janes, M. E., Xue, Q. G., Losso, J. & La Peyre, J. F. Control of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella anatum* on the surface of smoked salmon coated with calcium alginate coating containing oyster lysozyme and nisin. *J. Food Sci.* **73**, M67–M71 (2008).
120. Bajpai, S. K. & Sharma, S. Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca<sup>2+</sup> and Ba<sup>2+</sup> ions. *React. Funct. Polym.* **59**, 129–140 (2004).
121. Armisen, R. & Galatas, F. Production, properties and uses of agar. *Production and utilization of products from commercial seaweeds* **288**, 1–57 (1987).
122. Nussinovitch, A. in *Hydrocolloid Applications* 1–18 (Springer US, 1997). doi:10.1007/978-1-4615-6385-3\_1
123. Lahaye, M. & Rochas, C. Chemical Structure and Physio-Chemical Properties of Agar. *Hydrobiologia* **221**, 137–148 (1991).
124. Renn, D. W. Agar and Agarose : Indispensable Partners in Biotechnology. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* **23**, 17–21 (1984).
125. Pomfret, R., Sillay, K. & Miranpuri, G. Investigation of the electrical properties of agarose gel: characterization of concentration using nyquist plot phase angle and the implications of a more comprehensive in vitro model of the brain. *Ann. Neurosci.* **20**, 99–107 (2013).
126. Armisen, R. Agar and agarose biotechnological applications. *Hydrobiologia* **221**, 157–166 (1991).
127. Pernodet, N., Maaloum, M. & Tinland, B. Pore size of agarose gels by atomic force microscopy. *Electrophoresis* **18**, 55–58 (1997).
128. Xiong, J. Y., Narayanan, J., Liu, X. Y., Chong, T. K., Chen, S. B., & Chung, T. S. Topology evolution and gelation mechanism of agarose gel. *J. Phys. Chem. B* **109**, 5638–5643 (2005).
129. Sheehan, D. *Physical Biochemistry: Principles and Applications*. John Wiley & Sons Ltd., UK (2009).
130. Arnott, S., Fulmer, A. S. W. E., Scott, W. E., Dea, I. C. M., Moorhouse, R., & Rees, D. A. The agarose double helix and its function in agarose gel structure. *J. Mol. Biol.* **90**, 269–284 (1974).
131. Hur, J., Im, K., Kim, S. W., Kim, J., Chung, D. Y., Kim, T. H., Park, N. Polypyrrole/agarose-based electronically conductive and reversibly restorable hydrogel. *ACS Nano* **8**, 10066–10076 (2014).
132. Holbrook, K. A. & Odland, G. F. Regional Differences in the Thickness (Cell Layers) of the Human Stratum Corneum: An Ultrastructural Analysis. *J. Invest. Dermatol.* **62**, 415–422 (1974).
133. Scheuplein, R. J. Mechanism of Percutaneous Absorption. *J. Invest. Dermatol.* **48**, 79–88 (1967).
134. Prausnitz, M. R., Elias, P. M., Franz, T. J., Schmuth, M., Tsai, J. C., Menon, G. K., Feingold, K. R. Skin Barrier and Transdermal Drug Delivery. *Dermatology* 2065–2073 (2012).
135. Faure, S., Clère, N. & Guerriaud, M. *Bases fondamentales en pharmacologie Sciences du médicament*. (Elsevier Masson, 2014).
136. Benson, H. A. Transdermal drug delivery: penetration enhancement techniques. *Curr. Drug Deliv.* **2**, 23–33 (2005).
137. Engelke, L., Winter, G., Hook, S. & Engert, J. Recent insights into cutaneous immunization: How to vaccinate via the skin. *Vaccine* **33**, 4663–4674 (2015).
138. Williams, A. C. & Barry, B. W. Penetration enhancers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 128–137 (2012).
139. Smith, E. W. & Maibach, H. I. *Percutaneous Penetration Enhancers*. CRC Press. (CRC Press, 2005).
140. Prausnitz, M. R. & Langer, R. Transdermal drug delivery. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1261–1268 (2009).
141. Dhiman, S., Singh, T. G. & Rehni, A. K. Transdermal Patches: a Recent Approach To New Drug Delivery System. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **3**, (2011).
142. Lee, J. W., Gadiraju, P., Park, J. H., Allen, M. G. & Prausnitz, M. R. Microsecond thermal ablation of skin for transdermal drug delivery. *J. Control. Release* **154**, 58–68 (2011).
143. Mitragotri, S. Devices for overcoming biological barriers: The use of physical forces to disrupt the barriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 100–103 (2013).
144. Lakshmanan, S., Gupta, G. K., Avci, P., Chandran, R., Sadasivam, M., Jorge, A. E. S., & Hamblin, M. R. Transdermal drug delivery: Innovative pharmaceutical developments based on disruption of the barrier properties of the stratum corneum. *Pharmaceutics* **7**, 438–470 (2015).
145. Arora, A., Hakim, I., Baxter, J., Rathnasingham, R., Srinivasan, R., Fletcher, D. A., & Mitragotri, S. Needle-free delivery of macromolecules across the skin by nanoliter-volume pulsed microjets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 4255–60 (2007).
146. Prausnitz, M. R. Microneedles for transdermal drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**, 581–587 (2004).
147. Kim, Y.-C., Park, J.-H. & Prausnitz, M. R. Microneedles for drug and vaccine delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 1547–1568 (2012).
148. ong, X., Wu, Z., Chen, L., Wu, F., Wei, L., & Yuan, W. Hydrogel Microneedle Arrays for Transdermal Drug Delivery. *Nano-Micro Lett.* **6**, 191–199 (2014).
149. Yu, J., Zhang, Y., Ye, Y., DiSanto, R., Sun, W., Ranson, D., Gu, Z. Microneedle-array patches loaded with hypoxia-sensitive vesicles

