



**HAL**  
open science

# Nanotubes de carbone pour la délivrance transdermique électrostimulée de molécules thérapeutique

Juliette Simon

► **To cite this version:**

Juliette Simon. Nanotubes de carbone pour la délivrance transdermique électrostimulée de molécules thérapeutique. Science des matériaux [cond-mat.mtrl-sci]. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2022. Français. NNT : 2022TOU30052 . tel-03728077

**HAL Id: tel-03728077**

**<https://theses.hal.science/tel-03728077v1>**

Submitted on 20 Jul 2022

**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.



# THÈSE

En vue de l'obtention du  
**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**  
Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

---

Présentée et soutenue par  
**Juliette SIMON**

Le 4 mars 2022

**Nanotubes de carbone pour la délivrance transdermique  
électrostimulée de molécules thérapeutiques**

---

Ecole doctorale : **SDM - SCIENCES DE LA MATIERE - Toulouse**

Spécialité : **Sciences et Génie des Matériaux**

Unité de recherche :

**CIRIMAT - Centre Interuniversitaire de Recherche et d'Ingénierie des  
Matériaux**

Thèse dirigée par  
**Emmanuel FLAHAUT et Muriel GOLZIO**

Jury

**Mme Véronique PREAT**, Rapporteur  
**M. Olivier CHAUVET**, Rapporteur  
**M. Mathieu PINAULT**, Examineur  
**M. Emmanuel FLAHAUT**, Directeur de thèse  
**Mme Muriel GOLZIO**, Co-directrice de thèse  
**Mme Bettina COUDERC**, Présidente



# Remerciements

Ces travaux de thèse ont été financés conjointement par la Région Occitanie et l'Université Toulouse III - Paul Sabatier. Je tiens à remercier ces deux institutions pour avoir soutenu ce projet, et d'en avoir prolongé la durée après la pandémie. Je tiens également à remercier l'ANR d'avoir accordé un financement, permettant plusieurs recrutements, dont celui d'un doctorant. Le projet a pu prendre de l'ampleur grâce à ces fonds et un passage de connaissances a pu être fait.

Je tiens ensuite à remercier chaleureusement les membres de mon jury qui ont accepté de lire et d'évaluer mes travaux de thèse. Merci au Pr Véronique Prétat et au Pr Olivier Chauvet pour les retours détaillés faits sur manuscrit en tant que rapporteurs. Merci également au Pr Bettina Couderc et au Dr Mathieu Pinault pour leurs contributions en tant qu'examineurs. Merci à tous pour vos commentaires bienveillants et pour la diversité de vos questions lors de la soutenance. Ça a été un réel plaisir pour moi de pouvoir échanger sur mes travaux avec chacun d'entre vous.

Ces travaux de thèse ont été dirigés conjointement par Emmanuel Flahaut et Muriel Golzio. Merci infiniment pour votre confiance, votre bienveillance et votre accessibilité. J'ai particulièrement apprécié travailler avec vous. Merci également pour toutes les discussions, scientifiques ou non, que nous avons pu avoir. Ces années de recherches ont été une excellente expérience tant sur le plan scientifique qu'humain, j'ai énormément appris de vos expertises respectives et de votre pédagogie.

Un grand merci également à Audrey Tourrette-Diallo, Zarel Valdez-Nava, Valérie Samouillan et Manuel Marcoux qui ont pris le temps de me former à leur discipline respective. La multidisciplinarité est, je pense, une force de mes travaux de thèse, et je n'aurais pas pu aller aussi loin sans votre implication et votre disponibilité. Audrey, Zarel, j'ai également eu la chance de vous voir participer à mon jury de thèse en tant de membres invités.

Ces travaux ont été menés au sein de deux laboratoires différents. Merci donc à Christophe Laurent et Olivier Neyrolles, car j'ai eu la chance d'être merveilleusement bien accueillie et intégrée, aussi bien dans l'un que dans l'autre. Un grand merci également aux équipes techniques et administratives du CIRIMAT et de l'IPBS sans qui la recherche ne

pourrait fonctionner, et notamment à Murielle, Nabila, Pierre, Vincent, Yann, Marie-Claire, Geoffroy et Serges.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe NNCED, mais plus largement tout le CIRMAT, car j'ai eu la chance d'interagir avec de nombreuses personnes de différentes équipes et notamment de l'équipe PPB. Merci également à tous les docteurs et doctorants qui font de ce laboratoire un lieu où il fait bon vivre et où j'ai eu plaisir à travailler. Merci à Andréas, Anthony, Arnaud, Maylis, Fanny, Cassandra, Marie, Inthuga, Kévin, Thomas et en particulier à Edouard, Ariane, Clémence, Marco, Guillaume, Julien et Mélanie pour la cohésion et l'amitié que nous avons eues dès les premiers jours. Mélanie, il en reste plus que toi et je sais que ce sera extraordinaire ! Laure, merci pour ces moments partagés au bureau, Yorgos, merci de donner une suite à ce projet de recherche qui me tient à cœur. Sarah, ça a été un plaisir de te retrouver pour ces quelques mois. À vous de jouer maintenant !

Je tiens à remercier chaleureusement Marie-Pierre Rols de m'avoir donné la chance d'intégrer l'équipe de Biophysique cellulaire de l'IPBS. J'espère vraiment pouvoir retrouver une telle atmosphère de travail et une telle cohésion dans mon futur professionnel. Vincent, Laurent, Franck ça a été un plaisir d'échanger avec vous. Babeth, Géraldine, merci pour le temps que vous avez passé à me former et à répondre à mes questions tout au long de mes travaux, j'ai beaucoup appris grâce à vous. Bastien, merci d'avoir travaillé sur la toxicité et sur l'histologie. Charlotte, Elena, Mathilde, Laetitia, merci pour votre aide et surtout pour toutes nos discussions de couloirs. Jelena, merci pour nos discussions scientifiques et pour notre soutien mutuel pendant nos rédactions respectives. Encore félicitations pour ce poste, j'ai hâte de voir l'évolution de ton projet. Caro, merci pour ta bonne humeur à toute épreuve et ton café. Diana, merci pour ton soutien indéfectible, surtout sur la fin ! Anne, Alexia, j'ai vraiment hâte de voir où vont vous mener vos projets de recherche, bon courage pour la suite.

Je souhaiterais également remercier toutes les personnes impliquées dans le projet ANR Carbo<sup>2</sup>Derm que je n'ai pas encore citées. Ça a été une chance de participer à un projet réunissant autant d'expertises dans autant de disciplines différentes. Merci à Lionel Laudebat et Sorin Dinculescu du laboratoire Laplace, en particulier pour leur implication dans la fabrication du dispositif d'électroporation. Merci à Brigitte Soula, Anne-Marie Galibert, Alicia Weibel et Morgan Légnani du CIRIMAT pour leur implication dans l'amélioration du matériau nanocomposite.

Il me reste à remercier les personnes qui m'ont donné confiance en moi et permis d'aller aussi loin. Merci à ma famille et mes amis pour leur soutien indéfectible et leur intérêt pour ces travaux. Je souhaite en particulier remercier mes parents qui m'ont toujours poussé à faire ce qui m'intéresse. Merci d'avoir toujours soutenu tous mes choix, j'espère vous avoir rendus fiers. Clément, merci d'avoir traversé la France avec moi pour me permettre de vivre cette expérience. Merci d'avoir été là dans les bons moments et d'avoir toujours trouvé les mots, tu as été l'un des piliers de ma réussite.

En vous souhaitant une très bonne lecture.



# Table des matières

<b>Abréviations.....</b>	<b>13</b>
<b>Introduction générale .....</b>	<b>15</b>
<b>Chapitre 1. Introduction bibliographique .....</b>	<b>19</b>
1.1. La délivrance transdermique non invasive .....	21
1.1.1. La peau, barrière naturelle du corps humain .....	21
1.1.1.a. Anatomie .....	21
1.1.1.b. Fonction barrière de la peau .....	23
1.1.1.c. La délivrance dermique et transdermique .....	26
1.1.2. Méthodes de délivrance transdermique .....	28
1.1.2.a. Méthodes chimiques passives.....	29
1.1.2.b. Méthodes actives .....	29
1.2. L'électroporation.....	31
1.2.1. Théorie de l'électroporation.....	32
1.2.1.a. Caractéristiques du champ électrique.....	32
1.2.1.b. Induction de l'électroperméabilisation membranaire .....	34
1.2.1.c. Réponses cellulaires et tissulaires .....	37
1.2.2. Applications médicales .....	38
1.2.2.a. Electrochimiothérapie .....	38
1.2.2.b. Électrogénothérapie .....	39
1.2.3. Délivrance transdermique par électroporation de la peau.....	39
1.2.3.a. Mécanismes de la délivrance transdermique par impulsion de basse intensité – l'iontophorèse .....	40
1.2.3.b. Mécanismes de la délivrance transdermique par impulsion de moyenne et haute intensité – l'électroporation .....	40

1.2.3.c.	Paramètres affectant la délivrance par électroporation.....	42
1.2.3.d.	Dispositifs expérimentaux .....	43
1.3.	Les nanotubes de carbone pour le biomédicale .....	45
1.3.1.	Introduction aux nanotubes de carbone .....	45
1.3.1.a.	Définition .....	46
1.3.1.b.	Méthodes de synthèse .....	47
1.3.1.c.	Propriétés .....	48
1.3.2.	Nanotubes de carbone pour le biomédical .....	49
1.3.2.a.	NTC pour le diagnostic.....	49
1.3.2.b.	Ingénierie tissulaire .....	50
1.3.2.c.	Thérapies ciblées .....	50
1.3.3.	Toxicité des NTC.....	51
1.4.	Les hydrogels nanocomposites pour le biomédical.....	53
1.4.1.	Introduction aux hydrogels nanocomposites.....	53
1.4.1.a.	Hydrogels.....	53
1.4.1.b.	Matériaux nanocomposites - Théorie de la percolation .....	55
1.4.1.c.	Propriétés des hydrogels nanocomposites à base de NTC .....	56
1.4.2.	Applications pour le biomédical .....	57
1.4.2.a.	Hydrogels nanocomposites à base de NTC pour le diagnostic .....	57
1.4.2.b.	Ingénierie tissulaire .....	58
1.4.2.c.	Traitements ciblés .....	59
1.4.3.	Focus sur les hydrogels d'agarose .....	60
1.5.	Présentation du projet .....	62
	<b>Chapitre 2. Matériels et méthodes.....</b>	<b>65</b>
2.1.	Préparation des plateformes de délivrance nanocomposites.....	67
2.1.1.	Préparation des hydrogels nanocomposites .....	67

2.1.1.a.	Synthèse et extraction des nanotubes de carbone double-parois .....	67
2.1.1.b.	Préparation des hydrogels nanocomposites .....	67
2.1.2.	Séchage et regonflement .....	68
2.2.	Techniques de caractérisation des hydrogels nanocomposites .....	70
2.2.1.	Analyses des suspensions de NTC .....	70
2.2.1.a.	Mesures de turbidité des suspensions .....	70
2.2.1.b.	Observations des NTC par microscopie électronique en transmission.....	70
2.2.2.	Caractérisations de la microstructure des nanocomposites .....	71
2.2.2.a.	Observations par Cryo-MEB .....	71
2.2.2.b.	Mesures de porosité par la méthode d'Archimède .....	72
2.2.3.	Mesures des dimensions des échantillons nanocomposites. ....	73
2.2.4.	Cinétiques de relargage du principe actif.....	74
2.2.4.a.	Traceur de relargage – l'isothiocyanate de fluorescéine .....	74
2.2.4.b.	Protocole de relargage en volume .....	74
2.2.4.c.	Protocole de relargage en cellule de diffusion verticale .....	76
2.2.4.d.	Mise en équation - modèle Korsmeyer-Peppas .....	77
2.2.5.	Analyses mécaniques dynamiques .....	78
	<i>Mesure en cisaillement</i> : .....	80
	<i>Mesure en compression</i> : .....	80
2.2.6.	Analyses en mécanique statique .....	81
2.2.7.	Mesures de conductivités électriques.....	82
2.2.8.	Analyses statistiques.....	84
2.3.	Délivrance transdermique assistée par électroporation - expérimentations <i>ex vivo</i>	85
2.3.1.	Provenance des explants .....	85
2.3.2.	Dispositifs expérimentaux .....	85
2.3.3.	Paramètres d'électroporation .....	87

2.3.4.	Marqueurs fluorescents utilisés .....	88
2.3.5.	Mesures de température <i>in situ</i> .....	89
2.3.6.	Microscopie de fluorescence.....	90
2.3.7.	Observations histologiques .....	91
2.3.8.	Évaluation de la toxicité des NTC sur des lignées cellulaires de la peau.....	93
2.3.8.a.	Culture cellulaire.....	93
2.3.8.b.	Évaluation de la viabilité cellulaire .....	93
2.3.8.c.	Contrôle de l'influence de la CMC sur la viabilité cellulaire .....	96
2.3.9.	Analyses statistiques.....	97
<b>Chapitre 3. Caractérisations des plateformes nanocomposites .....</b>		<b>99</b>
3.1.	Caractérisations de la morphologie des nanocomposites.....	104
3.1.1.	Dispersion des suspensions de NTC – effet de la CMC.....	104
3.1.1.a.	Mesures de turbidité .....	105
3.1.1.b.	Observations au MET des suspensions .....	106
3.1.2.	Caractérisations de la microstructure des nanocomposites .....	107
3.1.2.a.	Observations des microstructures au Cryo-MEB .....	107
3.1.2.b.	Evaluation de la porosité par la méthode d'Archimède .....	111
3.1.3.	Évolution des dimensions des plateformes nanocomposites après un cycle séchage/regonflement.....	113
3.1.3.a.	Homogénéité des échantillons bruts de coulée .....	114
3.1.3.b.	Influence de la composition et du type de séchage sur le séchage .....	115
3.1.3.c.	Influence du type de séchage et de la composition sur les dimensions sur le regonflement.....	118
3.2.	Fonction réservoir – capacité de stockage et de relargage des plateformes nanocomposites .....	120
3.2.1.	Capacité de stockage des plateformes nanocomposites .....	121

3.2.2.	Relargage de FD4 en volume .....	122
3.2.3.	Relargage de FD4 en cellule verticale.....	126
3.2.4.	Influence de différents paramètres sur le facteur d'incorporation .....	128
3.3.	Évaluation des propriétés mécaniques des plateformes nanocomposites.....	130
3.3.1.	Analyses mécaniques dynamiques.....	130
3.3.2.	Analyses en mécanique statique .....	134
3.4.	Fonction électrode – Mesures de conductivité en tension continue .....	137
3.5.	Conclusion.....	142

## **Chapitre 4. Evaluation des plateformes nanocomposites pour la délivrance transdermique électrostimulée .....145**

4.1.	Investigation des mécanismes de délivrance .....	148
4.1.1.	Mise en évidence de la perméabilisation.....	148
4.1.2.	Évaluation du caractère transitoire de la perméabilisation .....	150
4.1.3.	Influence de la taille de la molécule sur sa délivrance.....	152
4.1.4.	Influence de la charge de la molécule sur sa délivrance .....	154
4.1.4.a.	Effets des pulses unipolaires .....	154
4.1.4.b.	Effets des pulses bipolaires .....	156
4.1.5.	Durée de délivrance du principe actif après les impulsions.....	157
4.1.6.	Compréhension des phénomènes observés .....	158
4.1.7.	Validation du FD4 comme modèle pour mimer l'insuline .....	162
4.2.	Influence de paramètres externes au dispositif .....	164
4.2.1.	Influence du modèle de tissu .....	164
4.2.1.a.	Fraicheur du tissu .....	164
4.2.1.b.	Changement de modèle – Épiderme reconstruit humain.....	165
4.2.2.	Considérations sur les variations de pH <i>in situ</i> .....	167
4.2.2.a.	Traitement avec des pulses unipolaires .....	168

4.2.2.b. Traitement avec des pulses bipolaires .....	170
4.2.3. Influence de la conductivité de la solution d'hydratation de la gaze.....	171
4.2.4. Mesures de température <i>in situ</i> .....	172
4.2.5. Influence de la concentration en NTC .....	174
4.3. Toxicité des NTC biparois bruts sur les cellules de la peau.....	176
4.3.1. Évaluation de la viabilité cellulaire .....	177
4.3.2. Éluclidation du comportement des fibroblastes aux faibles de concentrations de NTC .....	178
4.4. Conclusion .....	181
<b>Conclusions et perspectives .....</b>	<b>183</b>
<b>Références .....</b>	<b>189</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>211</b>





# Abréviations

AGR : Agarose

BC : Brut de Coulée

CMC : Carboxyméthyle Cellulose

CSA : Congélation avant Séchage sous Air

DWCNT : « Double-Walled Carbon Nanotube » – Nanotube de carbone biparois

EGT : Electrogénothérapie

ERH : Epidermes Reconstitués Humains

FD4 : FITC + Dextran de 4kDa

FD4-CM : FITC + Dextran de 4kDa + Carboxyméthyle

FD4-DEAE : FITC + Dextran de 4kDa + Diéthylaminoéthyle

FITC : Isothiocyanate de Fluorescéine

I-FITC : Insuline + FITC

IRF : Intensité Relative de Fluorescence

LY : Lucifer Yellow

MWCNT : « Multi-Walled Carbon Nanotube » – Nanotube de carbone mutliparois

NTC : Nanotubes de Carbone

PA : Principe Actif

PBS : « Phosphate Buffer Saline » - tampon phosphate salin

PI : Iodure de Propidium

PLP : Periodate-lysine-paraformaldéhyde (tampon de fixation)

SC : *Stratum Corneum*

SSA : Séchage Sous Air

SSC : Séchage Sous Charge

SWCNT : « Single-Walled Carbon Nanotube » – Nanotube de carbone monoparois

TE : Tampon d'Electroporation



# Introduction générale

La voie transdermique est une voie d'intérêt lorsqu'il s'agit de délivrer un principe actif (PA) localement ou de remplacer la voie orale (*per os*), qui peut engendrer une dégradation de l'efficacité et une diminution de la quantité de la substance active lorsque celle-ci est métabolisée principalement par le foie (effet de premier passage hépatique). La voie transdermique est une voie de traitement très versatile qui peut permettre une délivrance systémique ou locale, et avoir une action rapide ou bien lente et prolongée. Cependant, les molécules qui peuvent être délivrées naturellement par voie transdermique grâce à des patchs ont des caractéristiques physicochimiques très spécifiques et leur nombre est limité. Actuellement, c'est donc l'injection qui est utilisée pour arriver aux mêmes résultats sans limitation, mais son efficacité va de pair avec plusieurs inconvénients. Premièrement, la douleur, notamment lors d'injections répétées comme c'est le cas pour les patients atteints de diabète, peut être la source d'un manque d'assiduité au traitement. Il existe également des risques sanitaires liés à l'utilisation du matériel d'injection, comme la transmission de maladies, lorsque celui-ci réutilisé. Selon un rapport de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), sur les 16 milliards d'injections administrées dans les années 2000, 40% ont été pratiquées avec du matériel réutilisé, entraînant des millions de nouvelles contaminations par des virus ou des maladies telles que l'hépatite B [1]. Finalement, les blessures issues de la manipulation d'aiguilles ou de leur élimination ne sont pas rares, dans le même rapport l'OMS dénombrait 3 millions de piqûres accidentelles pouvant également être contaminantes rien que chez le personnel de santé.

Pour ces raisons, de nombreux travaux visent actuellement à substituer des méthodes de délivrance transdermique non invasive à l'injection classique. La difficulté majeure à laquelle se heurtent ces recherches réside dans la couche extérieure de la peau, le *stratum corneum* (SC), qui assure une fonction barrière. Cette couche est très jointive et hydrophobe, ce qui protège le corps de nombreuses agressions, mais empêche des molécules très hydrophiles ou de plus de 500Da de la traverser. Il existe donc un véritable défi visant à développer une méthode de délivrance transdermique de macromolécules hydrophiles qui soit efficace, facile d'utilisation, et non invasive, tout en conservant sur le long terme l'intégrité de la fonction barrière de la peau.

C'est dans ce contexte que l'équipe Nanocomposite, Nanotubes de Carbone : élaboration et Densification (NNCED) du CIRIMAT et l'équipe de Biophysique Cellulaire de l'IPBS, se sont associées pour tenter de répondre à cette problématique. L'équipe NNCED est experte dans la synthèse et l'utilisation dans des matériaux composites de nanotubes de carbone biparois, connus pour être des nanoparticules combinant de très bonnes propriétés mécaniques et électriques. De son côté, l'équipe de Biophysique Cellulaire est experte dans la délivrance de molécules dans les cellules et tissus par l'application de champs électriques pulsés : l'électroporation. L'approche envisagée repose sur le développement d'un matériau nanocomposite deux-en-un, à base de polymère biocompatible et de nanotubes de carbone, pouvant faciliter l'application de l'électroporation résultant en une perméabilisation réversible de la peau (fonction d'électrode), et pouvant assurer le stockage d'un principe actif, ainsi que sa délivrance lors du traitement (fonction de réservoir). Ce matériau pourrait être utilisé comme une plateforme de vectorisation, dans laquelle l'introduction du principe actif (d'hydrophilie variable) pourrait permettre sa délivrance à travers la peau. L'élaboration d'un tel matériau ainsi que la preuve de faisabilité de ce concept de délivrance transdermique *ex vivo* ont fait l'objet de précédents travaux de thèse [2–4].

Les travaux présentés dans ce manuscrit prennent la suite directe de cette première thèse et s'inscrivent dans un projet de recherche plus ambitieux, financé par l'Agence Nationale de la Recherche (CARBO<sup>2</sup>DERM 2020-2024). L'obtention de ce financement pendant le déroulement de cette thèse a permis l'implication d'un troisième laboratoire, le LAPLACE, apportant une expertise sur les matériaux diélectriques, mais également le recrutement d'un ingénieur d'étude à l'IPBS et d'un doctorant co-dirigé par le CIRIMAT et le LAPLACE, assurant la continuité du projet.

L'objectif de la thèse que nous présentons ici est de fournir des bases solides de caractérisation et de compréhension, sur lesquelles les travaux futurs pourront s'appuyer pour améliorer et optimiser à la fois le matériau nanocomposite et les paramètres de délivrance transdermique par électroporation avec notre dispositif.

Le premier chapitre de ce manuscrit est consacré à une introduction bibliographique. Nous présentons dans un premier temps la structure de la peau, les enjeux de la délivrance transdermique non invasive, ainsi que les approches qui sont actuellement adoptées. Nous abordons ensuite la technique d'électroporation et nous nous focalisons sur son application

pour la perméabilisation de la peau. Dans un troisième temps, nous introduisons l'intérêt de l'utilisation des nanotubes de carbone pour les applications biomédicales, ainsi que des questions de toxicité que leur utilisation soulève et la solution trouvée dans les matériaux nanocomposites. Ces recherches bibliographiques ont été publiées sous la forme d'une revue en début de thèse [5]. Nous finirons par introduire la matrice polymère biocompatible qui avait déjà été choisie lors de précédents travaux, l'agarose.

Le deuxième chapitre décrit les différents protocoles utilisés au cours des 2 chapitres de résultats (3 et 4). Il concerne la préparation du matériau nanocomposite que nous utilisons dans nos travaux, les différentes mises en forme que nous avons développées, ainsi que les techniques que nous avons utilisées pour le caractériser. Les protocoles des expériences *ex vivo* que nous avons réalisées y sont également détaillés.

Le chapitre 3 rassemble toutes les caractérisations du matériau nanocomposite que nous avons réalisées durant nos travaux, et qui nous servent à discriminer différentes compositions et mises en forme des nanocomposites. Dans une première partie, une observation de la microstructure et une caractérisation de la porosité nous permettent de mieux comprendre l'organisation des constituants du matériau. Nous étudions par la suite les propriétés de stockage et de relargage d'une molécule fluorescente, pour caractériser la fonction réservoir. Les propriétés mécaniques sont mesurées et comparées puis des mesures de conductivité électrique nous ont servi à caractériser la fonction électrode.

Pour finir, le chapitre 4 décrit toutes les expériences d'application *ex vivo* du matériau comme plateforme réservoir/électrode pour la délivrance transdermique par électroporation. Nous validons dans un premier temps la perméabilisation de la peau (modèle murin) ainsi que son caractère réversible, puis pour comprendre les mécanismes de délivrance en jeu, des molécules de différentes charge et taille sont utilisées. Ces travaux ont fait l'objet d'une seconde publication [6]. Dans une deuxième partie, nous évaluons l'impact de divers facteurs comme la nature du tissu, les variations de température, de pH et de conductivité électrique. Enfin, l'exposition des tissus aux nanotubes de carbone n'est pas souhaitable pour les applications envisagées, et il nous a semblé nécessaire d'en évaluer les effets potentiels. Ainsi, nous évaluons la cytotoxicité des nanotubes de carbone utilisés sur différences lignées cellulaires issues de la peau *in vitro*.

Une conclusion générale résume l'ensemble des conclusions auxquelles nous sommes arrivés et le manuscrit se termine en présentant les perspectives pour la poursuite de ces recherches.

# **Chapitre 1**

## **Introduction bibliographique**



## 1.1. La délivrance transdermique non invasive

### 1.1.1. La peau, barrière naturelle du corps humain

#### 1.1.1.a. Anatomie

La peau est un organe de 2m<sup>2</sup> chez l'adulte à l'interface entre le corps et l'environnement extérieur et constitué d'un empilement de trois couches : l'hypoderme, le derme et l'épiderme (Figure 1-1).

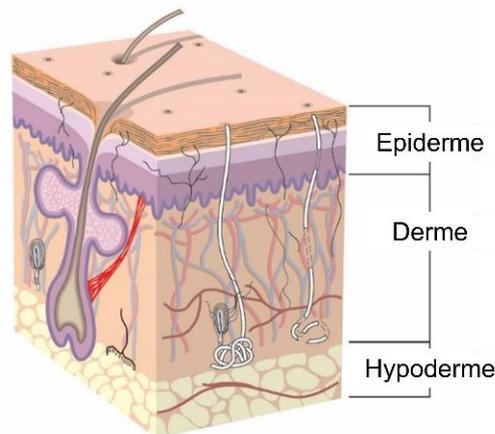


Figure 1-1 Schéma de la structure de la peau.

L'hypoderme est la couche la plus profonde de la peau. Il est constitué d'adipocytes, ou cellules graisseuses, organisées en lobules et d'une matrice extracellulaire fibreuse dans laquelle sont localisés des vaisseaux sanguins, des vaisseaux lymphatiques et des nerfs. Cette couche sert de réserve d'énergie et permet une certaine mobilité entre la peau et les tissus plus profonds [7]. L'épaisseur de cette couche est extrêmement variable en fonction de la localisation et de l'individu.

Au « dessus » de l'hypoderme se trouve le derme, une couche épaisse (~1mm) de tissu conjonctif très élastique et résistant aux stress mécaniques. Il doit ces propriétés à la présence en grande quantité de fibres de collagène dans la matrice extracellulaire, et dans une moindre mesure d'élastine, synthétisées par les fibroblastes [8]. Il accueille différentes cellules participant à la réponse immunitaire, dont des macrophages, des cellules dendritiques dermiques et des mastocytes. On y trouve également des appendices comme les follicules pileux, les glandes sébacées et sudorales, et différents récepteurs sensoriels [9]. Le derme peut être subdivisé en deux couches : le derme réticulaire et le derme papillaire. Le derme

réticulaire représente la couche la plus épaisse et la plus profonde du derme, elle assure la stabilité mécanique grâce à la densité de son tissu conjonctif. Le derme papillaire est une zone plus lâche et spongieuse qui sert d'interface avec la couche plus externe, l'épiderme, à travers la jonction dermo-épidermique. Le derme est richement irrigué et innervé, ce qui participe au fonctionnement de l'épiderme avasculaire, grâce aux échanges rendus possibles par cette jonction [10].

La couche externe de la peau, l'épiderme, consiste en un empilement dense de kératinocytes. Cet empilement peut être divisé en quatre couches en fonction du stade de différenciation de ces cellules en cornéocytes, lorsqu'elles migrent des couches profondes vers l'extérieur pour former la couche cornée ou *stratum corneum* (SC) (Figure 1-2) [11]. On trouve d'abord la couche basale ou germinative. C'est une monocouche de kératinocytes alignés reposant sur la lame basale de la jonction dermo-épidermique. La cohésion entre ces kératinocytes est assurée par des desmosomes, des jonctions membranaires intercellulaires fortes, et par des hémidesmosomes avec la lame basale. Les cellules y prolifèrent puis entament leur migration vers les couches supérieures. Vient ensuite la couche épineuse, formée de 5 à 10 couches de cellules. Les kératinocytes commencent à y produire de la kératine, une protéine fibreuse nécessaire à la cornéification. Le nom de cette strate provient des filaments de kératine présents dans le cytoplasme des kératinocytes, qui forment des épines au niveau des desmosomes. La couche granuleuse est la dernière couche dite viable de l'épiderme. Après celle-ci, les kératinocytes se destinent à une mort programmée et une transformation en cornéocytes, à travers notamment la perte de leur noyau et de leurs organites. Les kératinocytes de la couche granuleuse continuent à s'enrichir en kératine et s'aplatissent. Cette transformation est facilitée par la production de protéines filamenteuses par les granules de kératohyaline contenues dans leur cytoplasme : la filaggrine. Cette protéine s'agrège sur les filaments de kératine et forme ainsi des faisceaux serrés qui provoquent l'effondrement de la cellule en une configuration plane typique des cornéocytes [12]. Ces granules sont aussi responsables de la libération d'un produit lamellaire lipidique entre les cellules, qui à terme formera une barrière lipidique imperméable, caractéristique de la couche cornée de l'épiderme.

La couche la plus externe de la peau, le *stratum corneum*, consiste donc en empilement d'environ 10 à 20µm de cellules mortes, aplaties, anucléées, fortement enrichies en kératine

et dont l'enveloppe membranaire est cornéifiée : les cornéocytes [8]. La matrice extracellulaire du SC est principalement constituée de céramides, de cholestérols et d'acides gras. Le SC est souvent représenté par un modèle « brique et ciment », où les briques sont des cornéocytes liés entre eux par des jonctions serrées, les cornéodesmosomes, et entourés par un ciment lipidique imperméable et hydrophobe. La dégradation progressive de ces jonctions engendre la desquamation des cornéocytes en surface et participe au renouvellement continu de l'épiderme.

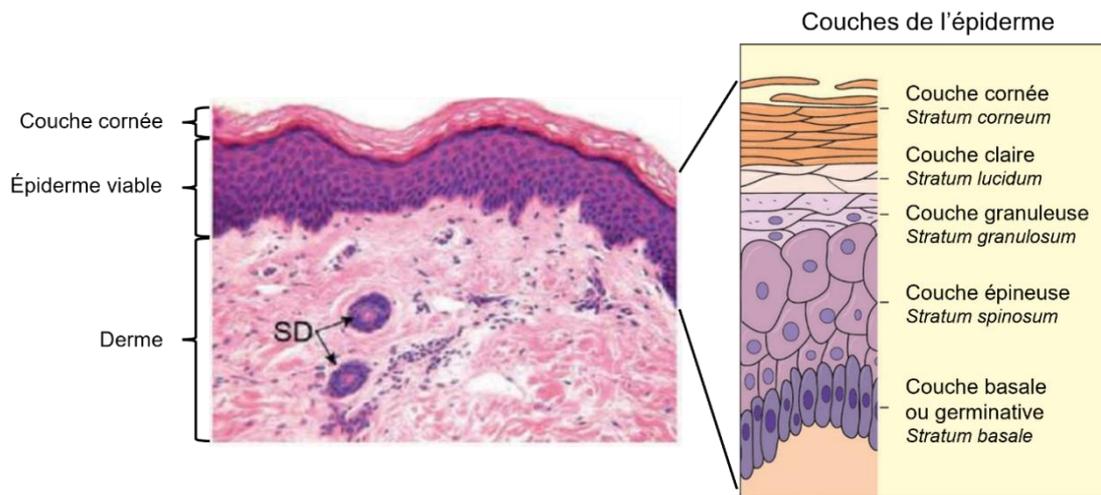


Figure 1-2 Exemple d'une coupe de peau humaine, sur laquelle on reconnaît le derme ainsi que différentes couches de l'épiderme. Ces couches sont identifiées plus précisément sur schéma de droite. SD : canaux de glandes sudorales. Adaptée de Sunberg et coll. [11].

L'épiderme a une épaisseur moyenne de 100 $\mu$ m, mais celle-ci varie en fonction de la localisation dans le corps. Les kératinocytes représentent au moins 80% de la population cellulaire de l'épiderme. On y trouve également des mélanocytes, responsables de la pigmentation de la peau, des cellules de Merkel impliquées dans la sensibilité tactile, et des cellules de Langherans, cellules dendritiques participant à la reconnaissance d'antigènes et à la réponse des lymphocytes T dans l'épiderme [8].

#### 1.1.1.b. Fonction barrière de la peau

La peau a plusieurs fonctions, c'est une voie de régulation de la température corporelle, un formidable outil de perception et c'est aussi un espace de stockage (graisse, eau, vitamine D) [7], mais c'est pour ses capacités de protection ou fonction barrière qu'on s'intéresse à elle dans nos travaux.

La peau assure une protection contre les agressions mécaniques et pathogènes grâce à ces propriétés suturales, physicochimiques et immunologiques. Comme décrit précédemment, les trois couches de la peau ont des propriétés mécaniques très différentes. Les graisses stockées dans l'hypoderme permettent un glissement de la peau sur les tissus plus profonds. Le réseau dense de collagène dans le derme rend cette strate très élastique et enfin l'empilement de cornéocytes et la présence de jonctions serrées entre les cellules dans l'épiderme rendent cette couche très résistante [13]. Son renouvellement perpétuel en fait également une couche sacrificielle pouvant se réparer. L'association de ces différentes propriétés mécaniques permet à la peau d'amortir les agressions mécaniques. Elle protège aussi des rayonnements UV, en activant notamment la production de mélanine.

La peau est une barrière à double sens : elle prévient les intrusions provenant de l'extérieur, mais elle régule également la fuite excessive d'éléments de l'intérieur vers l'extérieur, comme celle de l'eau [12]. Ce rôle est en partie assuré par le ciment lipidique du SC composé d'un ratio molaire 1:1:1 de céramides, de cholestérols et d'acides gras libres. Ces lipides sont organisés en bicouches lamellaires autour de cornéocytes. Leur cohésion est assurée par de fortes interactions de type Van der Waals, grâce à leurs très longues chaînes hydrocarbonées saturées [14, 15]. Un schéma de cette organisation est présenté Figure 1-3. L'organisation structurale de ces lamelles dépend fortement de la température. À la température physiologique, leur organisation latérale est orthorhombique, très dense et imperméable. Elles subissent une transition vers la phase hexagonale lorsque la température dépasse 35-40°C, puis vers une phase cristal-liquide très désorganisée après 70°C.

Malgré son caractère non viable et hydrophobe, un SC sain contient une faible quantité d'eau (>10%), qui lui donne notamment une certaine souplesse. Cette eau est captée par des agents hygroscopiques au sein des cornéocytes, appelés facteur naturel d'hydratation ou Natural Moisturizing Factor NMH [16]. La barrière lipidique du SC permet également de limiter la perte d'eau transépidermique (transepidermal water loss TEWL), dont la quantification permet de qualifier le bon état de la fonction barrière [17].

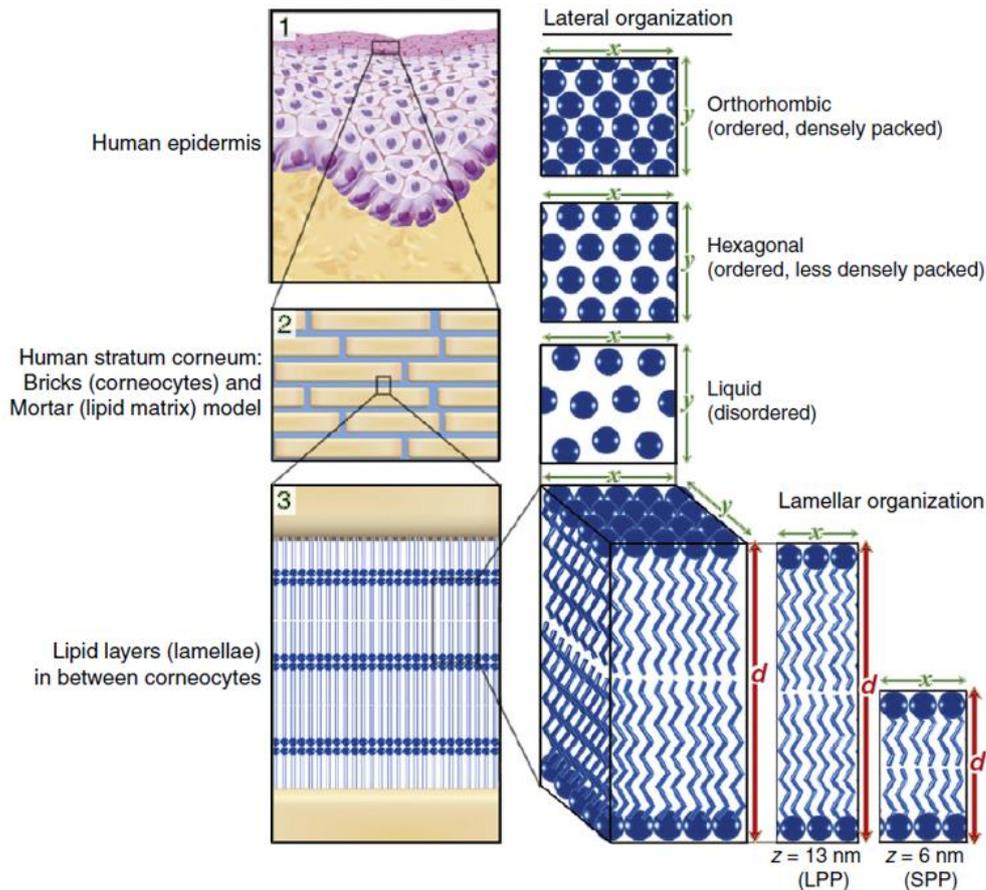


Figure 1-3 Schéma de l'organisation lamellaire et latérale des lipides de la couche cornée. (1) Schéma de l'épiderme. (2) Modèle brique et mortier (ciment) de la couche cornée. (3) Bicouches lamellaires des lipides du stratum corneum. Les lamelles ont des organisations latérales différentes : orthorhombique, hexagonale ou liquide (cristal liquide) et se répètent à courte (SPP) ou longue (LPP) distance. Extrait de Janssens et coll. [14].

La peau a un pH neutre dans la majeure partie de sa zone viable, mais il s'acidifie progressivement entre la couche granuleuse et la couche cornée pour atteindre une valeur moyenne en surface inférieure à 5 [18, 19]. Ce pH en surface est maintenu par la présence d'un film hydrolipidique formant une première couche protectrice sur la peau [20]. Il est composé de sueur (hydrophile), de sébum et de lipides (hydrophobes) respectivement sécrétés par les glandes sébacées et libérées par le corps lamellaire du SC. Le pH acide permet de neutraliser la prolifération de microorganismes pathogènes tout en maintenant un environnement optimal pour le développement de la flore naturelle de la peau. De plus, ce pH acide participe au bon fonctionnement des enzymes nécessaires à la maturation des différents lipides formant le ciment du SC [10].

Enfin, dans le cas où un agent pathogène parviendrait à pénétrer le SC, il serait rapidement éliminé par le système immunitaire de la peau. En effet, en plus de former une barrière physique, les kératinocytes synthétisent différentes cytokines et chimiokines, ainsi que des peptides antimicrobiens participant à une réponse immunitaire innée et adaptative [21, 22]. De plus, la présence dans les couches profondes de l'épiderme de cellules de Langherans, spécialisées dans la détection et la présentation d'antigènes aux lymphocytes T, facilite leur élimination. Si ce n'est toujours pas suffisant, la population de cellules immunitaires résidentes du derme (macrophages, cellules dendritiques, mastocytes...) peut prendre le relais. La présence de vaisseaux lymphatiques dans le derme permet également le recrutement de cellules immunitaires extérieures.

#### *1.1.1.c. La délivrance dermique et transdermique*

La barrière épidermique est certes très efficace, mais elle n'est pas absolue. L'absorption percutanée de principe actif (PA) est possible, elle est généralement décrite selon 3 étapes :

- Pénétration du PA dans le SC,
- Diffusion à travers les différentes couches de l'épiderme jusqu'au derme,
- Passage du PA dans la circulation sanguine via les capillaires du derme.

On appelle délivrance dermique l'application d'un PA sur la peau entraînant sa diffusion jusqu'aux différentes strates de celle-ci. Elle est transdermique lorsque le PA atteint la circulation sanguine, permettant sa délivrance systémique [23].

La pénétration d'un PA dans la peau est possible selon 3 voies principales : intracellulaire (à travers les cellules et la matrice extracellulaire), intercellulaire (à travers la matrice extracellulaire) et annexielle, c'est-à-dire à travers les annexes de la peau (follicules pileux et canaux sudoripares) (Figure 1-4). La voie annexielle est souvent considérée comme secondaire puisque les annexes ne représentent qu'une infime partie de la surface de la peau (~0,1%) [10, 23]. Par ailleurs, même si les compositions varient entre les couches de la peau, la matrice extracellulaire est généralement plus lipophile que l'espace intracellulaire. C'est particulièrement le cas dans le SC qui ne contient qu'une très faible quantité d'eau. Il est d'ailleurs reconnu pour être le facteur limitant de la délivrance transdermique. De ce fait, la voie intercellulaire plus longue et tortueuse est empruntée par les molécules lipophiles, alors que la voie intracellulaire est réservée aux petites molécules hydrophiles.

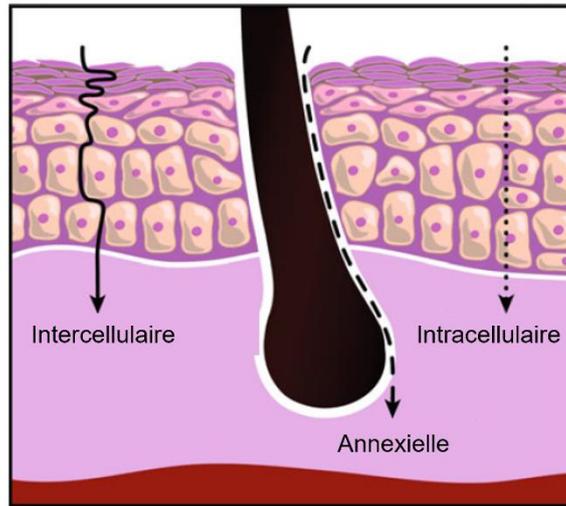


Figure 1-4 Représentation schématique des voies de pénétration d'un principe actif dans la couche cornée : intercellulaire, intracellulaire et annexielle. Adapté de Godin et coll. [23].

La diffusion d'un PA à travers la peau est mue par le gradient de concentration existant entre la zone d'application et les couches de la peau. Cette diffusion suit la première loi de Fick :

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

Équation 1-1 Première loi de Fick. Avec le flux percutané  $J$  ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), le coefficient de perméabilité  $K_p$  ( $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ),  $\Delta C$  ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ) la différence de concentration en PA aux extrémités de la peau ou couche étudiée d'épaisseur  $e$  (cm), le coefficient de partage  $K_m$  et le coefficient de diffusion  $D$  ( $\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$ ).

D'après cette équation, le flux percutané d'un PA est égal au produit du coefficient de perméabilité  $K_p$  et de la différence de concentration en PA entre les deux côtés de la membrane cutanée. Le coefficient de perméabilité  $K_p$  dépend lui-même de l'épaisseur  $e$  de cette membrane, ainsi que de deux autres grandeurs  $K_m$  et  $D$ . Le coefficient de partage  $K_m$  du PA entre son excipient (solution, formulation ou véhicule) et la peau correspond au rapport de sa solubilité dans ces deux milieux. Plus il est élevé, plus une molécule a d'affinité avec la peau. Cependant, la peau étant elle-même constituée de corps hydrophiles (les cellules) et lipophiles (matrice extracellulaire), une trop grande affinité avec l'un ou l'autre limite la diffusion globale [24]. Le coefficient de diffusion  $D$  représente quant à lui une mobilité intrinsèque au PA, qui dépend de sa taille : plus sa masse molaire est faible, plus sa mobilité sera grande [25]. Par conséquent, les PA pouvant traverser la peau (et surtout sa couche cornée) de manière passive sont limités : ils représentent uniquement des molécules modérément hydrophiles et d'une taille inférieure à 500Da environ [10, 24, 26]. C'est par

exemple le cas de la nicotine ou de la lidocaïne, dont la délivrance par voie transdermique passive est commercialisée.

Pour finir, la pénétration d'un PA dans la peau dépend fortement de ses propriétés physicochimiques, mais elle dépend également de l'état de la peau (âge, site d'application, peau saine ou lésée) [27].

*La peau est une interface très étendue entre l'environnement extérieur et le corps, ce qui en fait une voie très intéressante pour la délivrance de PA. Cependant, la peau est une barrière. Outre sa résistance mécanique, son pH acide et la présence de cellules immunitaires, la fonction barrière de la peau repose principalement sur le stratum corneum (SC), la couche externe hydrophobe de la peau. Sa structure en brique et mortier, dense et complexe, est en perpétuel renouvellement. La traversée de cette couche par des macromolécules hydrophiles est impossible de manière passive et c'est là tout l'enjeu de la délivrance transdermique non invasive.*

### **1.1.2. Méthodes de délivrance transdermique**

Comme exposé en introduction générale, la délivrance transdermique de PA repose actuellement sur l'utilisation de seringues, mais leur manipulation pose plusieurs problèmes sanitaires. C'est pourquoi les recherches portant sur le développement de méthodes alternatives minimalement invasives sont en essor. Les approches adoptées ont beaucoup évolué depuis la commercialisation des premiers patches de délivrance transdermique dans les années 1980. Leurs avancées sont largement et régulièrement passées en revue [24, 28–33], notamment par Prausnitz et Langer [34, 35] et très récemment par Ramadan et coll. [36] et Jeong et coll. [37]. Les stratégies d'amélioration de la délivrance transdermique peuvent être classées selon plusieurs générations [35], et elles tendent maintenant à être combinées dans le but de potentialiser leur efficacité.

Il existe deux grandes catégories de délivrance transdermique de PA : la pénétration passive visant à augmenter chimiquement la diffusion du PA dans la peau et/ou la perméabilité de celle-ci au PA; et la pénétration active, qui utilise une force motrice extérieure pour stimuler la délivrance du PA.

### 1.1.2.a. Méthodes chimiques passives

Les méthodes passives visent à améliorer l'affinité chimique entre le PA et la peau. Il est possible de travailler directement sur la formulation du PA pour améliorer sa diffusion (prodrogues, couplage d'ions), mais aussi de l'encapsuler dans des véhicules amphiphiles, comme les liposomes. La perméabilité du SC peut être altérée par la déstabilisation de sa barrière lipidique grâce à des promoteurs de pénétration chimiques (CPE) [38]. Il en existe 10 classes d'après Williams et coll., qui interagissent de manière différente avec les lipides du SC. Parmi elles on peut citer l'eau, jouant par exemple sur l'hydratation de la couche cornée ce qui génère des défauts aqueux dans les couches lipidiques, mais également les tensioactifs ou les alcools [24]. Ces méthodes de délivrance transdermique se confrontent à plusieurs limitations : elles sont généralement réservées à la délivrance de petites molécules et les agents chimiques utilisés se doivent d'être non toxiques et non irritants, ce qui réduit le spectre de molécules appropriées [35, 38, 39].