- provide fast glucose-responsive insulin delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 8260–8265 (2015).
150. Mitragotri, S., Blankschtein, D. & Langer, R. Ultrasound-mediated transdermal protein delivery. *Science* **269**, 850–3 (1995).
  151. Lee, W.-R., Shen, S.-C., Lai, H.-H., Hu, C.-H. & Fang, J.-Y. Transdermal drug delivery enhanced and controlled by erbium:YAG laser: a comparative study of lipophilic and hydrophilic drugs. *J. Control. Release* **75**, 155–166 (2001).
  152. Kalia, Y. N., Naik, A., Garrison, J. & Guy, R. H. Iontophoretic drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**, 619–658 (2004).
  153. Banga, A. K. *Electrically assisted transdermal and topical drug delivery*. (Taylor & Francis Group, 1998).
  154. Schoellhammer, C. M., Blankschtein, D. & Langer, R. Skin permeabilization for transdermal drug delivery: recent advances and future prospects. *Expert Opin. Drug Deliv* **11**, 393–407 (2014).
  155. Gratieri, T. & Kalia, Y. N. Mathematical models to describe iontophoretic transport in vitro and in vivo and the effect of current application on the skin barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 315–329 (2013).
  156. Pikal, M. J. The role of electroosmotic flow in transdermal iontophoresis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **46**, 281–305 (2001).
  157. Gratieri, T., Alberti, I., Lapteva, M. & Kalia, Y. N. Next generation intra- and transdermal therapeutic systems: Using non- and minimally-invasive technologies to increase drug delivery into and across the skin. *Eur. J. Pharm. Sci.* **50**, 609–622 (2013).
  158. Dixit, N., Bali, V., Baboota, S., Ahuja, A. & Ali, J. Iontophoresis - An approach for controlled drug delivery: A review. *Curr. Drug Deliv.* **4**, 1–10 (2007).
  159. Khan, A., Yasir, M., Asif, M., Chauhan, I., Singh, A. P., Sharma, R., ... & Rai, S. Iontophoretic drug delivery: History and applications. *J. Appl. Pharm. Sci.* **1**, 11–24 (2011).
  160. Prausnitz, M. R. The effects of electric current applied to skin: A review for transdermal drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **18**, 395–425 (1996).
  161. Zempsky, W. T., Sullivan, J., Paulson, D. M. & Hoath, S. B. Evaluation of a low-dose lidocaine iontophoresis system for topical anesthesia in adults and children: A randomized, controlled trial. *Clin. Ther.* **26**, 1110–1119 (2004).
  162. Kreyden, O. P. Iontophoresis for palmoplantar hyperhidrosis. *J. Cosmet. Dermatol.* **3**, 211–214 (2004).
  163. Tamada, J. A., Garg, S., Jovanovic, L., Pitzer, K. R., Fermi, S., Potts, R. O., & C. R. T. Noninvasive glucose monitoring: comprehensive clinical results. *JAMA* **282**, 1839 (1999).
  164. Green, P. G., Hinz, R. S., Cullander, C., Yamane, G. & Guy, R. H. Iontophoretic delivery of amino acids and amino acid derivatives across the skin in vitro. *Pharm. Res.* **8**, 1113–1120 (1991).
  165. Green, P. G., Hinz, R. S., Kim, A., Cullander, C., Yamane, G., Szoka, F. C., & Guy, R. H. Transdermal iontophoresis of amino acids and peptides in vitro. *J. Control. Release* **21**, 187–190 (1992).
  166. Thysman, S., Tasset, C. & Pr eat, V. Transdermal iontophoresis of fentanyl: delivery and mechanistic analysis. *Int. J. Pharm.* **101**, 105–113 (1994).
  167. Srinivasan, V., Higuchi, W. I., Sims, S. M., Ghanem, A. H. & Behl, C. R. Transdermal Iontophoretic Drug Delivery: Mechanistic Analysis and Application to Polypeptide Delivery. *J. Pharm. Sci.* **78**, 370–375 (1989).
  168. Burnette, R. R. & Bagniefski, T. M. Influence of Constant Current Iontophoresis on the Impedance and Passive Na<sup>+</sup> Permeability of Excised Nude Mouse Skin. *J. Pharm. Sci.* **77**, 492–497 (1988).
  169. Miller, L. L. & Smith, G. A. Iontophoretic transport of acetate and carboxylate ions through hairless mouse skin. A cation exchange membrane model. *Int. J. Pharm.* **49**, 15–22 (1989).
  170. Green, P. G. Iontophoretic delivery of peptide drugs. *J. Control. Release* **41**, 33–48 (1996).
  171. Sung, K. C., Fang, J.-Y., Yoa, O. & Hu, -Pu. Delivery of nalbuphine and its prodrugs across skin by passive diffusion and iontophoresis. *J. Control. Release* **67**, 1–8 (2000).
  172. Burnette, R. R. & Ongpipattanakul, B. Characterization of the Permselective Properties of Excised Human Skin During Iontophoresis. *J. Pharm. Sci.* **76**, 765–773 (1987).
  173. Burnette, R. R. & Ongpipattanakul, B. Characterization of the Pore Transport Properties and Tissue Alteration of Excised Human Skin during Iontophoresis. *J. Pharm. Sci.* **77**, 132–137 (1988).
  174. Lawler, J. C., Davis, M. J., & Griffith, E. C. Electrical Characteristics of the Skin: The Impedance of the Surface Sheath and Deep Tissues. *J. Invest. Dermatol.* **34(5)**, 301–308 (1960).
  175. Banga, A. K. & Chien, Y. W. Iontophoretic delivery of drugs: fundamentals, developments and biomedical applications. *J. Control. Release* **7**, 1–24 (1988).
  176. Thysman, S., Pr eat, V. & Roland, M. Factors Affecting Iontophoretic Mobility of Metoprolol. *J. Pharm. Sci.* **81**, 670–675 (1992).
  177. Roberts, M. S., Favretto, W. A., Meyer, A., Reckmann, M., & Wongseelashote, T. Topical bioavailability of methyl salicylate. *Intern. Med. J.* **12**, 303–304 (1982).
  178. Cross, S. E. & Roberts, M. S. Importance of Dermal Blood Supply and Epidermis on the Transdermal Iontophoretic Delivery of Monovalent Cations. *J. Pharm. Sci.* **84**, 584–592 (1995).
  179. Roustit, M., Gaillard-Bigot, F., Blaise, S., Stanke-Labesque, F., Cracowski, C., Seinturier, C., Cracowski, J. L. Cutaneous

- iontophoresis of treprostinil in systemic sclerosis: a proof-of-concept study. *Clin. Pharmacol. Ther.* **95**, 439–45 (2014).
180. Pavselj, N., Bregar, Z., Cukjati, D., Batiuskaite, D., Mir, L. M., & Miklavcic, D. The course of tissue permeabilization studied on a mathematical model of a subcutaneous tumor in small animals. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **52**, 1373–1381 (2005).
  181. Paganin-Gioanni, A., Bellard, E., Escoffre, J. M., Rols, M. P., Teissie, J., & Golzio, M. Direct visualization at the single-cell level of siRNA electrotransfer into cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 10443–10447 (2011).
  182. Golzio, M., Teissie, J. & Rols, M.-P. Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1292–1297 (2002).
  183. Min, S., Jin, Z. T. & Zhang, Q. H. Commercial scale pulsed electric field processing of tomato juice. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 3338–3344 (2003).
  184. Ade-Omowaye, B. I. O., Angersbach, A., Taiwo, K. A. & Knorr, D. Use of pulsed electric field pre-treatment to improve dehydration characteristics of plant based foods. *Trends Food Sci. Technol.* **12**, 285–295 (2001).
  185. Elez-Martinez, P., & Martin-Belloso, O. Effects of high intensity pulsed electric field processing conditions on vitamin C and antioxidant capacity of orange juice and gazpacho, a cold vegetable soup. *Food Chem.* **102**, 201–209 (2007).
  186. Tsong, T. Y. Electroporation of cell membranes. *Biophys. J.* **60**, 297–306 (1991).
  187. Weaver, J. C. Electroporation in cells and tissues: A biophysical phenomenon due to electromagnetic fields. *Radio Sci.* **30**, 205–221 (1995).
  188. Abidor, I. G. *et al.* Electric breakdown of bilayer lipid membranes. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **104**, 37–52 (1979).
  189. Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., & Hofschneider, P. H. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* **1**(7), 841 (1982).
  190. Chabot, S., Teissié, J. & Golzio, M. Targeted electro-delivery of oligonucleotides for RNA interference: siRNA and anti-miR. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **81**, 161–168 (2015).
  191. Lakshmanan, S. *et al.* Physical energy for drug delivery; poration, concentration and activation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **71**, 98–114 (2014).
  192. Woodall, C. A. Electroporation of E. coli. *E. coli Plasmid Vectors Methods Appl.* **1**, 55–59 (2003).
  193. Prausnitz, M. R., Bose, V. G., Langer, R. & Weaver, J. C. Electroporation of mammalian skin: a mechanism to enhance transdermal drug delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 10504–10508 (1993).
  194. Heller, L. C. & Heller, R. *In Vivo* Electroporation for Gene Therapy. *Hum. Gene Ther.* **17**, 890–897 (2006).
  195. Yarmush, M. L., Golberg, A., Serša, G., Kotnik, T. & Miklavčič, D. Electroporation-Based Technologies for Medicine: Principles, Applications, and Challenges. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **16**, 295–320 (2014).
  196. Cemazar, M. & Sersa, G. Electrotransfer of therapeutic molecules into tissues. *Curr Opin Mol Ther* **9**, 554–562 (2007).
  197. Weaver, J. C. Electroporation of cells and tissues. *IEEE Trans. plasma Sci.* **28**(1), 24–33 (2000).
  198. Rols, M. P. & Teissié, J. Electropermeabilization of mammalian cells. Quantitative analysis of the phenomenon. *Biophys. J.* **58**, 1089–98 (1990).
  199. Rols, M. P. Electropermeabilization, a physical method for the delivery of therapeutic molecules into cells. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1758**, 423–428 (2006).
  200. Belehradec, M., Domenge, C., Luboinski, B., Orłowski, S., Belehradec, J., & Mir, L. M. Electrochemotherapy, a new antitumor treatment. First clinical phase I-II trial. *Cancer* **72**, 3694–700 (1993).
  201. Mir, L. M., Belehradec, M., Domenge, C., Orłowski, S., Poddevin, B., Belehradec Jr, J., Paoletti, C. Electrochemotherapy, a new antitumor treatment: first clinical trial. *C. R. Acad. Sci. III.* **313**, 613–8 (1991).
  202. Campana, L. G., Valpione, S., Mocellin, S., Sundararajan, R., Granziera, E., Sartore, L., Rossi, C. R. Electrochemotherapy for disseminated superficial metastases from malignant melanoma. *Br. J. Surg.* **99**, 821–830 (2012).
  203. Matthiessen, L. W., Johannesen, H. H., Hendel, H. W., Moss, T., Kamby, Gehl, J. Electrochemotherapy for large cutaneous recurrence of breast cancer: a phase II clinical trial. *Acta Oncol.* **51**, 713–21 (2012).
  204. Sersa, G., Teissie, J., Cemazar, M., Signori, E., Kamensek, U., Marshall, G., & Miklavcic, D. Electrochemotherapy of tumors as in situ vaccination boosted by immunogene electrotransfer. *Cancer Immunology, Immunotherapy* **64**, 1315–1327 (2015).
  205. Escoffre, J.-M. & Rols, M.-P. Electrochemotherapy: Progress and Prospects. *Curr. Pharm. Des.* **18**, 3406–3415 (2012).
  206. Titomirov, A. V., Sukharev, S. & Kistanova, E. In vivo electroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid DNA. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* **1088**, 131–134 (1991).
  207. Rols, M. P., Delteil, C., Golzio, M., Dumond, P., Cros, S., & Teissie, J. In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma. *Nat Biotechnol* **16**, 168–171 (1998).
  208. Oshima, Y., Sakamoto, T., Yamanaka, I., Nishi, T., Ishibashi, T., & Inomata, H. Targeted gene transfer to corneal endothelium in vivo by electric pulse. *Gene Ther.* **5**, 1347–1354 (1998).