### 1.1.2.b. Méthodes actives

Dans le but de délivrer des macromolécules hydrophiles, comme des protéines ou même de l'ADN, des stratégies ont été élaborées en utilisant une force motrice extérieure pour promouvoir la diffusion du PA et déstabiliser physiquement et temporairement la fonction barrière du SC [40]. Un schéma récapitulatif de ces méthodes est présenté Figure 1-5, nous en décrivons une partie :

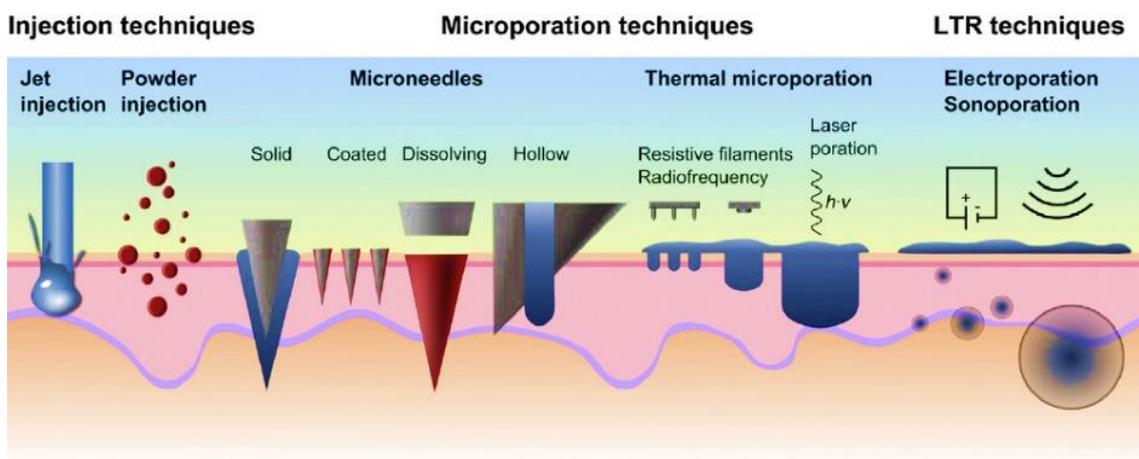


Figure 1-5 Schéma récapitulatif des différentes techniques de délivrance transcutanée actives. Adapté de Engelke et coll. [33].

Une des solutions proposées est de remplacer la pénétration mécanique d'une aiguille classique par la pénétration d'un microjet de PA à haute pression. Les risques liés à leur manipulation sont alors contournés. C'est le PA lui-même qui par sa très haute vitesse (>100m/s) perfore la peau pour atteindre les différentes couches, jusqu'à l'hypoderme au besoin. Cette méthode ne dépend pas des propriétés physicochimiques du PA, mais peut s'avérer douloureuse [41]. Elle peut notamment être adaptée à la vaccination [42].

Il existe des approches thermiques dont le but est l'ablation locale du SC. L'exposition de l'épiderme à de fortes températures (315°C) sur des durées très courtes (<1s) provoque la vaporisation de la kératine générant des trous dans le SC [43], ce qui augmente énormément sa perméabilité [44]. De tels échauffements peuvent être obtenus grâce à des lasers ou des radiofréquences, sans endommager les tissus sous-jacents.

La technologie des microaiguilles (microneedles, MN) fait l'objet de beaucoup d'attention, car c'est une technique très versatile tant sur la mise en forme que sur le mode de délivrance de PA. Les MN génèrent des pores microscopiques par destruction mécanique du SC, comme dans le cas d'une aiguille classique, mais à plus faible échelle, et moins profondément [45]. Ces MN peuvent être solides, solubles, enrobées de PA ou creuses, il existe donc pléthore de modes d'administration les utilisant, parfois combinés avec des méthodes passives.

Enfin, les dernières approches existantes reposent sur des méthodes physiques utilisant des ultrasons (la sonoporation), ou une assistance électrique (iontophorèse et électroporation) pour générer des chemins aqueux dans le SC et permettre un transport localisé des molécules hydrophiles (LTR : local transport region). L'utilisation d'ultrasons peut promouvoir la délivrance de PA (sonophorèse) et la déstabilisation de la barrière lipidique (sonoporation). Les mécanismes impliqués pendant ces deux phénomènes dépendent de la bande de fréquence utilisée : basses fréquences 20-100kHz, et hautes fréquences >3MHz [46]. L'iontophorèse est l'une des premières méthodes actives explorées pour la délivrance percutanée. Elle consiste en l'application d'un faible courant continu (<0,5 mA/cm<sup>2</sup>) à travers la peau, qui provoque la migration des molécules par électrophorèse et électroosmose. Elle n'a cependant pas d'effet sur la barrière lipidique, ce qui limite son utilisation aux molécules de petite taille (<500Da). Enfin, l'électroporation permet d'obtenir une perméabilisation transitoire de la peau par l'application de courtes impulsions électriques ayant une forte

tension. C'est cette technique que nous exploitons dans nos travaux et nous la détaillons dans la partie suivante.

*Toutes ces méthodes ont chacune leurs avantages et leurs inconvénients (diversité des PA délivrables, risques d'effets secondaires ou d'irritations, dosage ou précision limités...) [37]. Nous avons choisi de travailler avec l'électroporation pour des raisons historiques dans l'équipe de Biophysique Cellulaire, et aussi parce qu'elle peut offrir dans le cas des macromolécules hydrophiles le meilleur compromis entre efficacité de délivrance et protection du SC.*

## 1.2. L'électroporation

L'électroporation (EP), ou électroperméabilisation, a été décrite la première fois par Neumann et Rosenheck [47]. Elle consiste en l'application d'impulsions électriques de haute tension et courte durée, capables de déstabiliser temporairement la membrane plasmique des cellules et d'y générer des défauts appelés « pores » et ceci au-dessus d'une valeur seuil de l'intensité du champ électrique. Ainsi, en fonction de l'intensité du champ électrique délivrée aux cellules, on observe différents effets pouvant donc conduire à une perméabilisation, temporaire ou irréversible. Un résumé de ces phénomènes, proposé par Kolosnjaj-Tabi et coll. [48], est présenté Figure 1-6.

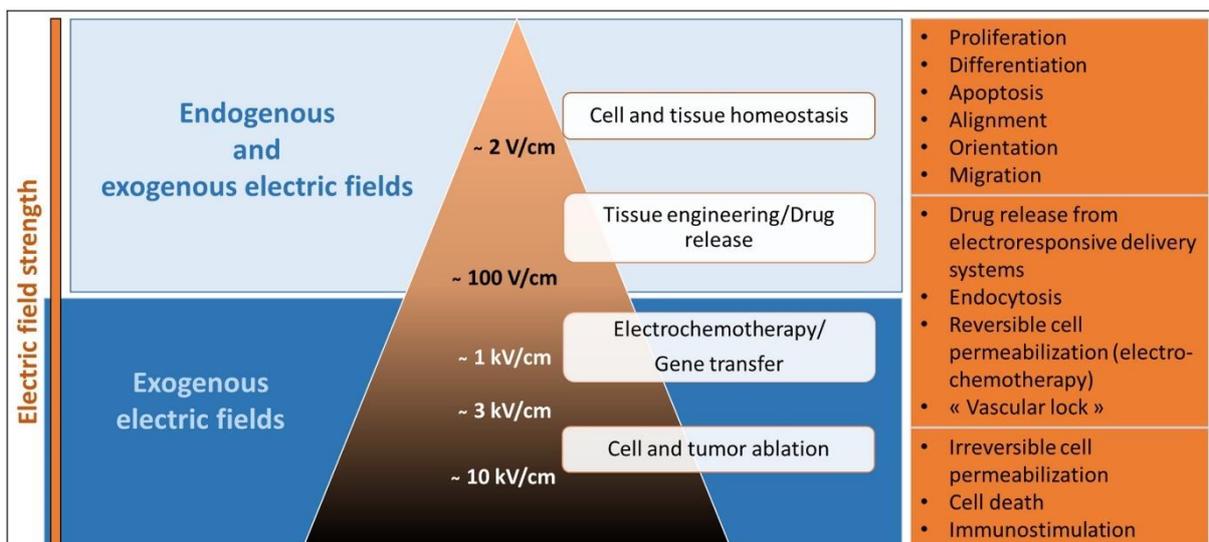


Figure 1-6 Schéma récapitulatif des effets cellulaires résultant de l'application d'un champ électrique pulsé, en fonction de l'intensité de celui-ci. Extrait de Kolosnjaj-Tabi et coll. [48].

Cette perméabilité transitoire de la membrane permet l'échange d'espèces entre le cytoplasme de la cellule et le milieu extérieur, ce qui en fait une méthode de vectorisation très efficace. Il a été montré que l'incorporation de différents PA par des cellules, tels que des ions [49, 50], des molécules anticancéreuses [51] ou même des acides nucléiques [52] est potentialisée lorsque les membranes sont électroperméabilisées. Ces observations ont donc mené à des applications thérapeutiques en clinique : l'électrochimiothérapie ou ECT pour les molécules anticancéreuses et électrogénothérapie ou EGT pour les acides nucléiques (transfert de gènes). Lorsque la membrane plasmique est trop déstabilisée, entraînant la mort de la cellule, l'EP est dite irréversible (IRE). On utilise ce type de champ électrique pour procéder à des ablations tumorales, notamment dans le cancer du foie [53, 54]. Ces champs très intenses peuvent également être utilisés dans l'agroalimentaire pour la stérilisation par exemple [55]. Ainsi, les champs d'application de cette méthode physique sont donc très larges.

### **1.2.1. Théorie de l'électroporation**

#### *1.2.1.a. Caractéristiques du champ électrique*

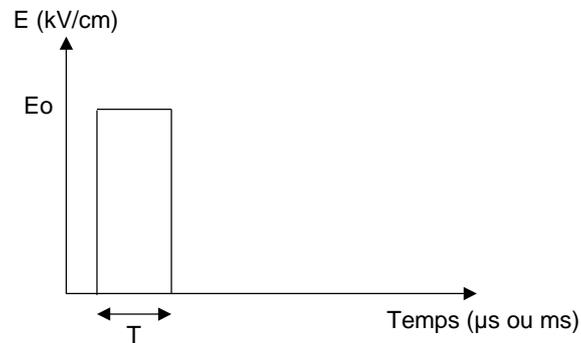
Le champ électrique est généré par l'application d'une différence de potentiel (U) aux bornes de deux électrodes reliées à un générateur de tension. Selon la géométrie des électrodes, le champ électrique est uniforme ou non dans l'espace. Il peut être continu ou alternatif en fonction de la nature du courant qui traverse l'échantillon.

Dans le cas de deux électrodes planes et parallèles, éloignées d'une distance d, l'intensité du champ électrique E est reliée à U selon la relation :

$$E = \frac{U}{d}$$

Avec E en kV/cm, U en kV et d en cm. Les conditions électriques appliquées se caractérisent par différents paramètres physiques: E l'intensité du champ électrique appliqué, N le nombre d'impulsions électriques appliquées sur le système cellulaire, T la durée d'une impulsion et F la fréquence d'application des impulsions électriques. Le délai entre chaque impulsion est de  $1/(F-T)$ .

La cinétique de variation de la tension  $U$  appliquée aux bornes des électrodes peut être soit en décroissance exponentielle, soit en vague carrée (Figure 1-7). En vague carrée, l'intensité du champ électrique  $E$  est constante pendant toute la durée  $T$  de l'impulsion.



*Figure 1-7 Schéma d'une impulsion électrique de type « vague carrée ». Elle est caractérisée par son intensité de champ électrique  $E_0$  et sa durée  $T$ . L'intensité est constante sur toute la durée des impulsions.*

Lorsqu'une suspension de cellules est placée dans un champ électrique, elle subit différents effets à caractère scalaire homogènes dans l'espace (effet joule, électrochimie) et des effets à caractère vectoriel, dépendants de la position des cellules par rapport aux lignes de champ.

Le passage du courant au travers d'une suspension cellulaire entraîne des modifications thermiques et chimiques. Tout courant électrique d'intensité  $I$  (A) traversant une résistance  $R$  (ohms) induit un échauffement thermique appelé effet Joule. La production de chaleur  $\Delta Q$  pendant une période  $\Delta t$  est donnée par la loi de Joule :

$$\Delta Q = R \cdot I^2 \cdot \Delta t$$

Toute l'énergie électrique appliquée est convertie en chaleur dans une solution homogène sans cellule [56]. L'échauffement  $\Delta T^\circ$ , lié au carré de l'intensité du champ électrique appliqué ( $E$ ), à la durée de l'impulsion ( $T$ ), à la conductivité de l'échantillon ( $\sigma$ ), ne dépend pas du volume de l'échantillon. Il est donné par la formule suivante [47, 57] :

$$\Delta T^\circ = \frac{E^2 \cdot T \cdot \sigma}{Cp \cdot \rho}$$

Avec  $Cp$  la chaleur spécifique (voisine de 4,18 J/g.K) et  $\rho$  la masse spécifique de l'échantillon (1g/cm<sup>3</sup>). Cet incrément thermique étant associé à une seule impulsion, l'élévation globale de température sera d'autant plus importante que le nombre d'impulsions sera grand.

Cependant, une dissipation thermique a lieu entre chaque impulsion, d'autant plus importante que la fréquence d'impulsion est basse.

Sous l'effet du courant électrique, des réactions d'oxydoréductions peuvent produire des espèces chimiques très réactives telles que des radicaux libres ou la libération d'ions métalliques comme l'aluminium [58]. Ces réactions, localisées au niveau des électrodes, dépendent de la nature chimique des électrodes (acier, acier inoxydable, aluminium), de la composition du milieu et des paramètres électriques [59]. Les composés générés au niveau des électrodes peuvent avoir des conséquences néfastes sur la viabilité cellulaire et entraîner des modifications des conditions électriques pendant l'impulsion par variation des propriétés physiques du milieu [56].

Une des conséquences de l'application d'un champ électrique continu sur une suspension cellulaire est la redistribution des espèces chargées présentes, créant ainsi de nouveaux dipôles. Sous l'effet d'un champ électrique externe, plusieurs phénomènes de polarisation sont observés : les ions mobiles de la couche ionique à l'interface membrane/milieu sont redistribués en fonction de leur charge, ce qui transforme la cellule en dipôle. Suite à ce phénomène, les cellules non sphériques vont s'orienter le long des lignes de champ de sorte que l'énergie du système devienne minimale. De plus, comme les cellules possèdent une charge nette de surface négative, elles vont migrer par électrophorèse vers l'anode (électrode positive) sous l'effet du champ électrique. Dans le cas de certaines cellules adhérentes, un déplacement préférentiel dirigé par l'orientation du champ électrique est observé. Ce phénomène, appelé galvanotactisme, a été mis en évidence chez de nombreux types cellulaires eucaryotes connus pour leurs propriétés de migration [60].

Cette polarisation de l'environnement à l'interface de la membrane plasmique va induire des modifications des comportements cellulaires, comme une réorganisation des macromolécules chargées à la surface de la membrane ou la modification du potentiel transmembranaire.

#### *1.2.1.b. Induction de l'électroperméabilisation membranaire*

Toute cellule vivante possède une différence de potentiel transmembranaire native  $\Delta\Psi_0$ , résultant de la séparation de charges de part et d'autre de la membrane, provoquée par un courant permanent d'ions (majoritairement potassium) à travers des canaux ioniques. Cette

différence de concentration est maintenue en permanence par l'activité consommatrice en énergie des pompes sodium-potassium. Le potentiel électrochimique qui lui correspond constitue une réserve d'énergie potentielle qui permet d'assurer les transports de substances nécessaires à la survie de la cellule [61]. Lorsqu'une cellule est placée dans un champ électrique délivré par deux électrodes se faisant face, les charges en surface de la membrane cellulaire sont polarisées. Cette polarisation génère une seconde différence de potentiel dans la cellule, nommée différence de potentiel transmembranaire induite  $\Delta\Psi_i$ . Elle est définie par l'équation suivante et ses composantes peuvent être visualisées Figure 1-8 :

$$\Delta\Psi_i = f \cdot g(\lambda) \cdot r \cdot E \cdot \cos\theta(M) \cdot (1 - e^{-T/\tau c})$$

L'expression de  $\Delta\Psi_i$  prend en compte la géométrie de la cellule via son facteur de forme  $f$  et son rayon  $r$ , mais aussi les conductivités des différents constituants du système (membrane, cytoplasme et milieu extracellulaire) grâce au facteur  $g(\lambda)$ . L'orientation du champ électrique d'intensité  $E$  par rapport à la cellule est prise en compte par l'angle  $\theta$  existant en la direction du champ et la normale au point d'application  $M$  sur la membrane. Enfin, on définit  $T$  la durée de l'impulsion, et  $\tau c$  le temps nécessaire à la charge de la membrane (capacitance).

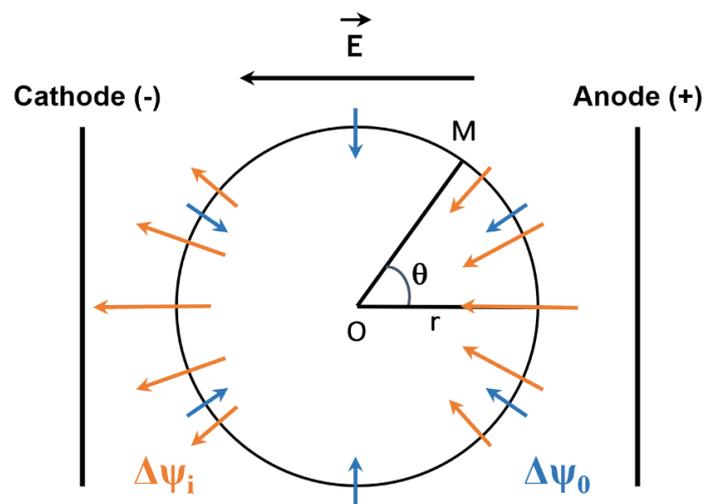


Figure 1-8 Schéma de la répartition et de l'orientation des différences de potentiel existantes au niveau de la membrane d'une cellule soumise à un champ électrique  $E$ . La différence de potentiel transmembranaire native  $\Delta\Psi_0$  en bleu, est orienté de l'extérieur de la membrane vers l'intérieur. La différence de potentiel transmembranaire induite  $\Delta\Psi_i$  (en orange) est orientée selon la direction du champ électrique de l'anode vers la cathode.

La différence de potentiel transmembranaire  $\Delta\Psi_i$  générée par l'application d'un champ électrique est orientée de l'anode vers la cathode, comme représentée sur le schéma Figure 1-8. La différence de potentiel native  $\Delta\Psi_0$  étant orientée de l'extérieur vers l'intérieur de la membrane, les deux s'additionnent du côté de l'anode et s'opposent à la cathode. Il en résulte alors respectivement une hyperpolarisation et une dépolarisation [62]. Sur le même principe, le champ électrique n'affecte pas la membrane lorsqu'il lui est tangent (perpendiculairement à la normale du point d'application M). La perméabilisation induite par les champs électriques pulsés n'est donc pas uniforme sur toute la surface de la membrane, mais localisée au niveau de pôles faisant face aux électrodes. De plus, la diffusion de molécules fluorescentes à travers des membranes plasmiques perméabilisées a été montrée comme plus importante à l'anode qu'à la cathode [52, 63], traduisant une asymétrie de perméabilisation entre les pôles.

Teissié et Rols ont déterminé que la valeur absolue de la somme  $\Delta\Psi_i + \Delta\Psi_0$  devait atteindre une valeur seuil de 200mV pour que la membrane déstabilisée devienne perméable à la fuite ou l'internalisation d'espèces chimiques [64, 65]. Cet état perméable n'est pas stable lorsqu'il n'affecte pas la viabilité cellulaire, et la membrane lipidique tend à retrouver son état initial relativement rapidement (secondes ou minutes), en fonction des paramètres d'impulsions utilisés mais aussi de la température [66, 67]. Une température basse augmentera la durée de vie de l'état perméable. Les travaux de l'équipe de biophysique cellulaire ont permis d'identifier l'influence des paramètres d'impulsion sur la perméabilisation. L'intensité du champ E nécessaire à l'obtention d'une perméabilisation transitoire, dépend directement de la taille et de la forme de la cellule. Plus une cellule sera petite, plus le champ appliqué devra être intense pour obtenir la même différence de potentiel. Ainsi, un champ de 100V/cm est suffisant pour perméabiliser de grandes cellules eucaryotes, mais il faut utiliser des champs beaucoup plus intenses, jusqu'à 1-2kV/cm pour perméabiliser des bactéries [68]. L'augmentation de l'intensité du champ E au-delà de la valeur seuil de perméabilisation a pour effet d'augmenter la surface perméabilisée Figure 1-9. La durée des impulsions couramment utilisées varie de la dizaine de millisecondes à la centaine de microsecondes, voire de nanosecondes, en fonction de l'objectif et des autres paramètres. La durée des impulsions T et leur nombre N ont une influence sur la densité de défauts membranaires générés par l'EP.

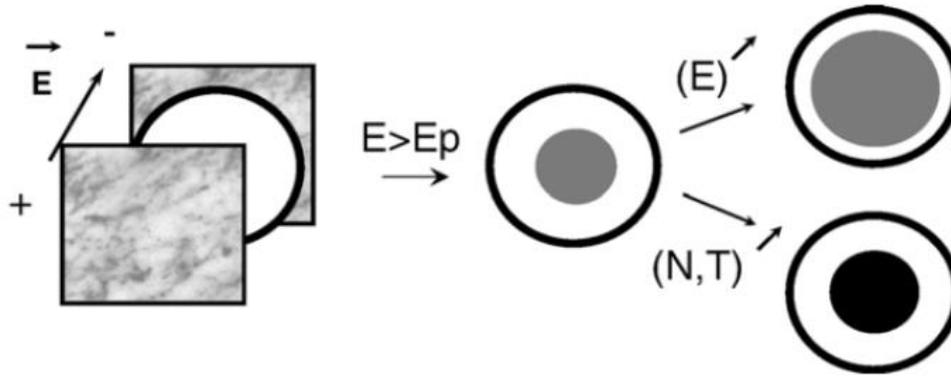


Figure 1-9 Influence des paramètres électriques,  $N$  le nombre d'impulsions,  $T$  la durée de ces impulsions et  $E$  l'intensité du champ, sur la surface membranaire affectée par l'EP.  $E_p$  représente la valeur seuil nécessaire à l'induction de pores membranaires. La surface en gris représente la surface perméabilisée ( $E > E_p$ ). Cette surface augmente avec l'intensité du champ  $E$  (en haut à droite). Pour  $E$  constant, l'augmentation de  $N$  ou  $T$  induit une densification des défauts membranaires (efficacité de perméabilisation)(surface noire, en bas à droite). Figure tirée de [69].

### 1.2.1.c. Réponses cellulaires et tissulaires

La perméabilisation est perçue par la cellule comme un stress qui peut avoir de nombreuses conséquences, dont sa mort. Le déséquilibre osmotique généré par les flux d'espèces chimiques entrants et sortants de la cellule perméabilisée peut lorsqu'il est trop important conduire à la rupture de la membrane plasmique. L'EP peut faciliter l'apparition de déformations membranaires (bleds) ou microvillosités supplémentaires [66], traduisant une altération du cytosquelette. Ces altérations peuvent également conduire à la rupture de la membrane plasmique. En plus du phénomène de modification transitoire des propriétés membranaires des cellules au niveau des lipides, le cytosquelette peut devenir la cible de l'EP, dans le but de provoquer des modifications au niveau de ses protéines et des protéines impliquées dans les jonctions cellulaires [70].

Il a été montré que l'EP s'accompagnait d'une génération d'espèces oxygénées réactives (EOR) en réponse au stress chez les cellules animales, au niveau des membranes affectées par le champ électrique [71, 72]. Il a également été observé une activation du métabolisme de ces mêmes cellules, se traduisant par l'augmentation de leur vitesse de croissance [73].

Au niveau des lipides membranaires, l'application du champ électrique provoque une perte partielle de l'asymétrie de distribution des phospholipides dans la membrane des cellules en induisant un flip/flop rapide des phospholipides [74].

La situation est plus complexe dans les tissus qui sont composés de multiples cellules en contact les unes avec les autres. Leur composition est de plus hétérogène : divers types cellulaires aux conductivités différentes, matrices extracellulaires de différentes natures, ainsi qu'un réseau vasculaire. Tous ces facteurs exercent une influence sur la densité de courant et la distribution du champ électrique. L'efficacité de l'EP d'un tissu reposant essentiellement sur la distribution homogène du champ électrique en son sein, l'hétérogénéité intrinsèque des tissus est un obstacle. L'homogénéité du champ est également directement dépendante de la géométrie des électrodes utilisées [75].

Pour pallier ces difficultés, des modèles numériques 3D ont été développés pour anticiper la distribution du champ électrique dans des tissus, notamment dans les tumeurs [76, 77]. L'alimentation de ces modèles par des données de conductivité spécifique des tissus, et de champs électriques seuils déterminés expérimentalement, ainsi que leur confrontation avec des résultats expérimentaux d'EP, a permis de les affiner et de les valider. Ces simulations sont devenues de bons outils pour prédire au mieux la réponse du tissu et l'influence des grandeurs physiques sur l'efficacité de l'EP.

### **1.2.2. Applications médicales**

Deux grandes applications ont émergé de l'utilisation de l'électroporation réversible pour promouvoir la délivrance intracellulaire de PA.

#### *1.2.2.a. Electrochimiothérapie*

L'électrochimiothérapie (ECT) est basée sur le traitement combiné de cellules cancéreuses par une molécule anti-cancéreuse (bléomycine, cis-platine) et de l'électroporation. Le PA est injecté soit directement dans la tumeur ou soit par injection intraveineuse, puis la zone atteinte est pulsée dans plusieurs directions pour augmenter l'internalisation du PA par les cellules. La preuve de concept spectaculaire de la pertinence de l'ECT a été fournie par Orłowski et coll. en 1988 : ils ont observé une cytotoxicité de la bléomycine 700 fois supérieure dans le cas de cellules électroporées [78]. L'ECT présente plusieurs avantages par rapport à des traitements antitumoraux classiques : la délivrance est localisée, mais plus efficace avec un dosage réduit, ce qui limite les effets secondaires. Plusieurs essais cliniques d'ECT ont été couronnés de succès tant en médecine humaine [79] que vétérinaire [80–82], et cette méthode de traitement se répand de plus en plus dans le monde [83]. Pour finir, la délivrance

de forte concentration de calcium par électroporation (Ca-EP), développée Ghel et coll. se dresse également comme une méthode prometteuse de traitement efficace du cancer [84].

### *1.2.2.b. Électrogénothérapie*

En dehors de la délivrance de petites molécules thérapeutiques, de nombreux travaux se sont intéressés au transfert de macromolécules, comme les protéines ou même de molécules d'ADN par le biais de plasmides, ou d'ARN (si-RNA). Le but est de permettre l'internalisation de ce type d'actif par une cellule pour y modifier l'expression d'un gène : l'électrogénothérapie (EGT). L'apport d'informations génétiques aux cellules demande une étape complexe de séquençage, mais leur donne le moyen de corriger l'expression d'un gène non fonctionnel (thérapie génique), de développer une réponse immunitaire antitumorale (immunothérapie antitumorale) [85] ou antivirale (vaccination ADN). Les premiers travaux portant sur la transfection d'ADN en 1982 s'étaient montrés prometteurs [86]. Plusieurs essais cliniques ont été réalisés depuis [87].

### **1.2.3. Délivrance transdermique par électroporation de la peau**

L'EP est utilisée pour perméabiliser des tissus complexes comme la peau afin de faciliter la délivrance médicamenteuse. Pour comprendre les mécanismes de perméabilisation impliqués lors de l'EP de la peau, il faut d'abord la considérer sur le plan électrique.

Comme décrit au début de ce chapitre, la peau est un organe complexe organisé en couche ayant des propriétés et des épaisseurs différentes. La caractérisation électrique macroscopique de ses différentes couches a montré que les strates cutanées viables avaient une conductivité du même ordre de grandeur que celle de muscles ou des tumeurs (~quelques centaines de mS/m). Cependant, le SC présente pour sa part une conductivité électrique de l'ordre du mS/m, ce qui est 10 000 fois moins que les tissus viables [76]. Cette forte résistivité électrique lui vient de sa structure lamellaire et de sa faible teneur en eau. Le SC est donc, une fois de plus, le facteur limitant l'efficacité, en s'opposant au champ électrique appliqué lors de la délivrance transdermique assistée par champ électrique. La compréhension des mécanismes de délivrance a largement été assistée par l'étude de l'évolution des propriétés électriques de la peau pendant le traitement. Celles-ci évoluent pendant la durée de l'EP : on observe une chute importante de l'impédance de la peau dès la première impulsion, puis celle-ci tend à retrouver sa valeur initiale avec le temps [88, 89]. De même que pour les tissus,

plusieurs modèles électriques et numériques de la peau ont été proposés notamment par Chizmadzhev et coll. [90, 91], et Pavšelj et coll. [76, 92, 93], dans le but d'être confronté à des données expérimentales.

Il existe deux grands types de stimulations électriques pour la délivrance transdermique de molécules pharmacologiques, l'iontophorèse et l'électroporation [94, 95]. Les mécanismes de perméabilisation impliqués lors de ces stimulations ont été démontrés expérimentalement comme différents, et dépendant de la tension utilisée, ainsi que de la durée des impulsions. Nous proposons ici de décrire l'évolution de ces mécanismes avec l'augmentation de l'intensité du champ électrique utilisé, pour mieux comprendre le phénomène d'EP de la peau.

#### *1.2.3.a. Mécanismes de la délivrance transdermique par impulsion de basse intensité – l'iontophorèse*

La théorie de la perméabilisation transdermique par champ électrique pulsé a été notamment formalisée par Weaver et coll. [96], à partir de résultats expérimentaux. Dans le cas où l'intensité du champ électrique ressentie au niveau de la peau est basse (LV, tension mesurée dans la peau  $U_{\text{skin}} < 5\text{V}$ ,  $< 0,5\text{mA/cm}^2$ ), c'est-à-dire des paramètres utilisés en iontophorèse, le transport de molécules a lieu au niveau constituants annexes de la peau (follicules, canaux sudoripares), et par des défauts aqueux préexistants [97, 98].

L'iontophorèse consiste en l'application de tensions continues faibles dont le but est de fournir une force électromotrice pour la délivrance du PA. Lors de l'application d'un champ électrique continu de faible intensité, les molécules chargées migrent sous influence de l'électrophorèse, alors que les molécules non chargées sont entraînées par le flux électroosmotique généré par le mouvement de cations dans le SC (par exemple  $\text{Na}^+$ ) [99]. Cependant, l'iontophorèse n'affecte pas significativement la fonction barrière de la peau, ce qui en fait notamment une technique non-invasive. De ce fait, la délivrance par iontophorèse se limite aux petites molécules.

#### *1.2.3.b. Mécanismes de la délivrance transdermique par impulsion de moyenne et haute intensité – l'électroporation*

Lorsque l'intensité ressentie est moyenne (MV,  $U_{\text{skin}} < 50\text{V}$ ), deux modes de transport parallèles sont observés : par les annexes cutanées et par de nouveaux défauts aqueux, des pores, générés dans la matrice extracellulaire et dans l'enveloppe des cornéocytes [91]. On

commence alors à parler d'électroporation de la peau. Enfin, dans le cas d'impulsions HV (haut voltage,  $U_{\text{skin}} > 50\text{V}$ ) seul le transport par des pores générés aléatoirement dans la peau, loin des annexes cutanées, est observé. Le transport de molécules pour ces impulsions n'est observé que par ces régions perméables nommées LTR pour Local Transport Region [97, 98], et peut être transcellulaire ou intercellulaire en fonction de la taille de la molécule [100] (Figure 1-10). C'est ce type de délivrance qui nous intéressera particulièrement.



*Figure 1-10 Représentation idéalisée de la génération défauts aqueux au sein du stratum corneum (modèles brique et ciment) par des impulsions ayant un fort voltage (HV). A gauche, état avant traitement, à droite représentation d'une zone à forte densité de chemins perméable au sein d'une région de transport locale (LTR) après l'application de plusieurs impulsions. Weaver et coll. [96].*

Une chute importante de la résistivité est observée au cœur de ces LTR, résultant d'un à un échauffement local par effet Joule. En effet, l'échauffement résultant du passage du courant électrique dans un défaut aqueux est suffisamment important avec des impulsions HV pour altérer irréversiblement, mais localement la structure des bicouches lipidiques ( $T > 70^\circ\text{C}$ , transition vers la phase cristal liquide) [101–103]. De l'eau peut alors s'intercaler dans ces lipides désorganisés, ce qui participe à freiner le retour à l'imperméabilité initiale de la peau en fonction du temps [89]. Un front de chaleur se propage radialement depuis le cœur de ce défaut pour dissiper l'énergie thermique ce qui lui permet de croître si l'énergie est encore suffisante pour continuer à déstabiliser les bicouches lipidiques environnantes. La zone perméable devient alors assez large pour faciliter le transport de molécules hydrophiles (LTR). La zone limite dissipant la chaleur, mais n'atteignant plus la transition de phase est appelée Local Dissipation Region (LDR). Le transport d'ions semble toutefois y être possible [97]. Une représentation idéalisée de ces zones est présentée Figure 1-11.

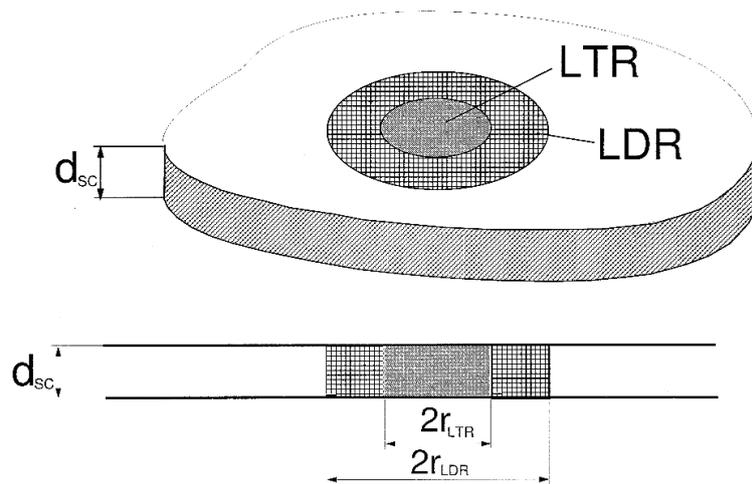


Figure 1-11 Représentation idéalisée de la couche cornée montrant la structure hypothétique d'une Région Locale de Transport (LTR) contenue dans une Région Locale de Dissipation (LDR). La LTR est représentée par un cylindre traversant toute l'épaisseur du SC ( $d_{sc}$  10-20 $\mu$ m). Le rayon de la LTR  $r_{LTR}$  (10 – 100 $\mu$ m) dépend fortement de la durée des impulsions d'EP. Extrait de Pliquett et coll. [97].

### 1.2.3.c. Paramètres affectant la délivrance par électroporation

La taille des LTR dépend du nombre et de la durée des impulsions (de la milliseconde à la centaine de millisecondes), alors que leur densité dépend elle du voltage appliqué (de la centaine de volts aux kilovolts) [104–107]. Le transport de PA dans ces LTR est assuré majoritairement par électrophorèse ou diffusion, en fonction des propriétés physicochimiques de la molécule à délivrer et notamment de sa charge [105, 108–110].

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	-

Tableau 1-1 Influences de différents paramètres sur le transport moléculaire lors de l'EP de la peau. Les + et les - représentent l'effet de l'augmentation d'un facteur sur la délivrance. D'après les travaux de Prémat et Vanbever cités par Denet et coll. [105].

Les impulsions électriques sont caractérisées par la forme du signal, la tension (50-1500V), leur durée ( $\mu$ s-ms), et l'intervalle de temps entre les impulsions (s/min) ou fréquence (Hz). Il

est possible de jouer sur ces différents paramètres dans le but d'optimiser la délivrance. La forme de l'impulsion est aussi importante. Deux formes d'impulsion sont couramment utilisées, en fonction de la technologie du générateur d'impulsions. Les impulsions en décroissance exponentielle et les impulsions en vague carrée. Cependant, les impulsions en vagues carrées sont recommandées pour conserver un meilleur contrôle et une meilleure reproductibilité de la délivrance [105]. Par ailleurs, il semblerait que l'utilisation de ce type d'impulsions n'induit qu'une dégradation mineure de la peau [111, 112]. Cependant, il faut tenir compte de l'énergie totale délivrée lorsque l'on fait varier ces paramètres pour optimiser la délivrance, dans le but de ne pas engendrer de dégradation majeure.

#### 1.2.3.d. Dispositifs expérimentaux

Une grande majorité des expériences de délivrance transdermique par électroporation *ex vivo* ont été réalisées grâce à des cellules de diffusion verticales où le champ est appliqué perpendiculairement au tissu [106, 110, 113–117]. Une solution donneuse contenant le PA se situe du côté du SC d'un explant de peau, et une solution réceptrice est placée du côté du derme. Le champ électrique est délivré via deux électrodes carrées plates souvent en acier inox, placées dans les solutions de part et d'autre de l'explant, permettant de générer un champ électrique uniforme. Des molécules de dextran allant jusqu'à 38kDa avaient pu être délivrées à travers des peaux abdominales de rats par cette méthode (10 impulsions, 150V, 150ms, 2Hz) par Lombry et coll. [100]. La transposition de cette méthode *in vivo* a recours à des plis de peau pour pouvoir appliquer le champ électrique perpendiculairement. La peau est pincée entre deux compartiments contenant les électrodes plates et le liquide donneur [118–121] (Figure 1-12a).

Le recours à des réseaux d'électrodes (multi-array electrodes) *in vivo* peut être trouvé dans la littérature [122]. Un patch contenant le PA déposé à la surface de la peau, enlevé pour laisser la place aux électrodes puis redéposé après traitement. Les impulsions sont appliquées entre toutes les paires d'électrodes, ce qui permet de faire varier la direction du champ électrique délivré dans la surface de la peau (Figure 1-12b). Cependant, la faible disponibilité du PA pendant le traitement limite la délivrance assurée par l'électrophorèse, ne laissant que la diffusion passive sur une peau perméabilisée.

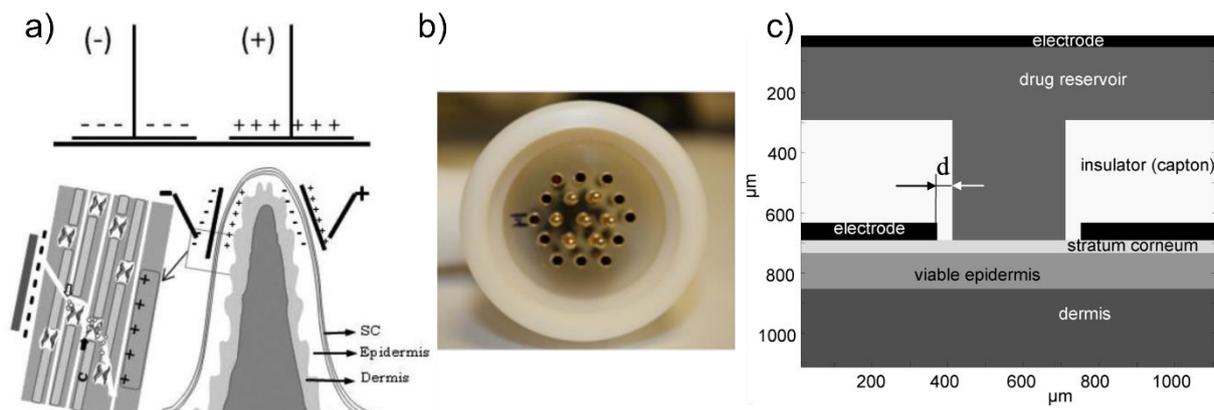


Figure 1-12 Différentes géométries d'électrodes utilisées dans la littérature pour la délivrance transdermique assistée par électroporation. a) Electroporation à travers un pli de peau, extrait d'Escobar-Chávez et coll. [121]. b) Réseau d'électrodes ou « multi-array électrodes » utilisé par Blagus et coll. [122]. c) Dispositif « electrode-reservoir device (ERD) » proposé par Pliquett et Weaver [123].

Une autre configuration avait été proposée par Pliquett et Weaver pour la délivrance d'une molécule hydrophile fluorescente d'environ 560Da : la sulforhodamine [123]. Les deux électrodes sont posées sur la peau sans pli, et donc ne se font pas face. Le réservoir est implémenté de sorte à délivrer le PA entre les électrodes (Figure 1-12c). Le but de cette disposition est de confiner le champ dans le SC pour limiter les sensations (contraction musculaire, douleur...) [124]. Un modèle très similaire été utilisé par Tokumoto et coll. pour la délivrance d'insuline *in vivo* chez le rat [125]. Une autre étude portant sur la délivrance d'insuline *in vivo* inspirée de cette géométrie a été publiée plus récemment : l'insuline a été incorporée dans un gel et déposée à la surface de la peau entre deux électrodes (fils parallèles, 100 V/cm, 60 impulsions, 2 ms, décroissance exponentielle) [126]. L'utilisation d'un gel permet de s'affranchir de la présence d'un réservoir de liquide, qui peut manquer de praticité pour une utilisation par le grand public.

*La délivrance transdermique de PA par électroporation est une technique prometteuse qui a fait ses preuves in vitro et in vivo. Elle permet de limiter le caractère invasif de la délivrance et engendre des modifications transitoires et localisées au niveau du SC, par rapport à d'autres méthodes évoquées précédemment. De très bons résultats ont été obtenus pour la délivrance de macromolécules ex vivo et in vivo, mais le dispositif utilisé pourrait être optimisé pour limiter les sensations désagréables et améliorer la facilité d'utilisation. L'utilisation de chambre contenant le PA en solution semble complexe à implémenter pour utilisation par le grand public. Pour pallier cet aspect pratique, l'inclusion du PA dans un gel peut être une solution.*

*L'idéal serait d'avoir un matériau deux-en-un qui serve à la fois d'électrode et de réservoir. Ainsi le PA serait disponible in situ pour être délivré par électrophorèse directement au niveau des zones perméabilisées.*

## **1.3. Les nanotubes de carbone pour le biomédicale**

### **1.3.1. Introduction aux nanotubes de carbone**

Le carbone est la brique de base de tous les édifices organiques présents sur notre planète. Il se trouve à l'état naturel sous plusieurs formes, une forme amorphe ou désorganisée, et deux formes cristallines : le graphite et le diamant. Ces deux formes cristallines diffèrent par l'organisation du carbone en leur sein.

Dans la structure du diamant, l'organisation est quasi parfaite : la compacité de la maille est à son maximum et chaque carbone est lié de manière covalente à 4 autres atomes, son hybridation est  $sp^3$ . Cette structure donne au diamant ses propriétés de dureté et de conductivité thermique exceptionnelles.

Le graphite, très bon conducteur électrique, a quant à lui est une structure anisotrope : il est constitué d'un empilement de feuillets de graphène. Dans le graphène, les atomes de carbone sont hybridés  $sp^2$ , c'est-à-dire qu'ils ne forment de liaisons covalentes qu'avec 3 autres atomes (présence d'insaturations). On obtient une structure planaire, d'épaisseur atomique. La cohésion entre les feuillets de graphène dans le graphite est quant à elle assurée par des interactions faibles de type de Van der Waals entre les électrons  $\pi$  des doubles liaisons C=C ( $\pi$ - $\pi$  stacking) qui permettent un glissement des feuillets les uns sur les autres, d'où les propriétés lubrifiantes associées à ce matériau [127].

D'autres formes allotropiques du carbone ont été mises en évidence. En 1985, la famille des fullerènes est mise en évidence par Kroto, Curl et Smalley [128]. Ces objets nanométriques, sont composés d'atomes de carbone se partageant entre des hexagones ( $sp^2$ ) et 12 pentagones permettant de refermer la structure. Quelques années plus tard, c'est un arrangement tubulaire de feuillets de graphène, le nanotube de carbone, qui est rapporté.

### 1.3.1.a. Définition

Les nanotubes de carbone ont été identifiés pour la première fois par Sumio Iijima, parmi les suies condensées à l'issue de la décomposition du carbone par arc électrique [129]. Cette forme du carbone avait déjà été observée dès 1952 par Radushkevich, mais sans disposer des moyens techniques assez avancés pour identifier clairement sa structure [130]. Les NTC sont constitués de feuillets de graphène enroulés suivant un axe, formant un tube creux, et refermé à ses extrémités par un dôme type demi-fullerène.

On distingue 3 types d'enroulement des feuillets définis par le vecteur d'hélicité  $Ch$  et l'angle d'hélicité  $\theta$  : chiral, chaise et zigzag [131]. Le vecteur est défini par la relation suivante :  $Ch=na_1+ma_2$ ,  $n$  et  $m$  étant deux entiers positifs, et  $a_1$ ,  $a_2$  les deux vecteurs unitaires définissant le plan de graphène (Figure 1-13). Cette organisation structurale exerce une influence directe sur les propriétés de conduction électrique des NTC, en modifiant le gap entre la bande de valence et de conduction. Ainsi dans le cas de NTC « armchair » ( $n = m$ ,  $\theta=30^\circ$ ), et « zig-zig » quand  $n$  est un multiple de 3 ( $n, m=0$ ,  $\theta=0^\circ$ ) le gap est nul les NTC ont un comportement métallique. Dans les autres cas, les NTC ont un comportement semi-conducteur [127]. Statistiquement, 2/3 des NTC monoparois sont donc semiconducteurs.

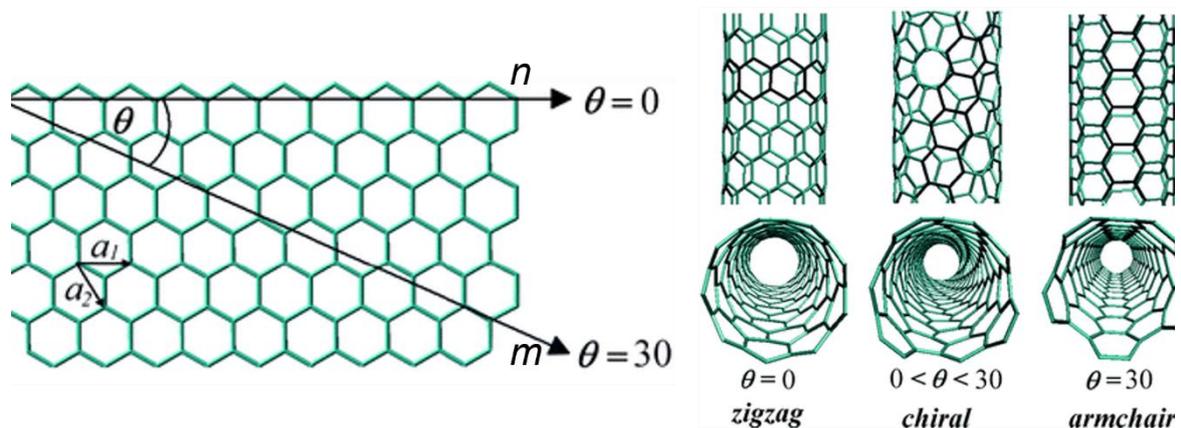


Figure 1-13 Représentation des 3 types d'enroulement du graphène que l'on peut trouver dans un NTC, avec leur angle d'hélicité respectif.