209. Satkauskas, S., Bureau, M. F., Puc, M., Mahfoudi, A., Scherman, D., Miklavcic, D., & Mir, L. M. Mechanisms of in Vivo DNA Electrotransfer: Respective Contributions of Cell Electroporation and DNA Electrophoresis. *Mol. Ther.* **5**, 133–140 (2002).
210. Zaharoff, D., Barr, R., Li, C.-Y. & Yuan, F. Electromobility of plasmid DNA in tumor tissues during electric field-mediated gene delivery. *Gene Ther.* **9**, 1286–1290 (2002).
211. Heller, R. & Heller, L. C. Gene Electrotransfer Clinical Trials. *Adv. Genet.* **89**, 235–262 (2015).
212. Daud, A. I., DeConti, R. C., Andrews, S., Urbas, P., Riker, A. I., Sondak, V. K., Heller, R. Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* **26**, 5896–5903 (2008).
213. Foster, K. R. & Schwan, H. P. Dielectric properties of tissues and biological materials: a critical review. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* **17**, 25–104 (1989).
214. Adib, M. & Cretu, E. Wavelet-based artifact identification and separation technique for EEG signals during galvanic vestibular stimulation. *Comput. Math. Methods Med.* **2013**, (2013).
215. Miklavcic, D., Pavselj, N. & Hart, F. X. Electric properties of tissues. *Wiley Encycl. Biomed. Eng.* **209**, 1–12 (2006).
216. Weaver, J. C., Vaughan, T. E. & Chizmadzhev, Y. Theory of electrical creation of aqueous pathways across skin transport barriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **35**, 21–39 (1999).
217. Martin, G. T., Pliquett, U. F. & Weaver, J. C. Theoretical analysis of localized heating in human skin subjected to high voltage pulses. *Bioelectrochemistry* **57**, 55–64 (2002).
218. Pliquett, U. F., Martin, G. T. & Weaver, J. C. Kinetics of the temperature rise within human stratum corneum during electroporation and pulsed high-voltage iontophoresis. *Bioelectrochemistry* **57**, 65–72 (2002).
219. Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**, 33–38 (1996).
220. Pliquett, U. F., Zewert, T. E., Chen, T., Langer, R. & Weaver, J. C. Imaging of fluorescent molecule and small ion transport through human stratum corneum during high voltage pulsing: localized transport regions are involved. *Biophys. Chem.* **58**, 185–204 (1996).
221. Prausnitz, M. R., Gimm, J. A., Guy, R. H., Langer, R., Weaver, J. C., & Cullander, C. Imaging Regions of Transport Across Human Stratum Corneum during High-Voltage and Low-Voltage Exposures. *J. Pharm. Sci.* **85**, 1363–1370 (1996).
222. Vanbever, R., Pliquett, U. F., Pr at, V. & Weaver, J. C. Comparison of the effects of short, high-voltage and long, medium-voltage pulses on skin electrical and transport properties. *J. Control. Release* **60**, 35–47 (1999).
223. Pliquett, U. & Gusbeth, C. Surface area involved in transdermal transport of charged species due to skin electroporation. *Bioelectrochemistry* **65**, 27–32 (2004).
224. Pliquett, U., Gusbeth, C. & Nuccitelli, R. A propagating heat wave model of skin electroporation. *J. Theor. Biol.* **251**, 195–201 (2008).
225. Pliquett, U., Gallo, S., Hui, S. W., Gusbeth, C. & Neumann, E. Local and transient structural changes in stratum corneum at high electric fields: Contribution of Joule heating. *Bioelectrochemistry* **67**, 37–46 (2005).
226. Prausnitz, M. R. Do high-voltage pulses cause changes in skin structure? *J. Control. Release* **40**, 321–326 (1996).
227. Gowrishankar, T. R., Herndon, T. O., Vaughan, T. E. & Weaver, J. C. Spatially constrained localized transport regions due to skin electroporation. *J. Control. Release* **60**, 101–110 (1999).
228. Vanbever, R., Le Bouleng e, E. & Pr at, V. Transdermal delivery of fentanyl by electroporation I. Influence of electrical factors. *Pharmaceutical Research* **13**, 559–565 (1996).
229. Prausnitz, M. R., Bosset, V. G., Langer, R. & Weaver, J. C. Electroporation of mammalian skin: A mechanism to enhance transdermal drug delivery. *Med. Sci.* **90**, 10504–10508 (1993).
230. Denet, A. R., Vanbever, R. & Pr at, V. Skin electroporation for transdermal and topical delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**, 659–674 (2004).
231. Denet, A. R. & Pr at, V. Transdermal delivery of timolol by electroporation through human skin. *J. Control. Release* **88**, 253–262 (2003).
232. Guy, R. H., Geneva, U. & Hadgraft, J. *Transdermal Drug Delivery - Developmental Issues and Research Initiatives*. (2003).
233. Vanbever, R., Leroy, M.-A. & Pr at, V. Transdermal permeation of neutral molecules by skin electroporation. *J. Control. Release* **54**, 243–250 (1998).
234. Vanbever, R., De Morre, N. & Pr at, V. Transdermal delivery of fentanyl by electroporation II. Mechanisms involved in drug transport. *Pharm. Res.* **13**, 1360–1366 (1996).
235. Lombry, C., Dujardin, N. & Pr at, V. Transdermal delivery of macromolecules using skin electroporation. *Pharm. Res.* **17**, 32–37 (2000).
236. Pliquett, U. & Weaver, J. C. Electroporation of human skin: simultaneous measurement of changes in the transport of two fluorescent molecules and in the passive electrical properties. *Bioelectrochemistry Bioenerg.* **39**, 1–12 (1996).
237. Chen, T., Segall, E. M., Langer, R. & Weaver, J. C. Skin Electroporation: Rapid Measurements of the Transdermal Voltage and Flux of Four Fluorescent Molecules show a Transition to Large Fluxes Near 50V. *J. Pharm. Sci.* **87**, 1368–1374 (1998).