On distingue également un autre paramètre structural qui peut se décliner en plusieurs catégories : le nombre de parois. Si les NTC monofeuillet ou Single-Walled Carbon Nanotubes (SWCNT) se composent d'un seul enroulement de graphène, il existe également des NTC composés de plusieurs feuillets enroulés concentriquement. On les appelle NTC biparois (Double-Walled Carbon Nanotubes, DWCNT) lorsqu'ils sont constitués de deux feuillets, puis

multi-parois ou (Multi-Walled Carbon Nanotubes, MWCNT) (Figure 1-14). Le diamètre de ces objets varie en fonction du mode de synthèse et du nombre de parois. Des diamètres subnanométriques ont été observés pour des SWCNT, alors que le diamètre des MWCNT peut mesurer plusieurs dizaines de nanomètres. Leur longueur peut atteindre plusieurs centaines de micromètres, voire de millimètres dans certains cas [132].

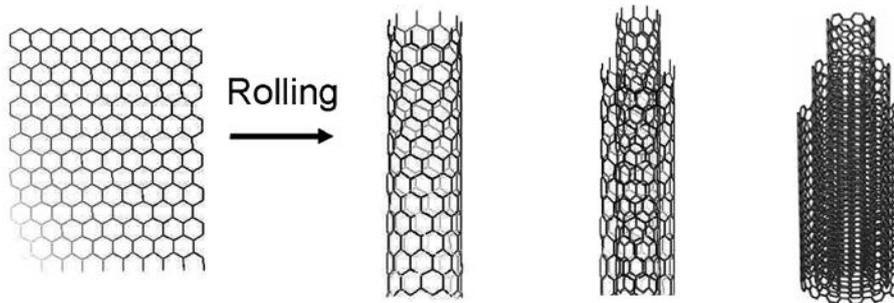


Figure 1-14 Représentation de NTC monoparois, biparois et multiparois.

### 1.3.1.b. Méthodes de synthèse

On peut diviser les méthodes de synthèses de NTC en deux grandes familles : les méthodes physiques dites « haute température » basées sur la sublimation du carbone à 3000-4000K et les méthodes chimiques dites « moyenne température » basées sur la décomposition catalytique d'un composé carboné en phase vapeur, le plus souvent entre 400 et 1100°C. Les synthèses hautes températures, ont été les premières utilisées : elles se basent sur la sublimation et condensation du carbone par des techniques comme l'arc électrique ou l'ablation laser [127]. Ces techniques permettent d'obtenir des NTC avec une grande qualité structurale et permettent la croissance de SWCNT si des catalyseurs sont utilisés [133]. Cependant, les températures employées très élevées qui rendent le procédé très énergivore, et la quantité non négligeable de sous-produits carbonés formés nécessitant des étapes de purification supplémentaires après synthèse rendent la production très coûteuse.

La seconde famille est basée sur un procédé de dépôt chimique assisté catalytiquement en phase vapeur (CCVD). Cette technique consiste à décomposer un gaz ou un liquide carboné entre 400 et 1100°C dans un four, sur des nanoparticules catalytiques. Ces nanoparticules sont généralement des métaux de transition tels que le fer, le nickel, le cobalt, ou des composés bimétalliques intégrant ces métaux de transition [127]. C'est cette méthode qui a été utilisée et développée dans l'équipe NNCD du CIRIMAT pour la synthèse de NTC biparois [134]. La synthèse CCVD est très utilisée de nos jours, car en plus de pouvoir être transposée à l'échelle

industrielle, elle offre un bon contrôle du nombre de parois mais aussi de l'organisation/orientation des NTC (croissance de tapis orientés perpendiculairement à la surface d'un substrat).

#### *1.3.1.c. Propriétés*

Les NTC sont connus pour avoir des propriétés physico-chimiques exceptionnelles. Sur le plan mécanique, ils allient une résistance à la déformation très élevée suivant leur axe, de l'ordre du TPa (soit 100 fois plus que l'acier pour 1/6 de sa masse) [135], à une très grande flexibilité (angle critique de  $110^\circ$ ) [136]. La surface spécifique de ces objets peut atteindre  $1000\text{m}^2/\text{g}$  dans le cas de DWCNT [134], un facteur de forme très élevé ( $>1000$ ) et une faible densité (proche de celle du graphite) [137].

Les NTC ont également d'excellentes propriétés de conduction électrique. Nous avons déjà mentionné que dans le cas des SWCNT, la proportion est de 2/3 de NTC semi-conducteurs pour 1/3 de NTC métalliques [138]. D'après Qi et coll. les SWCNT sont capables de transporter des densités de courant d'environ  $4 \cdot 10^9 \text{A}/\text{cm}^2$ , ce qui est 3 ordres de grandeur de plus que dans des métaux comme l'aluminium ou le cuivre [139]. Il n'est cependant pas possible de les fonctionnaliser sans dégrader les propriétés électriques. Dans le cas des MWCNT, chacun des feuillets est relativement indépendant du point de vue de ses propriétés électriques (métallique ou semi-conducteur). 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. Cependant, il a été montré par spectroscopie Raman que l'augmentation du nombre de parois provoque l'augmentation de la proportion de défauts [140], et donc une diminution de la conductivité électrique. Pour Ando et coll., un nanotube multiparois constitué de NTC concentriques ayant des chiralités différentes peut avoir une conductivité électrique jusqu'à  $1,85 \cdot 10^3 \text{S}/\text{cm}$ , et peut transporter des densités de courant supérieures à  $10^7 \text{A}/\text{cm}^2$  [141], et supérieur à  $10^9 \text{A}/\text{cm}^2$  (à  $300^\circ\text{C}$  pendant un temps très court) pour Wei et coll. [142].

Enfin, les DWCNT offrent la conformation géométrique idéale à la frontière des NTC mono et multiparois. Leur caractère métallique est très prononcé (75-80%), en particulier dans le cas de faisceaux (travaux équipe NNCED, non publiés). Les densités de courant peuvent atteindre par exemple  $9 \cdot 10^8 \text{A}/\text{cm}^2$ , même dans le cas de DWCNT oxydés dont la conductivité est pourtant dégradée [143, 144]. Ils conservent plusieurs caractéristiques des SWCNT tels

que le faible diamètre et les excellentes propriétés mécaniques. Cependant, la présence du nanotube extérieur permet comme pour les MWCNT de les fonctionnaliser sans dégrader la conductivité électrique des tubes internes. Les propriétés mécaniques des NTC alliés à leur faible densité en font de très bons candidats pour l'élaboration de matériaux de structure composites, qui soient à la fois très résistants et légers, pour l'aérospatial par exemple [145, 146]. Les NTC sont aussi très prometteurs pour des applications au stockage de l'énergie. Par exemple, la synthèse de tapis de NTC verticalement alignés (VACNT) sur support métallique est notamment très intéressante pour les applications en tant que supercondensateur [147, 148]. Enfin, ils sont de plus en plus utilisés à des fins biomédicales, c'est cette application que nous allons détailler maintenant.

### **1.3.2. Nanotubes de carbone pour le biomédical**

Les NTC au sens large, c'est-à-dire indépendamment du nombre de parois et de leur fonctionnalisation, trouvent de plus en plus d'applications dans le biomédical. Ces applications ont fait l'objet de plusieurs revues [5, 149]. Nous proposons d'en faire ici un exposé non exhaustif.

#### *1.3.2.a. NTC pour le diagnostic*

Différents types de biosenseurs ont été développés à base de NTC. Les NTC et notamment les DWCNT, ont été utilisés dans des dispositifs électrochimiques pour la détection de complexes immuns (salmonelle [150], adiponectine [151]). Leur grande conductivité électrique participe à l'amélioration de la vitesse et de la sensibilité de détection électrochimique [152–154], parfois jusqu'à la détection d'une molécule unique [155, 156]. Les NTC peuvent également être utilisés en tant que traceur pour l'imagerie. Les SWCNT ont des propriétés de fluorescence lorsqu'ils sont irradiés dans le proche infrarouge (NIR-II : 1100–1400nm). À ces longueurs d'onde, les tissus et l'eau sont presque transparents, ce qui permet d'obtenir une très bonne résolution. Cette méthode a notamment permis d'observer la biodistribution de SWCNT dans les tissus et surtout dans les vaisseaux sanguins chez la souris [157–160].

### 1.3.2.b. Ingénierie tissulaire

Plusieurs travaux convergent vers le fait que les NTC puissent être des supports adaptés à la prolifération et à la différenciation cellulaire, notamment de cellules neuronales, par rapport à d'autres supports comme le silicium [161–163]. Bédier et coll. ont montré que cette croissance préférentielle des neurones sur des DWCNT pouvait être un moyen de les guider [164]. D'autres travaux utilisent la capacité des structures 3D ou « échafaudages », pour favoriser la recolonisation cellulaire dans un milieu électriquement conducteur [165–167]. Certaines de ces structures sont stables *in vivo* mais d'autres sont destinées à se disperser avec la croissance du tissu, ce qui soulève des questions concernant leur devenir dans le corps. Celles-ci seront adressées plus tard.

### 1.3.2.c. Thérapies ciblées

La dernière application biomédicale des NTC que l'on peut citer concerne leur utilisation en thérapies ciblées. Certains NTC ont la capacité de rentrer dans les cellules par plusieurs mécanismes. Ils peuvent percer mécaniquement la membrane plasmique ou être incorporées dans les cellules par endocytose [168, 169]. Les propriétés photothermiques des NTC sont souvent mises à profit : lorsque les NTC sont exposés à un rayonnement ils peuvent absorber l'énergie et la restituer sous forme de chaleur. Cet échauffement a pour effet de déstabiliser la membrane plasmique et de faciliter l'internalisation des NTC par la cellule [170]. Ces différentes capacités en font d'excellents candidats pour véhiculer des PA à l'intérieur des cellules. Par exemple, Liu et coll. rapportent une stratégie utilisant des NTC conjugués avec des polyéthylènes glycol (PEG) permettant de transporter de la doxorubicine, combinée à un relargage pH-dépendant de ce PA. Cette méthode leur a permis de développer des traitements antitumoraux localisés, même dans le cas d'inoculation du véhicule NTC-PEG-DOX par intraveineuse. En effet, grâce au principe d'accumulation dans les tissus tumoraux, les NTC transportant le PA tendent à se concentrer au niveau de la tumeur, et le pH acide de ce milieu déclenche la délivrance du PA [171, 172]. D'autres travaux prometteurs portant sur la thérapie génique ont montré qu'il était possible d'utiliser des NTC pour vectoriser des siRNA ou des plasmides fonctionnels au sein des cellules [173–176].

Les propriétés photothermiques des NTC ont également été exploitées pour procéder à des ablations tumorales. Dans ces travaux les NTC sont injectés directement dans la tumeur ou

par intraveineuse, puis la tumeur est exposée à un laser, ce qui provoque l'échauffement de NTC et l'ablation des tissus [177, 178].

*Les NTC sont des nanoobjets très versatiles et beaucoup de travaux ont su tirer parti de leurs propriétés exceptionnelles pour développer des applications dans le diagnostic, l'ingénierie tissulaire ou la thérapie ciblée. La plupart des travaux cités dans cette partie ont évalué la cytotoxicité de leur NTC, mais la question de leur devenir dans le corps et de leur potentielle dégradation est rarement examinée. Cette question non résolue est identifiée comme étant le facteur majeur freinant la translation en clinique des recherches employant les NTC pour le biomédical.*

### **1.3.3. Toxicité des NTC**

La toxicité des NTC est un sujet complexe et encore ouvert. En effet, les NTC englobent une famille de nanoparticules ayant des propriétés et des comportements fortement dépendants de leur structure, nombre de parois, chiralité, diamètre, longueur et fonctionnalisation [179]. Cependant, il est possible de faire plusieurs observations à partir des différentes études qui essaient de répondre à cette question.

Les NTC sont susceptibles de pénétrer l'organisme à travers 3 voies principales : l'injection, l'ingestion et l'inhalation. Les interférences entre ces nanoparticules et les cellules ou organes existent et peuvent être la source du développement de pathologies de sévérités variables d'après les travaux de revue de Madani et coll. [180]. Cependant, cette équipe comme plusieurs autres insiste sur la nécessité de plus d'études de la toxicité de ces nanoparticules sur le long terme, pour prendre du recul sur cette question [181–183].

Il a été montré par le suivi de MWCNT marqués au  $^{14}\text{C}$  que ces objets sont capables après une injection locale de transfecter les cellules, d'atteindre la circulation sanguine, et ainsi se répandre dans l'organisme [184, 185]. À ce stade, les NTC peuvent sortir du corps par les urines ou bien s'accumuler dans les organes (foie, rate, poumons), indéfiniment si le système immunitaire peine à les éliminer [182]. En effet, Czarny et coll. ont démontré une biopersistance de ces MWCNT jusqu'à 12 mois, et ce sans diminution de leur nombre malgré une certaine redistribution [186].

Le devenir des NTC dans le corps est lié à plusieurs paramètres : fonctionnalisation, dispersion et longueur. Une bonne élimination des NTC est par exemple observée lorsqu'ils sont bien dispersés par fonctionnalisation avec des PEG [182]. La réduction de la longueur des NTC lors des étapes de fonctionnalisation participe également à leur bonne élimination [187], même si les effets cytotoxiques ne sont pas toujours décrits comme diminués [188]. Les CNT étant intrinsèquement hydrophobes, sans fonctionnalisation ou ajout de dispersant, ils tendent à s'agglomérer et à s'accumuler dans les organes. La formation de ces agglomérats est à éviter puisque leur présence déclenche une réponse immunitaire, qui n'est pas toujours capable de les éliminer [182, 189], ce qui génère une inflammation [190]. L'inflammation prolongée provoquée par une suractivité du système immunitaire, lorsqu'il n'y a pas mise en quarantaine de ces objets par fibrose, peut mener au développement de cancer [191]. D'après les travaux de Allen et coll. des hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP) connus pour leur toxicité [192], peuvent être trouvés dans les produits de dégradation de SWCNT carboxylés, alors que les SWCNT bruts seraient moins sensibles à ces dégradations [193]. Ils rapportent également que les produits de dégradations des NTC seraient moins inflammatoires que les NTC au niveau des poumons [194]. Les NTC « idéaux », facilement éliminables par l'organisme sans induire de toxicité ne sont donc pas si facile à identifier.

L'utilisation de différents NTC de morphologies et puretés différentes, sur des modèles biologiques différents (cellules cancéreuses ou primaires, *vitro* vs *vivo*, modèles animal différents), à des dosages différents et avec des dispersions, expositions et protocoles de détection différents, ne laisse aucun doute sur la raison pour laquelle la toxicité des NTC n'est pas élucidée. Les dosages d'exposition en conditions réelles sont difficiles à déterminer et les études sont donc parfois loin de la réalité. De plus, les concentrations surfaciques devraient être utilisées plutôt que les concentrations massiques, pour comparer les travaux entre eux de manière pertinente, indépendamment des NTC utilisés [195].

*En conclusion de ces observations, l'approche la plus sûre pour utiliser les NTC sans risques est de ne pas les mettre en libre contact avec le corps. La solution qui s'est imposée pour exploiter au mieux les propriétés mécaniques et électriques des NTC, tout en contournant les questions de toxicité, est de les utiliser dans des matériaux composites [196]. Les NTC piégés dans ces matrices ont ainsi des interactions limitées avec le corps, et les hydrogels biocompatibles sont particulièrement adaptés à cet objectif.*

## 1.4. Les hydrogels nanocomposites pour le biomédical

### 1.4.1. Introduction aux hydrogels nanocomposites

#### 1.4.1.a. Hydrogels

Les hydrogels sont une classe particulière de matériaux polymère dont le constituant majoritaire est l'eau retenue dans un réseau polymérique hydrophile et peu dense. Ils sont caractérisés par leur capacité à absorber de grande quantité d'eau, parfois jusqu'à 1000 fois leur masse (hydrogels super absorbants). La cohésion des chaînes polymères dans l'hydrogel peut être issue d'une réticulation chimique ou physique. Les hydrogels chimiques sont dits irréversibles, car leur réticulation repose sur la formation de liaisons covalentes à partir d'un ou plusieurs monomères et en présence d'un agent réticulant. Au contraire, les hydrogels physiques sont dits réversibles, car leur réticulation repose sur des interactions faibles comme des liaisons hydrogène, des liaisons ioniques ou des interactions hydrophobes, qu'il est facile de briser [197, 198].

L'eau à l'intérieur de ces matériaux peut être de plusieurs types. L'eau liée fait partie intégrante de la structure polymérique et ne peut être éliminée qu'à très haute température. L'eau interstitielle n'est pas chimiquement liée à la structure, mais piégée physiquement entre les chaînes. Enfin, le remplissage des espaces disponibles entre les chaînes de polymère, les pores, est assuré par l'eau libre, qui elle est facilement éliminable. Le gonflement d'un hydrogel peut être motivé par trois forces : les interactions entre l'eau et le polymère, les interactions électrostatiques entre des ions dans le polymère et dans les ions de la solution et l'osmose. Le remplissage infini d'un hydrogel, ou sa dissolution, est limité par la réticulation des chaînes polymères dans les hydrogels qui lui confère des propriétés viscoélastiques [199]. L'hydrogel est à l'équilibre de gonflement lorsque ces différentes forces s'équilibrent (Figure 1-15). La forte hydrophilie des hydrogels ainsi que leurs propriétés viscoélastiques en font généralement des matériaux biocompatibles.

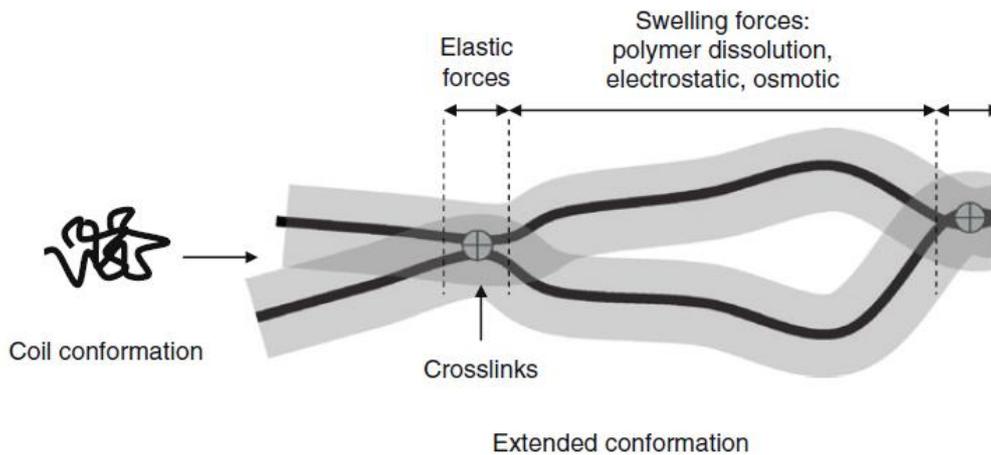


Figure 1-15 Les forces de gonflement dans un hydrogel sont opposées par des forces viscoélastiques liées à sa réticulation. Ottenbrite et coll. [196].

Il est possible de classifier les hydrogels selon plusieurs critères : leur source (naturelle ou synthétique, leur charge (présence d'ions ou non dans la structure), leur configuration (amorphe cristalline ou semi cristalline), leur réticulation ou encore leur composition. Un hydrogel est cependant défini de façon plus générale par trois paramètres : le pourcentage volumique de polymère sous forme hydratée, la longueur moyenne des chaînes entre les points de réticulation et la taille des pores. Ces paramètres ont une influence directe sur les propriétés de l'hydrogel, par exemple plus la distance inter-réticulaire sera petite, moins il pourra absorber d'eau [200].

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 de leurs propriétés mécaniques. On peut classer les hydrogels dans différentes catégories reflétant leurs réponses à l'application d'un stimulus externe. Ce stimulus peut être une variation de pH, changeant le degré d'oxydation d'une fonction libre sur le polymère, et de ce fait l'équilibre des forces électrostatiques dans l'hydrogel. Typiquement, les hydrogels anioniques, comme l'alginate (groupe libre : acide carboxylique) ou cationiques, comme le chitosan (groupe libre : fonction amine) sont sensibles au pH. Les hydrogels physiques peuvent être thermosensibles : le changement de température engendre une transition entre la phase liquide et la phase gel (sol-gel), comme le polyNIPAM (poly(N-isopropylacrylamide) ou l'agarose par exemple. Enfin, on peut citer les hydrogel électro-stimulables, dont les propriétés de gonflement peuvent être modifiées par l'application d'un champ électrique [201].

### 1.4.1.b. Matériaux nanocomposites - Théorie de la percolation

Un composite est un matériau comprenant au moins deux constituants de natures différentes, qui combine leurs propriétés. Il est dit « nanocomposite » lorsque l'un des constituants est de taille nanométrique, ici les NTC. Les interactions entre les constituants peuvent être faibles (Van der Waals, liaisons hydrogène ou électrostatiques), ou bien plus fortes comme des liaisons covalentes ou iono-covalentes.

Dans le but d'exploiter au maximum les propriétés notamment électriques des NTC dans un nanocomposite à base de polymère, il est nécessaire de les y introduire en quantité suffisante pour atteindre une valeur critique : le seuil de percolation. La percolation correspond à la formation d'un réseau secondaire de nanoparticules dispersées, en contact les unes avec les autres, lorsque leur fraction volumique est suffisante. Un exemple de cette vision est proposé Figure 1-16a [202]. Dans le cas de la conductivité électrique, la percolation des NTC permet de faciliter le transport des charges en offrant un réseau plus conducteur que celui de la matrice polymère (généralement isolante). Lorsque le seuil de percolation est atteint, on observe un changement de régime de conduction, du polymère au réseau percolant de NTC, s'accompagnant d'une augmentation importante de la conductivité. Un exemple de ce phénomène est présenté Figure 1-16b, d'après les travaux de Barrau et coll. sur des nanocomposites à base de résine époxy et de NTC [203], où la conductivité augmente d'environ 10 log lorsque la percolation est atteinte.

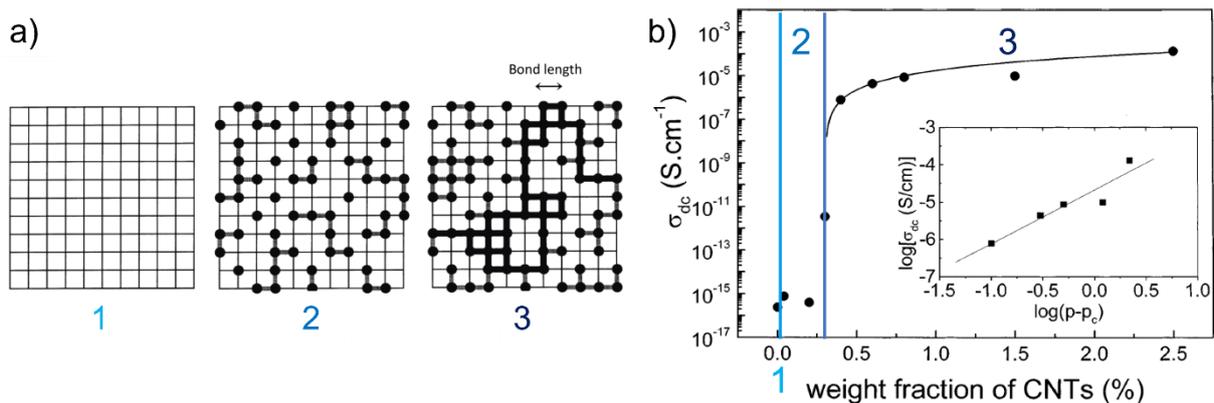


Figure 1-16 Théorie de la percolation électrique. a) Représentation de schématique de la percolation : 1 matrice polymère sans nanoparticules, 2 la fraction massique de nanoparticules réparties aléatoirement augmente, elles sont en contact par endroits, 3 le réseau de nanoparticules est percolant. b) Évolution de la conductivité électrique dans un nanocomposite à base d'époxy et de NTC. Les numéros correspondent aux schémas de gauche. Le seuil de percolation est défini par la frontière entre 2 et 3. Adapté de Ghanbarian et coll. [202] et Barrau et coll. [203].

Une bonne dispersion des nanoparticules est un élément clé pour abaisser le seuil de percolation. Les NTC, du fait de leur structure  $sp^2$  insaturée, sont très hydrophobes. Ils tendent à s'organiser en faisceaux. La cohésion de ces derniers étant assurée par des liaisons de Van der Waals dans le sens de la longueur des NTC. Ces liaisons sont donc d'autant plus fortes que les tubes sont longs. Leur dispersion est très instable en milieu aqueux et ils forment spontanément des agglomérats qui sédimentent rapidement. Dans le but de stabiliser la dispersion des NTC en milieux aqueux, nécessaire à la percolation dans des nanocomposites à base d'hydrogels, plusieurs stratégies sont envisageables [204, 205]. Il est possible de fonctionnaliser leur surface par liaisons covalentes avec des fonctions amines ( $NH_2$ ), hydroxyles (OH), ou encore des fonctions carboxyliques (COOH). Cependant, les fonctionnalisations peuvent avoir des effets négatifs sur la conductivité électrique des NTC [144]. La deuxième solution consiste en l'ajout d'un dispersant comme par exemple un tensioactif, ou encore des polymères amphiphiles pour modifier les propriétés de surface des NTC [206].

#### *1.4.1.c. Propriétés des hydrogels nanocomposites à base de NTC*

D'après plusieurs travaux de revue, il existe énormément de publications traitant de l'influence des NTC sur les propriétés électriques et mécaniques d'un polymère [207–209]. L'amélioration de la conductivité électrique peut être spectaculaire, souvent de plusieurs logs, en fonction du type de NTC, de leurs fonctionnalisation et dispersion. Il en va de même pour les propriétés mécaniques, la rigidité et le module élastique peuvent être augmentés de plusieurs dizaines voire centaines de pourcent, pour des fractions massiques de NTC souvent inférieures à 10%. Par exemple Du et coll. rapporte un hydrogel nanocomposite à base de PMMA (poly(méthacrylate de méthyle)) pour lequel l'ajout de 2%<sub>m</sub> de SWCNT permet d'augmenter la conductivité électrique de 7 log jusqu'à  $10^{-2}S/m$  et de doubler le module élastique [210]. La présence de 0,5mg/ml de CNT dans des GelMA (gelatin methacrylate) a permis de tripler les modules en traction et compression [211] et d'en améliorer leur conductivité électrique [212–214]. Finalement l'ajout de NTC peut exercer une influence positive sur la capacité de gonflement de l'hydrogel par une phase liquide, ce qui combiné à leurs nouvelles propriétés de conduction et de rigidité permet de diversifier leur application [215, 216].

### 1.4.2. Applications pour le biomédical

Les nanocomposites à base d'hydrogels et de NTC vont se retrouver dans les mêmes champs d'application que les NTC seuls. La matrice poreuse et biocompatible de l'hydrogel offre même des applications potentielles supplémentaires. Leur porosité et leur hydrophilie permettent d'y imprégner des PA pour leur délivrance, ou des applications en tant que biocapteurs [200]. Leurs propriétés mécaniques viscoélastiques sont aussi appropriées à l'ingénierie tissulaire [217]. Les hydrogels thermosensibles sont très intéressants pour l'injection et la gélification *in situ* de ces matériaux [218]. Enfin, comme nous l'avons déjà évoqué, certains hydrogels sont capables de répondre à des stimuli extérieurs autres que la température, comme les variations de pH [219], l'exposition à la lumière ou à des champs électriques, permettant parfois un contrôle à distance de la délivrance d'un PA.

Les polymères biosourcés sont souvent plébiscités pour la synthèse d'hydrogels nanocomposite pour le biomédical, car ils répondent majoritairement au critère de biocompatibilité (non toxique et faible inflammation). Beaucoup de polymères synthétiques sont également utilisés en fonction de l'application visée [198, 200, 220, 221]. De plus, ils sont souvent combinés. Une liste non exhaustive de ces polymères peut être trouvée Tableau 1-2.

Bio-sourced polymers	Synthetic monomers
Agarose	Acrylamide (AM)
Alginate	Acrylic acid (AA)
Chitosan	Ethylene glycol (EG)
Collagen	Hydroxyethyl methacrylate (HEMA)
Dextran	Lactic acid (LA)
Fibrin	Methyl methacrylate (MMA)
Hyaluronic acid	Vinyl alcohol (VA)
Pectin	

*Tableau 1-2 Polymères biosourcés et synthétiques utilisés pour la synthèse d'hydrogels ou de nanocomposites pour le biomédical. Simon et coll. [5].*

#### 1.4.2.a. Hydrogels nanocomposites à base de NTC pour le diagnostic

La plupart des biocapteurs élaborés à partir d'hydrogels nanocomposites contenant des NTC se concentrent sur la détection du glucose, car elle est bien documentée. Comme pour les NTC seuls, ces biocapteurs électrochimiques tirent parti de la conductivité électrique des NTC pour améliorer la détection [222, 223], mais certains travaux utilisent également la matrice hydrogel pour capter les espèces réactives [224]. D'autres méthodes de détection ont

pu être développées avec ces matrices. Par exemple, Barone et coll. ont élaboré une détection optique du glucose basée sur les propriétés photoluminescentes des NTC. La réaction du glucose et de son oxydase provoque une réticulation du réseau polymérique contenant les NTC, qui a pour effet de leur appliquer une pression. Cette pression déforme la maille d'atomes de carbone dans NTC et modifie la longueur d'onde d'émission de photons lorsqu'ils sont irradiés [225]. La détection de mouvement du corps par le comportement piézorésistif d'un hydrogel sec (aérogel) a aussi été rapportée par Hosseini et coll., et plus récemment par Han et coll. avec des hydrogels d'agarose [226, 227].

#### 1.4.2.b. Ingénierie tissulaire

La biocompatibilité, l'hydrophilie des hydrogels en font de très bons supports pour la croissance cellulaire. L'intégration de NTC dans ces structures et les améliorations des propriétés mécaniques et électriques qui s'y accompagnent permettent de se rapprocher des propriétés des tissus biologiques. Ainsi ces supports 3D ont été utilisés pour la régénération tissulaire de cellules cardiaques (cardiomyocytes) [212–214, 228–230] où le passage de stimulations électriques est primordial pour leur fonctionnement et différenciation. Les hydrogels physiques thermosensibles offrent aussi une mise en forme intéressante pour fabriquer des supports 3D sur mesure. L'injection d'une forme liquide de l'hydrogel sur une zone lésée, puis sa gélification à la température physiologique permet de proposer un support à la recolonisation par les cellules environnantes, alternative à la greffe beaucoup plus invasive, comme pour les os par exemple [231, 232]. Le gel peut s'adapter parfaitement à la forme de la zone endommagée et promouvoir la recolonisation par des ostéoblastes et donc la réparation de l'os. Cette méthode est aussi une candidate pour aider la reconnexion des axones par recolonisation de cellules nerveuses après des lésions de la moelle épinière [233]. Dans ces travaux et plus généralement dans le cas de formulations implantables, la question du devenir des hydrogels nanocomposites reste primordiale à étudier. En effet, pour jouer leur rôle de barrière entre les NTC et les tissus, ils ne doivent pas se dégrader dans le temps.

Enfin, ces hydrogels sont utilisés comme support pour le développement de modèles 3D *in vitro*, intermédiaire entre les études sur des cellules en 2D et des études *in vivo*, ce qui facilite la translation des traitements d'un modèle à l'autre. Par exemple des sphéroïdes, utilisés comme modèle de tumeur 3D *in vitro* ont pu être obtenus grâce à ces hydrogels [234]. Il existe également des solutions d'impression 3D commercialisées utilisant comme encre des

hydrogels à base de NTC, pour fournir une matrice extracellulaire conductrice sur mesure, adaptée par exemple à la différenciation des neuroblastomes [235].

#### *1.4.2.c. Traitements ciblés*

La capacité des hydrogels nanocomposites à stocker une solution aqueuse, combinée à leur capacité à répondre à des stimulations extérieures en font des outils pour la délivrance contrôlée de PA. Le gonflement des hydrogels par une phase liquide dépendant fortement des interactions électrostatiques entre la matrice et les ions présents, la modification de ces interactions par l'application d'un champ électrique ou un changement de pH peut déclencher une rétraction ou au contraire un relargage de la phase liquide. Le développement d'hydrogels stimulables électriquement a fait l'objet de beaucoup d'études à la fois pour des systèmes implantables de délivrance [236–242], mais aussi de délivrance transdermique [243–246]. Deux des inconvénients majeurs des patches de délivrance transdermique actuellement utilisés sont le relargage lent du PA et la faible perméabilité de la peau [247]. L'utilisation de ces matériaux électro-stimulables pourrait apporter une solution efficace à ces deux limitations, surtout lorsque combinée à la technique d'électroporation de la peau, c'est ce qui a été tenté dans nos travaux antérieurs [2, 3].

*Comme le synthétise la Figure 1-17, l'inclusion des NTC dans des matrices hydrogels ne limitent pas leurs applications pour le biomédical, bien au contraire. L'ajout d'une matrice poreuse hydrophile et biocompatible ouvre le champ d'application notamment dans le domaine de l'ingénierie tissulaire et la délivrance de PA. Leur utilisation combinée avec des champs électrique peut permettre de moduler la délivrance d'un PA. Cependant, pour respecter une approche « safer by design », ils ne doivent pas se dissoudre ou se dégrader lors de leur utilisation, pour limiter les interactions entre les NTC et l'environnement biologique.*

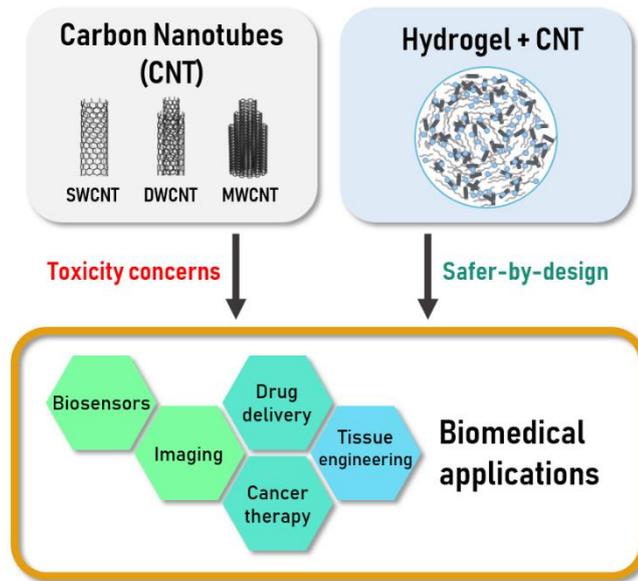


Figure 1-17 Les nanotubes de carbone (NTC) sont des nanoparticules pertinentes pour diverses applications biomédicales, mais leur utilisation soulève des questions de toxicité encore ouvertes. Leur inclusion dans des matériaux nanocomposites à base d'hydrogels permet de contourner cette problématique. Simon et coll. [5].

### 1.4.3. Focus sur les hydrogels d'agarose

Comme nous l'avons vu, différents polymères biosourcés ou non, sont utilisés pour la préparation d'hydrogels nanocomposites. C'est l'agarose qui avait été choisi dans les travaux antérieurs du CIRIMAT et de l'IPBS.

L'agarose est un polymère non ramifié biosourcé et abondant, car issu de la purification de l'agar-agar, un polysaccharide extrait de la paroi cellulaire de certaines algues rouges. Il est constitué de D-galactose et de 3,6-anhydro-L-galactose (Figure 1-18).

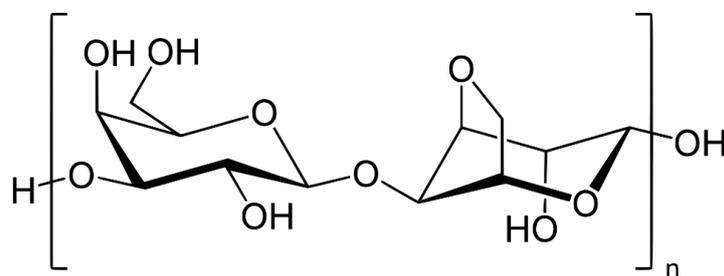
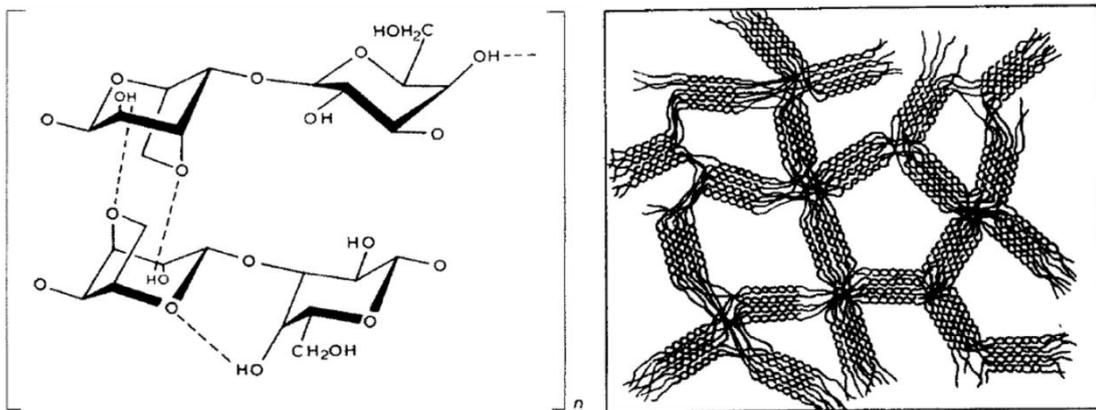


Figure 1-18 Structure chimique de l'agarose. Le monomère est composé D-Galactose et le L-Anhydro Galactose.

L'agarose est utilisé dans l'agroalimentaire comme épaississant, gélifiant ou stabilisant, ou dans l'industrie pharmaceutique comme excipient ou agent de libération. En biologie, il est utilisé comme support pour l'électrophorèse de l'ADN, ou pour la croissance de

microorganisme [248, 249]. Ce polymère est donc bien connu de la littérature tant sur son principe de gélification que ses propriétés [250].

L'agarose forme un gel physique. Sa transition sol-gel à lieu en dessous de 40°C après avoir été dissout dans de l'eau à 90°C. À cette température les chaînes d'agarose sont hydratées et dissociées. Lors du refroidissement, entre 60 et 40°C environ, les chaînes s'organisent en double hélice et forment des liaisons hydrogène intra et intermoléculaires [251]. Des molécules d'eau sont aussi impliquées dans ces liaisons hydrogène, ce qui participe également à la rigidité de la structure. Arnott et coll. suggèrent la présence d'une cavité au sein des doubles hélices qui pourrait accueillir une molécule d'eau liée [252]. Les doubles hélices s'arrangent ensuite en faisceaux dont la cohésion est assurée par l'interconnexions des brins ou de nouvelles liaisons hydrogène (Figure 1-19). La gélification de l'agarose est réversible : une fois pris s'il est chauffé 90°C, un hydrogel retournera à l'état liquide. Il n'y a donc pas besoin de réticulant pour préparer un hydrogel d'agarose. De plus sa mise en forme peut être facilement modulée, il suffit d'avoir un moule adapté. L'agarose est donc extrêmement simple à utiliser



*Figure 1-19 Modèle de gélification de l'agarose. À gauche, modèle de liaisons intra et intermoléculaire proposé par Tako et Nakamura [248]. À droite, organisation des doubles hélices formant le réseau polymérique poreux de l'agarose. Arnott et coll. [249].*

L'agarose peut contenir des traces de sulfonates issus de sa purification (à partir de l'agar-agar), mais il est globalement neutre et présente peu de réactivité, mis à part sa capacité à former ses liaisons hydrogène grâce à ces fonctions hydroxyles. Il est également assez résistant aux variations de pH.

*L'agarose permet de réaliser des hydrogels de manière très simple. Il est stable, peu réactif et ses propriétés sont assez bien documentées. Il est donc tout à fait adapté pour l'élaboration d'une preuve de concept et c'est pourquoi il avait été choisi dans les travaux antérieurs.*

## 1.5. Présentation du projet

Comme nous l'avons exposé au travers de ce chapitre, la délivrance transdermique représente une voie de délivrance efficace. Cependant, il existe différents problèmes liés à l'utilisation d'aiguilles, l'injection étant la méthode majoritaire actuellement. Dans le but de développer des méthodes de délivrance transdermique non invasives, plusieurs stratégies ont été développées pour permettre à des molécules hydrophiles de haut poids moléculaire de traverser la barrière cutanée et notamment le SC. Parmi ces méthodes, l'électroporation a permis d'obtenir des résultats très prometteur *in vitro* et *in vivo*. Cependant, les dispositifs utilisés ne semblent pas complètement faciles d'utilisation. De plus, ils ne permettent pas de tirer pleinement parti des forces électrophorétiques lors de la délivrance, tout en limitant les sensations désagréables pour l'utilisateur.

Les NTC ont des propriétés électriques et mécaniques exceptionnelles et sont notamment exploités dans le domaine du biomédical. Cependant, des questions ouvertes concernant leurs toxicité poussent la communauté scientifique à adopter une approche plus sûre, en les confinant dans un hydrogel. Les utilisations de ces matériaux nanocomposites rapportées dans la littérature notamment pour la délivrance de PA nous ont inspiré pour l'élaboration de ce projet de recherche.

La stratégie qui est adoptée dans ces travaux pour développer une méthode efficace de délivrance transdermique la moins invasive possible repose sur l'élaboration d'un matériau nanocomposite hydrogel/NTC. Ce nanocomposite **servira à la fois d'électrode pour l'électroporation et de réservoir** pour la délivrance simultanée du PA (Figure 1-20).

L'élaboration de ce matériau, qui a été le sujet de travaux antérieurs, a permis d'obtenir des plateformes nanocomposites de délivrance, composées d'une matrice d'agarose dans laquelle sont piégés des nanotubes de carbone biparois. De premiers essais *ex vivo* ont également permis de valider la pertinence de cette approche.

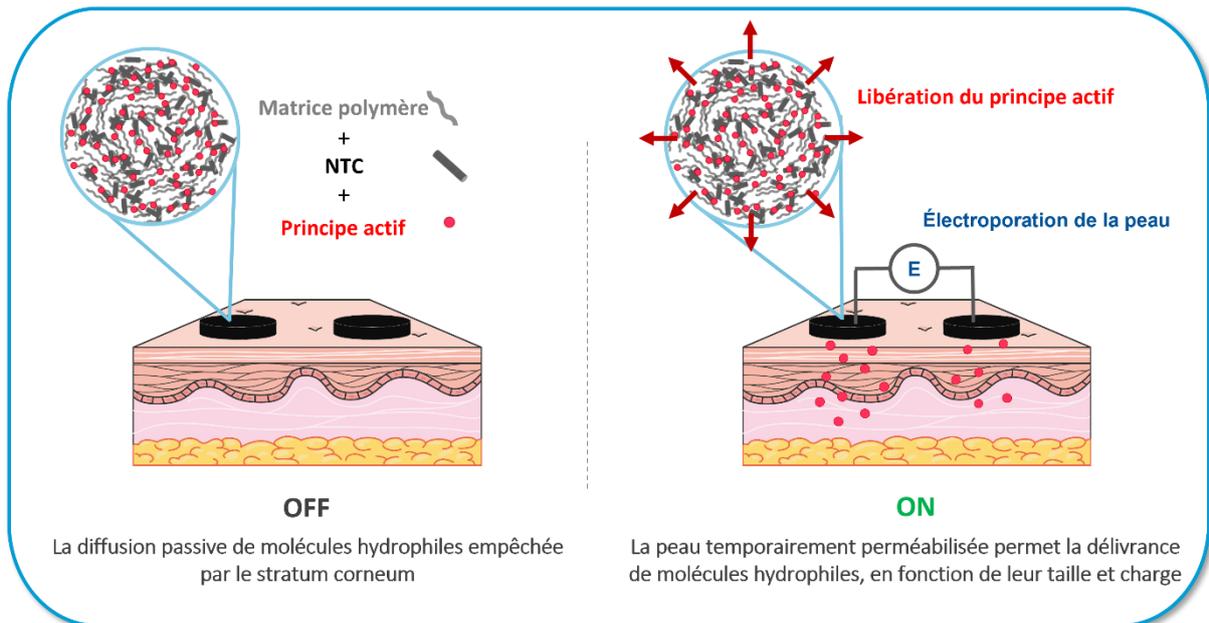


Figure 1-20 Nanotubes de carbone pour la délivrance transdermique électrostimulée de molécules thérapeutiques.

Nos travaux se sont concentrés sur l'amélioration de la dispersion des NTC dans les nanocomposites ainsi que sur la caractérisation de ces derniers. Le matériau idéal que nous cherchons à élaborer doit rassembler plusieurs propriétés :

- Une bonne capacité de stockage pour pouvoir délivrer des quantités suffisantes de PA ;
- Une vitesse de restitution relativement rapide pour être disponible pendant la délivrance par EP et ne pas être le facteur limitant de la délivrance dans la peau ;
- Une résistance mécanique cohérente avec une utilisation en patch cutané ;
- Une bonne conductivité électrique pour faciliter le passage du courant lors de l'EP.

La caractérisation de ces différentes propriétés nous permettra de déterminer les axes d'amélioration pour tendre vers le matériau idéal.

Ces travaux se concentrent également sur l'utilisation *ex vivo* de ces nanocomposite pour la délivrance transdermique par électroporation. Nous validons la preuve de concept et proposons quelques hypothèses sur la base desquelles nous déterminons quels sont les paramètres qui nous permettraient d'optimiser la délivrance transdermique de macromolécules hydrophiles par EP.



# **Chapitre 2**

## **Matériels et méthodes**



## 2.1. Préparation des plateformes de délivrance nanocomposites

Le protocole de préparation des plateformes nanocomposites utilisées dans ces travaux est issu des travaux de thèse de Jean-François Guillet [2, 3]. Il a été adapté afin d'apporter des améliorations.

### 2.1.1. Préparation des hydrogels nanocomposites

#### 2.1.1.a. Synthèse et extraction des nanotubes de carbone double-parois

La première étape de préparation des plateformes nanocomposites consiste en la synthèse de nanotubes de carbone double-parois. Ces NTC sont synthétisés par « catalytic chemical vapour deposition » ou CCVD, à partir d'un catalyseur  $Mg_{0.99}(CO_{3/4}Mo_{1/4})_{0.01}O$  [134]. Le catalyseur est obtenu par combustion puis calcination d'une solution à base d'acide citrique, d'heptamolybdate d'ammonium, de nitrate de cobalt et de nitrate de magnésium. Pendant la synthèse, un flux gazeux de méthane et dihydrogène est décomposé à haute température (1000°C) sur les nanoparticules catalytiques bimétalliques (Co ; Mo) générées *in situ* à la surface d'oxyde de magnésium, et servant de germes pour la croissance de nanotubes en carbone hybridé  $sp^2$ . La poudre composite obtenue contient environ 10% de carbone qu'il faut extraire. Cette extraction se fait facilement grâce à l'ajout d'un excès d'acide chlorhydrique qu'on laisse agir pendant une nuit. Les particules catalytiques et le support (MgO) sont dissouts par l'acide et restent dans la phase aqueuse sous forme ionique alors que les NTC ne sont pas affectés. Après neutralisation par lavages à l'eau DI et filtration sur une membrane de nitrate de cellulose, les NTC sont et conservés sous forme dite « humide », car l'eau encore présente représente environ 95% de la masse. Les NTC utilisés dans ces travaux sont tous issus du même lot.

#### 2.1.1.b. Préparation des hydrogels nanocomposites

Les hydrogels nanocomposites sont composés d'une matrice d'agarose à 25g/l dans laquelle sont piégés des NTC double-parois à une concentration de 0,25g/l, ce qui représente 1% de la masse d'agarose. Au besoin, une masse de CMC ([9004-32-4], Ultra Low viscosity carboxymethylcellulose sodium salt, Fluka) équivalente à celle des NTC est introduite. La CMC est un polysaccharide pouvant s'adsorber de manière non covalente sur les NTC et leur procure une stabilisation électrostatique grâce aux fonctions carboxylates qu'il porte, au pH de l'eau DI (~5-6). Les hydrogels sont synthétisés en solubilisant de l'agarose ([9012-36-6],

BioReagent, for molecular biology, low EEO, Sigma) dans l'eau DI sous agitation magnétique (Figure 2-1). Une température de 80°C est atteinte dans le ballon en le plongeant dans un bain d'huile silicone (huile silicone 47 V 350 RHODORSIL, VWR, France) chauffé à 100°C. Dans un second ballon, les NTC sont dispersés dans de l'eau DI - avec ou sans CMC - grâce à un traitement de 15 min effectives de sonde à ultrasons (1s ON, 1s OFF, 15min, durée totale 30min, amplitude 30%, diamètre sonde : 12mm, Sonics, Fischer Scientific). L'agarose solubilisé est versé dans le ballon contenant la suspension de NTC, préchauffé dans le bain d'huile, puis une seconde étape de dispersion est appliquée en utilisant un ultra-turrax (IKA, Allemagne), 20 min à 8000 rpm, sous agitation. Il est important d'attendre un moment sans agitation pour éliminer les bulles du mélange avant de couler les hydrogels. Les hydrogels sont coulés dans des moules cylindriques en silicone. Plusieurs dimensions ont été utilisées dans ces travaux, mais le ratio diamètre/épaisseur a été conservé. La majorité des caractérisations des matériaux ainsi que des expérimentations *ex vivo* ont été faites avec des échantillons de nanocomposite coulés dans un moule de 10mm de diamètre et 2mm d'épaisseur. Des échantillons coulés dans des moules de 25mm X 5mm ont été utilisés pour les cinétiques de relargage en cellule de diffusion verticale.

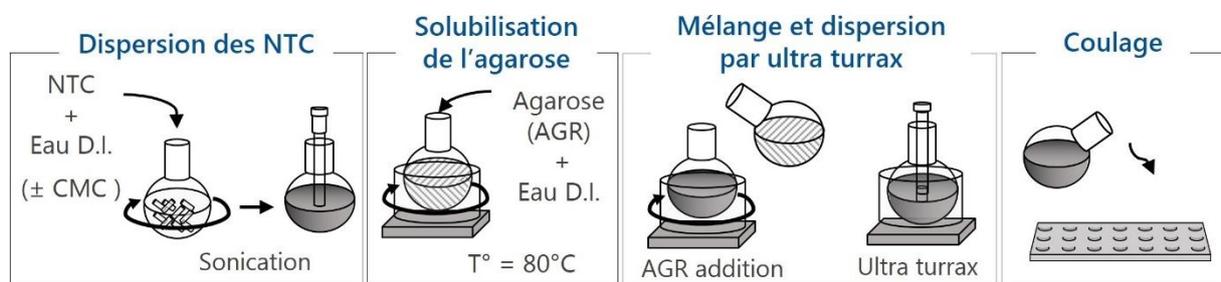
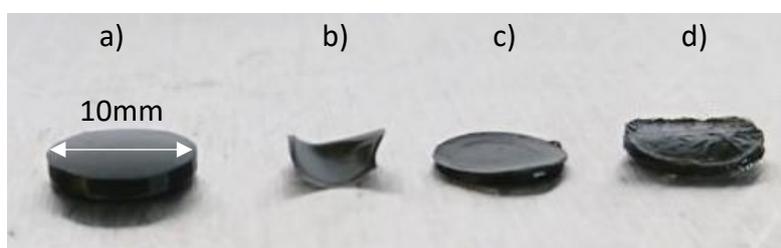


Figure 2-1 Schéma du protocole de synthèse des plateformes nanocomposites.

### 2.1.2. Séchage et regonflement

Le séchage s'est avéré être une étape déterminante dans la préparation des plateformes. Les travaux précédents avaient comparé le séchage à l'air avec la lyophilisation et un séchage par la méthode du CO<sub>2</sub> supercritique, et avaient montré que le séchage à l'air offrait le meilleur regonflement. Ici, nous avons cherché à améliorer ce séchage pour permettre aux échantillons regonflés de garder une homogénéité de forme et une taille suffisante pour l'application *ex vivo*. Comme dans les travaux antérieurs, les échantillons séchés sous air (SSA) sont disposés sur une plaque en inox et laissés une nuit dans un four réglé à 30°C. Dans nos travaux, les

échantillons ont aussi été séchés sous charge (SSC), en les disposant sur la même plaque, mais recouverts d'une seconde plaque inox. La charge appliquée par cette seconde plaque est d'environ 0,7g par échantillon. Les échantillons mettent plus de temps à sécher dans cette configuration (48h dans le four à 30°C). Une autre méthode a été d'utiliser des échantillons congelés puis séchés sous air (CSA). Dans ce cas, ils sont placés bruts de coulée (BC) dans un congélateur à -20°C pendant une nuit puis décongelés à température ambiante et disposés sur une plaque inox pour être séchés une nuit à 30°C. Les échantillons sont ensuite plongés dans le solvant de regonflement un minimum de 48h à 4°C. Les différences d'aspect des échantillons sont illustrées par la photo présentée par la Figure 2-2.



*Figure 2-2 Photographie de plateformes nanocomposites AGR+NTC+CMC à différents stades : a) Plateforme juste après la synthèse ou brute de coulée BC. b) Plateforme séchée par séchage sous charge SSC. L'aspect des plateformes nanocomposites séchées à l'air SSA, sous charge SSC ou congelées avant d'être séchées à l'air CSA, est très similaire, seules les dimensions varient. c) Plateforme regonflée 48h dans de l'eau DI. Les plateformes SSA et SSC ont le même aspect une fois regonflées, seules les dimensions varient. d) Plateforme CSA regonflée 48h dans de l'eau DI.*

L'étape de regonflement permet aux plateformes d'incorporer un principe actif. Ici, différents marqueurs fluorescents ont été utilisés pour mimer différents types de principes actifs, ils seront présentés dans la partie 2.3.4. Différents milieux de regonflement ont été utilisés : premièrement de l'eau DI; un tampon d'électroporation (TE) préparé au laboratoire, constitué de 8,1mM de  $K_2HPO_4$ , 1,9mM de  $KH_2PO_4$ , 1mM de  $MgCl_2$  et de 250mM saccharose (298mOsmol/l; pH : 7,4;  $\sigma = 1,54mS$ ) ; ou un tampon phosphate salin (PBS) commercial, sans ions calcium ni magnésium (Eurobio, Les Ulis, France) (pH : 7,4;  $\sigma = 15,14mS$ ).

## 2.2. Techniques de caractérisation des hydrogels nanocomposites

### 2.2.1. Analyses des suspensions de NTC

#### 2.2.1.a. Mesures de turbidité des suspensions

La stabilité des suspensions de NTC dans l'eau DI avec des sans CMC a été étudiée à l'aide d'un turbiscan (Formulation, Toulouse, France). Ces mesures consistent en la détection d'un signal lumineux transmis à travers une fiole en verre contenant la suspension à étudier, en fonction du temps et de la hauteur dans la fiole (Figure 2-3). Ce signal transmis s'en trouve réduit s'il rencontre des particules sur son chemin. Dans le cas d'une suspension stable, le signal n'évolue que très peu au cours du temps et sur la hauteur de la fiole. Dans le cas où la suspension se déstabilise au cours de temps, par floculation ou décantation par exemple, le signal transmis en haut de la fiole augmente.

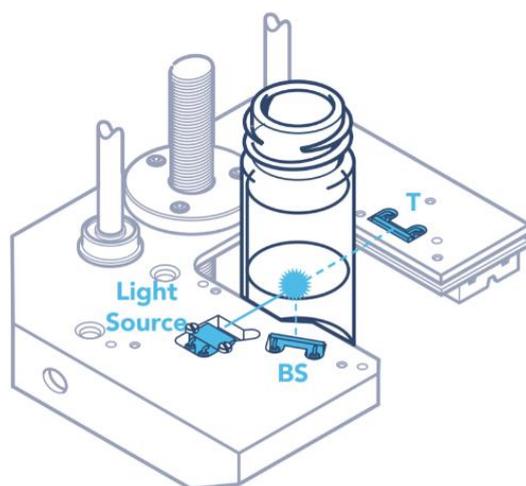


Figure 2-3 Schéma du dispositif de mesure de turbidité. T = détection du signal transmis, BS = signal rétrodiffusé. D'après [formulation.com](http://formulation.com).

#### 2.2.1.b. Observations des NTC par microscopie électronique en transmission

Un microscope électronique en transmission JEOL 1400 a été utilisé avec une tension d'accélération des électrons de 120kV. Une goutte de suspension de NTC a été diluée dans quelques ml d'éthanol, puis quelques gouttes de cette nouvelle suspension ont été déposées sur une grille-porte-échantillon en cuivre recouverte d'un film polymère à trous renforcé par un dépôt de carbone. Une suspension de NTC et une suspension de NTC + CMC de concentrations massiques égales ont été observées.

## 2.2.2. Caractérisations de la microstructure des nanocomposites

### 2.2.2.a. Observations par Cryo-MEB

La méthode d'observation de microscopie électronique à balayage (MEB) est une méthode classique d'observation des microstructures. Un faisceau d'électrons accélérés par une électrode, atteignant des tensions comprises entre 0,1kV et 30KV, vient balayer la surface de l'échantillon générant diverses interactions entre la matière et les électrons. La détection des électrons dits secondaires ou rétrodiffusés issus de ces interactions permet d'obtenir des images avec un contraste, une profondeur de champ et une résolution pouvant atteindre le nanomètre. Dans ces travaux, nous avons utilisé une déclinaison de cette méthode d'imagerie, l'observation cryo-MEB, utilisant une chambre d'observation basse température, ce qui nous a permis de faire des images de la structure de nos composites figés à l'état hydraté et congelé. Peu de méthodes sont adaptées à l'observation d'échantillons humides à température ambiante, car elles font appel à un vide poussé, ce qui est incompatible avec la présence d'eau liquide.

La structure des échantillons hydratés, bruts de coulée ou regonflés dans l'eau DI a été figée par cryofixation haute pression (ICE, Leica) dans des cupules de 1mm de diamètre, permettant de geler rapidement l'eau contenue dans la structure, évitant ainsi la formation de glace cristallisée pouvant déformer l'échantillon. Les échantillons ont été conservés et transportés dans l'azote liquide. Une fois dans le module de cryopréparation à -140°C (Qurom PP3000T) du MEB (Quanta 250 FEG, FEI), une fracture liée à l'ouverture des cupules ou par l'action mécanique d'une lame, a mis à nu une zone interne de l'échantillon. L'échantillon a ensuite été sublimé à -95°C pendant 30min pour éliminer la glace en surface, puis métallisé au platine sur quelques nanomètres. Ainsi préparé, il a été introduit dans la chambre d'observation du MEB à -140°C pour être observé. Les observations ont été réalisées sur les surfaces mises à jour par la fracture, qui constitue un endroit représentatif du cœur de l'échantillon (Figure 2-4). Il est très difficile d'orienter l'échantillon dans les cupules. Les morceaux introduits dans les cupules ont été prélevés dans le cœur des nanocomposites, pour éviter d'observer des structures liées d'un effet de bord. Un échantillon de chaque composition ayant subi un séchage sous charge a été observé. L'influence des trois types de séchage a aussi été observée grâce à des échantillons de composition CNT+CMC, comparés à un échantillon frais.

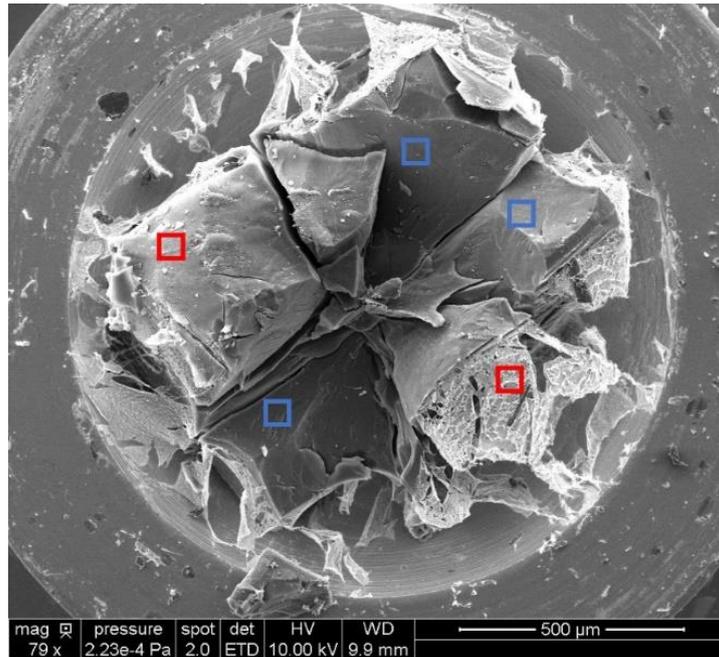


Figure 2-4 Cliché d'un échantillon AGR+NTC+CMC /SSC fracturé dans sa cupule, obtenu par Cryo-MEB. Les carrés bleus représentent les zones d'intérêt et les carrés rouges les zones que l'on a évitées.

### 2.2.2.b. Mesures de porosité par la méthode d'Archimède

La porosité des plateformes nanocomposites a été mesurée en utilisant la méthode de la triple pesée, reposant sur le principe d'Archimède et la balance schématisée sur la Figure 2-5.

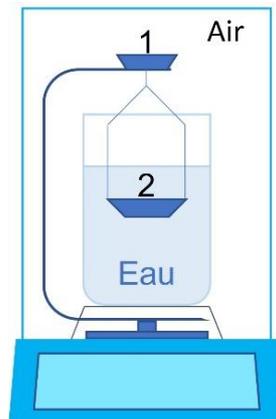


Figure 2-5 Schéma de la balance utilisée pour déterminer de la densité des échantillons. Les échantillons sont pesés secs puis regonflés sur le plateau 1 pour déterminer  $m_s$  et  $m_{air}$ , puis immergés dans l'eau DI sur le plateau 2 pour déterminer  $m_i$ . Le bécquer contenant l'eau DI ne repose pas sur le plateau de pesée.

D'après le principe d'Archimède il est possible de déterminer le volume total d'un échantillon en mesurant sa masse dans l'air  $m_{air}$  (Figure 2-5, 1) puis sa masse  $m_i$  lorsqu'il est immergé dans un liquide, de l'eau DI ici (Figure 2-5, 2). En effet, la masse de liquide déplacé

par l'échantillon lors de son immersion est égale à  $m_{air} - m_i$ , il est donc possible de calculer le volume total  $V_T$  :

$$V_T = \frac{m_{air} - m_i}{\rho_{eau}}$$

Les échantillons que nous étudions ici sont poreux. Nous avons considéré le volume de ces pores comme étant égal au volume d'eau réabsorbée par l'échantillon lors du regonflement. Les échantillons ont été pesés secs dans l'air, pour déterminer la masse de la matrice nanocomposite,  $m_s$ . Ils ont ensuite été regonflés 10 jours avec de l'eau DI et pesés regonflés dans l'air. Cette masse correspond à la masse totale de l'échantillon dans l'air  $m_{air}$ . Nous avons ainsi pu déduire la masse d'eau incorporée soit  $m_{eau} = m_{air} - m_s$ , et le volume de porosité dans l'échantillon  $V_P$  :

$$V_P = \frac{m_{air} - m_s}{\rho_{eau}} = \frac{m_{eau}}{\rho_{eau}}$$

Le pourcentage de porosité  $\%P$  est défini comme étant le rapport de ces deux volumes :

$$\%P = \frac{V_P}{V_T} * 100 = \frac{m_{air} - m_s}{m_{air} - m_i} * 100$$

### 2.2.3. Mesures des dimensions des échantillons nanocomposites.

Les dimensions des échantillons ont été mesurées à plusieurs étapes lors de la préparation des nanocomposites dans le but de comparer les facteurs composition et type de séchage. La masse des échantillons a été mesurée sur une balance de précision à enceinte fermée (A200S-F1, max 202g  $\pm$ 0.1mg, Sartorius). Les échantillons hydratés sont rapidement essuyés sur un papier absorbant avant d'être pesés, afin d'éponger l'eau non incorporée dans la matrice. Les échantillons secs sont quant à eux passés devant une barre antistatique, afin de neutraliser les charges de surface et améliorer la précision des pesées.

L'épaisseur des hydrogels nanocomposites bruts de coulée (BC) et regonflés a été mesurée grâce à une jauge d'épaisseur (modèle J15, Käfer Messuhrenfabrik GMBH & CO. KG, Villingen-Schwenningen, Allemagne). Cette jauge se compose d'un piston et un ressort plutôt que d'une vis, ce qui permet d'appliquer toujours la même pression sur nos échantillons viscoélastiques, et d'obtenir ainsi des mesures répétables et précises avec 0,01mm de précision.

Le diamètre des échantillons regonflés a été mesuré par traitement d'image grâce au logiciel ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) à partir des micrographies obtenues par microscopie optique (Microscope optique 3D, Keyence, Bois-Colombes, France).

#### 2.2.4. Cinétiques de relargage du principe actif

##### 2.2.4.a. Traceur de relargage – l'isothiocyanate de fluorescéine

La molécule qui a été utilisée comme traceur dans les expériences suivantes est l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Dans le but de mimer le comportement d'une macromolécule hydrophile, nous l'avons utilisée greffée sur un Dextran de 4kDa (FD4). Cette molécule a également été utilisée comme modèle principal dans la partie application *ex vivo*. L'isothiocyanate de fluorescéine émet un rayonnement vers 520nm lorsqu'elle absorbe un rayonnement de 490nm. Rigoureusement, la fonction isothiocyanate devient une fonction thiocarbamate lors du greffage sur le dextran. Nous garderons tout de même la dénomination FITC pour rester cohérent avec la littérature et les données du fournisseur.

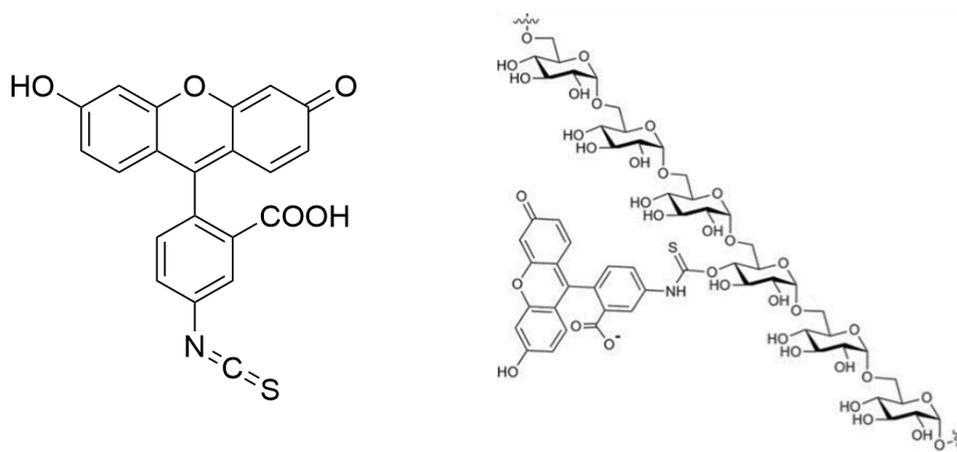


Figure 2-6 A gauche Isothiocyanate de fluorescéine (FITC), à droite FITC greffé sur un Dextran.

##### 2.2.4.b. Protocole de relargage en volume

Les plateformes nanocomposites de différents types de séchage et compositions ont été regonflées 48h à 4°C dans une solution de tampon d'électroporation (TE), et de FD4 à 1mM. Cette solution est fraîchement préparée pour chaque série et sert d'étalon pour la quantification. Les plateformes ont été pesées avant regonflement et avant utilisation pour déterminer la masse de solutions incorporée et donc la quantité initiale de traceur  $m_{incorporé}$ . Les relargages ont été réalisés dans une plaque de culture de 12 puits, remplis avec 4ml d'une solution de sueur artificielle (SA, pH 5,5) qui servira de solution réceptrice [253]. Pour éviter

de détériorer les échantillons lors de l'agitation, nous avons réalisé et utilisé un panier sur mesure, imprimé en acide polylactique (PLA). L'agitation a été obtenue par le mouvement de billes en silice placées au fond des puits, entraînées par un agitateur à bascule. Une représentation de ce dispositif est schématisée par la Figure 2-7.

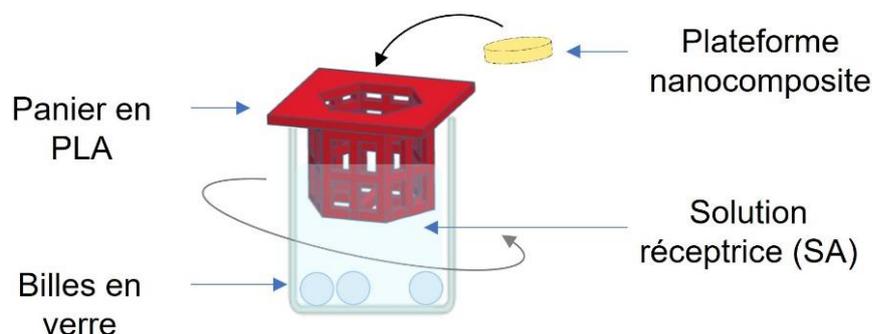


Figure 2-7 Dispositif de relargage en volume.

Nous avons réalisé le relargage de quatre échantillons en parallèle, correspondant aux quatre compositions d'un même type de séchage. Les échantillons ont été plongés dans les puits à  $t = 0$  et des prélèvements de  $20\mu\text{L}$  ont été effectués à  $t = 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 30, 45, 60, 120$  et  $180\text{min}$ . Ces prélèvements ont par la suite été dilués dans  $1\text{ml}$  de SA pour être mesurés au spectromètre de fluorescence.

Les mesures de la fluorescence ont été pratiquées grâce à un spectromètre Edimburg FLSP920. Le prélèvement est transvasé dans une cuve en quartz de  $1\text{ml}$  et placé dans la chambre de mesure. Du fait des volumes manipulés, les concentrations mesurées sont très faibles. De plus, la fluorescéine est connue pour être sensible au pH et son rendement quantique de fluorescence est réduit à  $\text{pH } 5,5$  [254]. Dans le but de capter le maximum de signal, la longueur d'onde d'excitation a été décalée de  $10\text{nm}$  pour pouvoir utiliser des bandes passantes d'excitation et d'émission très larges. L'échantillon est excité avec un rayonnement de  $480\pm 5\text{nm}$  provenant d'une lampe xénon. Le rayonnement de fluorescence a été mesuré grâce à un détecteur placé à  $90^\circ$  du rayonnement d'excitation. Un monochromateur permet de sélectionner la longueur d'onde du faisceau reçu à  $515\pm 5\text{nm}$ .

Le volume des prélèvements étant petit devant le volume total de solution dans les puits, nous avons considéré ce dernier comme constant. Le dosage de la quantité de FD4 libéré dans les puits à  $t$  ( $m_t$ ), a été réalisé grâce à des étalons préparés à partir des solutions de

regonflement correspondantes (n=3). Le pourcentage de FD4 libérée à t par rapport à la quantité initiale dans l'échantillon a été calculé selon l'équation suivante :

$$\%FD4 \text{ libéré} = \frac{m_t * 100}{m_{incorporé}}$$

#### 2.2.4.c. Protocole de relargage en cellule de diffusion verticale

Ce protocole a été mis en place pour se rapprocher de la configuration finale d'utilisation des plateformes, comme un patch, donc reposant sur une diffusion de surface plutôt que de volume. Il nous a aussi permis d'éviter les écueils du modèle précédent sur le plan de la manipulation et de la quantification. Cette fois, ce sont des mesures d'absorbance à pH neutre qui ont été réalisées pour la quantification. De plus, le volume des prélèvements est 5 fois plus grand. Les plateformes nanocomposites AGR/SSC, AGR+NTC+CMC/SSC et AGR+NTC+CMC/CSA ont été regonflées 48h à 4°C dans leur solution respective de TE + FD4 à 1mM. Elles ont ensuite été découpées avec un emporte-pièce de 18mm de diamètre pour harmoniser les diamètres et limiter le volume mort en bord d'échantillon. Finalement la masse et l'épaisseur ont été mesurées avant et après regonflement pour déterminer la masse de solutions incorporée et donc la quantité de traceur incorporé avant le test  $m_{incorporé}$ , et à la fin du test.

Les échantillons ont été épongés très rapidement sur un papier absorbant, avant d'être déposés à la surface d'une cellule de diffusion verticale, préalablement remplie avec une solution de TE qui nous a servi de solution réceptrice (Figure 2-8).

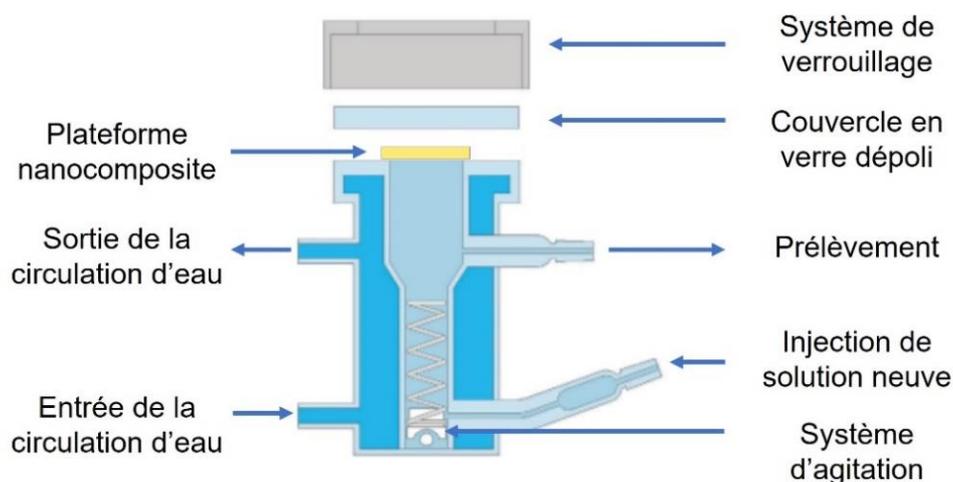


Figure 2-8 Cellule de diffusion verticale.

Cette étape est délicate : il faut éviter les bulles pour ne pas altérer la surface d'échange et positionner l'échantillon correctement pour éviter les fuites. L'agitation dans la cellule est générée par la rotation d'un ressort, entraîné par un agitateur magnétique (400rpm). Les cellules de diffusion ont été thermostatées à 32.5°C grâce à une circulation d'eau. Nous avons réalisé le relargage de trois échantillons en parallèle. Le chronomètre a été déclenché dès le positionnement des échantillons et des prélèvements de 1ml par injection de solution neuve ont été recueillis à  $t = 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 30, 45, 60$ min puis toutes les heures pendant 7h ( $t_{max} = 420$ min). On notera que la masse des échantillons regonflés et découpés de la série AGR SSC n'a pas pu être mesurée avant regonflement, les données ont été extrapolées à partir d'autres échantillons ayant subi le même traitement.

Nous avons mesuré la concentration des prélèvements grâce à une mesure d'absorbance à 492 nm (spectromètre SHIMADZU UV-1800). Le volume des prélèvements n'est cette fois négligeable devant le volume total, la quantité cumulée de FD4 libéré a donc été calculée par la formule  $m_{libéré\ à\ t} = \sum_{i=0}^t m_{prélèvement\ i}$ . Le pourcentage de FD4 libéré a été déterminé par le ratio :

$$\%FD4\ libéré = \frac{m_{libéré\ à\ t} * 100}{m_{incorporé}}$$

#### 2.2.4.d. Mise en équation - modèle Korsmeyer-Peppas

Nous avons mis en équation les courbes issues des relargages pour tenter de déterminer le régime de diffusion du traceur depuis les plateformes nanocomposites poreuses. Nous avons utilisé le modèle éponyme proposé par Korsmeyer et Peppas [255–257]. Ce modèle propose d'utiliser l'Équation 2-1 aux temps courts, soit  $m_t/m_0 > 60\%$ , pour en extraire le coefficient exponentiel  $n$  et en déduire le mécanisme de diffusion.

$$\frac{m_t}{m_0} = Kt^n$$

*Équation 2-1 Modèle de Korsmeyer-Peppas, avec  $m_t$  la quantité de traceur relarguée à  $t$ ,  $m_0$  la quantité de traceur initialement incorporée,  $K$  une constante de libération,  $t$  le temps et  $n$  un coefficient exponentiel de libération.*

L'application de ce modèle requiert plusieurs conditions. Premièrement, les conditions « perfect sink » qui impliquent que la concentration finale soit inférieure à 10% de la solubilité du soluté pour garantir la constance du coefficient de diffusion. D'après les données du

fournisseur, la solubilité du FD4 dans l'eau est de 25mg/ml. La concentration maximale dans les puits si le relargage était total serait de 1,7µg/ml pour le premier protocole et 125µg/ml pour le second, bien en deçà de la limite de 2,5mg/ml. Deuxièmement, nous avons considéré que les échantillons étaient complètement regonflés avant le début du test et que ce paramètre ne variait pas pendant la durée du test. Finalement, nous avons approximé une diffusion par les surfaces planes des plateformes, en négligeant la diffusion par la tranche, pour utiliser l'équation unidimensionnelle proposée. Cette approximation est discutée dans les travaux de Ritger et coll. [258, 259], et nous avons tenu compte de l'influence de géométrie de notre échantillons sur la valeur limite de l'exponentiel n pour le relargage en volume.

Nous avons extrait n grâce à une régression linéaire sur la fonction suivante :

$$\log\left(\frac{m_t}{m_0}\right) = \log(K) + n * \log(t)$$

### 2.2.5. Analyses mécaniques dynamiques

Les analyses mécaniques dynamiques ont été réalisées sur un rhéomètre Discovery HR series de TA Instrument, à l'aide d'une géométrie plan-plan sablée de 8mm de diamètre. Cet appareil permet de pratiquer des mesures mécaniques sur des échantillons à l'état hydraté, grâce à une cuve à immersion présente sur la partie fixe. Un module Peltier permet de fixer la température à 20°C pendant la mesure.

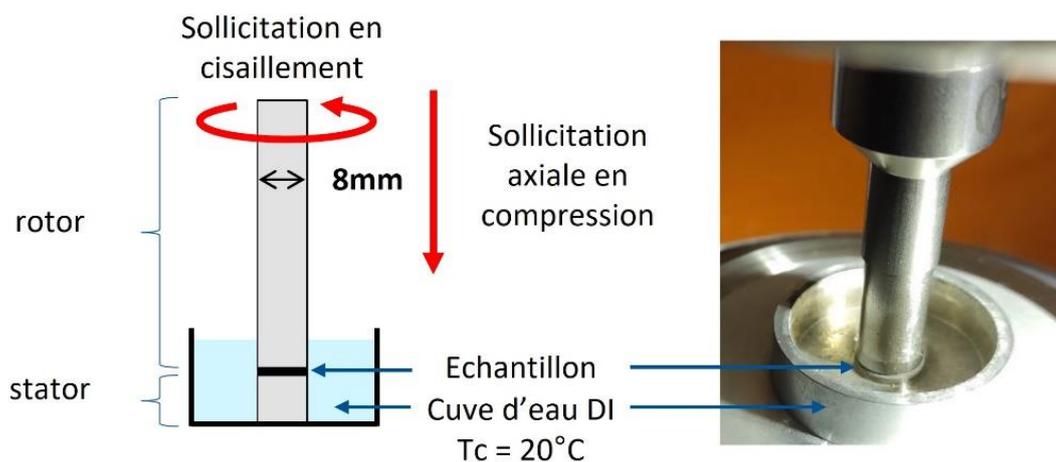


Figure 2-9 Schéma du dispositif de mesures mécaniques et en regard la photographie de l'appareil utilisé.

Le principe de ces mesures consiste à appliquer une contrainte oscillatoire (sinusoïdale) de cisaillement ou de compression à l'échantillon, et à mesurer la déformation résultante dans le domaine linéaire, ce qui permet d'accéder à plusieurs paramètres dont le module viscoélastique. Il existe retard  $\tau$  entre la sollicitation et la réponse de l'échantillon, comme représenté sur la Figure 2-10.

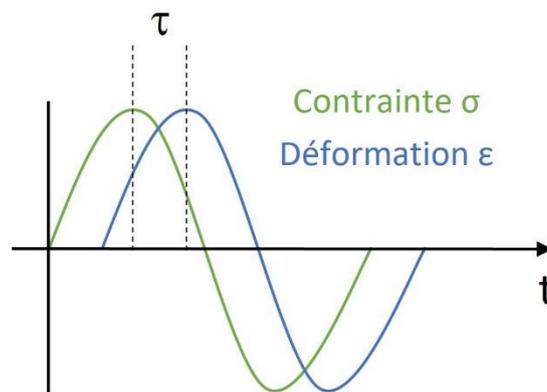


Figure 2-10 Réponse d'un matériau viscoélastique à une sollicitation oscillatoire.

L'utilisation d'un mode de sollicitation oscillatoire permet d'utiliser le formalisme complexe pour écrire la contrainte complexe  $\sigma^*$ , la déformation complexe  $\varepsilon^*$  et la relation entre ces grandeurs via le module viscoélastique complexe  $G^*$ , la pulsation  $\omega$  et le déphasage entre déformation et contrainte  $\delta = \omega\tau$  :

$$\sigma^*(\omega) = \sigma_0 e^{j\omega t}$$

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_0 e^{j(\omega t - \delta)}$$

$$G^*(\omega) = \frac{\sigma^*(\omega)}{\varepsilon^*(\omega)} = G'(\omega) + j G''(\omega)$$

*Équation 2-2 Définitions des formes complexes de la contrainte  $\sigma$ , de la déformation  $\varepsilon$  et du module viscoélastique en cisaillement  $G$  en fonction de la pulsation  $\omega$ , du temps  $t$  et du déphasage  $\delta$ . Avec  $\sigma_0$  et  $\varepsilon_0$  les amplitudes de contraintes et de déformations,  $\omega = 2\pi f$ , et  $f$  la fréquence de sollicitation.*

Dans l'équation 2-2, le module  $G'$  est appelé module de conservation et correspond à l'énergie emmagasinée lors de la sollicitation, qui est restituée sous forme de déformation élastique. Le module de  $G''$ , ou module de perte, correspond quant à lui à l'énergie dissipée par glissement des chaînes polymères sous l'action de la sollicitation mécanique. Ils sont notés  $G'$  et  $G''$  dans le cas d'un cisaillement, et  $E'$ ,  $E''$  dans le cas d'une compression.

Le rapport entre ces deux modules, aussi appelé facteur de perte  $\tan \delta = \frac{G''}{G'}$  ou  $\frac{E''}{E'}$ , permet de quantifier le comportement viscoélastique du matériau. En effet, dans le cas d'un solide élastique parfait le déphasage sera nul ( $\tan \delta = 0$ ), alors que dans le cas d'un liquide visqueux newtonien, il sera de  $\pi/2$  ( $\tan \delta \rightarrow \infty$ ) [260]. Enfin, dans le cas d'un matériau où les composantes élastique et visqueuse sont égales, le déphasage sera de  $\pi/4$  ( $\tan \delta = 1$ ).

D'un point de vue expérimental, il a été nécessaire d'appliquer une force nominale en compression de à 0,2N (20g) sur tous les échantillons avant de commencer la mesure pour assurer un bon contact entre les deux géométries et obtenir des mesures reproductibles. Cette étape de réglage s'est faite manuellement, en ajustant l'entrefer et en attendant que l'échantillon se stabilise. Pour les deux modes de sollicitation, cisaillement et compression, la première étape a consisté en un balayage en temps pour vérifier la stabilité de la réponse de l'échantillon à la sollicitation. Puis un balayage en amplitude de déformation a été pratiqué pour déterminer le domaine viscoélastique linéaire. La limite de ce domaine est définie comme la déformation pour laquelle le module de conservation chute de plus de 5%.

*Mesure en cisaillement :*

- Balayage en temps : Amplitude de déformation  $\varepsilon_0 = 0,1\%$ , fréquence  $f = 0,1\text{Hz}$ .
- Balayage en déformation :  $f = 0,1\text{Hz}$ ,  $\varepsilon_0 = 0,01$  à  $2\%$ , logarithmique, 5 points par décade.

*Mesure en compression :*

- Balayage en temps :  $\varepsilon_0 = 0,5\%$ ,  $f = 0,1\text{Hz}$ .
- Balayage en déformation :  $f = 0,1\text{Hz}$ ,  $\varepsilon_0 = 0,1$  à  $4,9\%$ , logarithmique, 5 points par décade.

Un exemple ces différentes mesures peut être trouvé Figure 2-11.

Les quatre mesures ont été pratiquées à la suite sur un même échantillon, et ont été répétées sur trois échantillons de chaque composition, BC, SSC ou CSA, regonflés dans l'eau DI plus de 10 jours. Le diamètre des échantillons a été adapté à la géométrie de 8mm avec un emporte-pièce dans le cas où il était trop grand. Les échantillons SSA n'ayant pas un diamètre suffisant, ils n'ont pas pu être étudiés ici. Enfin, seuls les modules de conservation ont été discutés dans la partie résultats.

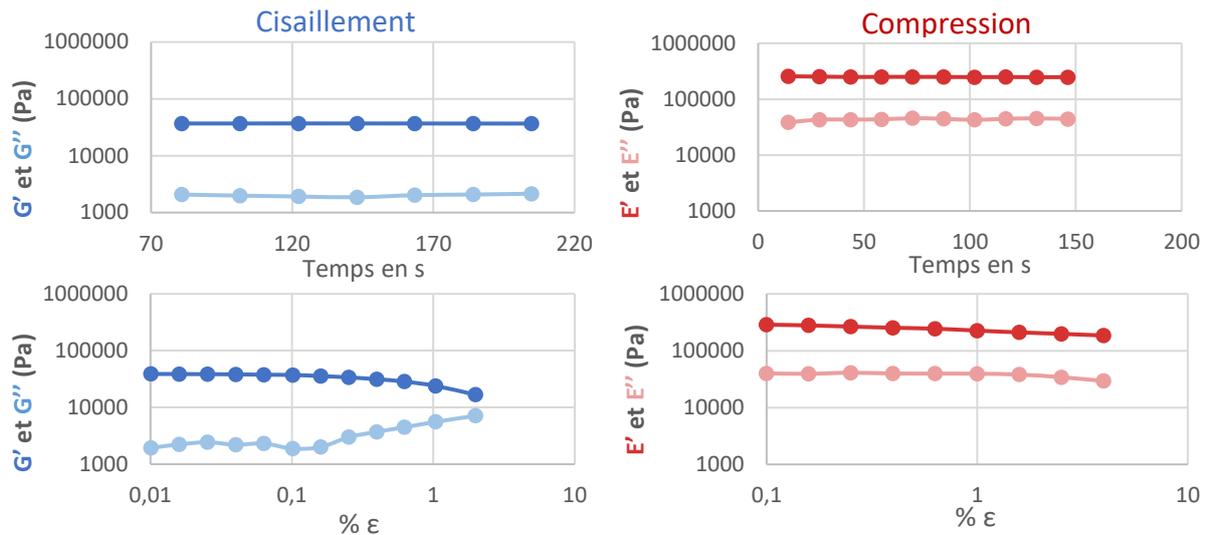


Figure 2-11 Exemple des quatre différentes acquisitions pratiquées sur un échantillon d'agarose brut de coulée (AGR BC). En haut les balayages en temps et en bas en amplitude.

L'obtention des modules, des facteurs de perte et des limites de linéarité du domaine viscoélastique en fonction de l'amplitude de déformation des échantillons nous permettra de conclure sur l'influence de la composition et du type de séchage sur le comportement viscoélastique et la rigidité des plateformes nanocomposites.

### 2.2.6. Analyses en mécanique statique

Des mesures en compression statique ont aussi été pratiquées directement à la suite des 4 essais dynamiques, sur le même appareil. Dans ce cas, une vitesse de déplacement de la géométrie supérieure de  $1\mu\text{m/s}$  est imposée. La contrainte nécessitant l'application de cette déformation en compression est mesurée, nous permettant de déterminer le module d'élasticité en compression E, ou module d'Young des différentes plateformes. Le module E tangent a été déduit de la pente de la région linéaire comme sur l'exemple présenté Figure 2-12.

Dans certains cas, la rupture est atteinte, mais le test a le plus souvent été arrêté manuellement avant, par mesure de sécurité. Les épaisseurs manipulées sont faibles et ce type d'essais sans contrôle pourrait endommager l'appareil. De ce fait, les contraintes et déformations à rupture n'ont pas été comparées.

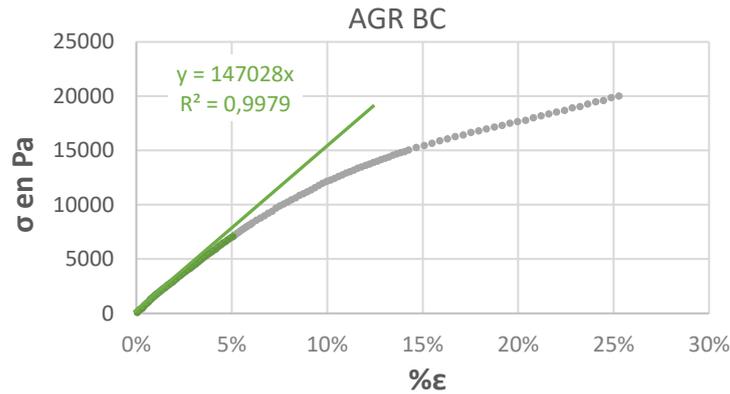


Figure 2-12 Exemple de courbe de compression statique obtenue sur un échantillon d'agarose brut de coulée et détermination du module d'Young  $E$ , définie comme la pente du domaine linéaire aux faibles déformations.

### 2.2.7. Mesures de conductivités électriques

Les mesures de conductivité en courant continu ont été pratiquées sur plusieurs séries d'échantillons dans la continuité des travaux précédents [4].

Des échantillons des 4 compositions ont été mesurés, à l'état BC ou SSC. Nous avons également essayé de déterminer le rôle joué par le solvant dans la conductivité globale, en utilisant trois solvants de conductivité croissante : l'eau DI, le TE et le PBS. Les échantillons BC, déjà hydratés avec de l'eau DI, ont été placés dans 3 bains successifs de 24h pour remplacer l'eau DI par le TE ou le PBS. Les échantillons SSC sont mis à regonfler plus de 48h avant mesure.

Les mesures sont réalisées dans une enceinte fermée en plexiglas, pour limiter l'évaporation du liquide. L'échantillon est placé dans un guide en plexiglas entre une plaque en inox et un disque en laiton recouvert d'or. Le contact est obtenu grâce à deux électrodes fixées dans le couvercle de l'enceinte et possédant un ressort. L'homogénéité de la pression de contact entre les échantillons est obtenue en contrôlant la hauteur entre le haut des échantillons et la sonde Figure 2-13. L'épaisseur des échantillons est mesurée et la hauteur totale est ajustée à l'aide de cales pour compenser l'écart d'épaisseur entre BC et SSC. La température ambiante est maintenue constante à 24°C pendant les mesures grâce à une enceinte HERAEUS HT7010.

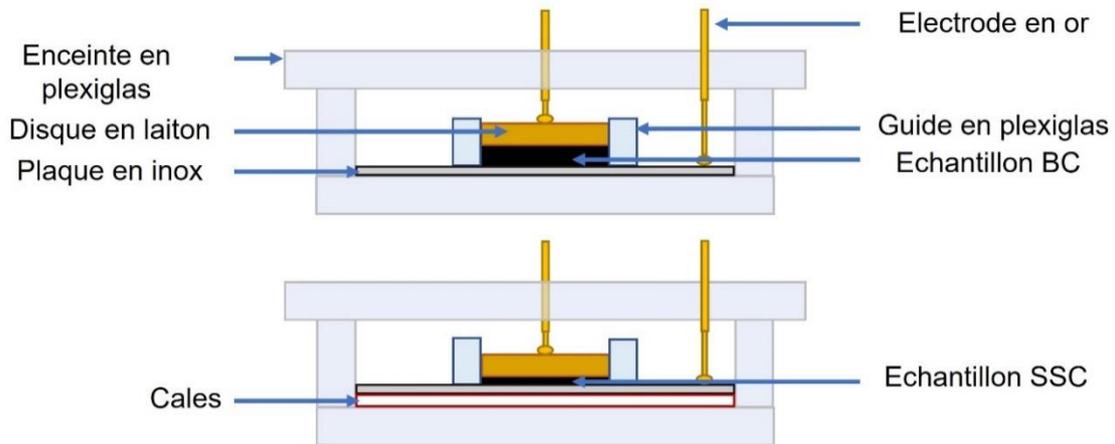


Figure 2-13 Schéma du dispositif de mesure de conductivité en tension continue pour les échantillons BC en haut et SSC en bas.

Une tension continue est appliquée pendant 280s (4,5 min) grâce à un électromètre Keithley 2410 piloté par le programme LabView Lab Tracer 2. La réponse en courant est mesurée avec le même appareil. Les matériaux n'ont pas un comportement ohmique, nous avons obtenu une courbe de forme puissance inverse, correspondant à la polarisation progressive de tous les dipôles du système jusqu'à ce qu'ils atteignent leurs positions d'équilibre au bout de quelques minutes. C'est de cette zone que nous avons extrait le courant à l'équilibre, en moyennant les valeurs du plateau comme sur la Figure 2-14.

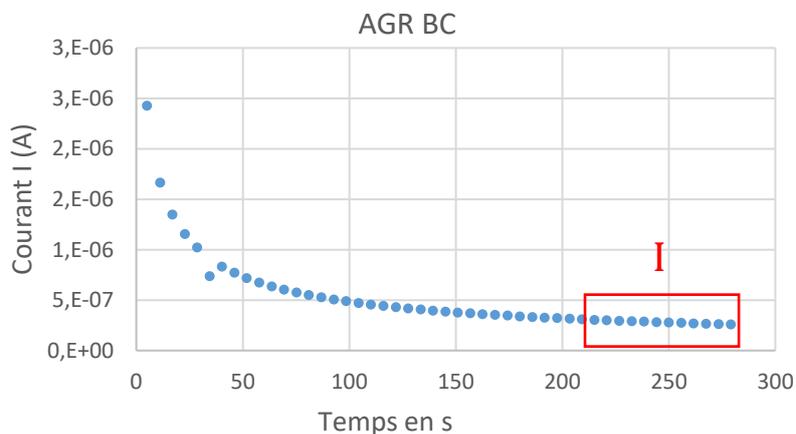


Figure 2-14 Évolution de la réponse en courant en fonction du temps, lorsque d'une tension de 0,75V est appliquée.

La conductivité du matériau nanocomposite a été calculée à partir de l'Équation 2-3, en normalisant par les dimensions de l'échantillon:

$$\sigma = \frac{I * e}{V * \pi * r^2}$$

*Équation 2-3 Conductivité des matériaux nanocomposites  $\sigma$  (S/m), avec  $I$  le courant moyen sur le plateau (A),  $e$  l'épaisseur de l'échantillon,  $V$  la tension appliquée (V) et  $r$  le rayon de l'échantillon (5mm pour les échantillons BC et 4 mm pour les SSC).*

Des tensions de 0,05V, 0,1V, 0,25V, 0,5V, 0,75V et 1V ont été appliquées à la suite sur les échantillons en observant un temps de relaxation de 5min entre chaque mesure. Seuls les résultats obtenus à 0,75V seront présentés, les tensions plus faibles donnant des résultats trop bruités, car les courants mesurés sont trop faibles. Dans le cas des mesures à 1V, c'est un problème de corrosion par piqure qui a été observé sur la plaque en inox, avec les échantillons dont la phase liquide était du PBS. Notre hypothèse est qu'une potentielle dégradation du revêtement en or mettant à nu le laiton, combinée à la présence d'ions chlorure a permis un couplage galvanique avec l'acier inox à cette tension. Augmenter la tension d'avantage complexifierait le système encore plus en introduisant des phénomènes électrochimiques supplémentaires à un système comportant déjà trois phases différentes : l'agarose, les NTC et une phase aqueuse.