238. Chen, T., Langer, R. & Weaver, J. C. Charged microbeads are not transported across the human stratum corneum in vitro by short high-voltage pulses. *Bioelectrochemistry Bioenerg.* **48**, 181–192 (1999).
239. Hofmann, G. A., Rustrum, W. V. & Suder, K. S. Electro-incorporation of microcarriers as a method for the transdermal delivery of large molecules. *Bioelectrochemistry Bioenerg.* **38**, 209–222 (1995).
240. Zhang, L. & Rabussay, D. P. Clinical evaluation of safety and human tolerance of electrical sensation induced by electric fields with non-invasive electrodes. *Bioelectrochemistry* **56**, 233–6 (2002).
241. Mori, K., Hasegawa, T., Sato, S. & Sugibayashi, K. Effect of electric field on the enhanced skin permeation of drugs by electroporation. *J. Control. Release* **90**, 171–9 (2003).
242. Sung, K. C., Fang, J.-Y., Wang, J.-J. & Hu, O. Y.-P. Transdermal delivery of nalbuphine and its prodrugs by electroporation. *Eur. J. Pharm. Sci.* **18**, 63–70 (2003).
243. Rayleigh, Lord. On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity. *Philos. Mag. Ser. 5* **14**, 184–186 (1882).
244. Deitzel, J. ., Kleinmeyer, J., Harris, D. & Beck Tan, N. . The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer (Guildf)*. **42**, 261–272 (2001).
245. Li, D. & Xia, Y. Electrospinning of Nanofibers: Reinventing the Wheel? *Adv. Mater.* **16**, 1151–1170 (2004).
246. Greiner, A. & Wendorff, J. H. H. Electrospinning: A fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **46**, 5670–5703 (2007).
247. Bhardwaj, N. & Kundu, S. C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol. Adv.* **28**, 325–347 (2010).
248. Reneker, D. H. & Yarin, A. L. Electrospinning jets and polymer nanofibers. *Polymer (Guildf)*. **49**, 2387–2425 (2008).
249. Huang, Z. M., Zhang, Y. Z., Kotaki, M. & Ramakrishna, S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Compos. Sci. Technol.* **63**, 2223–2253 (2003).
250. Jiang, H., Hu, Y., Li, Y., Zhao, P., Zhu, K., & Chen, W. A facile technique to prepare biodegradable coaxial electrospun nanofibers for controlled release of bioactive agents. *J. Control. Release* **108**, 237–243 (2005).
251. Longson, T. J., Bhowmick, R., Gu, C. & Cruden, B. A. Core-shell interactions in coaxial electrospinning and impact on electrospun multiwall carbon nanotube core, poly(methyl methacrylate) shell fibers. *J. Phys. Chem. C* **115**, 12742–12750 (2011).
252. Li, F., Zhao, Y. & Song, Y. Core-Shell Nanofibers : Nano Channel and Capsule by Coaxial Electrospinning. *Core-She* 419–438 (2010).
253. Zhang, Y. Z., Wang, X., Feng, Y., Li, J., Lim, C. T., & Ramakrishna, S. Coaxial electrospinning of (fluorescein isothiocyanate-conjugated bovine serum albumin)-encapsulated poly(caprolactone) nanofibers for sustained release. *Biomacromolecules* **7**, 1049–1057 (2006).
254. McCann, J. T., Marquez, M. & Xia, Y. Highly porous fibers by electrospinning into a cryogenic liquid. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 1436–1437 (2006).
255. Medeiros, E. S., Mattoso, L. H. C., Offeman, R. D., Wood, D. F. & Orts, W. J. Effect of relative humidity on the morphology of electrospun polymer fibers. *Can. J. Chem.* **86**, 590–599 (2008).
256. Nayani, K. *et al.* Electrospinning combined with nonsolvent-induced phase separation to fabricate highly porous and hollow submicrometer polymer fibers. *Ind. Eng. Chem. Res.* **51**, 1761–1766 (2012).
257. Wei, G. & Ma, P. X. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **25**, 4749–4757 (2004).
258. Megelski, S., Stephens, J. S., Bruce Chase, D. & Rabolt, J. F. Micro- and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers. *Macromolecules* **35**, 8456–8466 (2002).
259. Zhang, Y. Z., Feng, Y., Huang, Z.-M., Ramakrishna, S. & Lim, C. T. Fabrication of porous electrospun nanofibres. *Nanotechnology* **17**, 901–908 (2006).
260. Li, Z. & Wang, C. *One-Dimensional nanostructures*. (2013).
261. Marques, M. R. C., Loebenberg, R. & Almukainzi, M. Simulated biologic fluids with possible application in dissolution testing. *Dissolution Technol.* 15–28 (2011).
262. Murthy, S. N., Sen, A., Zhao, Y. L. & Hui, S. W. Temperature Influences the Postelectroporation Permeability State of the Skin. *J. Pharm. Sci.* **93**, 908–915 (2004).
263. Raman, C. V & Plate, F. R. S. [ A new radiation\*. *Indian J. Phys* **2**, 387–398 (1928).
264. Tuinstra, F., & Koenig, J. L. Raman spectroscopy on amorphous carbon films. *J. Chem. Phys.* **53(3)**, 1126–130 (1970).
265. Hodkiewicz, J. & Scientific, T. F. Characterizing Carbon Materials with Raman Spectroscopy. *Prog. Mater. Sci.* **50**, 929–961 (2005).
266. Osswald, S., Flahaut, E., Ye, H. & Gogotsi, Y. Elimination of D-band in Raman spectra of double-wall carbon nanotubes by oxidation. *Chem. Phys. Lett.* **402**, 422–427 (2005).
267. Domingo, C. & Santoro, G. Raman spectroscopy of carbon nanotubes. *Opt. Pura y Apl.* **1136**, 175–186 (2005).
268. Takahashi, T., Tsunoda, K., Yajima, H. & Ishii, T. Dispersion and Purification of Single-Wall Carbon Nanotubes Using Carboxymethylcellulose. *Jpn. J. Appl. Phys.* **43**, 3636–3639 (2004).