Les mesures de conductivité ont été pratiquées sur des échantillons BC et SSC regonflés de toutes les compositions, avec trois solvants différents, dans le but d'observer l'influence de ces paramètres. Des échantillons AGR+NTC+CMC avec concentration de 10% en NTC par rapport à la masse d'agarose ont également été mesurés.

### **2.2.8. Analyses statistiques**

Les analyses statistiques présentées dans le chapitre 3 ont été menées grâce au logiciel R (R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria), assisté de la librairie Rcmdr.

Dans le chapitre 3, l'impact des facteurs « composition » et « type de séchage » a été évalué par analyse de la variance à deux facteurs ANOVA 2F avec un intervalle de confiance de 95%. Les hypothèses de normalité et d'homoscédasticité des variances ont été systématiquement validées par le test de normalité de Shapiro-Wilk sur les résidus de

l'ANOVA et du test de Bartlett sur les variances des résidus de l'ANOVA, groupés par facteur. Le test de Tukey a été utilisé pour affiner les comparaisons. Dans les cas où les données expérimentales ne satisfaisaient pas aux deux hypothèses de validation, le test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été appliqué, suivi du test de Dunn. Ces tests donnent accès à une valeur « p » qui permet de donner une significativité statistique aux comparaisons de résultats. Plus elle sera faible par rapport à des valeurs seuil, plus le rejet de l'hypothèse nulle « les résultats sont équivalents » sera fort. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  l'écart-type. Les moyennes des groupes sont représentées sur les graphiques, la signification des codes utilisés pour qualifier la valeur de p est explicitée dans leur légende.

## **2.3. Délivrance transdermique assistée par électroporation - expérimentations *ex vivo***

### **2.3.1. Provenance des explants**

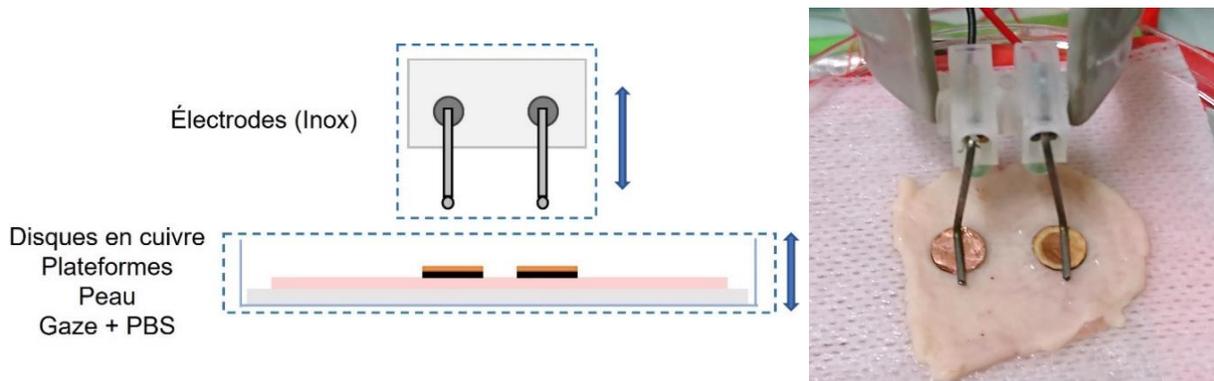
Des explants de peau ont été obtenus moins d'une heure avant les tests sur différentes lignées de souris « hairless » (sans poils) en fonction des disponibilités : souris femelles nude Balb/c AnNRj-Foxn1nu (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) âgées de 10 à 12 semaines et pesant entre 20 et 24g ; souris femelles nude NMRI-nu (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) âgées de 8 à 16 semaines et pesant entre 25 et 30g ; souris femelles hairless SKH1 (Charles River, Écully, France) âgées de 8 à 16 semaines et pesant entre 25 et 35g. La peau du dos est déposée sur une gaze humidifiée avec du PBS commercial (sans  $\text{Ca}^{2+}$ , ni  $\text{Mg}^{2+}$ , Eurobio, Les Ulis, France) dans une boîte de pétri. Les peaux ont été découpées en plusieurs échantillons dans le sens tête-queue, et orientées toujours côté tête vers l'anode lors du traitement par électroporation. Un tapis chauffant réglé à 37°C est placé sous la boîte de pétri pendant le traitement.

### **2.3.2. Dispositifs expérimentaux**

Les plateformes ont été mises à regonfler 48h à 4°C avant utilisation, dans une solution de TE + marqueurs fluorescents. Le TE est utilisé au laboratoire pour l'électroporation car il est iso-osmotique (298 mOsmol/l), a un pH de 7,4, adapté à la conservation de cellules eucaryotes et sa conductivité est faible (1,5mS) afin de limiter l'échauffement par effet Joules associé aux

impulsions électriques. La solution en surface des plateformes a été épongée avec un papier absorbant avant de disposer les plateformes sur les peaux.

Deux dispositifs d'électroporation ont été utilisés durant ces travaux, tous deux fabriqués au laboratoire. Le premier est constitué de deux électrodes sous forme de tiges en acier inox, connectées au générateur par un domino et maintenues en place par une potence Figure 2-15.



*Figure 2-15 A gauche, schéma du 1<sup>er</sup> dispositif électroporation utilisé dans ces travaux pour la délivrance transdermique assistée par électroporation. À droite, photo en utilisation.*

Des disques en cuivre ont été placés entre les plateformes et les tiges en inox dans le but de répartir le champ électrique sur toute la surface des plateformes. La pression de contact entre les électrodes et les plateformes est assurée par le réglage de la hauteur des électrodes sur la potence et de la boîte de pétri, grâce à un élévateur. Cette pression n'est par conséquent pas totalement homogène d'un test à un autre, et dépend directement de l'expérimentateur. La distance entre les plateformes nanocomposites est également réglée manuellement avec une règle pour laisser un écart de 0,5cm entre les bords de plateformes. Ce dispositif est tout à fait adapté pour tests préliminaires, mais il trouve ses limites lorsque l'on cherche à faire une comparaison plus fine des résultats, puisqu'il induit des biais de reproductibilité. De plus, la variabilité initiale du diamètre des plateformes nanocomposites pouvait être à l'origine de court-circuit entre la peau et le disque en cuivre, lorsque celui-ci dépassait des plateformes.

Un deuxième dispositif a donc été développé dans le cadre du projet ANR Carbo<sup>2</sup>Derm pour pallier ces problèmes. Le but était de s'assurer de la répétabilité des expériences en fixant la taille des plateformes, la distance inter électrodes et la pression de contact. La fabrication de ce second dispositif a également permis d'accélérer la réalisation des expérimentations puisqu'il y avait moins de réglages à effectuer Figure 2-16.

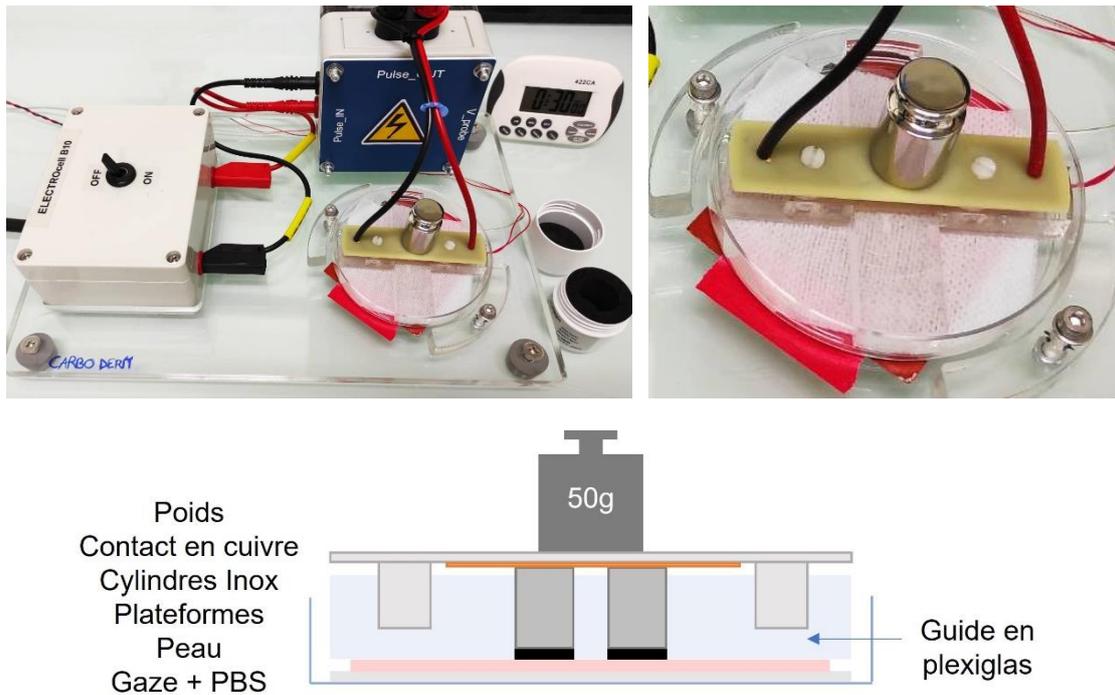


Figure 2-16 Photographies de l'ensemble du 2<sup>ème</sup> dispositif développé pour les expériences *ex vivo* de délivrance transdermique assistée par électroporation. À droite, zoom sur la boîte de pétri, la croix et le contact électrique assuré par le poids. En bas, schéma de la disposition des plateformes et des contacts électriques.

Un guide d'électrode a été fabriqué, sous la forme d'une croix en plexiglas percée de deux trous de 0,8cm de diamètre et écartés de 0,5cm bord à bord (Figure 2-16). Deux cylindres en acier inox de 0,8cm sont déposés sur les plateformes nanocomposites disposées dans les trous et le contact entre les cylindres et le générateur est assuré par une barrette recouverte de cuivre. Deux trous ont également été percés dans la croix pour accueillir les guides de cette dernière pièce. Le système est maintenu en place par un poids de 50g déposé sur la barrette. Un guide servant à immobiliser la boîte de pétri, et un report de contact pour limiter les mouvements des câbles électriques ont été fixés sur une plaque en plexiglas rendant tout le dispositif très stable. Des points de contact, prévus pour effectuer des mesures de tension et de courant *in situ*, ont également été intégrés.

### 2.3.3. Paramètres d'électroporation

Les pulses ont été délivrés par un générateur ELECTRO cell B10 HVLV, (Betatech, Saint-Orens-de-Gameville, France). Les paramètres des pulses utilisés dans ces travaux sont présentés Figure 2-17. Les paramètres majoritairement utilisés consistent en une série de 8 vagues carrées unipolaires de 20ms avec une fréquence de 1Hz. Une tension de 300V est

appliquée aux bornes des électrodes des dispositifs par la décharge d'un condensateur constituant le générateur. Ces impulsions sont celles utilisées par l'équipe de Biophysique Cellulaire de l'IPBS pour le transfert d'ADN plasmique dans la peau, et nommées impulsions EGT pour leur application en ElectroGénoThérapie [261]. Les paramètres EGT-inv correspondent à des paramètres EGT dont la polarité des pulses a été alternée.

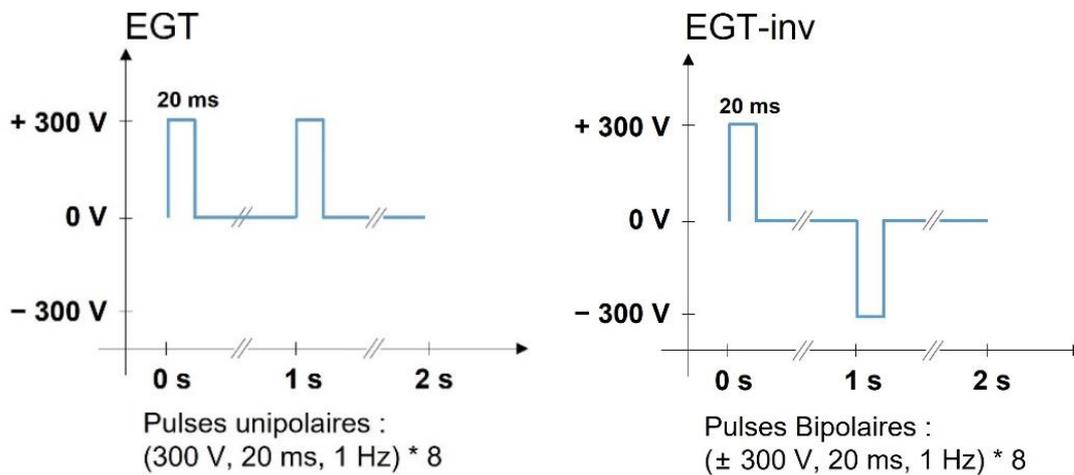


Figure 2-17 Paramètres d'électroporation utilisés pendant ces travaux.

#### 2.3.4. Marqueurs fluorescents utilisés

Les caractéristiques (masse molaire, concentration et charge globale à pH neutre) ainsi que la provenance des marqueurs utilisés sont rassemblées dans le Tableau 2-1. Un dextran de 4kDa a servi de modèle dans cette étude pour mimer la taille d'une macromolécule comme l'insuline. Il est greffé avec des groupements isothiocyanates de fluorescéine (FITC) pour le rendre fluorescent, il est appelé FD4 par la suite. L'iodure de propidium (PI) est une molécule pouvant s'intercaler dans l'ADN, et dont le rendement quantique de fluorescence augmente d'un facteur 1000 lorsque c'est le cas. Le PI est connu comme marqueur de mort cellulaire, car la membrane plasmique d'une cellule morte est endommagée, ce qui lui permet d'atteindre l'ADN présente en son sein. Cependant, nous l'avons utilisé ici comme marqueur de perméabilisation des membranes. En nous inspirant des travaux de Leclerc et coll. [262], nous avons utilisé le Lucifer Yellow (LY) pour étudier l'état de la fonction barrière du SC et donc sa perméabilité. Cette molécule est aussi dix fois plus petite que le FD4. Étudier sa délivrance nous a permis d'observer l'effet de la taille des molécules hydrophiles. Deux dérivés du FD4 ont été utilisés pour observer l'impact de la charge de la molécule sur sa délivrance. Le premier est greffé avec des groupements carboxyméthyle (FD4-CM), lui conférant une

charge globalement négative, et le second avec des groupements diéthylaminoéthyle (FD4-DEAE) pour lui donner une charge globalement positive. Les teneurs en carboxyméthyle ou en azote dans les deux dérivés sont similaires, 3-7% pour 2-5%, et supérieurs au taux de greffage de FITC, 0,001 à 0,008 mol FITC/mol glucose. Finalement, nous avons pu valider l'utilisation du FD4 comme modèle en le confrontant à de l'insuline marquée au FITC. Les concentrations présentées dans le Tableau 2-1 prennent en compte le taux de substitutions de FITC sur les molécules, pour travailler en concentration molaire de FITC égale. Tous les marqueurs proviennent de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), et ont été dilués dans un tampon d'électroporation (TE).

	LY	PI	FD4	FD4-CM	FD4-DEAE	I-FITC
M <sub>w</sub>	444g/mol	668g/mol	~4kDa	~4kDa	~4kDa	~5,8kDa
C	1mM	100μM	1mM	1mM	1mM	0,111mM
Charge	-	+	- (Faiblement)	-	+	
Ref fournisseur	L0259	P4170	FD4	68059	53557	I3661

Tableau 2-1 Informations sur les marqueurs fluorescents utilisés pour les expériences *ex vivo*.

### 2.3.5. Mesures de température *in situ*

Des mesures de température *in situ* ont été acquises grâce à un thermomètre optique NOMAD-Touch, Neoptix (Qualitrol, Quebec, Canada) équipée d'une fibre optique en téflon de la même compagnie. La sonde est placée entre la gaze et la peau, sous le centre de la plateforme, comme indiqué sur le schéma présenté Figure 2-18, et mesure une température toutes les secondes pendant un traitement de type EGT. L'évolution de la température en fonction du temps pendant le traitement d'électroporation a été mesurée sous chacune des électrodes. Nous en avons extrait l'écart de température généré par l'application des pulses sur une plage de 8s.

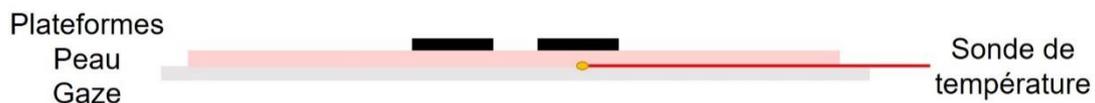


Figure 2-18 Schéma des mesures de températures *in situ*.

### 2.3.6. Microscopie de fluorescence

Les échantillons de peau ont été observés avec un microscope en fluorescence droit MacroFluo équipé d'une source EL6000 (Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France) et d'une caméra Cool Snap HQ (Roper Scientific, Ottobrunn, Allemagne) et grâce au logiciel d'acquisition Metamorph (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Un filtre Leica LR (excitation BP: 480/40nm, dich. 505LP, émission BP: 527/30nm) a été utilisé pour imager les signaux FITC et LY, et un filtre Leica 49,008 ET mCH/TR (excitation BP: 560/40nm, dich. 585LP, émission BP: 630/75nm) a été utilisé pour le PI, avec un temps d'exposition de 1s à chaque fois. Les images ont été traitées avec le logiciel ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA), pour homogénéiser le contraste et la luminosité. La quantification des signaux des différents marqueurs fluorescents a été corrigée grâce au ratio décrit dans l'Équation 2-4, entre l'intensité moyenne de la zone pulsée et celle de zones non pulsées de la même image (Figure 2-19). Le but de cette correction est de s'affranchir des biais induits par l'auto-fluorescence de la peau, variable d'un individu à un autre. Tous les graphiques présentés dans le chapitre 4 représentent une intensité relative de fluorescence (IRF) de chaque marqueur.

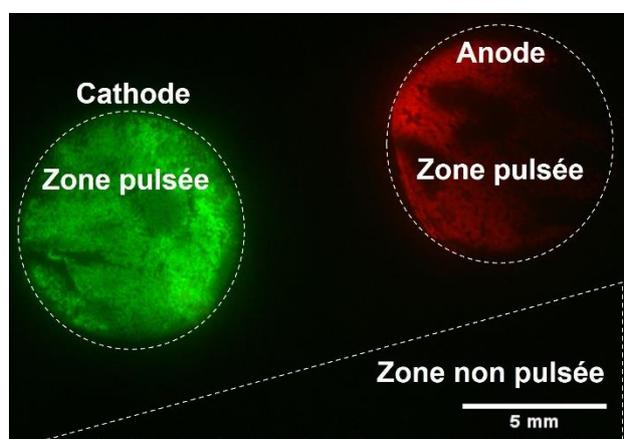


Figure 2-19 Exemple de macrographie obtenue par imagerie en fluorescence sur un échantillon de peau traitée par électroporation avec des plateformes nanocomposites chargées avec FD4 et PI. Représentation de zones dites pulsée et non pulsée.

Équation 2-4 Calcul de l'intensité relative de fluorescence (IRF).

$$IRF = \frac{I_P - I_N}{I_{NP} - I_N}$$

Avec :

$I_P$  : l'intensité moyenne de la zone pulsée

$I_{NP}$  : l'intensité moyenne de la zone non pulsée

$I_N$  : le noir caméra

Nous avons comparé la quantification de l'absorption du FD4 à la cathode par des peaux traitées grâce aux deux dispositifs, et elles se sont révélées équivalentes (Figure 2-20). Par

conséquent, dans le chapitre 4, les résultats présentés seront groupés indépendamment du dispositif utilisé pour les obtenir.

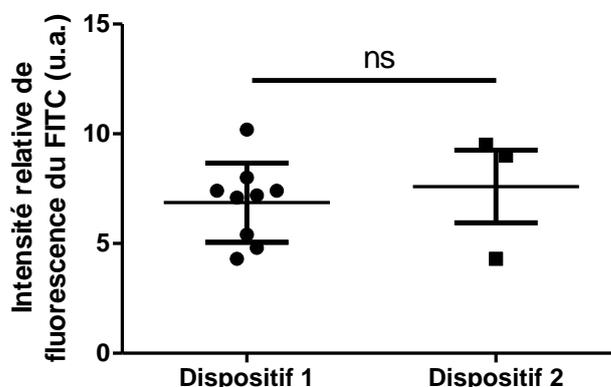


Figure 2-20 Comparaison de la délivrance FD4 assistée par EP en fonction du dispositif utilisé. Plateformes AGR+NTC+CMC SSC regonflées avec une solution TE+FD4. Quantification de l'IRF du FITC, les barres représentent la moyenne et l'écart-type. Analyse statistique : t test, ns = non significatif. n = 3-9.

Nous n'avons pas pu répéter autant d'expériences avec le deuxième dispositif qu'avec le premier, il est donc difficile de juger de l'amélioration de la répétabilité. Cependant, nous avons pu apprécier pleinement la facilité de mise en œuvre offerte par le second dispositif.

### 2.3.7. Observations histologiques

Immédiatement après avoir été observés, les échantillons de peau ont été découpés grâce à un emporte-pièce de 8mm de diamètre et plongés dans 3ml de tampon de fixation periodate-lysine-paraformaldéhyde (PLP) pendant une nuit à 4°C. Le PLP a été rincé trois fois avec du PBS (sans Ca<sup>2+</sup>, ni Mg<sup>2+</sup>, Eurobio, Les Ulis, France), puis les prélèvements de peau ont été immergés 24h dans des bains successifs de sucrose à 15% puis 30%. Ils ont ensuite été coupés en trois et inclus dans de l'OCT (Optimal Cutting Temperature compound, Shandon Cryomatrix, Richard-Allan Scientific, Subsidiary of Thermo Fisher Scientific, Kalamazoo, MI, USA) pour la conservation à -80°C. Les blocs d'OCT contenant les échantillons ont été coupés en tranches de 10µm dans un cryostat à -20°C. Les tranches ont été recueillies sur des lames et l'OCT revenu à température ambiante a pu être rincé avec du PBS ne laissant sur la lame que la tranche de tissu. Les coupes ont été montées avec un milieu de montage contenant du DAPI dans le but de marquer les noyaux (Mounting Medium with DAPI— Aqueous, Fluoroshield, Abcam, Cambridge, UK).

Pour évaluer la profondeur de pénétration des différents marqueurs fluorescents, les coupes ont été observées avec un microscope de fluorescence AxioImager M2 équipé d'un objectif plan apochromat 40X/0.95 korr M27 et d'une caméra AxioCam 503 color (Zeiss, Jena, Allemagne). Un filtre Zeiss 96 HE BP (excitation BP: 370–410nm, émission BP: 430–470nm) a été utilisé pour le DAPI. Un filtre Zeiss 38 HE Green Fluorescent Prot. (Excitation BP: 450–490 nm, émission BP: 500–550nm) a été utilisé pour le FITC et le LY, et un filtre Zeiss 20 HE Rhodamine (excitation BP: 540–552nm, émission BP: 575–640nm) a été utilisé pour le PI. Ce microscope est capable de reconstituer une image à partir d'une mosaïque d'images prises à fort grossissement. Cette méthode permet d'obtenir des images de zones très étendues avec une très bonne résolution. Il y a cependant un inconvénient, il réside dans la taille conséquente qu'occupe ce type d'acquisition, environ 3Go par image. Le logiciel ZEN 3.1 (Blue edition, ZEISS microscopy) nous a servi à traiter les micrographies d'histologies.

Un marquage de la Claudin-1 par immunofluorescence sur des coupes histologiques nous a permis de vérifier l'identification des différentes couches de la peau de souris Figure 2-21.

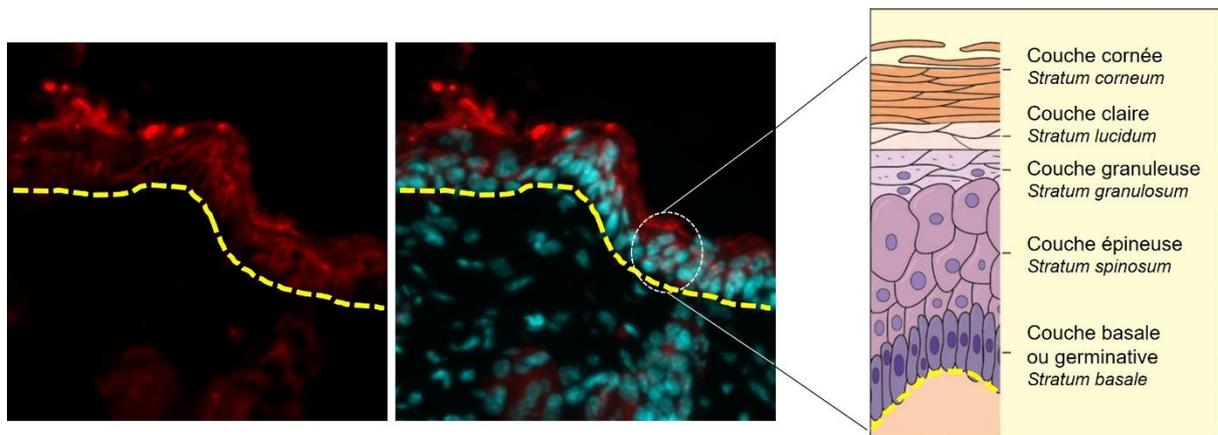


Figure 2-21 Identification des couches de l'épiderme sur une coupe de 10µm de peau de souris avec un en immunofluorescence de la claudin-1 en rouge. Les noyaux marqués au DAPI sont en cyan sur l'image de droite. La ligne jaune représente la délimitation entre l'épiderme et le derme.

Claudin-1 est une protéine transmembranaire impliquée dans les jonctions serrées des cellules épithéliales en général. On peut la trouver dans la peau au niveau de l'épiderme, du *stratum granulosum* au *stratum corneum* [13]. Sur la Figure 2-21, on reconnaît la couche basale à son organisation cellulaire très serrée et alignée, formant la limite entre le l'épiderme et le derme (ligne jaune). Le marquage de la claudin-1 ne commence qu'un peu au-dessus, au niveau des cellules appartenant au *stratum granulosum*. Le marquage rouge est aussi très

intense au bord de l'échantillon où il n'y a plus de noyau, c'est le *stratum corneum* (SC), composé de plusieurs couches de cornéocytes.

La structure de la peau humaine et celle de la peau de souris que nous avons utilisée dans nos travaux est assez similaire. Hormis la présence de muscles peauciers localisés sous l'épiderme chez les rongeurs, la différence principale réside dans l'épaisseur de la peau. L'épaisseur de l'épiderme humain comme murin varie selon la région corporelle, mais il mesure en moyenne 100µm chez l'homme, pour seulement une quinzaine de micromètres chez la souris [11]. C'est donc un modèle adéquat pour nos études bien que plus facile à perméabiliser.

### **2.3.8. Évaluation de la toxicité des NTC sur des lignées cellulaires de la peau**

Une étude de viabilité des cellules provenant de la peau lorsqu'elles ont été cultivées en présence de NTC biparois bruts et de CMC, a pu être menée dans le cadre du projet ANR Carbo<sup>2</sup>Derm.

#### *2.3.8.a. Culture cellulaire*

Les mélanocytes humains (MEL-ST) ont été obtenus auprès du Dr Christophe Lamaze (Institut Curie, France). Les fibroblastes humains normaux (F150617) ont été obtenus à partir d'une biopsie cutanée fournie par Icelltis (Toulouse, France). Les kératinocytes humains immortalisés (Hacat) ont été achetés auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC, US).

Les cellules ont été cultivées dans le milieu de culture DMEM (Gibco, Invitrogen, France) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur (Gibco, Invitrogen, France) et 100µg/ml de pénicilline et 100µg/ml de streptomycine. Les cellules ont été cultivées à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Les trois types de cellules ont été testés négatifs pour les mycoplasmes à l'aide du kit de détection des mycoplasmes MycoAlert (Lonza #LT07-318, USA).

#### *2.3.8.b. Évaluation de la viabilité cellulaire*

Pour les trois lignées, les cellules ont étéensemencées à 30 000cellules/cm<sup>2</sup> dans une plaque 96 puits (Nunc™ MicroWell™ 96-Well, Nunclon Delta-Treated, Flat-Bottom Microplate) dans 100µL de DMEM et incubées pendant 24h à 37°C, 5 % de CO<sub>2</sub> pour permettre l'adhésion cellulaire. Elles ont ensuite été exposées à 100µL de suspension de NTC dans l'eau DI + CMC,

permettant d'atteindre différentes concentrations finales de NTC dans les puits : 0, 1, 5, 10, 20 ou 50µg/ml (et toujours 50µg/ml de CMC). Les suspensions ayant été préparées plusieurs jours à l'avance, elles ont été placées 10min dans un bain à ultrasons avant utilisation.

Deux méthodes ont été utilisées pour évaluer la viabilité. La première méthode consiste en un dosage de l'absorbance d'une espèce présente dans le surnageant après utilisation du test WST-1 (Kit Ab65475, Abcam). Ce test repose sur une réaction membranaire entre un sel de tétrazolium et d'un NADH (Nicotinamide Adénine Dinucleotide + Hydrogène) par l'intermédiaire du 1-méthoxy-5-méthylphénazinium méthyle sulfate, ou 1-méthoxy-PMS. La production de NADH est directement reliée à la production d'ATP (activité mitochondriale) et témoigne de la quantité de cellules présentes dans le milieu. Le formazan qui résulte de cette réaction peut être dosé dans le surnageant par absorbance. Le schéma présenté par la Figure 2-22 reprend les différentes réactions en jeu.

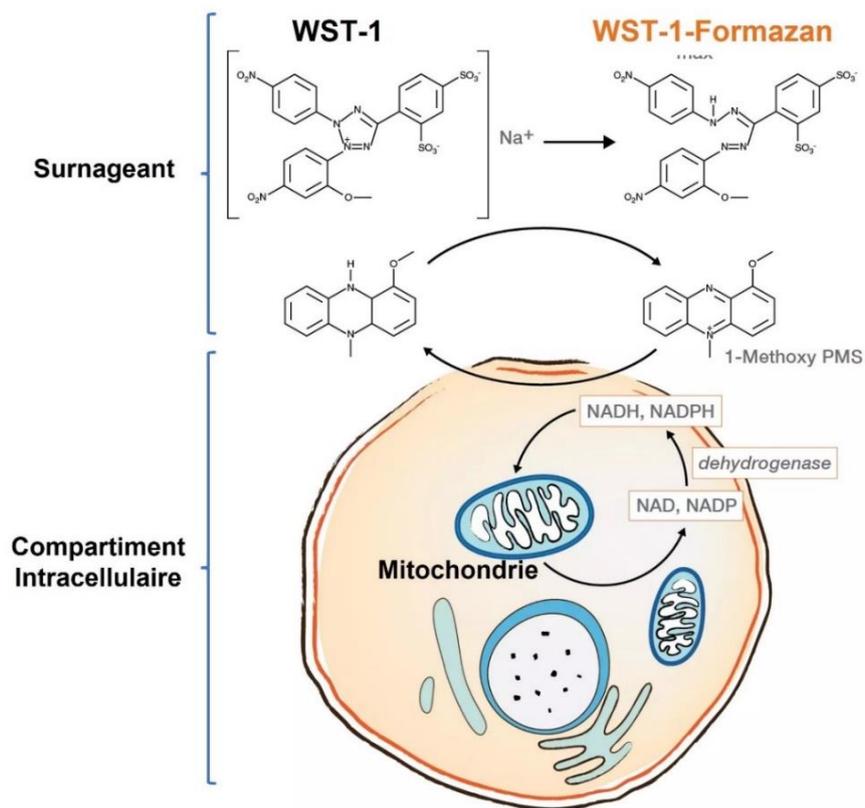
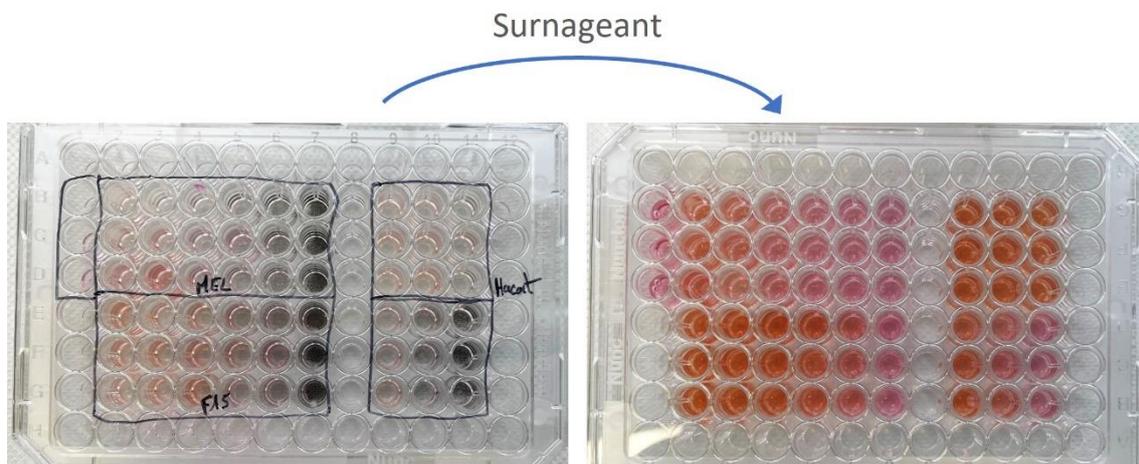


Figure 2-22 Schéma des réactions menant à la formation du WST-1 formazan, utilisé pour évaluer la viabilité cellulaire.

Après 24h d'exposition, les cellules ont été rincées avec du PBS ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), puis 100 $\mu\text{L}$  de DMEM contenant 10 $\mu\text{L}$  de WST-1 ont été ajoutés dans chaque puits. La plaque a été placée pendant 4h à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de  $\text{CO}_2$ . À l'issue, le surnageant contenu dans les puits a été transvasé dans une nouvelle plaque 96 puits, l'absorbance a ensuite été mesurée à 450nm puis 650nm en utilisant le lecteur de microplaque CLARIOstar Plus Spectrophotomètre (BMG-Labtech, Allemagne). Le bruit de fond correspondant à la moyenne des puits dépourvus de cellules a été soustrait à chaque autre valeur, puis le ratio  $\text{DO}_{450\text{nm}}/\text{DO}_{650\text{nm}}$  a été calculé. Les résultats obtenus des cellules traitées ont été normalisés par rapport à ceux des cellules non traitées (représentant une viabilité cellulaire de 100%). Nous avons choisi le test WST-1 plutôt qu'un test plus classique comme le MTT, pour deux raisons. Dans un premier temps, il a été montré que des NTC monoparois pouvaient interagir avec le réactif utilisé dans le test MTT et fausser les résultats [263]. Deuxièmement l'utilisation d'un dosage du surnageant comme c'est le cas pour le test WST-1 nous a permis de nous affranchir d'un biais relatif à l'exposition au NTC. Comme le montre la Figure 2-23, les NTC même après rinçage ont adhéré au fond des puits, ce qui aurait faussé un dosage direct.



*Figure 2-23 Photographie d'une plaque de culture contenant des cellules exposées aux différentes concentrations de NTC 0, 1, 5, 10, 20 ou 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  (à gauche) et d'une nouvelle plaque contenant le surnageant prélevé après utilisation du test WST-1 sur ces cellules (à droite). Les zones noircies correspondent à une adhésion de NTC au fond des puits.*

La seconde méthode utilisée repose sur le dénombrement des cellules, après exposition au NTC, grâce à un marquage des noyaux à l'iodure de propidium (PI) après fixation du tapis cellulaire (tampon PLP). Après 24h d'exposition aux NTC, les cellules ont été rincées avec du

PBS, puis 100µL de DMEM contenant du PI à [100µM] (P4864, Sigma Aldrich) sont ajoutés dans chaque puits. La plaque entière est alors observée avec un microscope inversé Incucyte (Sartorius, Allemagne). Les images acquises dans le canal rouge ( $\lambda_{ex}$  567-607nm;  $\lambda_{em}$  622-704nm; 800ms; objectif 10X : 1,24µm/pixel) sont analysées en utilisant un masque de comptage afin de déterminer le nombre de noyaux. Les images obtenues en contraste de phase et en fluorescence ont été superposées.

### 2.3.8.c. Contrôle de l'influence de la CMC sur la viabilité cellulaire

Avant de discuter d'un éventuel effet cytotoxique des NTC sur les différentes lignées cellulaires étudiées, nous avons dans un premier temps vérifié celui de la CMC. Plusieurs solutions dans l'eau DI ont été préparées en cascade pour obtenir des concentrations finales de 10, 25, 50, 100, 500µg/ml, et filtrées à travers un tamis de 0,2µm. Les cellules ont ensuite été exposées à 100µL de ces solutions dans du DMEM pendant 24h et le test WST-1 a été utilisé pour évaluer la viabilité cellulaire. Les résultats sont présentés Figure 2-24. La viabilité cellulaire reste proche de 100% et l'analyse statistique a montré que les différences entre les points d'une même lignée ne sont pas significatives. Nous avons donc écarté un effet cytotoxique de la CMC sur les cellules étudiées.

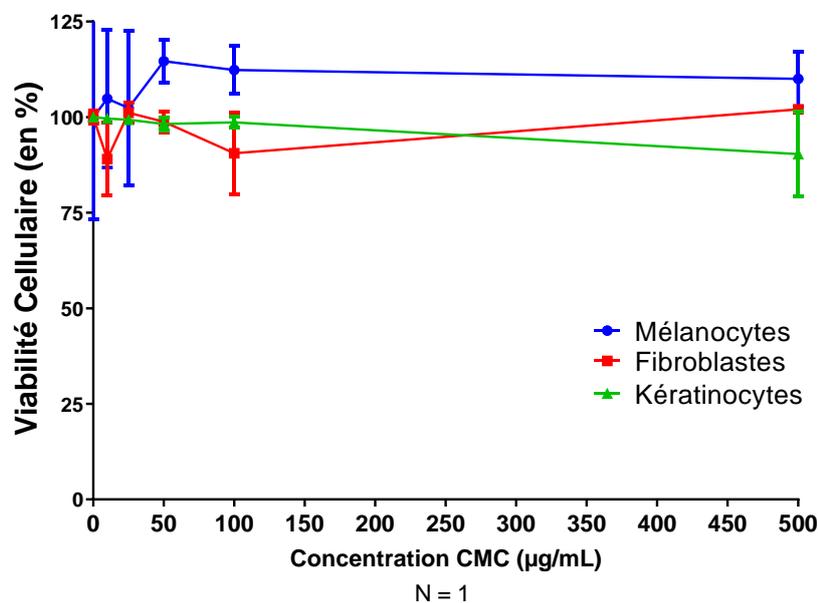


Figure 2-24 Mesure de la viabilité des trois lignées cellulaires en fonction de la concentration en CMC à l'aide du test WST-1. Les barres d'erreur représentent les écarts-types. n = 1 triplicata.

### **2.3.9. Analyses statistiques**

Dans le chapitre IV, c'est le logiciel GraphPad Prism 5.04 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) qui a été utilisé pour les analyses statistiques. Les données ont été analysées par ANOVA à un facteur avec un intervalle de confiance de 95%, suivi du test des comparaisons multiples de Tukey, ou des comparaisons contre le contrôle de Dunnett. Le logiciel GraphPad procède automatiquement à la validation des hypothèses de l'ANOVA.



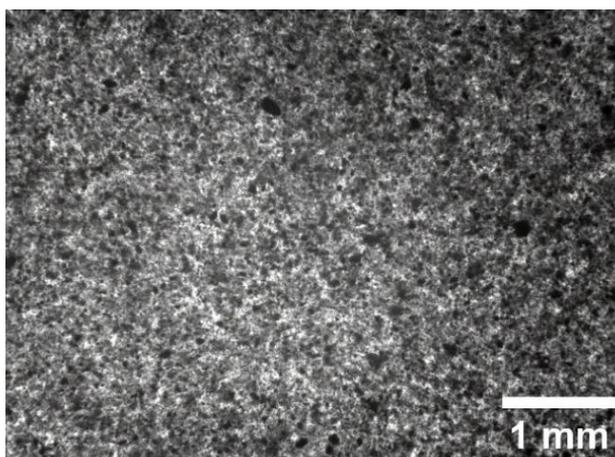
# **Chapitre 3**

## **Caractérisations des plateformes nanocomposites**



L'élaboration préliminaire des plateformes nanocomposites a fait l'objet de travaux antérieurs [3]. Ces travaux avaient notamment permis de sélectionner l'utilisation d'un moule plutôt qu'un emporte-pièce pour conditionner les dimensions des échantillons ainsi que de sélectionner un simple séchage sous air sur un support adapté. Plusieurs séries de mesures des propriétés électriques des hydrogels nanocomposites avaient été réalisées, et avaient montré la difficulté de déterminer le seuil de percolation des NTC dans le système triphasique eau/agarose/NTC, ainsi que le faible impact des NTC sur la conductivité [4]. Dans les travaux présentés ici, la méthode de préparation des nanocomposites ainsi que leurs mises en forme ont été utilisées à l'identique dans un premier temps pour des applications de délivrance de molécules *ex vivo* par électroporation. Des observations préliminaires de l'aspect des échantillons après coulage et après séchage ont conduit à des modifications du protocole de préparation.

En effet, l'observation à l'œil nu de premiers échantillons nanocomposites synthétisés lors de ces travaux ont mis en évidence des agglomérats de NTC n'ayant pas été dispersés. Nous avons précisé ces observations grâce à un microscope par transillumination, qui nous a permis d'observer la dispersion d'un échantillon AGR+NTC brut de coulée par transparence (Figure 3-1). La texture de l'échantillon semble granuleuse, on peut distinguer de nombreux agglomérats noirs disséminés dans tout son volume, correspondant à des agglomérats de NTC mal dispersés.



*Figure 3-1 Observation macroscopique de la dispersion des NTC par transillumination au sein d'un échantillon AGR+NTC brut de coulée.*

Le but premier de l'ajout des NTC dans l'hydrogel est de fournir un réseau percolant conducteur, pour améliorer la conduction électrique du nanocomposite et faciliter

l'application du champ électrique pulsé. De ce fait, la distribution des NTC dans le matériau se doit d'être la plus homogène possible. De plus, l'effet de percolation des NTC au sein du polymère n'a pas pu être mis en évidence dans les travaux de caractérisations électriques antérieurs, avec ce protocole de préparation [4]. Dans le but de réduire la taille et le nombre d'agglomérats de NTC restants dans la suspension malgré les différentes étapes de dispersion, nous avons cherché à améliorer leur dispersion dans le composite. Plutôt que de fonctionnaliser les nanotubes, nous avons ajouté de la carboxyméthyle cellulose (CMC) un dispersant des NTC connu dans la littérature [206], et couramment employé dans l'équipe NNCED au CIRIMAT. La CMC est un polysaccharide dérivé de la cellulose, pouvant interagir de manière non covalente avec les NTC pour stabiliser leur dispersion dans l'eau. D'après les travaux de Riou et coll. sur des NTC monoparois, les chaînes de cellulose de la CMC s'adsorbent sur les NTC par liaisons de type Van der Waals, et les groupements carboxylates, plus hydrophiles et chargés négativement, contribuent à une répulsion électrostatique entre les particules [264]. La CMC a été introduite ici en concentration massique égale à celle des NTC.

D'autre part, dans le but de réaliser des plateformes de délivrance pouvant être utilisées avec différents principes actifs, nos nanocomposites sont séchés après coulage, et non préparés directement avec le principe actif (PA). La température nécessaire à la solubilisation de l'agarose (AGR) est de toute façon trop élevée pour envisager cette approche (90°C), sans détériorer les molécules actives. Ce mode de préparation est issu de réflexions sur l'utilisation, et surtout la commercialisation des plateformes, beaucoup plus en aval du projet. D'un point de vue réglementaire, le fait de ne proposer qu'un support et non un objet contenant un PA, en fait un dispositif médical (DM) et non un médicament. La réglementation des DM est moins contraignante. Le PA peut être ajouté dans une plateforme déjà coulée, par imprégnation des plateformes sèches dans un milieu tamponné de concentration connue en PA. Le mode de séchage sous air (SSA) avait été choisi lors de précédents travaux [2, 3], car il permettait un meilleur regonflement et surtout une mise en œuvre plus simple, par rapport aux autres techniques testées, à savoir la lyophilisation et le séchage par CO<sub>2</sub> supercritique. En effet, la déformation engendrée s'est avérée être un paramètre critique pour les expérimentations *ex vivo*. Les plateformes ayant des géométries et des tailles inhomogènes, ceci ajoutait un biais supplémentaire à des expériences qui comportent déjà une grande variabilité biologique.

Pour pallier ce problème, nous avons séché les plateformes dans les mêmes conditions de température, mais en leur appliquant une charge d'environ 0,7g par échantillon, sous la forme d'une seconde plaque inox de 12,5cm x 2,5cm et 8,5g, afin de contraindre leurs déformations durant le séchage. Nous avons appelé ce type de séchage « séchage sous charge » (SSC).

En parallèle, la question de la conservation des plateformes brutes de coulée (BC) pour des utilisations ultérieures s'est aussi posée durant ces travaux. La préparation et la manipulation des plateformes ne se faisant pas en milieu stérile, des contaminations biologiques ont été observées sur les échantillons d'AGR et AGR + CMC au bout de plusieurs mois de stockage dans l'eau DI à 4°C. Cette contamination existe probablement aussi sur les échantillons contenant des NTC, mais elle n'est pas aussi visible puisque ces échantillons sont noirs.

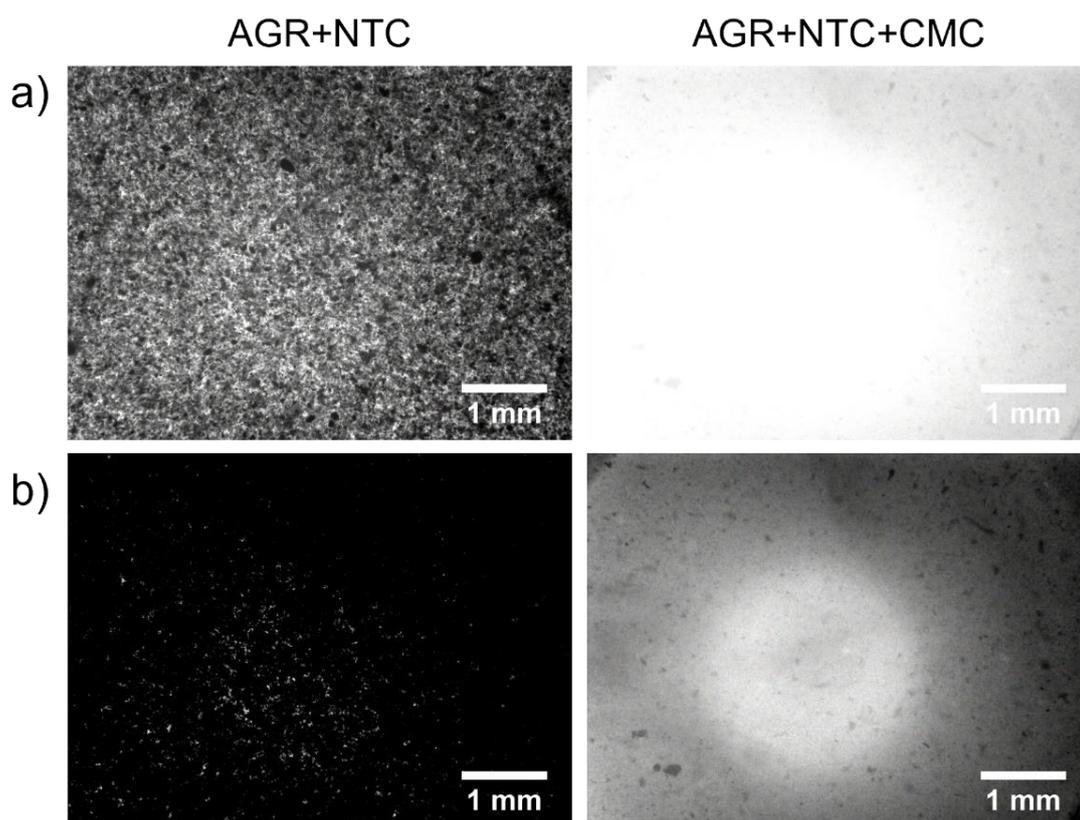
Nous avons essayé de stocker ces échantillons à -20°C pour tenter de ralentir ou même d'éviter cette contamination. Or, lors de la décongélation, l'aspect des plateformes était beaucoup plus spongieux. Ces échantillons congelés puis séchés sous air (notés CSA) ont des dimensions qui semblaient beaucoup mieux conservées que lors d'un séchage sous air classique. Ces observations nous ont poussés à également mesurer et comparer les changements de propriétés engendrés par cette étape de congélation, notamment en termes de conservation des dimensions et de capacité de stockage.

Le but des travaux présentés dans ce chapitre est de fournir des caractérisations plus poussées du matériau nanocomposite AGR + NTC, et ainsi déterminer les directions d'améliorations qui doivent être prises. Dans un premier temps, la caractérisation de la morphologie des nanocomposites a été approfondie. La caractérisation des propriétés correspondant à la fonction réservoir des plateformes a été ensuite abordée au travers des mesures des capacités de stockage et des cinétiques de restitution d'un PA. Des essais mécaniques ont été réalisés pour évaluer la résistance des plateformes. Enfin, dans la continuité des travaux précédents, nous nous sommes intéressés à leurs propriétés de conduction électrique, correspondant à leur fonction d'électrode, notamment en augmentant la proportion de NTC. Au travers des différentes caractérisations présentées, la pertinence des modifications de protocole apportées sera discutée, en prêtant une attention particulière à l'influence des NTC.

### 3.1. Caractérisations de la morphologie des nanocomposites.

#### 3.1.1. Dispersion des suspensions de NTC – effet de la CMC

Dans un premier temps, nous avons répété les observations présentées en Figure 3-1 sur un échantillon brut de coulée contenant la même quantité de NTC et de la CMC, et nous avons comparé les résultats. Les clichés Figure 3-2 AGR+NTC a et b correspondent au même échantillon que celui de la Figure 3-1, seul le contraste a été modifié entre les deux. L'ajout de la CMC a rendu l'échantillon beaucoup plus transparent à la lumière, comme le montre le cliché Figure 3-2 AGR+NTC+CMC a. L'augmentation du contraste a montré que la CMC avait permis d'éliminer une grande partie des agglomérats de NTC, même si un certain nombre persiste (Figure 3-2 AGR+NTC+CMC b). Nous avons ensuite essayé d'évaluer cet effet plus en détail.



*Figure 3-2 Observations macroscopiques des plateformes nanocomposites AGR+NTC et AGR+NTC+CMC par transillumination. Les séries a) et b) représentent les mêmes échantillons à la différence que le contraste est adapté à AGR+NTC dans la série a) et à AGR+NTC+CMC dans la série b).*

### 3.1.1.a. Mesures de turbidité

La stabilité de la suspension de NTC avant mélange avec l'agarose a été étudiée par la mesure de la turbidité. Cependant, les suspensions utilisées pour les composites étaient trop concentrées pour observer directement l'effet de stabilisation de la CMC. Sur la Figure 3-3, les courbes jaune et verte à 250mg/l sont superposées à zéro, signifiant qu'il n'y a aucune transmission, quelle que soit la suspension. Nous avons répété l'opération avec des suspensions diluées d'un facteur 25. La courbe rouge représente l'évolution de la transmission au sein d'une suspension de NTC à 10mg/l. Celle-ci augmente linéairement jusqu'à 35% pendant la première heure puis continue d'augmenter plus lentement pour atteindre les 60% de lumière transmise au bout de 24h. Cette évolution est associée à la floculation/sédimentation progressive des NTC au fond du flacon, ce qui permet à plus de lumière de traverser l'échantillon. Dans le cas de la suspension à 10mg/L avec CMC, la transmission se stabilise en une ou deux heures à une valeur beaucoup plus faible (20%), puis évolue très peu par la suite (25% à 24h). Les NTC sont mieux dispersés avec la CMC et ils le restent au moins 24h, sachant que les suspensions sont utilisées au maximum une heure après préparation, et restent peu de temps sans agitation.

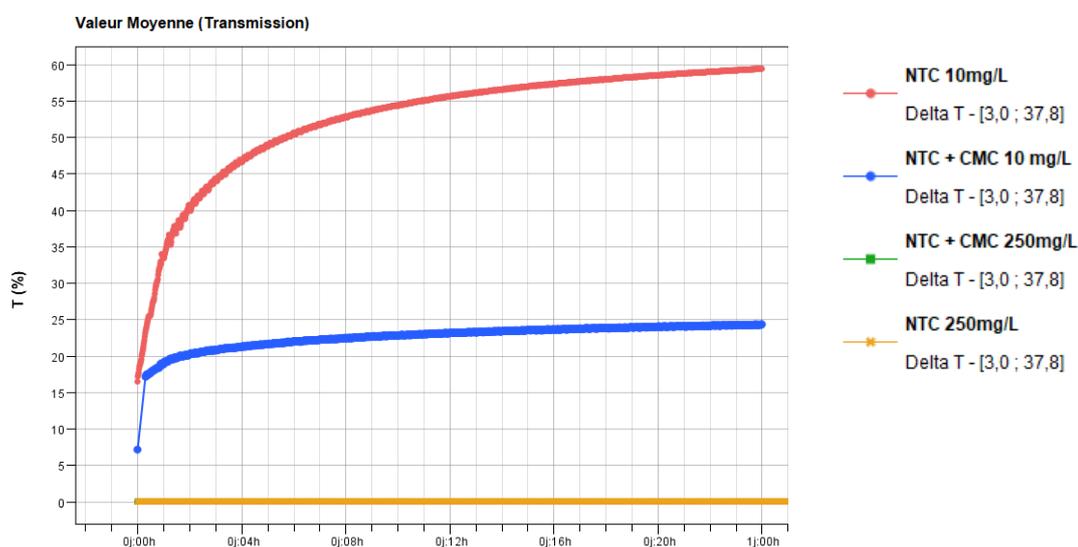
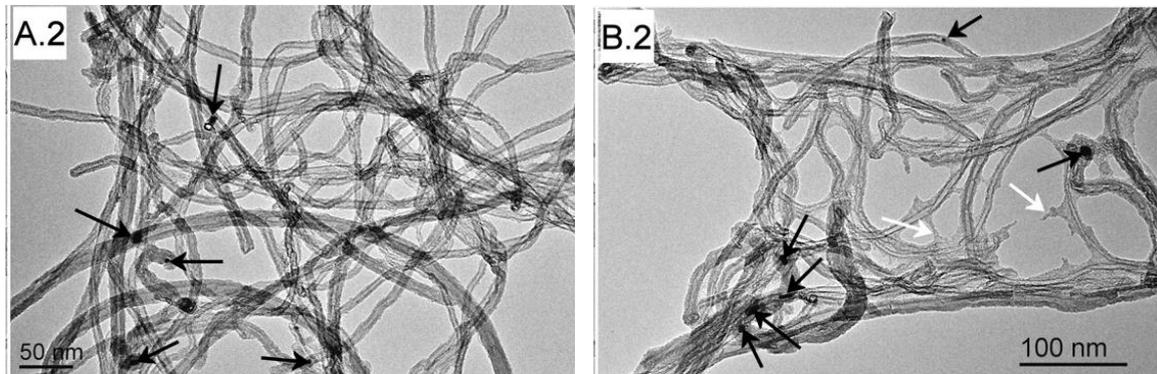


Figure 3-3 Évolution de la turbidité de suspensions NTC dans l'eau DI en fonction du temps, avec ou sans CMC, à 10mg/l et 250mg/l.

Les suspensions de NTC utilisés pour la synthèse des plateformes sont trop concentrées pour pratiquer des mesures de turbidité, mais des mesures sur des suspensions diluées ont permis de mettre en avant l'effet stabilisant des NTC attendus de la CMC.

### 3.1.1.b. Observations au MET des suspensions

Il est rapporté dans la littérature et notamment dans les travaux de Bourdiol et coll. [206] que la CMC a tendance à former une gaine autour des faisceaux de NTC, Figure 3-4 B.2.



*Figure 3-4 Comparaison de micrographies MET de NTC multiparois (MWCNT) bruts (dispersion mécanique) (A), et de MWCNT stabilisés par la CMC (dispersion mécanique et fonctionnalisation non covalente) (B), à fort grossissement (2). Les flèches noires indiquent la présence de nanoparticules catalytiques, alors que les flèches blanches indiquent la présence de l'agent dispersant (CMC) enveloppant les MWCNT. Adapté de Bourdiol et coll. [206].*

Les observations au MET que nous avons pu réaliser sur des suspensions de NTC avec et sans CMC n'ont cependant pas permis d'observer ces gaines, malgré une concentration initiale en NTC et CMC supérieure dans nos travaux (Figure 3-5). Cependant, on remarque de plus nombreux et plus fins faisceaux de NTC lorsque la CMC est présente, témoignant de son action dispersante. On peut également observer sur ces micrographies des amas de carbone désorganisés, pointés par des flèches noires. Au sein de ces objets, on remarque des points au contraste plus sombre. Ils correspondent à des nanoparticules de catalyseur ayant été encapsulées dans des coques de carbone lors de la synthèse des NTC par CCVD [265]. Ces coques en carbone protègent les nanoparticules de catalyseur métallique de la dissolution par ajout d'acide chlorhydrique lors de l'étape d'extraction des NTC, après la synthèse. C'est pourquoi on en retrouve dans la suspension de NTC lors de la synthèse des nanocomposites. Les agglomérats de carbone désorganisé semblent pouvoir être comparés à du graphène froissé [266, 267]. L'impact de ces constituants sur les propriétés du matériau, et notamment ses propriétés électriques, est considéré comme négligeable et n'a pas été étudié dans ces travaux. Cependant, il pourrait être intéressant de comparer les propriétés de conduction électrique des nanocomposites que nous utilisons ici, avec celles de nanocomposites préparés

à base de suspensions de NTC purifiés de ce carbone désorganisé et de ces nanoparticules de catalyseur.

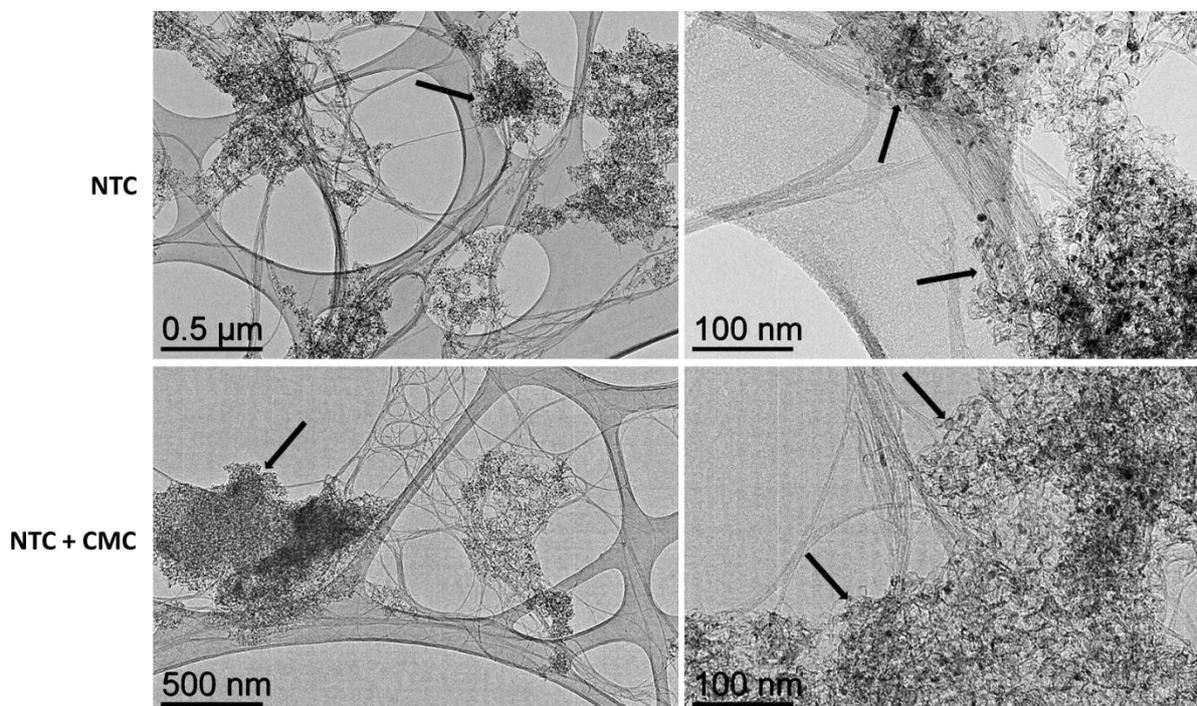


Figure 3-5 Observations MET de suspension de NTC avec et sans CMC. Les flèches noires pointent des agglomérats de carbone dit « désorganisé ».

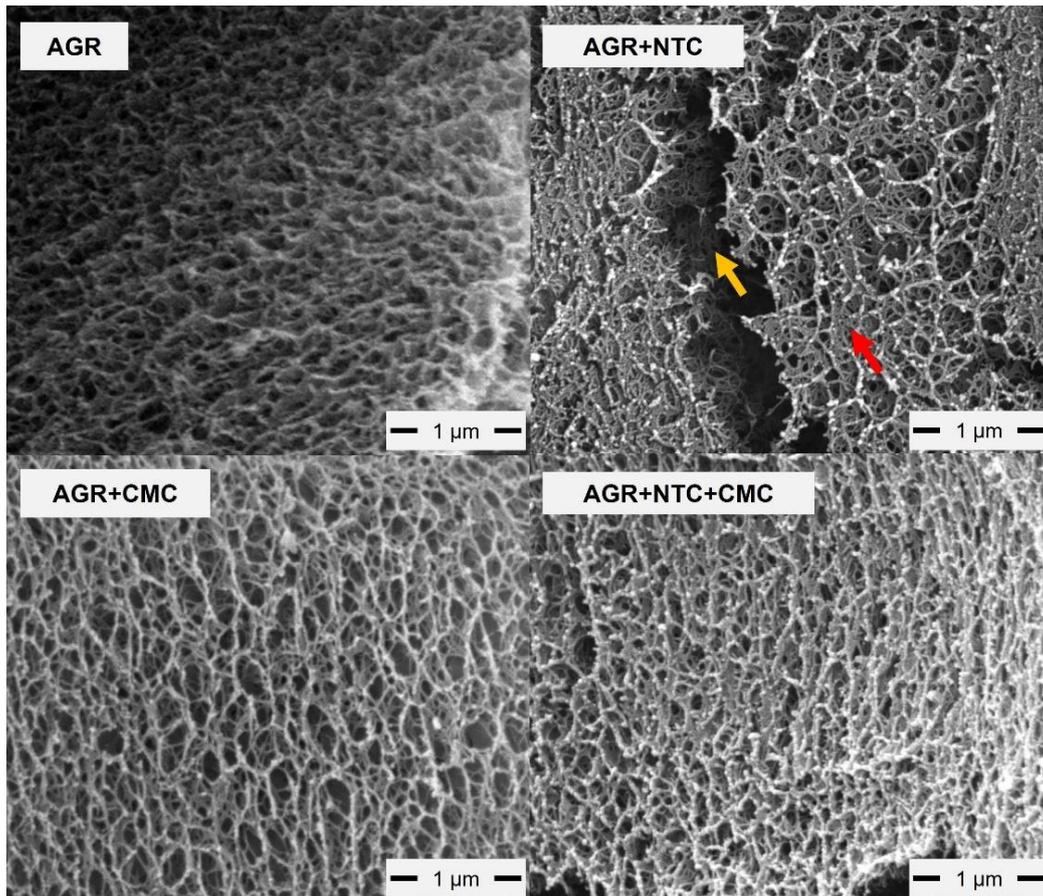
Les observations au MET nous ont permis de prendre conscience de la réelle composition de nos échantillons de NTC (NTC + carbone désorganisé) et de vérifier visuellement l'effet de la CMC. Par la suite, dans le souci de montrer un éventuel effet de cette modification de la composition, les plateformes nanocomposites avec et sans NTC et avec et sans CMC ont été caractérisées et comparées.

### 3.1.2. Caractérisations de la microstructure des nanocomposites

#### 3.1.2.a. Observations des microstructures au Cryo-MEB

La difficulté principale que nous avons rencontrée ici a été de pouvoir caractériser la microstructure à l'état hydraté. En effet, les principaux outils d'observation et de caractérisation de la porosité font appel à un vide poussé et la présence d'eau n'est pas adaptée pour les appareils de mesure. La méthode d'observation cryo-MEB nous a permis d'observer la structure de nos matériaux en conditions d'utilisation. Grâce à une cryofixation haute pression, la structure est gelée très rapidement, évitant ainsi la formation de glace cristallisée, pouvant texturer l'échantillon. Les observations se font dans une chambre à basse

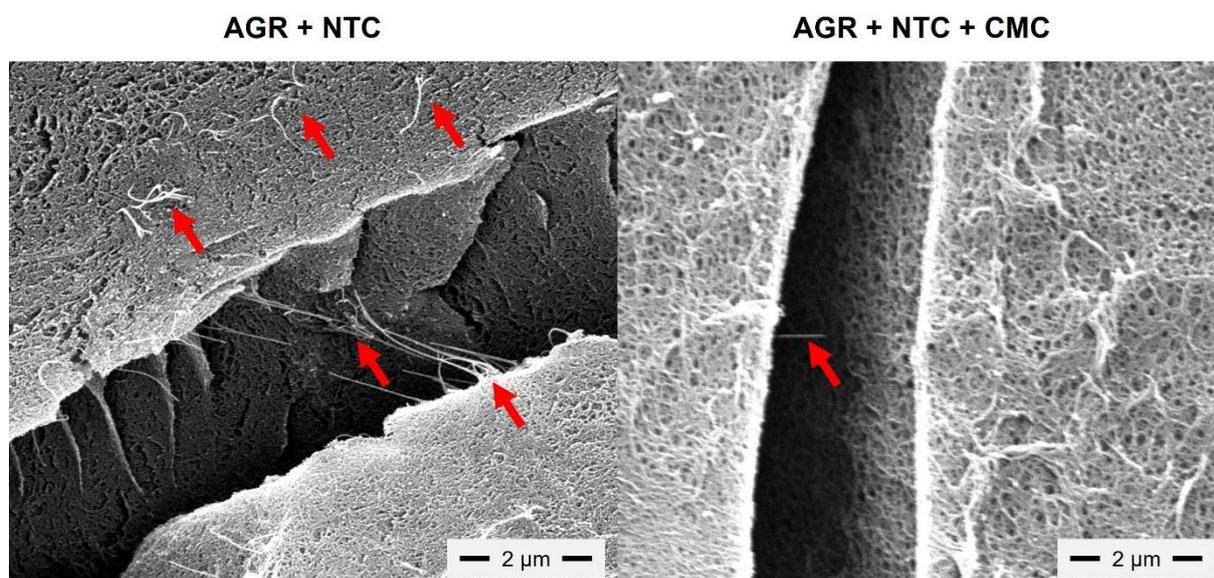
température, après avoir sublimé et métallisé la surface de l'échantillon. Un échantillon de chaque composition, agarose (AGR), AGR + CMC, AGR + NTC et AGR + NTC + CMC, ayant subi un séchage sous charge (SSC) a été observé (Figure 3-6). Les micrographies ont montré que la microstructure des échantillons se présentait comme un maillage d'agarose formant des pores interconnectés. Ces micrographies sont comparables à ce que l'on peut trouver dans la littérature [249, 268].



*Figure 3-6 Observations Cryo-MEB de la microstructure d'échantillons nanocomposite des quatre compositions différentes, ayant été séchés sous charge (SSC) avant regonflement 48h dans l'eau DI.*

On remarque que ce maillage semble « plein » en surface sur l'échantillon AGR+NTC. Un exemple est pointé par une flèche rouge sur la Figure 3-6 AGR+NTC. Cette apparence est probablement liée à la métallisation ou à la préparation de l'échantillon, puisque la microstructure à l'intérieur d'une faille, pointée par la flèche jaune, est similaire à ce qu'on observe sur les autres échantillons. Il est très difficile de différencier l'agarose des NTC dispersés et encore moins de la CMC. En effet, à la fois l'agarose et les NTC se présentent sous formes de structures filamenteuses. Cependant, dans le cas des échantillons contenant

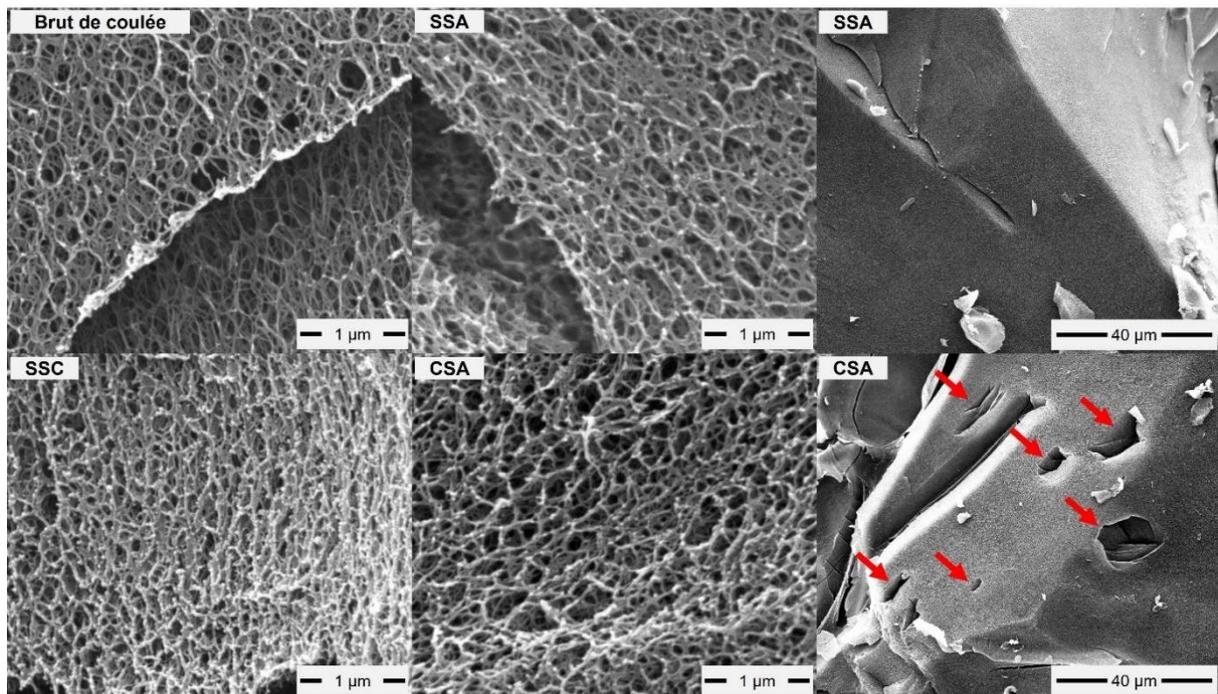
uniquement de l'agarose et des NTC, il est possible d'observer des assemblages de NTC, marqués par des flèches rouges, émergant de la surface, comme arrachés lors de la préparation de l'échantillon (Figure 3-7, à gauche). Ils apparaissent avec un fort contraste, car meilleurs conducteurs électroniques que les polysaccharides comme l'agarose, et sont rassemblés en faisceaux, organisation typique des NTC, comme en témoignent les observations MET (Figure 3-5). Lorsque la CMC est ajoutée dans la composition, ces objets sont beaucoup plus rares et plus petits. Il est tout de même possible d'observer ces faisceaux de NTC au niveau des fractures (Figure 3-7, partie droite).



*Figure 3-7 Observations Cryo-MEB de la microstructure d'échantillons de composition AGR+NTC à gauche et AGR+NTC+CMC à droite, séchés sous charge (SSC) avant regonflement 48h dans l'eau DI. Mise en évidence de l'effet dispersant de la CMC.*

L'influence des trois types de séchage, séchage sous air (SSA), séchage sous charge (SSC) et congélation puis séchage sous air (CSA) a aussi été évaluée grâce à des échantillons de composition AGR+NTC+CMC en comparant ces échantillons après regonflement à brut de coulée (BC), n'ayant pas été séché et regonflé comme les autres (Figure 3-8). La microstructure est globalement similaire pour tous les échantillons. Le maillage décrit par les chaînes d'agarose semble cependant plus resserré lorsque l'échantillon a subi un séchage. La structure des échantillons SSC semble encore plus resserrée, comparée à l'échantillon SSA. Il pourrait être intéressant de quantifier la taille moyenne des chaînes de polymères entre deux nœuds pour comparer les réseaux. Cette analyse nécessiterait plus d'images par échantillon et surtout plusieurs échantillons par groupe. Il faudrait également améliorer la résolution des

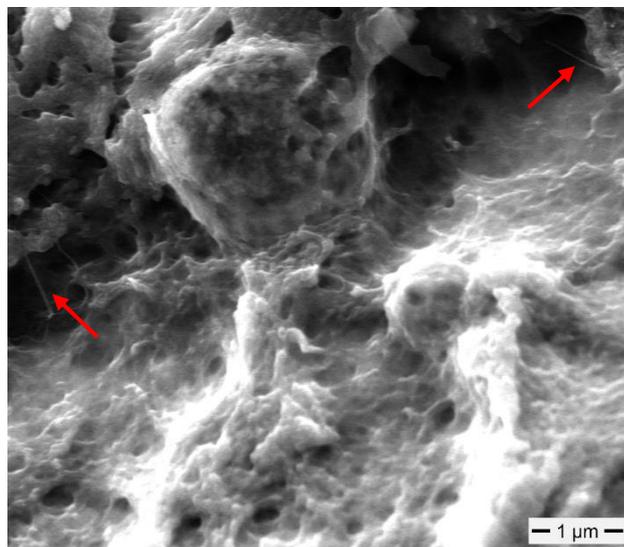
images lorsqu'il n'y a pas de NTC, et peut-être travailler sur des coupes fines, plutôt que sur des massifs, pour s'affranchir d'une partie de la profondeur.



*Figure 3-8 Observations Cryo-MEB de la microstructure d'un échantillon de nanocomposite AGR+NTC+CMC brut de coulée, et d'échantillons de même composition ayant subi un des trois types de séchage avant regonflement 48h dans l'eau DI.*

Des observations à plus faible grossissement ont mis en évidence des cavités de quelques microns dans la structure des échantillons CSA, pointées par les flèches rouges (Figure 3-8 en bas à droite). Dans ses travaux de thèse, J.F. Guillet impute ce type de texturation à des bulles encore présentes dans la solution avant l'étape de coulage [2]. Il pourrait effectivement s'agir d'un biais de manipulation que l'on pourrait vérifier en imageant un autre échantillon du même type provenant d'un autre lot de préparation. L'autre hypothèse serait celle de la formation de glace cristallisée dans l'échantillon pendant l'étape de congélation. Cependant, outre l'aspect amorphe/cristallisé, la taille et la régularité de la texturation sont très différentes de ce que rapporte J.F. Guillet, ou de ce que l'on trouve dans la littérature pour des échantillons lyophilisés contenant de l'agarose [269, 270]. Pour identifier la source de ces cavités, il pourrait également être intéressant de visualiser l'effet de la vitesse de congélation sur la texturation, en comparant des échantillons bruts de coulée congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$  à des échantillons bruts de coulée trempés dans l'azote liquide.

Enfin, le cliché Figure 3-9 montre la tranche d'un échantillon de plateforme nanocomposite sec, cryofracturé dans l'azote liquide avant d'être métallisé et observé par microscopie électronique à balayage classique.



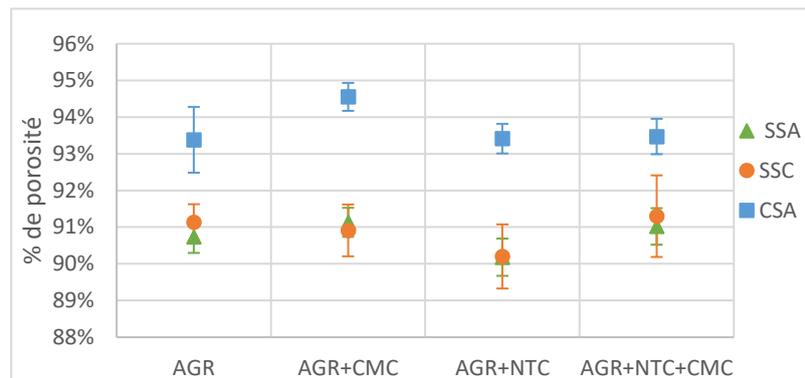
*Figure 3-9 Observation MEB de la tranche d'un échantillon AGR+NTC+CMC sec. Des faisceaux de NTC peuvent être observés (flèches rouges).*

On distingue par la rugosité de la surface le maillage caractéristique des gels d'agarose, mais rien de comparable aux clichés précédents, les pores semblent bouchés. L'agarose est un hydrogel physique dont le maillage qu'on observe au cryo-MEB se forme en présence d'eau lors du refroidissement. Pendant le séchage, le recul de l'interface air/eau à l'intérieur de l'échantillon génère l'effondrement des chaînes polymériques entre elles, rendant le xérogel final plus dense. Ce type de comportement des gels séchés à l'air a déjà été observé dans la littérature, notamment par J.F. Guillet dans ses travaux de thèse, et par Conzatti et coll. sur des gels à base d'alginate et de chitosan [271]. Sur cette micrographie, on ne voit plus que la rugosité des mailles entassées les unes sur les autres. Ces observations confirment la nécessité de caractériser les échantillons dans leur état hydraté.

### *3.1.2.b. Evaluation de la porosité par la méthode d'Archimède*

La porosité a pu être estimée grâce à la méthode d'Archimède. Les échantillons sont pesés secs, pour identifier la masse de matrice nanocomposite, puis regonflés dans l'eau DI pour identifier la masse d'eau réabsorbée, et donc le volume d'eau qui est considéré comme équivalent au volume de porosité. La dernière étape consiste en la détermination du volume d'eau déplacé lorsqu'on y immerge l'échantillon regonflé, nous donnant accès au volume total

de celui-ci. Les résultats sont donnés en pourcentage de porosité par rapport au volume total, en fonction de la composition et du type de séchage utilisé Figure 3-10.



*Figure 3-10 Porosités moyennes des plateformes nanocomposites regonflées par composition et type de séchage. Analyses statistiques : Kruskal-Wallis avec post test de Dunn. Seules les différences entre les moyennes CSA vs SSA et CSA vs SSC sont significatives avec  $p < 0.001$ . Les barres d'erreur représentent les écarts-types.  $n = 7$ .*

Les mesures présentées ici ont montré que la porosité diminue après un cycle de séchage/regonflement, et ce indépendamment de la composition d'après les analyses statistiques. Le type de séchage utilisé a lui plus d'impact sur la porosité : les échantillons SSA ou SSC recouvrent une porosité d'environ 91% après regonflement, là où les échantillons CSA sont à 94% ( CSA vs SSA :  $p < 0.001$ ; CSA vs SSC :  $p < 0.001$ ).

La quantité d'eau présente lors de la synthèse représente 97,6% du volume total. De ce fait, si nous considérons ce volume comme équivalent à celui de la porosité initiale, il est possible d'en déduire que les échantillons regonflés sont plus denses que les échantillons bruts de coulée, mais que la congélation limite cette densification. Le rapprochement des chaînes polymères lors de l'affaissement de la structure pendant le séchage doit être à l'origine de nouvelles interactions entre ces chaînes, dont certaines sont irréversibles, limitant le regonflement. Ce résultat est cohérent avec l'observation faite sur la microstructure des nanocomposites regonflés, où le maillage semble plus resserré.

*Les observations au cryo-MEB nous ont permis de visualiser la microstructure de nos nanocomposites, mais n'ont pas permis de mettre en avant de différence structurale majeure induite par le séchage ou la composition. Nous avons cependant pu vérifier au niveau microscopique l'effet dispersant de la CMC. Les mesures de porosité ont montré une*

*densification globale des plateformes après un cycle de séchage/regonflement, limitée par l'étape de congélation.*

*Il manquerait une mesure de la distribution de tailles de pores pour compléter ces caractérisations de la microstructure. Dans la littérature, une taille moyenne de pore d'environ 80nm avait pu être déterminée pour des hydrogels d'agarose à 2,5%*m*, par résonance magnétique nucléaire [272] et par absorbance [273] ce qui semble correspondre à ce que l'on observe sur les clichés cryo-MEB. Des mesures par AFM (Atomic Force Microscopie) avaient déterminé une taille de pore plutôt centré autour de 400nm pour des hydrogels à 2%*m* et fonction de la concentration [274]. Cependant, ces méthodes nous ont semblé difficiles à utiliser en présence de NTC. Dans le but de facilement mesurer la taille de pores et comparer nos échantillons, nous avons envisagé plusieurs alternatives, mais elles n'ont pas donné de résultat concluant. Parmi elles, des mesures d'inclusion au mercure ont été explorées, mais vite rejetées puisqu'elles reflètent la distribution de tailles de pores des plateformes nanocomposites à l'état sec uniquement. Des observations par tomographie aux rayons X avec un agent de contraste n'ont malheureusement pas eu la résolution nécessaire pour observer les pores. Nous avons également réalisé des essais pour tenter de mesurer les pressions de percée (collaboration IMFT, Toulouse) et ainsi avoir accès à certaines tailles de pores, mais sans succès également. Finalement, à part se tourner vers les premières méthodes citées, une quantification de la taille des pores par traitement d'image à partir de plus nombreux clichés cryo-MEB est ressortie comme étant la solution la plus simple et nous souhaiterions l'approfondir.*

### **3.1.3. Évolution des dimensions des plateformes nanocomposites après un cycle séchage/regonflement**

Le but de cette étude est de déterminer si l'application d'une contrainte ou l'étape de congélation permettaient de réduire le retrait et la déformation des plateformes lors du séchage. Les déformations observées sur les premiers échantillons préparés, séchés sous air (SSA), se répercutent sur le regonflement, ce qui les rend inhomogènes et difficiles à utiliser pour les applications *ex vivo*.

Nous avons quantifié les variations des dimensions des plateformes, lors des différentes étapes de préparation et en fonction du traitement de séchage appliqué. L'évolution de la

masse, de l'épaisseur et du diamètre des plateformes est suivie sur un cycle coulage/séchage/regonflement pour n=7 échantillons, pour les trois modes de séchages : séchage sous air (SSA), séchage sous charge (SSC) et congélation puis séchage sous air (CSA); ainsi que pour les 4 compositions : agarose (AGR), AGR + CMC, AGR + NTC et AGR + NTC + CMC. La masse des échantillons a été déterminée à chaque étape, leur épaisseur et leur diamètre seulement après les étapes de coulage et regonflement, la déformation étant trop importante pour donner une mesure fiable sur les échantillons secs.

### 3.1.3.a. Homogénéité des échantillons bruts de coulée

La première étape a été de montrer l'homogénéité des dimensions des échantillons de départ. Tous provenaient de lots différents en fonction de leur composition et du mode de séchage utilisé par la suite. Le diamètre des échantillons frais (bruts de coulée BC) étant conditionné par le moule, nous l'avons considéré homogène. L'épaisseur est une dimension que nous avons essayé de contrôler pendant la coulée pour la centrer sur 2mm. Nous avons vérifié l'homogénéité de l'épaisseur en comparant les épaisseurs moyennes dans chaque groupe avant séchage. Nous avons choisi de tolérer un écart entre les moyennes de 5%. Le graphique présenté Figure 3-11 montre que cet écart est respecté pour tous les groupes.

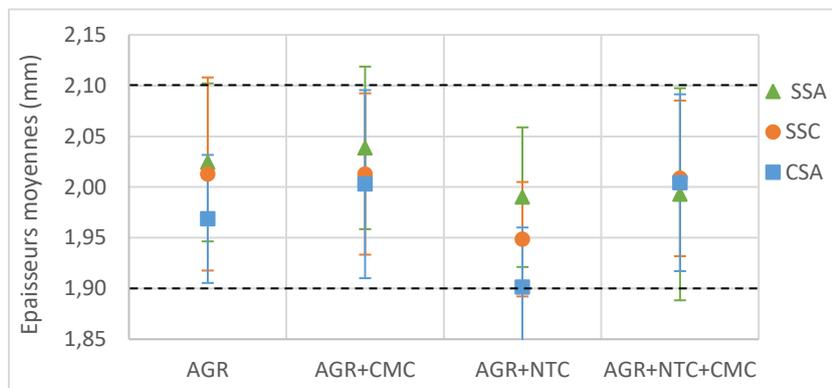


Figure 3-11 Épaisseurs moyennes des échantillons bruts de coulée (BC) groupés par composition et futur type de séchage. Les lignes en pointillés représentent la limite des 5%. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types. n = 7.

La masse des échantillons frais étant une variable non contrôlée ne dépendant que de la composition, nous avons vérifié son homogénéité par analyse statistique ANOVA à un facteur sur R (Figure 3-12). Cependant, aucune variation de masse n'est attendue, puisque les quantités de NTC et CMC introduites dans le mélange correspondent à 1% de la masse d'agarose. L'analyse a confirmé que la composition n'avait pas d'influence sur la masse des

échantillons frais, aucune différence entre les masses n'est significative. La masse de nos échantillons BC, de diamètre contraint à 10mm et d'épaisseur contrôlée à 2,0mm  $\pm$  5% est d'environ sur 150mg.

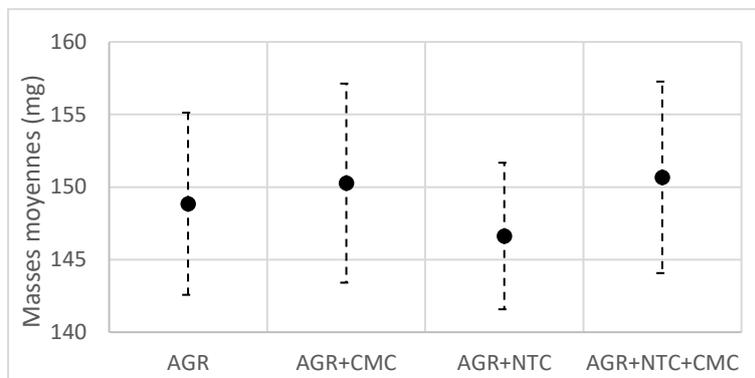


Figure 3-12 Masses moyennes des échantillons bruts de coulée (BC), groupés par composition. Analyse statistique : ANOVA 1 facteur, post test de Tukey. Aucune différence n'est significative. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types.  $n = 7$ .

### 3.1.3.b. Influence de la composition et du type de séchage sur le séchage

Les échantillons de chaque composition sont ensuite séparés en trois groupes de sept, pour être séchés sous air (SSA), sous charge (SSC) ou subir une congélation lente avant d'être séchés sous air (CSA). On étudie l'influence du type de séchage sur la masse sèche, les résultats de ces mesures sont rassemblés Figure 3-13.

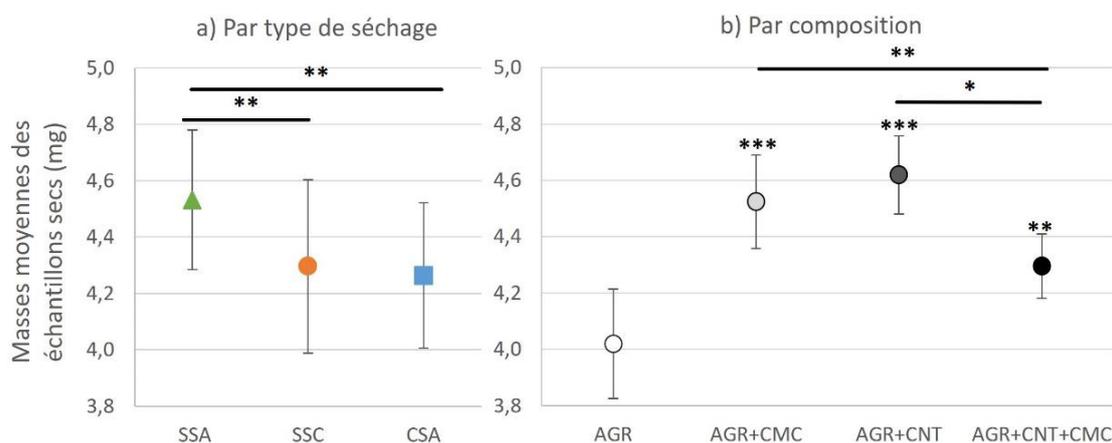


Figure 3-13 Masses moyennes des échantillons secs en fonction a) du type de séchage utilisé quelle que soit leur composition, b) de leur composition quel que soit le mode de séchage. Analyse statistique : ANOVA 2 facteurs avec post test de Tukey. Pour b) comparaison à AGR, puis entre les groupes. Codes : \* =  $p < 0.05$  ; \*\* =  $p < 0.01$  ; \*\*\* =  $p < 0.001$ . Les différences non représentées sont non significatives. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types.  $n = 7$ .

Les échantillons secs ont une masse comprise entre 3,9 et 4,8mg. Par le calcul, on obtient que la masse théorique d'agarose initialement à 25g/l restant dans un échantillon de 10mm de diamètre et 2mm d'épaisseur complètement sec est de 3,9mg. Toujours par le calcul, l'écart de masse engendrée par l'ajout de CMC, de NTC ou des deux ne fait varier la masse théorique que de 4 à 8 centièmes de milligramme, ce qui est négligeable et est bien en dessous de la précision de la balance. Les écarts de masse observés en Figure 3-13 ne sont donc pas directement issus de la masse apportée par le second constituant. Ils pourraient cependant être expliqués par l'eau liée, piégée dans les cavités des doubles hélices d'agarose, qui participe à la cohésion des chaînes par liaison hydrogène [252].

Une analyse thermogravimétrique (ATG) sur un échantillon AGR SSA a permis de vérifier cette hypothèse d'eau liée. Sur le graphe présenté en Figure 3-14, la première perte de masse de 20 à 100°C représente une perte d'environ 6%, liée à l'évaporation de l'eau restante dans l'échantillon, même après 48h de séchage à 30°C. La seconde, à partir de 220°C, correspond à la décomposition de l'agarose [275]. Il est cohérent qu'un séchage lent à 30°C ne soit pas suffisant pour éliminer ces dernières molécules d'eau participant à la structure. De plus, une analyse thermogravimétrique de la poudre d'agarose utilisée pour la préparation de nos échantillons renseignerait sur la quantité d'eau intrinsèquement présente dans l'agarose.

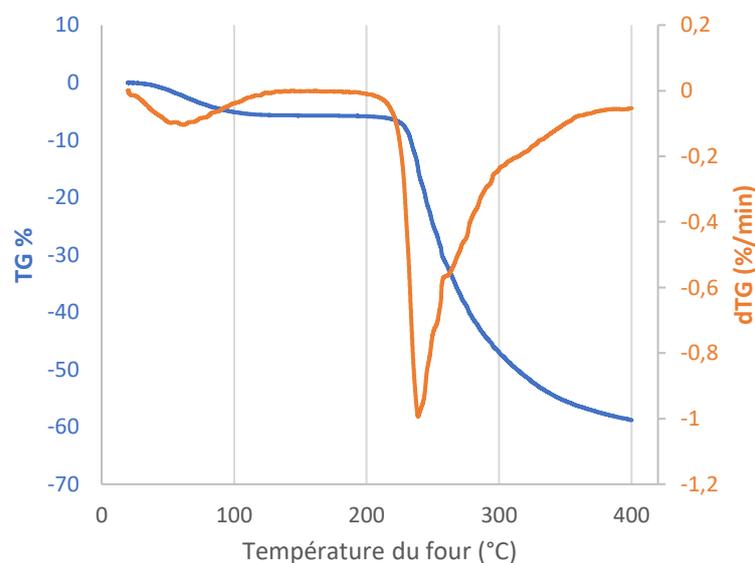


Figure 3-14 Analyse ThermoGravimétrique d'un échantillon sec AGR SSA. Rampe 1°C/min sous azote.

L'analyse statistique des résultats Figure 3-13a a montré des différences significatives entre les séchages. Les échantillons issus d'un séchage sous air (SSA) ont une masse finale

supérieure aux échantillons issus des deux autres types de préparation, séchage sous charge (SSC) et congélation puis séchage sous air (CSA). Le retrait observé sur les pastilles SSA est peut-être à l'origine de cet écart de masse. On pourrait supposer qu'en plus de l'eau liée, l'eau dans les pores a moins la possibilité de s'échapper : si les surfaces externes s'affaissent pendant le séchage, ce qui piégerait l'eau du cœur de l'échantillon. Les interfaces échantillon/air initiales sont moins nombreuses pendant le SSC, mais sa masse finale est légèrement plus faible. Cette observation pourrait être liée à la pression de la plaque contraignant les pores à se vider. Une autre explication pourrait être un effet sur la vitesse de séchage puisque le SSA est plus rapide que le SSC.

Les analyses menées sur la Figure 3-13b ont montré un net impact de la composition sur le séchage. La présence d'un second constituant (NTC ou CMC) limite le séchage, mais les mélanges des deux ont un effet intermédiaire. La CMC est comme l'agarose capable de former des liaisons hydrogène grâce à ses groupements carboxyméthyle. Il est probable qu'elle participe également à la rétention d'eau liée dans les plateformes pendant le séchage. Les NTC peuvent eux être responsables d'une rigidification de la structure, ce qui va à l'encontre de la tendance observée sur la Figure 3-3b selon nous : une rigidification de la structure permettrait un meilleur séchage en prévenant l'affaissement des pores. Cette hypothèse a été explorée dans la partie traitant des mesures mécaniques. La rétention d'eau dans la structure liée à la présence de NTC est pour le moment inexplicée. Cependant, la diminution de la masse des échantillons secs lorsqu'ils contiennent à la fois des NTC et de la CMC (Figure 3-13b) pourrait être expliquée par l'adsorption de la CMC sur les NTC, la rendant peut-être moins disponible pour la formation de liaisons hydrogène avec l'eau.

*Le SSA indépendamment de la composition, et l'ajout d'un composant (CMC ou NTC) quel que soit le mode de séchage, augmentent la masse des composites, différence de masse que nous pensons équivalente à une quantité d'eau liée ou piégée dans les échantillons. Une analyse ATG plus approfondie sur les différents échantillons de composition et type de séchage différents ainsi qu'une analyse DSC (differential scanning calorimetry) pour quantifier l'eau liée dans les échantillons secs pourrait permettre de mieux comprendre ces résultats. Elles feront l'objet de futurs travaux. Enfin, on notera que malgré les résultats de l'analyse statistique, les écarts de masse sont très faibles et proches de la limite d'incertitude de la balance utilisée pour les mesures.*

### *3.1.3.c. Influence du type de séchage et de la composition sur les dimensions sur le regonflement*

Dans ses travaux, J.F. Guillet avait évalué que la masse des échantillons atteignait un plateau après 24h. Ici, nous avons observé qu'elle pouvait mettre plus de temps à se stabiliser lors du regonflement, en fonction du type de séchage préalablement effectué. Ainsi, la masse, l'épaisseur et le diamètre des échantillons ont été mesurés après 10 jours de regonflement dans de l'eau DI pour être certains d'avoir atteint le plateau lors de la cinétique de regonflement. Les moyennes des dimensions mesurées par type de séchage et groupe de composition sont rassemblées dans Figure 3-15.