269. Vieillessement, C. & Gabrielli, C. Méthodes électrochimiques - Mesures d'impédances Méthodes électrochimiques Mesures d'impédances. **33**, (2016).
270. Elsayed, A. M. *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems Oral Delivery of Insulin: Novel Approaches*. (2012).
271. Mazères, S., Sel, D., Golzio, M., Pucihar, G., Tamzali, Y., Miklavcic, D., & Teissié, J. Non invasive contact electrodes for in vivo localized cutaneous electropulsation and associated drug and nucleic acid delivery. *J. Control. Release* **134**, 125–131 (2009).
272. Peigney, A., Laurent, C., Flahaut, E., Bacsu, R. & Rousset, A. Specific surface area of carbon nanotubes and bundles of carbon nanotubes. *Carbon N. Y.* **39**, 507–514 (2001).
273. Piperno, S., Lozzi, L., Rastelli, R., Passacantando, M. & Santucci, S. PMMA nanofibers production by electrospinning. *Appl. Surf. Sci.* **252**, 5583–5586 (2006).
274. Bae, H. S. *et al.* Fabrication of highly porous PMMA electrospun fibers and their application in the removal of phenol and iodine. *J. Polym. Res.* **20**, (2013).
275. Sung, J. H. *et al.* Nanofibrous Membranes Prepared by Multiwalled Carbon Nanotube/ Poly(methyl methacrylate) Composites. *Society* 9899–9902 (2004).
276. Sundarar, B., Subramanian, V., Natarajan, T. S. & Krishnamurthy, K. Electrical conductivity of a single electrospun fiber of poly(methyl methacrylate) and multiwalled carbon nanotube nanocomposite. *Appl. Phys. Lett.* **88**, 2012–2015 (2006).
277. Liu, J., Wang, T., Uchida, T. & Kumar, S. Carbon nanotube core-polymer shell nanofibers. *J. Appl. Polym. Sci.* **96**, 1992–1995 (2005).
278. Bazilevsky, A. V., Yarin, A. L. & Megaridis, C. M. Co-electrospinning of core-shell fibers using a single-nozzle technique. *Langmuir* **23**, 2311–2314 (2007).
279. Fong, H., Chun, I. & Reneker, D. H. Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer (Guildf)*. **40**, 4585–4592 (1999).
280. Liu, Y., He, J. H., Yu, J. Y. & Zeng, H. M. Controlling numbers and sizes of beads in electrospun nanofibers. *Polym. Int.* **57**, 632–636 (2008).
281. Datsyuk, V., Landois, P., Fitremann, J., Peigney, A., Galibert, A. M., Soula, B., & Flahaut, E. Double-walled carbon nanotube dispersion via surfactant substitution. *J. Mater. Chem.* **19**, 2729 (2009).
282. Sen, R., Zhao, B., Perea, D., Itkis, M. E., Hu, H., Love, J., ... & Haddon, R. C. Preparation of single-walled carbon nanotube reinforced polystyrene and polyurethane nanofibers and membranes by electrospinning. *Nano Lett.* **4**, 459–464 (2004).
283. Qian, Y.-F., Su, Y., Li, X.-Q., Wang, H.-S. & He, C.-L. Electrospinning of Polymethyl Methacrylate Nanofibres in Different Solvents. *Iran. Polym. J.* **19**, 123–129 (2010).
284. Casper, C. L., Stephens, J. S., Tassi, N. G., Chase, D. B. & Rabolt, J. F. Controlling surface morphology of electrospun polystyrene fibers: Effect of humidity and molecular weight in the electrospinning process. *Macromolecules* **37**, 573–578 (2004).
285. Hebeish, A., Hashem, M., El-Hady, M. M. A. & Sharaf, S. Development of CMC hydrogels loaded with silver nano-particles for medical applications. *Carbohydr. Polym.* **92**, 407–413 (2013).
286. Shang, J., Shao, Z. & Chen, X. Electrical behavior of a natural polyelectrolyte hydrogel: Chitosan/carboxymethylcellulose hydrogel. *Biomacromolecules* **9**, 1208–1213 (2008).
287. Bao, D., Chen, M., Wang, H., Wang, J., Liu, C., & Sun, R. Preparation and characterization of double crosslinked hydrogel films from carboxymethylchitosan and carboxymethylcellulose. *Carbohydr. Polym.* **110**, 113–120 (2014).
288. Lawrence, W. H., Malik, M., Turner, J. E. & Autian, J. Toxicity Profile of Epichlorohydrin. *J. Pharm. Sci.* **61**, 1712–1717 (1972).
289. Leung, H.-W. REVIEW: Ecotoxicology of Glutaraldehyde: Review of Environmental Fate and Effects Studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf. Environ. Res. Sect. B* **49**, 26–39 (2001).
290. Takigawa, T. & Endo, Y. Effects of Glutaraldehyde Exposure on Human Health. *J. Occup. Heal. J. Occup. Heal.* **48**, 75–87 (2006).
291. Golzio, M., Gabriel, B., Boissier, F., Deuwille, J., Rols, M. P., & Teissie, J. Calcium et cellules électropermeabilisées. *J. Soc. Biol.* **197**, 301–310 (2003).
292. Frandsen, S. K., Gissel, H., Hojman, P., Tramm, T., Eriksen, J., & Gehl, J. Direct therapeutic applications of calcium electroporation to effectively induce tumor necrosis. *Cancer Res.* **72**, 1336–1341 (2012).
293. Frandsen, S. K., Gibot, L., Madi, M., Gehl, J. & Rols, M. P. Calcium electroporation: Evidence for differential effects in normal and malignant cell lines, evaluated in a 3D spheroid model. *PLoS One* **10**, e0144028 (2015).
294. Kang, H. W., Tabata, Y. & Ikada, Y. Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* **20**, 1339–1344 (1999).
295. Rhein-Knudsen, N., Ale, M. T. & Meyer, A. S. Seaweed hydrocolloid production: an update on enzyme assisted extraction and modification technologies. *Mar. Drugs* **13**, 3340–59 (2015).
296. Pernodet, N., Maaloum, M. & Tinland, B. Pore size of agarose gels by atomic force microscopy. *Electrophoresis* **18**, 55–58 (1997).
297. Yasuda, T., Okuno, T. & Yasuda, H. *Contact Angle of Water on Polymer Surfaces*. *Langmuir* **10**, (American Chemical Society, 1994).
298. Wu, S. Polymer interface and adhesion. *M. Dekker* 630 (1982).

299. Starov, V. M., Kosvintsev, S. R. & Velarde, M. G. Spreading of Surfactant Solutions over Hydrophobic Substrates. *J. Colloid Interface Sci.* **227**, 185–190 (2000).
300. Fernandez, E., Lopez, D., Mijangos, C., Duskova-Smrckova, M., Ilavsky, M., Dusek, K. Rheological and Thermal Properties of Agarose Aqueous Solutions and Hydrogels. *J Polym Sci Part B Polym Phys* **46**, 322–328 (2007).
301. Rogers, C. E. Sorption and diffusion in multicomponent polymers. *J. Polym. Sci. Polym. Symp.* **72**, 301–301 (2007).
302. Daoud, M., Bouchaud, E. & Jannink, G. Swelling of polymer gels. *Macromolecules* **19**, 1955–1960 (1986).
303. Berens, A. R. & Hopfenberg, H. B. Diffusion and relaxation in glassy polymer powders: 2. Separation of diffusion and relaxation parameters. *Polymer (Guildf)*. **19**, 489–496 (1978).
304. Neogi, P. *Diffusion in Polymers (Plastics Engineering)*. (Marcel Dekker, 1996).
305. Li, N. N., Fu, C. P. & Zhang, L. M. Using casein and oxidized hyaluronic acid to form biocompatible composite hydrogels for controlled drug release. *Mater. Sci. Eng. C* **36**, 287–293 (2014).
306. Song, F., Zhang, L.-M., Yang, C. & Yan, L. Genipin-crosslinked casein hydrogels for controlled drug delivery. *Int. J. Pharm.* **373**, 41–47 (2009).
307. Katime, I. & Mendizábal, E. Swelling Properties of New Hydrogels Based on the Dimethyl Amino Ethyl Acrylate Methyl Chloride Quaternary Salt with Acrylic Acid and 2-Methylene Butane-1,4-Dioic Acid Monomers in Aqueous Solutions. *Mater. Sci. Appl.* **1**, 162–167 (2010).
308. Wang, T., Kwei, T. & Frisch, H. Diffusion in glassy polymers. III. ... *Sci. Part A-2 Polym. ...* **7**, 2019–2028 (1969).
309. Peppas, N. A. & Khare, A. R. Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **11**, 1–35 (1993).
310. Ségot-Chicq, S. & Peppas, N. A. Solute and penetrant diffusion in swellable polymers. IV. Semicrystalline, swelling-controlled release systems of poly(ethylene-co-vinyl alcohol). *J. Control. Release* **3**, 193–204 (1986).
311. Korsmeyer, R. W. & Peppas, N. A. Solute and penetrant diffusion in swellable polymers. III. Drug release from glassy poly(HEMA-co-NVP) copolymers. *J. Control. Release* **1**, 89–98 (1984).
312. Crank, J. Diffusion in a cylinder. *Math. Diffus.* (1975).
313. Lamprecht, A., Yamamoto, H., Takeuchi, H. & Kawashima, Y. Microsphere design for the colonic delivery of 5-fluorouracil. *J. Control. Release* **90**, 313–322 (2003).
314. Raucher, D. and Sefcik, M. D. Sorption and Transport in Glassy Polymers. *ACS Symp. Ser.* **223**, 111–124 (1983).
315. Barrhowell, B. D., Howell, J. M. & Peppas, N. A. Transport of Penetrants in the Macromolecular Structure of Coals .8. Transport Mechanism as a Function of Temperature. *Thermochim. Acta* **116**, 153–159 (1987).
316. Yoshida, R., Okuyama, Y., Sakaib, K., Okano, T. & Sakurai, Y. Sigmoidal swelling profiles for temperature-responsive poly (IV-isopropylacrylamide-co-butyl methacrylate ) hydrogels. *J. Memb. Sci.* **89**, 267–277 (1994).
317. Barbucci, R., Magnani, A. & Consumi, M. Swelling behavior of carboxymethylcellulose hydrogels in relation to cross-linking, pH, and charge density. *Macromolecules* **33**, 7475–7480 (2000).
318. Chang, C., Duan, B., Cai, J. & Zhang, L. Superabsorbent hydrogels based on cellulose for smart swelling and controllable delivery. *Eur. Polym. J.* **46**, 92–100 (2010).
319. Bartil, T., Bounekhel, M., Cedric, C. & Jeerome, R. Swelling behavior and release properties of pH-sensitive hydrogels based on methacrylic derivatives. *Acta Pharm.* **57**, 301–314 (2007).
320. Ganji, F., Vasheghani-Farahani, S. & Vasheghani-Farahani, E. Theoretical Description of Hydrogel Swelling: A Review. *Iran. Polym. J.* **19**, 375–398 (2010).
321. Pereira, L., Gheda, S. F. & Ribeiro-Claro, P. J. A. Analysis by Vibrational Spectroscopy of Seaweed Polysaccharides with Potential Use in Food , Pharmaceutical , and Cosmetic Industries. *Int. J. Carbohydr. Chem.* **537202**, (2013).
322. Matsuhiro, B. Vibrational spectroscopy of seaweed galactans. *Hydrobiologia* **326327**, 481–489 (1996).
323. Malfait, T., Van Dael, H. & Van Cauwelaert, F. Molecular structure of carrageenans and kappa oligomers: a Raman spectroscopic study. *Int. J. Biol. Macromol.* **11**, 259–264 (1989).
324. Kampouris, D. K., Ji, X., Randviir, E. P. & Banks, C. E. A new approach for the improved interpretation of capacitance measurements for materials utilised in energy storage. *RSC Adv.* **5**, 12782–12791 (2015).
325. Fournié, R. Diélectriques -Bases théoriques.
326. Segui, Y. Diélectriques Courants de conduction. *Tech. l'ingénieur Matériaux isolants en électrotechnique base docum*, 1–12 (2000).
327. Hall, R. B. The Poole-Frenkel effect. *Thin Solid Films* **8**, 263–271 (1971).
328. Lim, E. & Ismail, R. Conduction Mechanism of Valence Change Resistive Switching Memory: A Survey. *Electronics* **4**, 586–613 (2015).
329. Frenkel, J. On Pre-Breakdown Phenomena in Insulators and Electronic Semi-Conductors. *Phys. Rev.* **54**, 647–648 (1938).