Dans un premier temps concernant les masses des échantillons regonflés : les échantillons CSA ont une masse environ 20% plus grande que les échantillons SSA, alors que les échantillons SSC réabsorbent eux légèrement moins d'eau (Figure 3-15a). Sachant que les échantillons CSA et SSC avaient des masses sèches identiques, et plus faibles que les échantillons SSA (Figure 3-13a), le traitement CSA semble être d'intérêt pour le regonflement. Comme pour les masses sèches, la composition exerce une grande influence sur la masse des échantillons regonflés et induit les mêmes tendances (Figure 3-15b). Les deux compositions contenant des NTC réabsorbent plus d'eau que les échantillons AGR seul, mais c'est avec la composition AGR+CMC que nous avons obtenu le meilleur regonflement.

L'évolution de l'épaisseur des échantillons regonflés en fonction des deux facteurs est très similaire à celle des masses sèches des échantillons. Les échantillons SSA sont environ 30% plus épais que les autres échantillons (Figure 3-15c). Au niveau de la composition, seuls les échantillons AGR+CMC se démarquent des autres (Figure 3-15d).

Le SSC a permis d'obtenir un meilleur maintien du diamètre initial, ce qui est un objectif important du projet (Figure 3-15e). Cependant, ce sont les échantillons CSA qu'on retiendra sur ce plan puisqu'ils sont très proches du diamètre initial, 9,5mm pour 10mm au départ, et que la composition n'a pas d'influence sur cette valeur (Figure 3-15f). Enfin, on notera que la conservation du diamètre impacte plus la masse après regonflement qu'un regain d'épaisseur. En effet, on peut classer la masse moyenne des échantillons en suivant l'ordre CSA > SSA > SSC, alors que les échantillons CSA ont les épaisseurs les plus faibles.

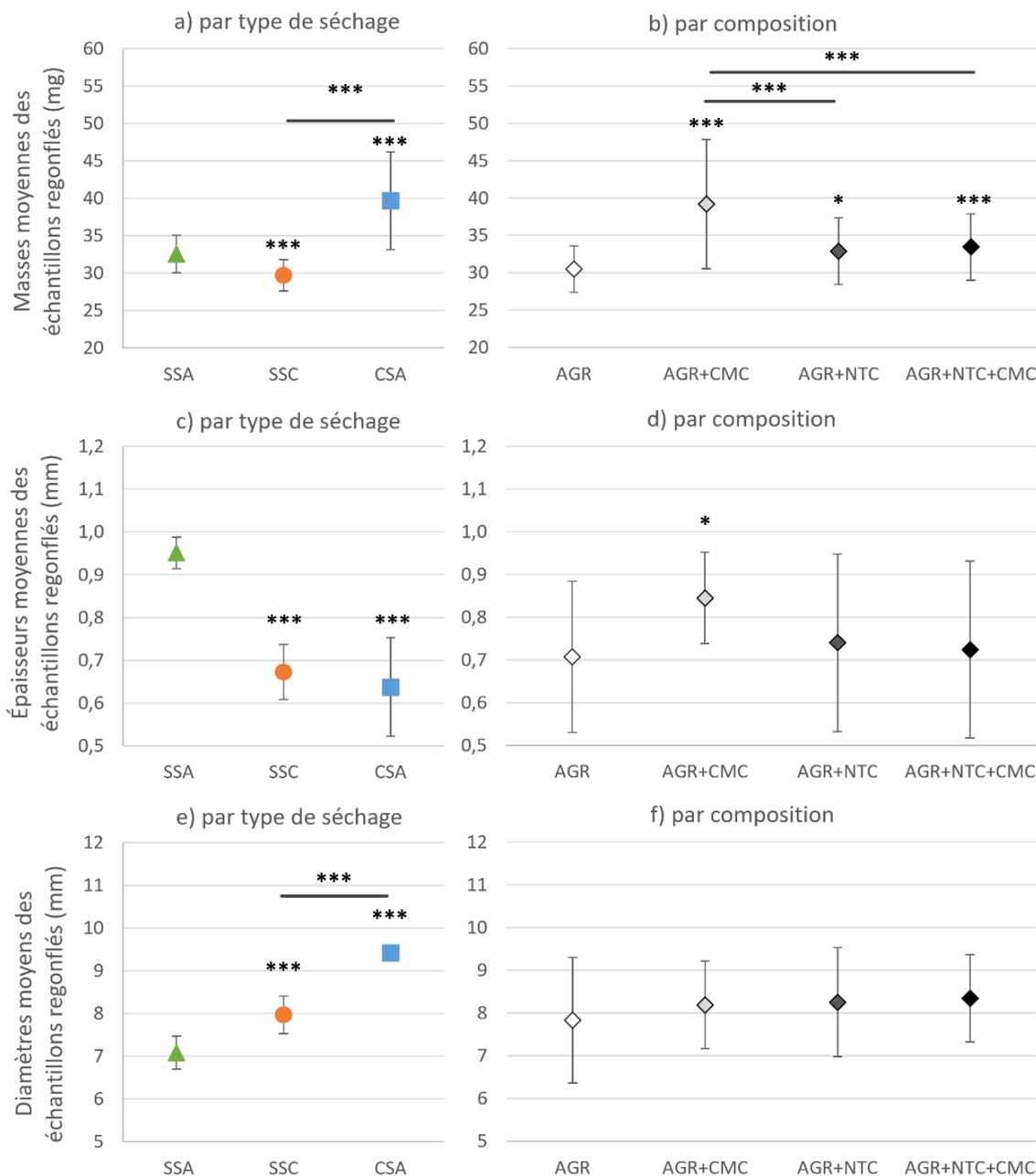


Figure 3-15 Masses moyennes (a et b), épaisseurs moyennes (c et d) et diamètres moyens (e et f) des échantillons par type de séchage, quelle que soit leur composition (à gauche) et groupe de composition, quel que soit le mode de séchage (à droite). Analyse statistique : ANOVA 2F avec post test de Tukey pour les masses, test non paramétrique de Kruskal-Wallis avec post test de Dunn pour les épaisseurs et les diamètres. Les groupes sont comparés à la référence (SSA ou AGR), puis entre eux. Codes : \* =  $p < 0.05$  ; \*\* =  $p < 0.01$  ; \*\*\* =  $p < 0.001$ . Les différences non représentées sont non significatives. Les barres d'erreur représentent les écarts-types.  $n = 7$ .

Du point de vue du type de séchage utilisé, on déduit de ces analyses que l'utilisation d'une charge pour contraindre le retrait de l'échantillon pendant le séchage (SSC) limite par la suite le regonflement. Cependant, l'objectif d'amélioration du diamètre est atteint puisqu'on gagne

*1mm, soit 10% de la taille initiale. L'étape de congélation (CSA) semble présenter plusieurs avantages : le diamètre après séchage/regonflement est presque parfaitement conservé, et elle permet d'augmenter d'environ 30% la quantité d'eau réabsorbée par rapport au SSA et SSC. Ces résultats sont intéressants pour notre application ex vivo : la très faible dispersion des diamètres observée pour les échantillons CSA témoigne de l'homogénéité et de la reproductibilité des échantillons. De plus, l'augmentation de la quantité d'eau absorbable est positive pour la fonction réservoir.*

*Concernant l'effet de la composition, les conclusions sont très similaires à celles de la partie précédente. Il en ressort que l'ajout d'un second constituant, NTC ou CMC, impacte positivement la quantité d'eau réabsorbée par les nanocomposites. On remarque également que les échantillons de composition comprenant des NTC ont des dimensions plus petites que ceux ne comprenant que de la CMC. Nous avons suggéré dans la partie précédente qu'il restait de l'eau piégée dans la structure à la fin du séchage. Cette eau liée pourrait limiter l'effondrement de la structure et les interactions entre les chaînes d'agarose, rendant la matrice plus apte à se gonfler. L'explication de ce phénomène pourrait être donnée par des analyses thermiques, en quantifiant l'eau liée présente dans chaque échantillon à la fin de l'étape de séchage. De même, la présence de NTC pourrait renforcer mécaniquement la structure, cette hypothèse sera explorée plus loin.*

### **3.2. Fonction réservoir – capacité de stockage et de relargage des plateformes nanocomposites**

L'un des rôles principaux du matériau développé dans ces travaux est de pouvoir stocker un principe actif et surtout de pouvoir le restituer au moment de la délivrance par électroporation. Dans la partie précédente, nous avons comparé le regonflement des nanocomposites de composition et séchage différents, en évaluant leurs dimensions. Dans cette partie, le but est de mettre en relation la capacité de stockage (lié au regonflement) avec le relargage de FD4 par les plateformes nanocomposites, en évaluant la cinétique de relargage d'abord en volume, puis dans un modèle de diffusion verticale, plus proche du mode d'administration visé. Ces cinétiques ne sont pas représentatives d'une administration assistée par électroporation à travers une membrane hydrophobe, mais pourront apporter des informations sur le matériau en lui-même.

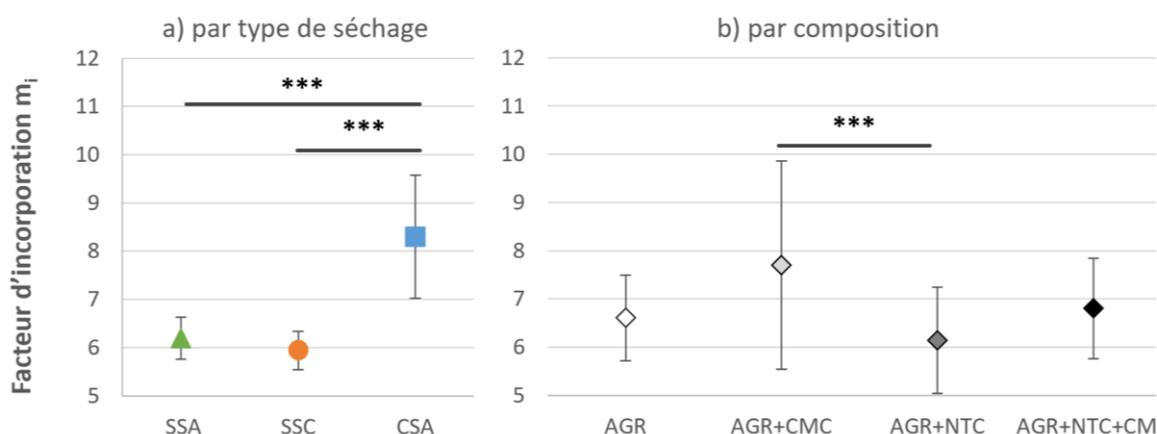
### 3.2.1. Capacité de stockage des plateformes nanocomposites

Au-delà de la conservation des dimensions pour des questions pratiques, les mesures de masses que nous avons présentées donnent accès à un second critère d'évaluation des nanocomposites : sa capacité à se regonfler, soit la masse de solution de principe actif incorporable. On définit ici le facteur d'incorporation  $m_i$ , comme étant le rapport de la masse d'eau réabsorbée pendant le regonflement sur la masse de l'échantillon sec  $m_s$  :

$$m_i = \frac{(m_r - m_s)}{m_s}$$

*Équation 3-1 Calcul du facteur d'incorporation  $m_i$  avec,  $m_r$  la masse de l'échantillon regonflé et  $m_s$  la masse l'échantillon sec. Ce ratio peut être trouvé sous forme de pourcentage dans la littérature. Il est supposé établi une fois l'échantillon totalement regonflé.*

Dans l'étude décrite ici la solution correspond à de l'eau DI, son pH est légèrement acide (~5-6) et son osmolarité est supposément nulle. Dans un but plus applicatif, il est nécessaire de comparer les capacités de réabsorption des nanocomposites en fonction des propriétés physicochimiques du liquide de regonflement, et notamment celles des tampons physiologiques. Les potentielles interactions entre le principe actif et la matrice nanocomposite devront également être prises en compte. Les masses moyennes d'eau DI incorporables calculées sur les différents échantillons pour une durée de regonflement de 10 jours sont présentées par la Figure 3-16.



*Figure 3-16 Facteurs d'incorporation  $m_i$ , groupés par a) type de séchage quelle que soit leur composition, b) composition quel que soit le mode de séchage. Durée de regonflement : 10 jours. Analyse statistique : Kruskal-Wallis avec post test de Dunn. Codes : \*\*\* =  $p < 0.001$ . Les différences non représentées sont non significatives. Les barres d'erreur représentent les écarts-types.  $n = 7$ .*

Ces résultats découlent directement d'un ratio entre les masses regonflées et les masses sèches, les observations sont donc très similaires. Comme précédemment, les échantillons comportant de la CMC se démarquent ainsi que les échantillons CSA. La normalisation par la masse de matrice initiale met encore plus en avant l'avantage de la congélation. Il faudra par la suite comprendre l'origine de cet avantage afin de l'exploiter au mieux. De plus, sous cet angle, le stockage potentiel dans les échantillons SSA et SSC est identique. Nous avons donc réussi à conserver les diamètres des plateformes sans affecter les propriétés de stockage, ce qui est très positif.

*La matrice d'agarose joue un rôle de réservoir tout à fait satisfaisant : les plateformes nanocomposites sont capables de réabsorber 6 à 8 fois leurs masses en eau. Cette capacité de regonflement est assez comparable avec ce que mesurent Awadhiya et coll. pour des composites agarose/glycérol, pouvant atteindre 700% soit à 37°C, soit un facteur d'incorporation de 7 [276]. À noter que la capacité de stockage et le gonflement des gels ne sont pas systématiquement corrélés dans la littérature, en fonction du mode d'incorporation des principes actifs. Par exemple, Yuan et coll. introduisent la ciprofloxacine directement pendant la préparation d'hydrogel à base d'agarose et calculent une capacité de stockage d'environ 10%, soit un facteur de 0,1 [277]. Enfin, il existe des composites avec des capacités de stockage plus importantes qu'il pourrait être intéressant d'explorer. Par exemple, Servant et coll. rapportent un composite à base de NTC multiparois et PMAA (acide polyméthacrylique) avec un facteur d'incorporation d'environ 25 (ou degré de regonflement dans leurs travaux) [241, 278]. Cependant, la comparaison directe des données est complexe pour plusieurs raisons. La première est que la composition exacte des hydrogels (concentration massique en polymère et en NTC) est souvent difficile à établir (les travaux de Servant et coll. en sont un bon exemple). La concentration massique en polymère joue un rôle important sur la taille des pores, et donc sur les performances en termes de regonflement. La seconde est liée à la nature des NTC qui diffère d'une étude à une autre.*

### **3.2.2. Relargage de FD4 en volume**

Des plateformes nanocomposites de diamètre initial 10mm ont été regonflées 48h dans une solution de FD4 à 1mM dans un tampon d'électroporation (TE). À t=0min, elles sont plongées dans un volume de sueur artificielle sous agitation. Des prélèvements sont réalisés à différents temps dans le but d'en mesurer la fluorescence, et ainsi remonter à la quantité de

FD4 libérée en fonction du temps (chapitre 2, partie 2.2.4.b). Les graphiques présentés Figure 3-17 et Figure 3-18 représentent le ratio de la quantité de FD4 mesurée à  $t$  sur la quantité initialement incorporée dans la plateforme, déterminée par écart de masse, la concentration de la solution de regonflement étant connue.

Nous avons comparé dans un premier temps les différentes compositions, que nous avons regroupées par type de séchage dans la Figure 3-17. La variabilité des résultats intra-échantillons ne permet pas de faire une interprétation de ces résultats, mais quelques tendances s'en dégagent tout de même. Les cinétiques de relargage sont très similaires, mais les échantillons contenant des NTC semblent relarguer plus de traceur et plus rapidement. La tendance est légère, mais identique pour les trois types de séchage SSA, SSC et CSA (Figure 3-17).

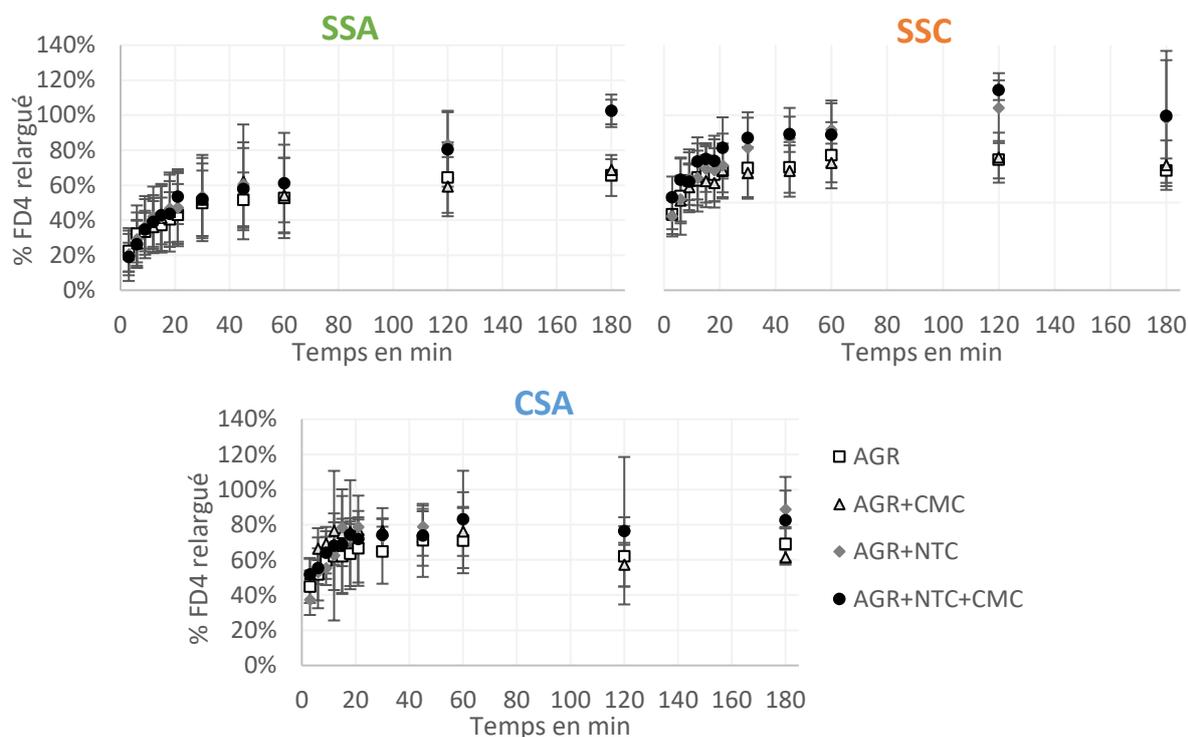


Figure 3-17 Comparaison des cinétiques de relargage en volume des plateformes nanocomposites, par rapport à la composition utilisée pour chaque type de séchage. Les barres d'erreur représentent les écarts-types.  $n = 4-8$ .

Nous avons par la suite évalué l'influence du type de séchage, grâce à la Figure 3-18. Nous avons observé que pour toutes les compositions, les échantillons issus de SSC et CSA relarguent le traceur FD4 beaucoup plus rapidement que les échantillons issus de SSA. La moitié du traceur est déjà relarguée dans les six, voire trois premières minutes du test, alors

qu'il faut attendre la première demi-heure pour atteindre le même résultat avec le SSA. De même, un plateau semble atteint au bout d'une heure pour SSC et CSA alors qu'il faut presque deux heures dans le cas du SSA. On note cependant que la quantité relarguée à 180 min est la même, quel que soit le type de séchage utilisé.

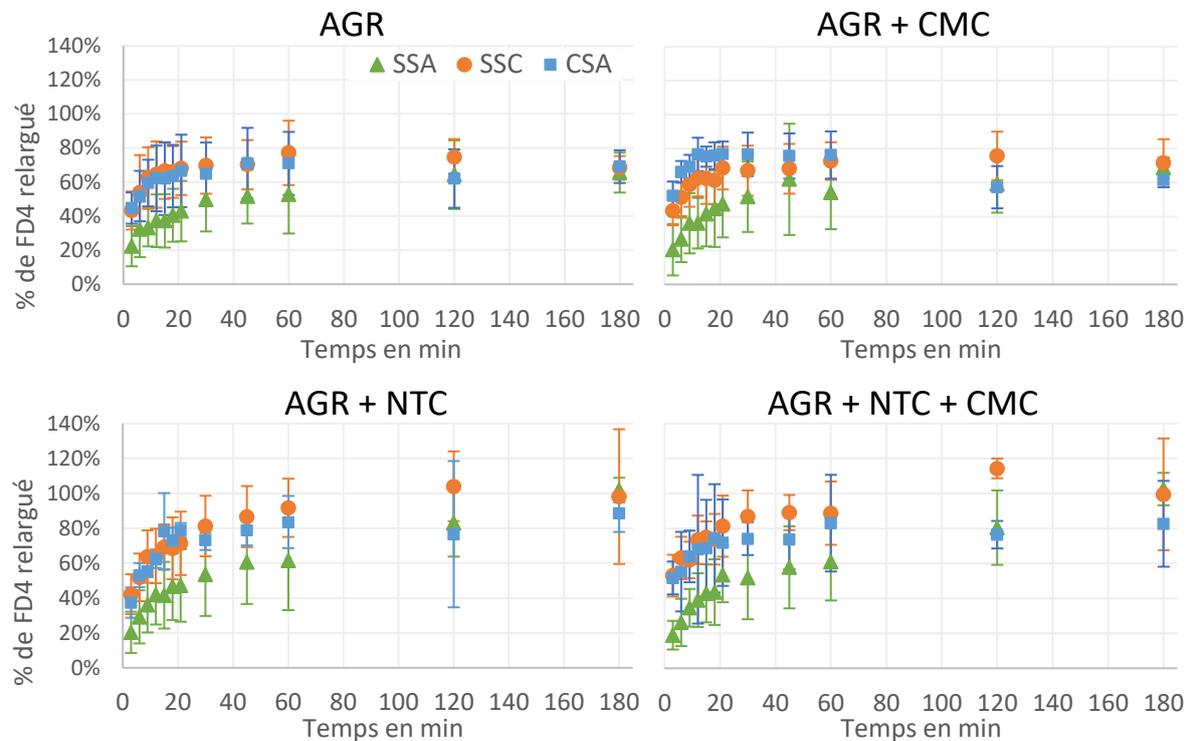


Figure 3-18 Comparaison des cinétiques de relargage en volume des plateformes nanocomposites, par rapport au type de séchage utilisé, pour chaque composition. Les barres d'erreur représentent les écarts-types.  $n = 4-8$ .

Dans le but de déterminer le régime régissant la diffusion du FD4 des plateformes vers le volume, nous avons utilisé le modèle de Korsmeyer-Peppas. Les tracés des régressions linéaires basées sur ce modèle sont présentés Figure 3-19. Les  $R^2$  issus de ces régressions sont tous au-dessus de 0,95, mais ils devraient dépasser 0,99 pour être jugés totalement satisfaisants. De plus, la zone linéaire de certains tracés ne représentait que le minimum de 3 points. Il faudrait acquérir plus de points aux temps courts pour permettre une meilleure analyse. Nous en avons conclu que ces expériences ne sont pas assez répétables pour que l'analyse soit vraiment exploitable.

À titre informatif, pour les trois échantillons qui satisfont au  $R^2 > 0,99$  et à 3% près  $m_t/m_0 > 60\%$ , soient AGR+NTC+CMC/SSA, AGR/SSC et AGR+CMC/SSC, nous avons déterminé que l'exponentiel de libération était respectivement de 0,52, 0,33 et 0,27. Cela suggère que la

diffusion du traceur FD4 depuis les échantillons de type AGR/SSC et AGR+CMC/SSC suivrait une loi de diffusion de Fick et résulterait donc du gradient de concentration entre l'intérieur et l'extérieur des échantillons. Les échantillons de type AGR+NTC+CMC/SSA quant à eux ont un  $n$  supérieur à la valeur limite donnée par Ritger et Peppas, 0,475 pour notre géométrie [258, 259, 279]. Cette valeur suggère qu'en plus d'une diffusion de Fick, il y aurait une contribution du gonflement de la matrice polymère nanocomposite modifiant la cinétique de relargage. La cinétique de regonflement des plateformes de 10mm dans une solution de FD4 dans le TE n'a pas été étudiée, et nous avons négligé la variation de regonflement sur la durée de l'expérience pour appliquer le modèle de Korsmeyer-Peppas. Cependant, d'après ce résultat, il est possible que les échantillons ne soient pas à l'équilibre.

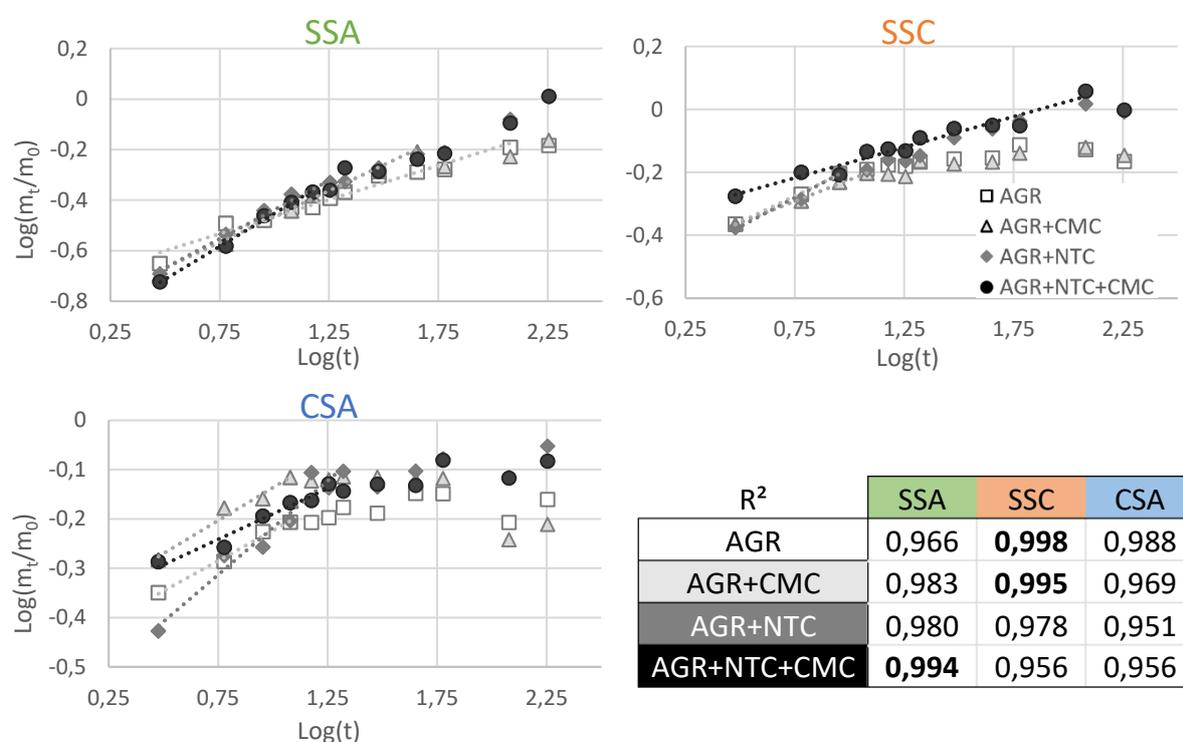


Figure 3-19 Régressions linéaires sur les courbes  $\log(m_t/m_0) = f(\log(t))$ , groupées par type de séchage. Les  $R^2$  obtenus à la suite de ces régressions sont également présentés.  $n = 4-8$ .

Le dimensionnement de l'expérience est sûrement en cause, les volumes prélevés sont très faibles et l'erreur associée à la manipulation de ces volumes est de ce fait très importante. Une solution pourrait être de travailler avec des plateformes plus grandes et donc des volumes mis en jeu plus grands, comme c'est le cas pour les tests suivants. Nous pourrions aussi changer de traceur. Le FD4 a été choisi puisque c'est celui qui est majoritairement utilisé dans les essais ex vivo pour mimer une macromolécule. Cependant, la fluorescéine est sensible au pH, et elle se

déstabilise quand il est exposé à la lumière. La dernière solution serait de procéder au relargage directement dans la cuve de mesure pour augmenter la précision aux temps courts et supprimer tout biais de prélèvement.

### 3.2.3. Relargage de FD4 en cellule verticale

Une deuxième stratégie de relargage répondant à plusieurs problématiques soulevées par le premier protocole a été testée. Le dispositif utilise une cellule de diffusion verticale, permettant un relargage unidirectionnel (en 2D), plus proche de l'application en patch prévue. Les échantillons utilisés ont un diamètre brut de coulée de 25mm. Finalement, c'est une mesure d'absorbance par spectrométrie UV-visible sur le FD4 qui est utilisée pour la quantification, à la place de la fluorescence, ce qui règle le problème de sensibilité au pH du signal en fluorescence (chapitre 2, partie 2.2.4.c).

Seules trois séries d'échantillons en triplicata sont mesurées lors de cette expérience : les plateformes AGR+NTC+CNT/SSC seront comparées sur le plan de la composition avec AGR/SSC, et sur celui du type de séchage avec AGR+NTC+CMC/CSA (Figure 3-20).

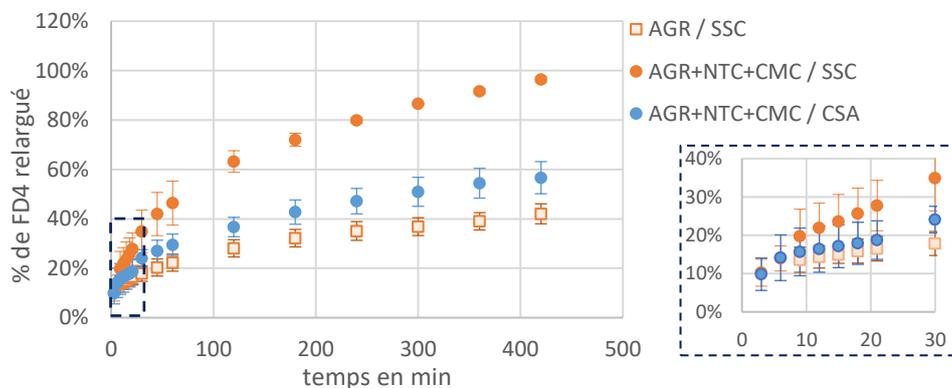


Figure 3-20 Comparaison des cinétiques de relargage en cellule de diffusion verticale des plateformes nanocomposites. Les barres d'erreur représentent les écarts-types.  $n = 3$ .

Contrairement aux résultats de la partie précédente, les relargages CSA et SSC ne sont pas équivalents pour une même composition. De manière surprenante, les échantillons les plus similaires sont ceux qui n'ont ni la composition ni le séchage en commun. L'ajout de la CMC et de NTC a permis dans ce cas de doubler la quantité délivrée dès les temps courts. Les cinétiques de relargage sont plus lentes. Seulement 10% du traceur ont été relargués dans les premières minutes et il aura fallu attendre une heure pour que AGR+NTC+CNT/SSC en

relargue la moitié. Pour les deux autres échantillons, les 50% relargués ont été atteints au bout de cinq heures.

Concernant le protocole de relargage en lui-même, nous avons observé une variabilité des mesures réduite par rapport aux expériences de relargage en volume, ce qui est positif pour analyser plus en détail le régime de diffusion. On notera cependant que la mise en place de l'expérience peut être assez délicate. Des pertes de matière liées à des fuites ou des difficultés à positionner l'échantillon ne sont pas à exclure, et pourraient être à l'origine de biais. Cette méthode permet donc d'obtenir des résultats plus répétables, mais peut perdre en fiabilité si la mise en place n'est pas maîtrisée.

Le modèle de Korsmeyer-Peppas se prête beaucoup mieux à la configuration utilisée lors de cette expérience (Figure 3-21). Les coefficients de régression calculés sont tous satisfaisants et nous ont permis de déterminer que la diffusion du FD4 depuis les trois séries d'échantillons suivait une loi de Fick Tableau 3-1. De plus, les paramètres K calculés, qui englobent des paramètres géométriques et de diffusion intrinsèque à la matrice polymère, montrent que les échantillons sont très similaires sur ce point également.

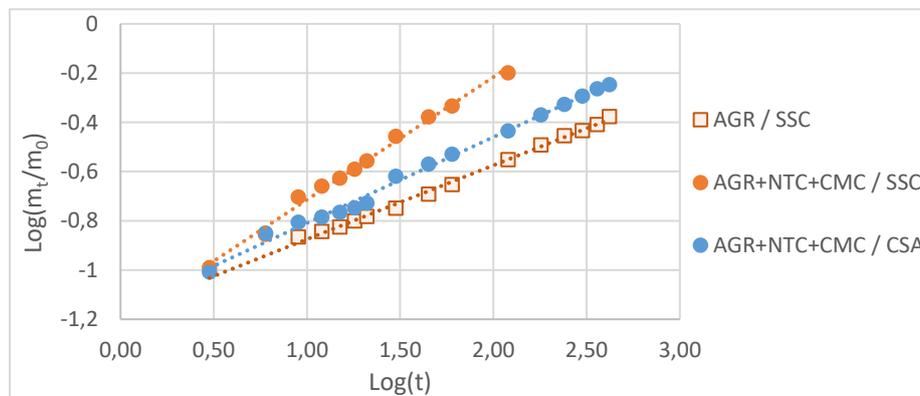


Figure 3-21 Régressions linéaires sur les courbes  $\log(m_t/m_0) = f(\log(t))$ . Les  $R^2$  ainsi que les paramètres  $n$  et  $K$  obtenus suite à ces régressions sont également présentés.  $n = 3$ .

n = 3	SSC			CSA		
	$R^2$	n	K	$R^2$	n	K
AGR	0,997	0,30	0,067			
AGR+NTC+CMC	0,993	0,50	0,061	0,994	0,35	0,070

Tableau 3-1 Coefficients de régression linéaire  $R^2$ , exponentiels  $n$  et constantes de diffusion  $K$ , déterminés par l'utilisation du modèle Korsmeyer-Peppas sur les courbes de relargage en diffusion verticale.

*Dans cette étude nous avons évalué les cinétiques de relargages de PA par les plateformes dans deux configurations différentes : en volume puis en cellules de diffusion verticale. Les expériences de relargage menées en volume ne nous ont pas permis d'obtenir des résultats satisfaisants pour approfondir l'analyse des régimes de diffusion sur tous les échantillons. Les expériences menées en cellule de diffusion verticale nous ont permis de pallier plusieurs problèmes rencontrés et nous ont donné des résultats satisfaisants. Cependant, moins d'échantillons ont pu être étudiés. Le régime de diffusion des échantillons semble être dominé par une loi de Fick, et les paramètres intrinsèques des échantillons décrits par le coefficient  $K$  sont très similaires. Il pourrait être intéressant d'appliquer d'autres modèles pour vérifier si le modèle utilisé ici est le plus indiqué et de poursuivre la comparaison des échantillons.*

### **3.2.4. Influence de différents paramètres sur le facteur d'incorporation**

Dans un dernier temps, nous avons comparé les facteurs d'incorporations calculés à partir des échantillons utilisés pour les expériences de relargage avec ceux présentés au début de cette partie. Les échantillons en question ont des dimensions initiales différentes, mais le ratio entre l'épaisseur et le diamètre a été conservé : 10mm\*2mm dans le cas du relargage en volume, et 25mm\*5mm pour le relargage en cellule de diffusion verticale. Ils ont été regonflés dans une solution de TE + FD4 pendant 48h. Les résultats présentés Figure 3-22 (rose et jaune) ont montré que la taille initiale des plateformes n'impactait pas le facteur d'incorporation, ce qui est intéressant pour notre application : il est possible de moduler la quantité de PA stockée en modulant les dimensions des plateformes. L'influence positive du séchage CSA, déjà observée lors de l'étude plus systématique des capacités de stockage en fonction des échantillons (Figure 3-16), est également visible.

La comparaison des facteurs d'incorporation des échantillons utilisés pour le relargage avec ceux présentés en début de cette partie (Figure 3-22, en bleu, eau DI 10j, 10mm\*2mm) a montré une influence de la nature du liquide de regonflement, à dimensions égales (rose). Le facteur d'incorporation est quasiment diminué de moitié lorsque l'on remplace l'eau DI par un liquide contenant des ions et un traceur (FD4). L'agarose est pourtant un hydrogel neutre et peu sensible au pH. Il est également peu réactif puisqu'il ne contient que des fonctions hydroxyles. Il semble nécessaire d'après ces résultats d'étudier plus en détail les interactions physico-chimiques possibles entre l'hydrogel, le liquide de regonflement et le PA ou le traceur.

Finalement, nous avons estimé que 48h suffisaient pour que les plateformes atteignent leur équilibre de gonflement. Cependant, les cinétiques de regonflement des plateformes dans les solutions de TE+FD4, et sur des plateformes de 25mm n'ont pas été étudiées et manquent à ces travaux. Même si les résultats présentés ici sont comparatifs, ce facteur pourrait influencer la cinétique de relargage et la détermination du régime de diffusion. Elles seront donc impératives pour pouvoir conclure sur ces résultats.

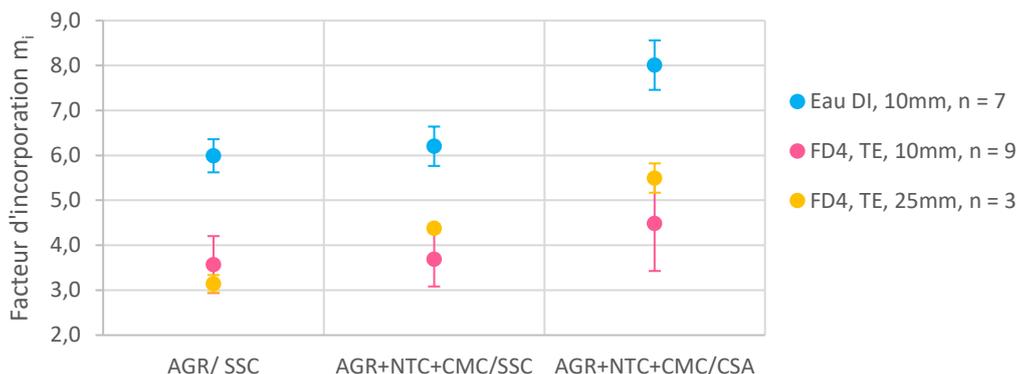


Figure 3-22 Facteurs d'incorporation, en fonction de la composition, du type de séchage, du solvant de regonflement, de la présence ou non de traceur et du diamètre initial des plateformes. Les barres d'erreur représentent les écarts-types.

Les plateformes ont des capacités de stockage intéressantes, de l'ordre de 6 à 8 fois leur masse sèche, ce qui semble cohérent avec la littérature pour ce type d'incorporation [276]. Les plateformes de type SSC et CSA présentent les cinétiques de relargage les plus rapides en volume et relarguent environ 70% à 80% de leur contenu au bout de 30min, ce qui correspond à des quantités de 2,6 et 3,2mg de solution de FD4 à 1mM. Dans le cas du relargage en cellule de diffusion verticale, seulement 25 à 35% sont libérés en 30min, ce qui représente 1 à 2 mg de solution. L'utilisation du modèle mathématique a montré que la diffusion depuis les plateformes était vraisemblablement dominée par une diffusion de Fick. Ces résultats comparatifs représentent la capacité des plateformes à restituer le PA qu'il a incorporé, pendant une durée définie. Cependant, la quantité de PA qui sera effectivement délivrée dans la peau dépendra avant tout de son état de perméabilité. De plus, il manquera une étude du relargage sous stimulation électrique, plus représentative des conditions réelles d'utilisation puisqu'elles incluront l'électrophorèse.

Finalement, la comparaison des facteurs d'incorporation a montré que la caractérisation des cinétiques de regonflement des plateformes en fonction de leurs dimensions et du solvant

*serait impérative pour la suite des travaux. Cependant, il semble possible de moduler la quantité de PA incorporée en changeant les dimensions des plateformes.*

### **3.3. Évaluation des propriétés mécaniques des plateformes nanocomposites**

#### **3.3.1. Analyses mécaniques dynamiques**

Dans le but de déterminer l'impact de la composition et du type de séchage sur le comportement viscoélastique et la rigidité des plateformes nanocomposites, nous avons sollicité les échantillons de manière oscillatoire en cisaillement (torsion entre le haut et le bas de l'échantillon), et en compression. Plusieurs grandeurs ont été extraites des mesures : les modules de conservation en cisaillement  $G'$  et compression  $E'$ , le facteur de pertes  $\tan\delta$  dans le domaine viscoélastique linéaire et la limite de ce domaine (Chapitre 2, partie 2.2.5.). La concentration en NTC dans les plateformes, lorsqu'il y en a, est toujours de 1%<sub>m</sub> par rapport à l'agarose.

L'ordre de grandeur du module  $G'$  des échantillons d'agarose bruts de coulée (AGR BC) que nous avons mesurés ici, environ 40kPa, est en accord avec les données trouvées dans la littérature [280–282] (Figure 3-23 a et b). Le module  $E'$  mesuré pour le même type d'échantillons (~250kPa) est également cohérent avec celui déterminé par Fernández et coll. (pour des agaroses à 3%<sub>m</sub>) [280].

L'analyse des résultats a montré que les modules de conservation étaient très dépendants de la mise en forme, mais pas de la composition. Les échantillons SSC présentent tous un module de conservation en cisaillement  $G'$  1,5 fois plus grand que celui des échantillons bruts de coulée (BC) et CSA. Le résultat inverse est observé en compression (Figure 3-23 c et d) : la congélation et le regonflement permettent de doubler, voire quadrupler le module  $E'$ .

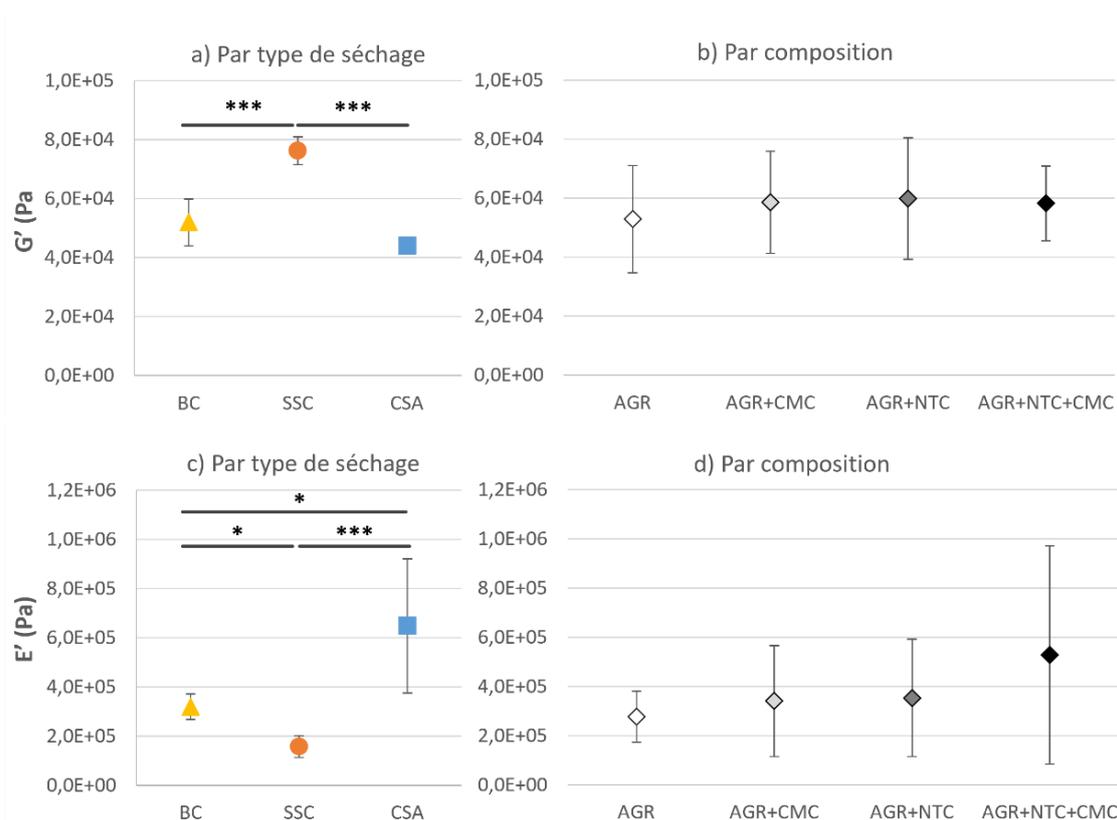


Figure 3-23 Modules de conservation des échantillons en cisaillement  $G'$  (a et b) et en compressions  $E'$  (c et d) en fonction de type de séchage quelle que soit la composition et de la composition quel que soit le séchage. Analyses statistiques : Kruskal-Wallis post test de Dunn. Codes : \* =  $p < 0.05$  ; \*\*\* =  $p < 0.001$ . Les différences non représentées sont non significatives. Les barres d'erreur représentent les écarts-types.  $n = 3$ .

Nous avons également observé une influence de la composition, qui ne se reflète pas dans les analyses statistiques des moyennes présentées Figure 3-23d : la présence des NTC et de CMC résulte en une augmentation du module  $E'$ , pour les échantillons CSA uniquement. Cette tendance est illustrée par la représentation des moyennes en fonction des deux facteurs, composition et séchage, que l'on peut trouver Figure 3-24.

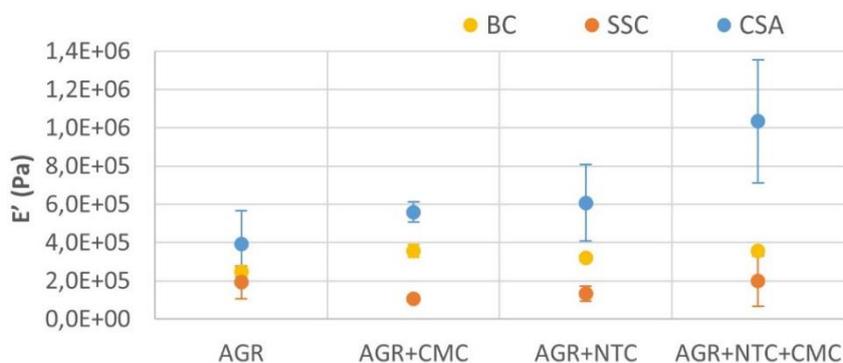


Figure 3-24 Modules de conservation en compression  $E'$  pour toutes les combinaisons composition/type de séchage. Les barres d'erreur représentent les écarts-types.  $n = 3$ .

L'augmentation de ces modules et donc de la rigidité du matériau, est probablement liée à la densification de la matrice nanocomposite après l'étape de séchage, observée par Cryo-MEB et mesure de porosité. Il est cependant surprenant de voir que ces modules n'évoluent pas dans le même sens en fonction de la sollicitation et du type de séchage (Figure 3-23 a et c). Si les observations Cryo-MEB n'ont pas permis de mettre en évidence des différences notables en termes de structure locale, il existe peut-être une anisotropie à l'échelle sur matériau dans son ensemble, révélée par les mesures mécaniques dynamiques.

Les facteurs de perte  $\tan\delta$  mesurés montrent que tous les échantillons ont un comportement majoritairement élastique, quels que soient la composition et le type de séchage (Figure 3-25 b et d). Les différences entre les groupes ne sont pas significatives. Seules les séries CSA se démarquent comme légèrement plus visqueuses que les autres, en cisaillement et en compression, sans atteindre la valeur seuil de  $\tan\delta=1$  (transition vers le comportement liquide visqueux) (Figure 3-25 a et d).