330. Rajavel, K; Verma, S; Asokan, K; Kumar, R. T. R. Field and temperature dependent electron transport properties of random network single walled and multi walled carbon nanotubes. *Mater. Res. Express* **1**, 1–10 (2014).
331. Jombert, A. S., Coleman, K. S., Wood, D., Petty, M. C. & Zeze, D. A. Poole–Frenkel conduction in single wall carbon nanotube composite films built up by electrostatic layer-by-layer deposition. *J. Appl. Phys.* **104**, 94503 (2008).
332. Pedron-Mazoyer, S., Plouët, J., Hellaudais, L., Teissie, J. & Golzio, M. New anti angiogenesis developments through electro-immunization: optimization by in vivo optical imaging of intradermal electro gene transfer. *Biochim. Biophys. Acta* **1770**, 137–42 (2007).
333. Netherton, B. L., Stecker, M. M. & Patterson, T. Mechanisms of electrode induced injury. Part 3: practical concepts and avoidance. *Am. J. Electroneurodiagnostic Technol.* **47**, 257–63 (2007).
334. Patterson, T., Stecker, M. M. & Netherton, B. L. Mechanisms of electrode induced injury. Part 2: Clinical experience. *Am. J. Electroneurodiagnostic Technol.* **47**, 93–113 (2007).
335. Zewert, T. E., Pliquett, U. F., Vanbever, R., Langer, R. & Weaver, J. C. Creation of transdermal pathways for macromolecule transport by skin electroporation and a low toxicity, pathway-enlarging molecule. *Bioelectrochemistry Bioenerg.* **49**, 11–20 (1999).
336. Pliquett, U. & Weaver, J. C. Transport of a charged molecule across the human epidermis due to electroporation. *J. Control. Release* **38**, 1–10 (1996).
337. Garidel, P. Structural organisation and phase behaviour of a stratum corneum lipid analogue: ceramide 3A. (2006). doi:10.1039/b517540b
338. Gowrishankar, T. R., Pliquett, U. & Weaver, J. C. Changes in skin structure and electrical properties following high voltage exposure. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **888**, 183–194 (1999).

**AUTEUR :**  
**Directeur/trice(s) de Thèse :**  
**Lieu et Date de soutenance :**

Guillet Jean-François  
Dr. Emmanuel Flahaut et Dr. Muriel Golzio  
Toulouse, le Jeudi 09 Novembre 2017

**TITRE :**

***Nanotubes de carbone pour la délivrance transdermique électro-stimulée de substances biologiquement actives.***

**RESUME:**

La perméabilité de la peau ne permet pas la diffusion passive de grandes molécules, comme l'insuline ou encore les plasmides d'ADN, au travers de l'épiderme dans le but d'atteindre les vaisseaux sanguins. Cela est uniquement possible pour des molécules de plus petite taille comme la nicotine par exemple. Il existe différentes voies alternatives (électrique, mécanique, thermique) de délivrance transdermique permettant d'éviter l'utilisation de la seringue d'injection, qui pourraient améliorer la qualité de vie des patients atteints de maladies comme le diabète. Ces méthodes incluent par exemple les micro-aiguilles, l'électro-perméabilisation, et l'iontophorèse.

L'électroperméabilisation permet, via l'application d'un champ électrique, d'augmenter momentanément la perméabilité de la peau et par conséquent de permettre le passage transdermique de molécules de haut poids moléculaire. L'objectif de ces travaux de thèse était de concevoir et de réaliser un patch nanocomposite à base de nanotubes de carbone permettant de stocker, mais également de relarguer un médicament lorsque qu'il est soumis à une électrostimulation. Pour ce faire, différents polymères ainsi que différentes techniques de mise en forme ont été explorées et développées pour permettre de démontrer la faisabilité de notre approche.

Les études ont permis de proposer et de développer un hydrogel nanocomposite biocompatible comportant une matrice polymère agarose et contenant de nanotubes de carbone biparois dans le but d'améliorer les propriétés à la fois électriques et mécanique du matériau. Nous en avons étudié les différentes caractéristiques telles que la microstructure, la capacité de stockage et de relargage, ainsi que les propriétés électriques. Dans le contexte général de précaution en relation avec la mise en œuvre de nanoparticules, et sur la base de travaux antérieurs démontrant l'innocuité des nanotubes utilisés lorsqu'ils ne sont pas en contact direct avec des cellules. Nous avons aussi démontré qu'il n'y a pas de relargage des nanotubes dans des conditions extrêmes (sans électrostimulation) de température en milieu sueur artificielle. L'avancée de ces travaux a permis d'effectuer les premiers tests de délivrance transdermique *ex-vivo* sur peau de souris et a démontré ainsi la faisabilité et l'intérêt d'utiliser les nanotubes de carbone biparois dans une matrice en polymère pour la délivrance transdermique électrostimulée de molécules de masse molaire de l'ordre de celle de l'insuline.

Cette thèse en co-direction alliant la Science des Matériaux (CIRIMAT) et la Science du Vivant (IPBS) a réuni différentes compétences lui donnant un véritable contexte interdisciplinaire. Elle s'est intégrée dans un projet de plus grande ampleur associant la Sociologie et le Droit (*Défi Nano CNRS*), centré sur le cas du diabète. Ceci a permis de démontrer l'intérêt de développer un tel dispositif (du point de vue des médecins et des patients), mais aussi en nous orientant vers un *dispositif médical* afin d'éviter de futurs écueils juridiques en termes d'application.