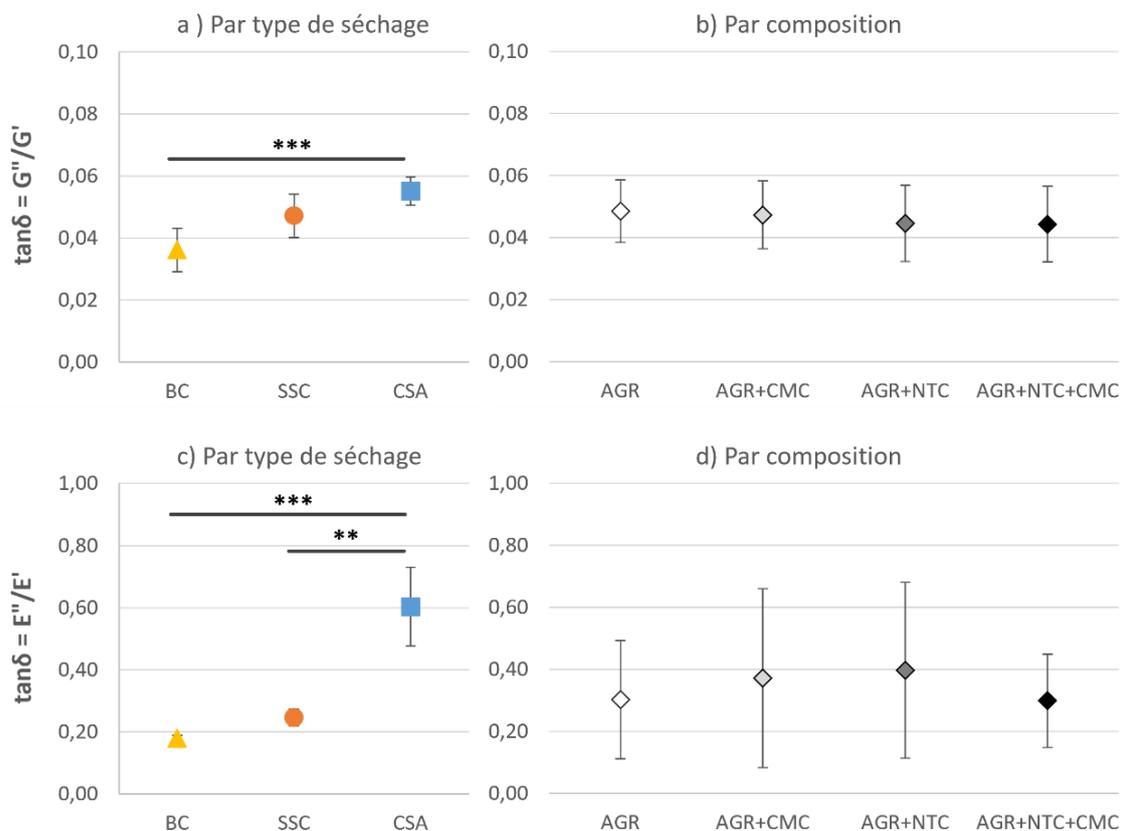


Figure 3-25 Évolution du facteur de perte  $G''/G'$  en cisaillement (a et b) et  $E''/E'$  en compression (c et d), en fonction de type de séchage et de la composition. Analyses statistiques : Kruskal-Wallis, post test de Dunn. Codes : \*\* =  $p < 0.01$  ; \*\*\* =  $p < 0.001$ . Les différences non représentées sont non significatives. Les barres d'erreur représentent les écarts-types.  $n = 3$ .

Finalement, un balayage en amplitude de déformation nous a permis de déterminer l'amplitude de déformation maximale applicable pour laquelle le matériau a eu une réponse viscoélastique linéaire. Au-delà de cette limite, il n'existe plus de proportionnalité entre contrainte et déformation, et l'échantillon pourrait se déformer irréversiblement ou bien de manière élastique non linéaire (comme pour les caoutchoucs). L'analyse de ces résultats a montré que les étapes de séchage et regonflement rendaient les plateformes moins fragiles en cisaillement, comme en témoigne l'augmentation de la limite du domaine viscoélastique linéaire ( $\gamma$ ) pour les séries SSC et CSA, Figure 3-26. Encore une fois, la composition ne joue pas de rôle majeur dans l'évolution de ces limites de linéarité.

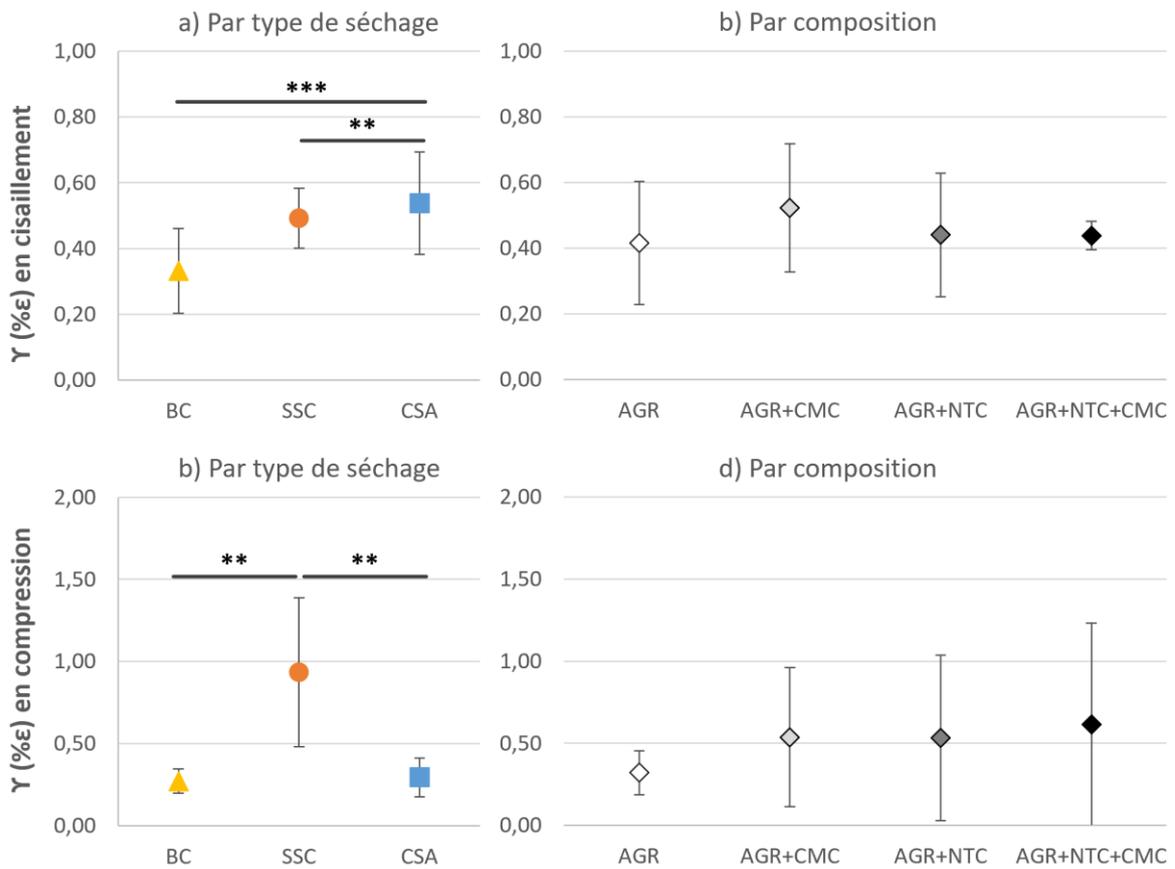


Figure 3-26 Limites du domaine viscoélastique linéaire  $\gamma$  en cisaillement (a et b), et en compression (c et d), en fonction de type de séchage quelle que soit la composition, et de la composition quel que soit le séchage. Analyses statistiques : Kruskal-Wallis, post test de Dunn. Codes : \*\* =  $p < 0.01$  ; \*\*\* =  $p < 0.001$ . Les différences non représentées sont non significatives. Les barres d'erreur représentent les écarts-types.  $n = 3$ .

On notera tout de même dans le cas de la sollicitation en compression, l'élévation importante de la limite de linéarité avec l'ajout de NTC et de la CMC dans le cas ponctuel des échantillons SSC. Cette tendance est illustrée par la Figure 3-27.

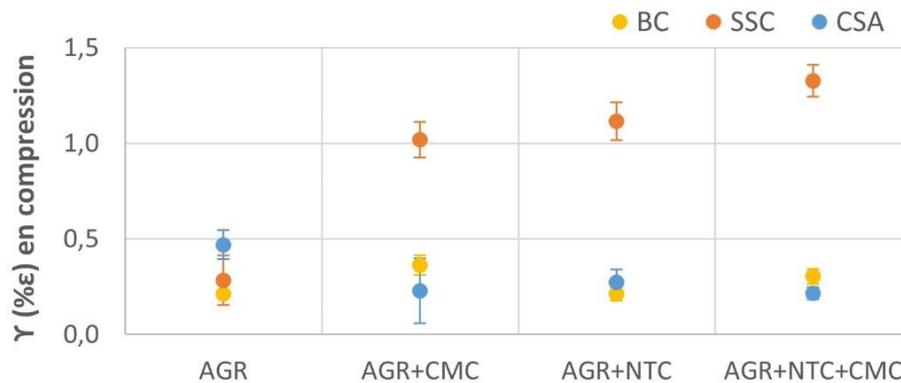


Figure 3-27 Limites du domaine viscoélastique linéaire  $\gamma$  en compression pour toutes les combinaisons composition/type de séchage. Les barres d'erreur représentent les écarts-types.  $n = 3$ .

Les analyses mécaniques dynamiques nous ont permis de comparer nos échantillons. Premièrement, nous avons pu vérifier que les propriétés des échantillons d'agarose brut de coulée (AGR BC) étaient en accord avec la littérature. Les modules de conservation des échantillons SSC et CSA n'évoluent pas dans le même sens en fonction du mode de sollicitation. L'étude du facteur de perte a montré que la congélation augmentait légèrement la viscosité des échantillons CSA, comparés aux échantillons BC et SSC. La détermination de la limite du domaine linéaire viscoélastique a également mis en lumière des différences de comportement entre les échantillons SSC et CSA en fonction de mode de sollicitation. Ces résultats suggèrent qu'il existe une anisotropie structurale, ou du moins une différence de structure, entre les échantillons SSC et CSA, qui n'a pas été révélée par microscopie. Finalement, la présence de NTC et de CMC n'affecte les propriétés étudiées que de manière très ponctuelle contrairement à ce qu'on aurait pu attendre.

### 3.3.2. Analyses en mécanique statique

Nous avons par la suite étudié l'évolution de la contrainte résultante lorsqu'on applique une déformation croissante à raison de  $1\mu\text{m/s}$  à l'échantillon. Ces mesurent nous ont permis d'extraire le module élastique  $E$  ou module de Young, qui correspond à la contrainte maximale que l'échantillon peut endurer tout en restant dans un régime de déformation totalement élastique. Il est défini comme la pente de la zone linéaire aux très faibles déformations

(chapitre 2, partie 2.2.6). Les moyennes des échantillons groupés par type de séchage puis par composition sont présentées par la Figure 3-28.

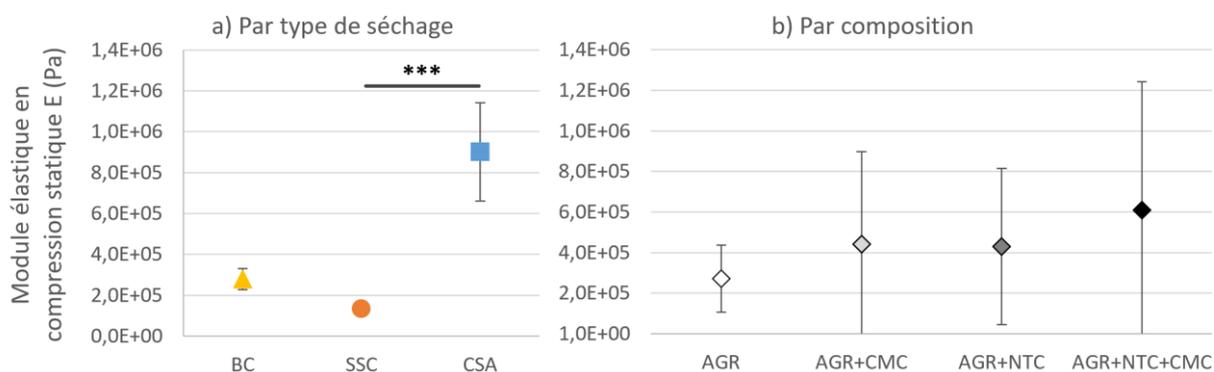


Figure 3-28 Modules élastiques  $E$  en compression statique en fonction a) du type de séchage quelle que soit la composition, b) de la composition quel que soit le séchage. Les barres d'erreur représentent les écarts-types.  $n = 3$ .

Comme pour les analyses mécaniques dynamiques, la composition n'a pas d'effet significatif sur le module élastique en compression statique. Ce module varie de manière identique au module de conservation en compression  $E'$  en fonction du type de séchage. On remarque une diminution du module  $E$  avec le traitement SSC d'environ 200kPa, alors qu'il est doublé, voire quadruplé pour les échantillons CSA. Comme pour le module de conservation en compression  $E'$  Figure 3-24, nous avons également observé une influence des NTC et de la CMC, augmentant le module  $E$  pour les échantillons CSA uniquement (Figure 3-29).

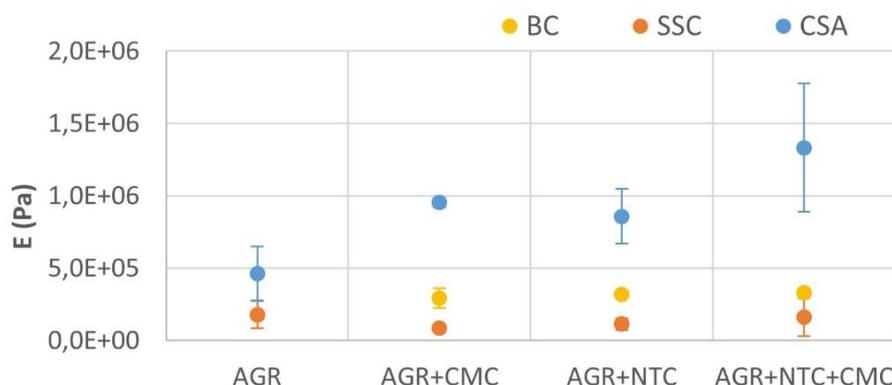


Figure 3-29 Modules élastiques en compression  $E$  pour toutes les combinaisons composition/type de séchage. Les barres d'erreur représentent les écarts-types.  $n = 3$ .

Enfin, d'après les travaux de Normand et coll., le module élastique en compression d'un gel d'agarose à 2,5% est d'environ 254kPa [283]. Felfel et coll. mesurent eux un module de 140kPa pour des agaroses à 2% [284] et Kingsley et coll. ont déterminé un  $E$  de 136kPa pour

des agaroses à 3%*m* [281]. Nos tests nous ont permis de mesurer un module de 176kPa pour AGR BC, l'ordre de grandeur du module de nos échantillons de références est donc en accord avec la littérature (Figure 3-29).

Les courbes de compression statiques des séries SSC et principalement CSA ont montré une augmentation importante de la contrainte pour les hautes déformations. Ce comportement peut être décrit comme rhéodurcissant [260]. Un exemple de ce comportement est montré Figure 3-30. L'échantillon a tendance à se durcir avec l'augmentation de la déformation en compression de l'échantillon. On pourrait expliquer ce comportement en considérant que la compression vide l'eau contenue dans les pores, rendant la structure plus dense et plus résistante à la déformation. De plus, la rupture des échantillons (non présentée) a toujours lieu après 50% de déformation.

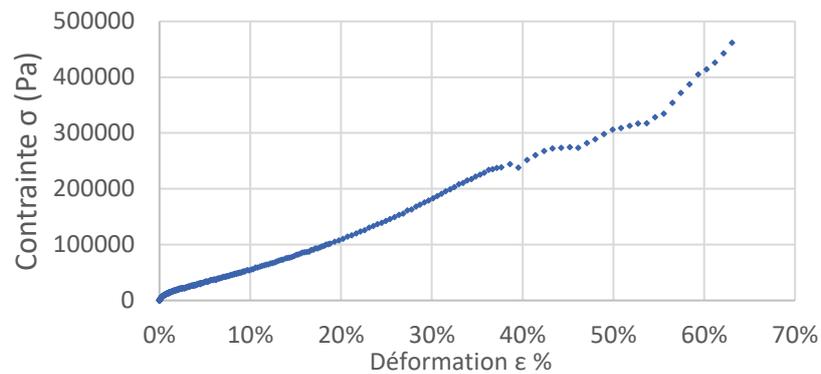


Figure 3-30 Évolution de la contrainte en fonction de la déformation en compression statique sur un échantillon de type AGR+CMC+NTC CSA.

La conservation de l'intégrité mécanique des plateformes nanocomposites après utilisation est un facteur clé pour limiter, voire inhiber, de potentielles fuites de NTC en cours d'utilisation. De plus, d'un point de vue plus pratique, il est plus simple d'établir des modèles et de construire des simulations avec des échantillons qui n'évoluent pas sous sollicitation mécanique. Dans le chapitre suivant traitant des applications *ex vivo*, nous avons utilisé un poids de 50g pour assurer le contact entre ces plateformes et les électrodes en inox qui ont chacune un poids d'environ 5g. Ainsi, la force appliquée sur chaque plateforme nanocomposite sera d'environ 0,2N ce qui équivaut à une pression d'environ 6000Pa. D'après l'exemple présenté Figure 3-30 l'application d'une telle contrainte sur un échantillon de type AGR+CMC+NTC/CSA engendrerait une déformation élastique d'environ 0,25%. Dans le cas d'échantillons de même composition SSC, majoritairement utilisés dans le chapitre 4, une

pression de 6000Pa engendrerait une déformation hors du domaine élastique, d'environ 6% (soit 0,04mm). Une telle déformation, même irréversible, nous semble acceptable.

*Nous avons conclu de ces essais mécaniques dynamiques et statiques que la composition, et surtout la présence de NTC et de CMC, n'avait qu'une influence ponctuelle sur les grandeurs mécaniques uniquement en compression à la concentration actuellement utilisée. Nous avons observé des augmentations du module de conservation  $E'$  et du module élastique  $E$  pour les échantillons CSA, et de la limite du domaine viscoélastique linéaire en compression pour les échantillons SSC. La variation de la concentration en NTC avait été explorée dans de précédents travaux et ces nouveaux critères de comparaison remettent cette question au centre de nos futures études.*

*Les traitements SSC et CSA sont globalement bénéfiques pour les propriétés mécaniques en mode dynamique. L'augmentation importante de la limite du domaine viscoélastique en compression dans le cas du traitement SSC est intéressante. Cependant, ces plateformes sont destinées à être utilisées comme des patches, et seront sollicitées principalement en compression statique. L'amélioration du module élastique  $E$  offerte par le mode de séchage CSA est donc particulièrement avantageuse pour garantir l'intégrité des échantillons, même si la compression envisagée en conditions d'utilisation sera certainement très modérée. Actuellement, la pression appliquée sur les plateformes nanocomposites par le dispositif utilisé pour les expérimentations ex vivo induit une faible déformation sur les échantillons SSC et une déformation négligeable et élastique pour les échantillons CSA. Cette contrainte est également bien trop faible pour déformer les plateformes jusqu'à leur rupture. Les échantillons CSA semblent donc les plus intéressants sur le plan mécanique.*

### **3.4. Fonction électrode – Mesures de conductivité en tension continue**

Les travaux antérieurs, comprenant des mesures électriques réalisées sur des échantillons AGR+NTC par spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE), n'avaient pas permis de mettre en évidence le seuil de percolation des NTC, malgré une augmentation de leur concentration jusqu'à 40% en masse par rapport à la masse d'AGR. La présence de NTC avait cependant eu un impact positif sur la conductivité. Des mesures en tension continue avaient aussi été réalisées, et avaient montré des résultats similaires.

Ici, nous avons cherché à répéter les mesures en tension continue sur un plus grand nombre d'échantillons, et à observer plus en détail l'effet du milieu de regonflement utilisé, ainsi que de l'ajout de CMC. Dans un second temps, nous avons étudié l'augmentation de la concentration des NTC de 1 à 10% en masse par rapport à l'agarose. Les mesures présentées ici n'ont pas été réalisées dans les conditions d'utilisation des plateformes, mais ont permis une caractérisation électrique pour nous aider à discriminer les différents échantillons.

Les résultats montrent que la présence de NTC à 1% par rapport à l'agarose ne suffit pas à modifier les propriétés de conduction de la plateforme, comme cela avait été déjà démontré, et ce même en présence de CMC (Figure 3-31). L'utilisation de solutions ayant des conductivités différentes n'entraîne pas non plus de modification significative des résultats. La seule différence considérée comme statistiquement significative (non présentée) existe entre la série eau DI et TE, où les échantillons contenant de l'eau DI ont en moyenne des conductivités supérieures, ce qui est relativement contre-intuitif.

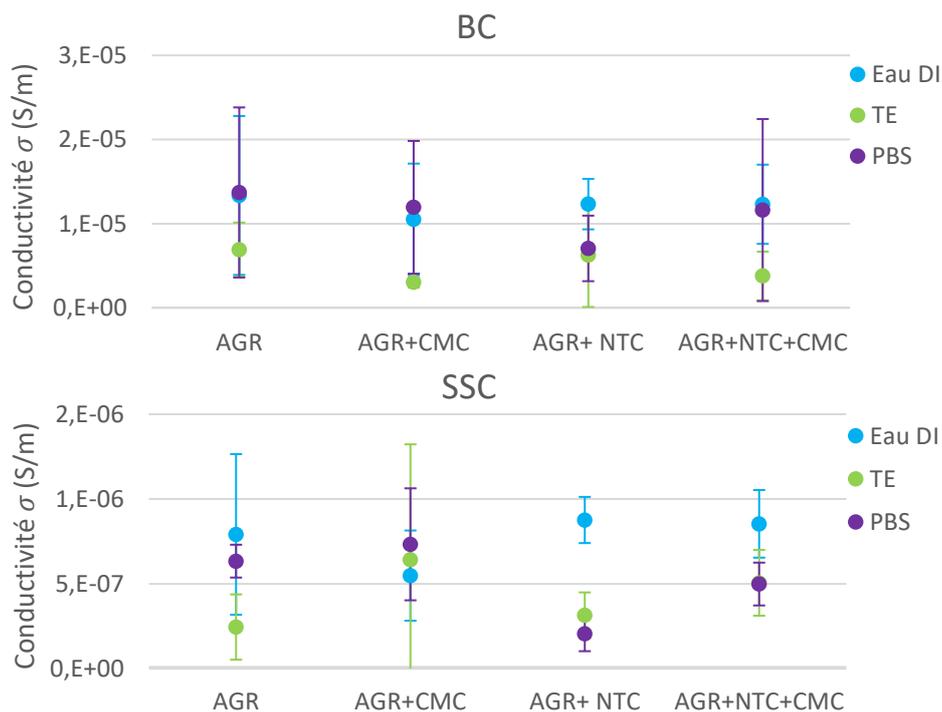


Figure 3-31 Influence de la composition de la matrice, de la composition de la phase aqueuse, et de la mise en forme sur la conductivité des plateformes nanocomposites. Les barres d'erreur représentent les écarts-types.  $n = 3$ .

La nature de la conduction dans le matériau est complexe du fait du nombre de constituants: la matrice polymère, les NTC et la phase aqueuse dans la porosité. Nous avons montré précédemment que l'étape de séchage densifiait le matériau. Si la conductivité était majoritairement liée à la conduction électronique dans la matrice composite, au travers des NTC, nous pourrions observer une augmentation de la conductivité des échantillons SSC par rapport aux échantillons BC. Cette élévation de conductivité serait issue du rapprochement des NTC, permettant d'atteindre le seuil de percolation, ou abaissant les barrières d'énergie nécessaires aux sauts des porteurs de charge, comme décrit par J.F. Guillet [4]. Or, nos résultats montrent que la conductivité des échantillons SSC est au contraire environ 15 fois plus faible que celle des échantillons BC.

J.F. Guillet dans ses travaux avait conclu des mesures en SIE que la conductivité dans les échantillons résultait en partie de la conductivité ionique au travers des porosités interconnectées du matériau. Cette observation est cohérente avec nos résultats puisque la densification correspond à une diminution de la quantité de solvant au sein de matériau. Si c'est le solvant qui assure la conductivité, les échantillons SSC devraient être moins conducteurs que les BC, et c'est ce que l'on observe.

Cependant, ici l'augmentation de la concentration d'ions, et donc de la conductivité de la phase aqueuse n'a pas d'influence sur la conductivité du système. Ce manque de précision dans la mesure vient peut-être de notre mode de sollicitation, en courant continu, puisque des différences entre les solvants avaient été mesurées en SIE. Il faudrait repasser sur ce modèle de mesure en SIE pour continuer à étudier cet aspect. De plus, des mesures à différentes températures seraient nécessaires pour aller plus loin dans l'analyse des différents modes de conduction. Des mesures à basse température, proche de 0, pourraient permettre d'immobiliser la phase aqueuse et ainsi de mesurer la conductivité intrinsèque de la matrice. L'étude de l'évolution de la conductivité sur un cycle de séchage et regonflement pourrait également permettre de comprendre la différence entre ces deux états.

Finalement, nous avons mesuré la conductivité dans l'eau DI de plateformes nanocomposites à 10%<sub>m</sub> de NTC en masse par rapport à l'agarose (Figure 3-32).

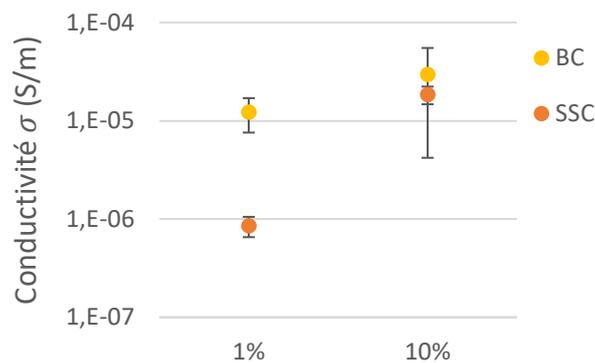


Figure 3-32 Influence de la concentration massique en NTC sur la conductivité. Les barres d'erreur représentent les écarts-types.  $n = 3$ .

Les mesures montrent que contrairement aux échantillons à 1% de NTC, la conductivité des échantillons comportant 10% de NTC n'est pas significativement réduite par l'étape de séchage et de regonflement (Figure 3-32). Cela pourrait correspondre à un changement de régime de conduction, à une bascule entre la conduction ionique et électronique. La conductivité de la matrice prendrait le pas sur la conductivité ionique dans le solvant, la conductivité globale ne serait donc plus impactée par la réduction du volume de celui-ci. Il faudrait continuer à augmenter la quantité de NTC dans la matrice pour voir comment évoluent ces valeurs.

Contrairement à ce qui peut être trouvé dans la littérature, l'augmentation de la concentration en NTC n'a pas eu d'effet spectaculaire sur la conductivité électrique de nos hydrogels nanocomposites. En effet, Barrau et coll. ont amélioré de 10 log la conductivité électrique d'une résine époxy en ajoutant des NTC mono et biparois [203]. Ramasubramaniam et coll. avaient mesuré une hausse de la conductivité électrique de 5 log en augmentant la fraction massique de NTC monoparois de 1% à 10% dans un composite à base de polycarbonate [285]. Des travaux portant sur des nanocomposites à base de polyméthacrylate de méthyle (PMMA), rapportent également des augmentations de plusieurs log de la conductivité électrique, en présence de faibles fractions volumiques de SWCNT et MWCNT [286, 287]. Enfin Han et coll. rapportent une conductivité d'environ 0,2S/m mesurée sur des nanocomposites à base d'agarose et de CNT à 10% dont les interactions électrostatiques sont stabilisées par la polydopamine [227]. Le seuil de percolation n'est pas étudié, mais ces travaux montrent qu'il est possible d'améliorer les propriétés de conduction électrique de l'agarose avec NTC.

*Dans le but d'identifier un biais quelconque dans notre méthode de préparation ou de mesure, il serait intéressant de tenter de reproduire ces résultats, avec de la polydopamine à la place de la CMC. De plus, une étude des interactions entre NTC et AGR dans notre matériau, ainsi que de l'organisation structurale des chaînes d'agarose en présence de NTC pourrait permettre de mieux apprécier les phénomènes de conduction.*

*Malheureusement, les propriétés mécaniques et de stockage des échantillons à 10% en NTC n'ont pas pu être incluses dans ces travaux, il n'est donc pas possible de conclure sur cet aspect. Cependant, l'augmentation de concentration en NTC ressort comme étant certainement nécessaire pour que leur rôle au sein des plateformes nanocomposites devienne pertinent, tant sur le plan mécanique que sur le plan électrique.*

### 3.5. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons tenté de fournir une caractérisation plus complète des plateformes nanocomposites à base d'agarose et de nanotubes de carbone, notamment sur leur microstructure, leur fonction de réservoir et leur fonction d'électrode.

Nous avons introduit la carboxyméthyle cellulose (CMC) dans la composition pour répondre à un besoin de dispersion et de stabilisation des NTC au sein des suspensions aqueuses utilisées pour la préparation des nanocomposites. Cet effet stabilisant a pu être vérifié au travers de mesures de turbidité et d'observations MET, qui ont mis en évidence une meilleure dispersion. Cependant, cet ajout n'a finalement que très peu d'effet sur l'ensemble des propriétés de réservoir, mécaniques et électriques. La concentration de NTC actuellement utilisée dans les nanocomposites, 1% en masse par rapport à l'agarose, ne semble pas suffisante pour avoir un effet significatif sur les propriétés étudiées. Des améliorations très ponctuelles ont été notées sur les propriétés de relargage du principe actif et sur certaines propriétés mécaniques. Les NTC ne jouent donc pas encore le rôle de renfort mécanique et électrique qu'on souhaite leur attribuer. Il sera primordial dans la suite de ce projet d'étudier l'organisation des NTC dans la matrice d'agarose, en fonction notamment de leur concentration, pour approfondir la compréhension des mécanismes de conduction au sein des plateformes. La composition du matériau devra être optimisée sur le plan électrique, tout en tenant compte des effets sur les propriétés de stockage et les cinétiques de restitution.

L'utilisation d'une charge pour contraindre le diamètre des plateformes pendant le séchage s'est avérée efficace pour la conservation de leurs dimensions, sans impacter la quantité de solvant incorporable dans les plateformes. Ce traitement SSC a également eu l'effet d'accélérer la cinétique de relargage par rapport aux échantillons SSA. La résistance mécanique a également été améliorée comparée à celle des échantillons BC. L'étape de congélation s'est avérée pertinente pour la mise en forme des plateformes. La forme et surtout le diamètre des plateformes ne sont quasiment pas affectés par le séchage, le facteur d'incorporation de 8 apparait comme le meilleur parmi les conditions étudiées sans dépendre de la composition. Sur le plan du relargage, les échantillons SSC et CSA sont similaires en volume, mais les échantillons CSA ont une cinétique plus lente en diffusion verticale. Un relargage sous stimulation électrique, plus proche des conditions d'utilisation, devra être mis

en place pour finaliser ces caractérisations. Pour finir, les propriétés mécaniques mesurées sur les échantillons CSA sont les plus intéressantes, ces échantillons sont assez résistants pour l'utilisation en patch que nous envisageons. Il manque la comparaison des propriétés de conduction électrique entre SSC et CSA pour conclure sur toutes les propriétés. Cependant, d'après les caractérisations détaillées dans ce chapitre, les échantillons CSA ressortent comme les plus adéquats en tant que plateformes nanocomposites de délivrance transdermique.



# **Chapitre 4**

## **Evaluation des plateformes nanocomposites pour la délivrance transdermique électrostimulée**



Une preuve de concept avait été présentée dans des travaux précédents montrant une augmentation de l'intensité du marquage d'une peau pulsée avec des plateformes nanocomposites, par rapport à une peau traitée avec des plateformes d'agarose [3]. Les plateformes avaient été regonflées avec une solution contenant un dextran de 4kDa, marqué avec de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) que nous appellerons FD4. Pendant ce projet, nous avons cherché à approfondir cette preuve de concept en adressant plusieurs questions clés nécessaires à la compréhension des mécanismes de délivrance. Dans notre dispositif d'EP, la forme des électrodes, leur composition ainsi que leur disposition sont différentes de ce qui a déjà été mis en œuvre dans la littérature. La première étape a été de démontrer plus solidement son efficacité en termes de perméabilisation de la peau. Pour cela, nous avons utilisé l'iodure de propidium (PI), une petite molécule hydrophile classiquement utilisée en électroporation cellulaire [52, 288]. Dans un second temps, dans le but de nous assurer du caractère réversible et non invasif de la méthode de délivrance, nous avons utilisé le Lucifer Yellow, LY, utilisé dans la littérature pour observer l'évolution de la fonction barrière de la peau en fonction de la durée après traitement. Par la suite, nous avons étudié l'influence de la taille et de la charge de la molécule à délivrer sur la délivrance en utilisant un FD4, et deux de ses dérivés chargés. Ces différentes expériences nous ont permis de proposer une explication des mécanismes de délivrances engagés. Dans un deuxième temps, nous avons entrepris l'étude de l'influence de paramètres plus environnementaux sur la délivrance, notamment pour aider à l'établissement de modèles numériques. Nous avons introduit un modèle de tissu alternatif à la peau de souris, évalué les variations de pH et de température et avons observé l'influence de la conductivité des composants du dispositif sur la délivrance. Dans une dernière partie, il nous a semblé intéressant d'évaluer la toxicité de nos NTC aux concentrations utilisées même si les plateformes ont été pensées pour garder les NTC piégés en leur sein. Ainsi, nous avons exposé trois lignées cellulaires provenant de la peau à une gamme de suspensions de NTC avec CMC de concentration variable.

## 4.1. Investigation des mécanismes de délivrance

Les plateformes utilisées pour ces expériences sont de composition AGR+NTC+CMC, avec un séchage de type séchage sous charge (SSC). Tout au long de cette partie, le traitement d'électroporation (EP) correspondra à une série de 8 impulsions unipolaires en vague carrée de 300V et 20ms, avec une fréquence de 1Hz. Les résultats présentés ici ont fait l'objet d'une publication [6].

### 4.1.1. Mise en évidence de la perméabilisation

Pour mettre en évidence l'aspect fonctionnel de notre dispositif, nous avons regonflé des plateformes avec une solution de PI à 100µM dans le TE et avons traité des peaux de souris avec ces plateformes. Le signal de marquage du PI sur ces peaux montre une asymétrie entre l'anode et la cathode, mais aussi une délivrance non uniforme au sein des zones traitées (Figure 4-1a).

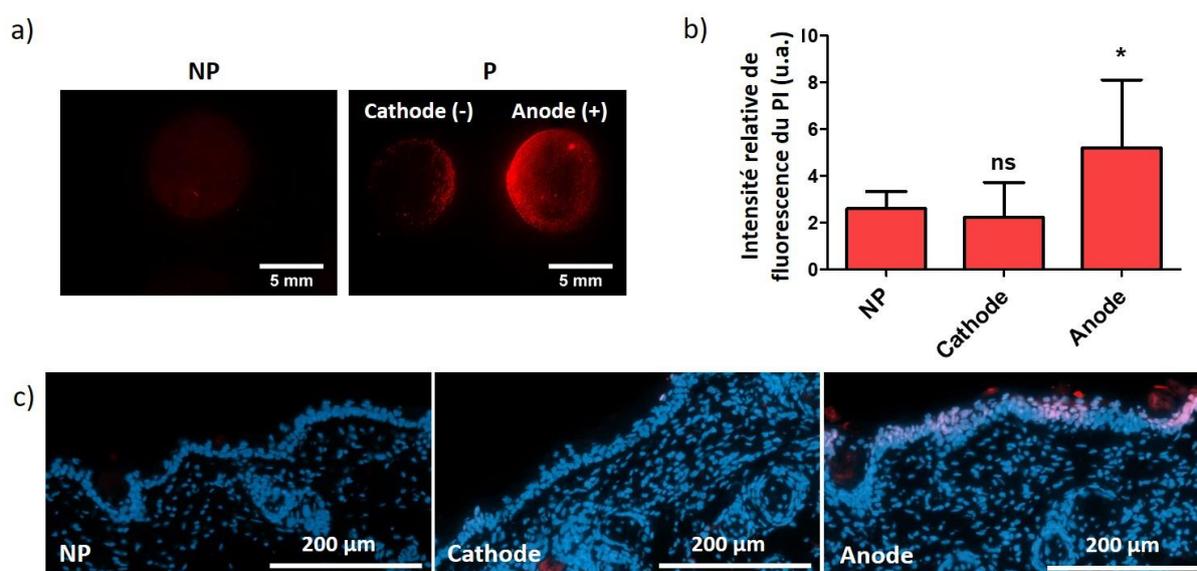


Figure 4-1 Mise en évidence de la perméabilisation de la peau après utilisation de plateformes nanocomposites regonflées avec de l'iodure de propidium (PI) pour l'électroporation. a) Motif de marquage du PI sur une peau pulsée, comparé à une peau non pulsée (NP). b) Quantification de l'intensité relative de fluorescence (IRF) du PI à l'anode et la cathode de peaux pulsées, comparée à celle de peaux NP. Analyses statistiques : Kruskal-Wallis, post test de Dunn vs NP. Codes : \* =  $p < 0.05$ ; ns = non significatif. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types.  $n = 9$ . c) Observations de coupes histologiques de 10 µm d'échantillons traités avec des plateformes contenant du PI. Le PI est en rouge, les noyaux marqués au DAPI en bleu.

La quantification de l'intensité relative de fluorescence relative (IRF) a confirmé les observations qualitatives : l'absorption de PI est bien augmentée à l'anode, comparée à l'absorption naturelle par des peaux non pulsées (NP) après 30min (Figure 4-1b). L'absorption côté cathode cependant pas significativement différente du contrôle NP. Les observations histologiques sur ces échantillons montrent la présence de noyaux marqués en rouge dans l'épiderme côté anode Figure 4-1c. Nous en avons déduit que le PI a pu traverser le *stratum corneum* (SC) pour marquer des noyaux de la couche inférieure alors que ceci lui est impossible sans électroporation, comme le montre la coupe de l'échantillon NP. De très rares noyaux marqués au PI sont observés côté cathode.

Le PI est un intercalant de l'ADN qui marque le noyau de cellules dont la membrane plasmique est perméable. De ce fait, il est très utilisé pour quantifier l'effet de l'électroperméabilisation, mais il peut aussi être un marqueur de mort cellulaire. Dans notre cas, pour vérifier si notre traitement d'électroporation induit de la mort cellulaire, nous avons traité des peaux avec des plateformes contenant uniquement du TE, et avons attendu 30min, pour permettre à une éventuelle réimpermeabilisation de se produire, avant de déposer 100 $\mu$ l de PI au niveau des électrodes. En parallèle, la même quantité de PI a été appliquée sur des peaux NP. Le PI a été laissé 30min à 37°C et a été rincé avant la prise d'image de la peau (Figure 4-2).

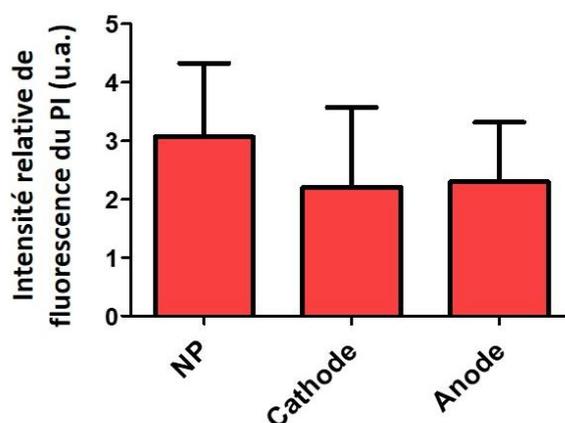


Figure 4-2 Évaluation de la mort cellulaire induite par le traitement d'EP avec des plateformes nanocomposites. Quantification de l'IRF du PI sur des peaux 30 minutes après traitement, comparée à celle d'une peau NP. Analyses statistiques : ANOVA 1 facteur, post test de Dunnett vs NP. Aucune différence n'est significative. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types.  $n = 3$ .

La quantification de l'intensité de fluorescence (IRF) du PI pour cette expérience n'a révélé aucune différence entre une peau vierge de tout traitement (NP) ou une peau traitée après

30min, que ce soit côté anode ou côté cathode. Ainsi, le marquage observé lors de l'électroperméabilisation avec le PI par notre dispositif correspond bien à une perméabilisation réversible de la peau et la mort cellulaire n'est pas impliquée de manière significative dans nos expériences.

*Le champ électrique appliqué a donc été suffisant pour déstabiliser la membrane plasmique des kératinocytes de l'épiderme, et permettre l'internalisation du PI dans les noyaux au niveau de l'anode. De plus, nous pouvons en déduire que le SC a été assez perméabilisé pour permettre au PI d'atteindre les couches plus profondes de l'épiderme. Nous avons noté une asymétrie de délivrance qui peut être issue de plusieurs phénomènes. D'une part, elle peut être le résultat de forces électrophorétiques poussant ou retenant le PI en fonction de la polarité de l'électrode, puisque les pulses appliqués sont unipolaires. D'autre part, notre seconde hypothèse implique que l'utilisation de pulses unipolaires génère des structures de perméabilisation asymétriques dans la peau en fonction de la polarité de l'électrode, permettant au PI d'être plus ou moins délivré en fonction des chemins disponibles.*

#### **4.1.2. Évaluation du caractère transitoire de la perméabilisation**

Le caractère réversible de la perméabilisation de la peau est un point clé, nécessaire pour qualifier la méthode de délivrance transdermique par EP comme non invasive. Pour l'évaluer, nous avons utilisé un marqueur fluorescent, le Lucifer Yellow (LY), utilisé dans la littérature pour estimer l'état de la fonction barrière de peaux de souris [262]. Dans ce test, des plateformes nanocomposites regonflées uniquement avec du TE sont utilisées, puis 100µl de LY sont déposés à la surface des zones traitées 0, 15, 30 ou 60min après EP. Les échantillons sont laissés pendant 1h à 37°C avant d'être rincés et observés. Les images en macroscopie de fluorescence montrent un marquage intense aux deux électrodes, mais supérieur à la cathode lorsque le LY est appliqué directement après EP (Figure 4-3a). L'intensité de fluorescence décroît côté anode dès 15min et le même comportement est observé côté cathode après 30min. La quantification de l'absorption du LY en fonction du temps permet de valider ces tendances. On observe une diminution de la pénétration du LY par la peau en fonction du temps, des deux côtés, indiquant que la peau tend à retrouver son imperméabilité initiale (Figure 4-3b). Le rétablissement de la fonction barrière côté cathode n'est pas total et stagne après 30min. Au contraire, côté anode, on observe un retour complet de l'imperméabilité au LY dès 15min.

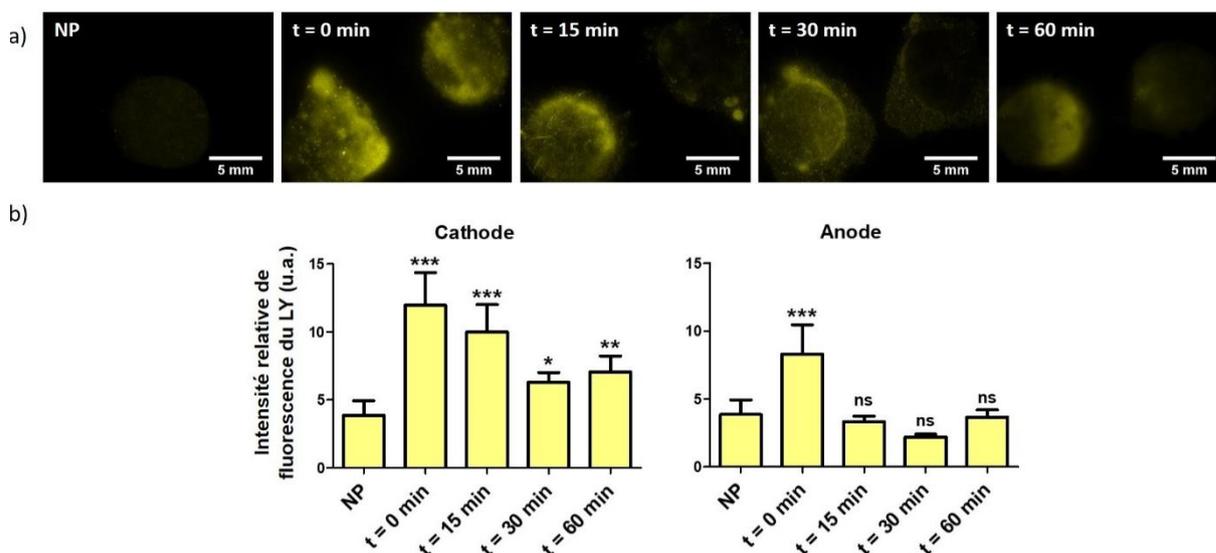


Figure 4-3 Évaluation de la réversibilité de la perméabilisation. Des plateformes regonflées avec du TE sont utilisées pour l'EP d'explants de peaux de souris et 100 $\mu$ l de LY sont appliqués 0, 15, 30 ou 60 min après traitement, pendant 1h à 37°C. a) Signal de fluorescence du LY par des peaux traitées après 0, 15, 30 et 60 min, comparé au motif d'absorption d'une peau NP. La cathode est toujours à gauche. b) Quantification de l'IRF du LY à la cathode et à l'anode, en fonction du temps attendu avant le dépôt de LY, comparé à l'IRF de LY d'une peau NP. Analyses statistiques : ANOVA 1 facteur, post test de Dunnett vs NP. Codes : \* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ ; ns = non significatif. Les barres d'erreur représentent les écarts-types.  $n = 3-4$ .

Le retour partiel de l'imperméabilité de la peau après EP avait été observé par Dujardin et coll., en mesurant l'impédance de peaux de rats *in vivo* [118]. L'application d'une série de 10 pulses de 335V et 5ms avait généré une forte diminution de l'impédance de la peau, puis une augmentation de celle-ci avait été observée au cours du temps, sans pouvoir atteindre la valeur initiale, même après six heures. Des résultats similaires ont été obtenus *in vitro* par Pliquett et coll. [89].

Pour le moment, cette réversibilité partielle nous conviendra pour valider notre dispositif, puisqu'aucune optimisation de nos paramètres électriques n'a encore été étudiée. Il sera nécessaire dans nos futurs travaux de passer sur des modèles *in vivo* pour étudier plus finement l'évolution de l'imperméabilité de la peau après traitement. En effet, notre modèle *ex vivo* ne permet pas de tenir compte de la circulation sanguine, maintenant l'équilibre physiologique dans le tissu, ce qui peut modifier le rétablissement de la peau. Des cycles d'EP, espacés de plusieurs heures, pourraient être intéressants pour évaluer si des traitements d'EP répétés sur une zone restreinte génèrent des dommages irréversibles du SC.

Cette expérience a aussi permis de mettre en évidence une asymétrie de marquage du LY entre les deux électrodes. Celui-ci est approximativement 1,5 fois plus intense côté cathode directement après EP. L'absorption de LY durant ce test se produit sans la présence du champ électrique. La seule force motrice restante pouvant permettre à la molécule de pénétrer dans la peau est une simple diffusion passive.

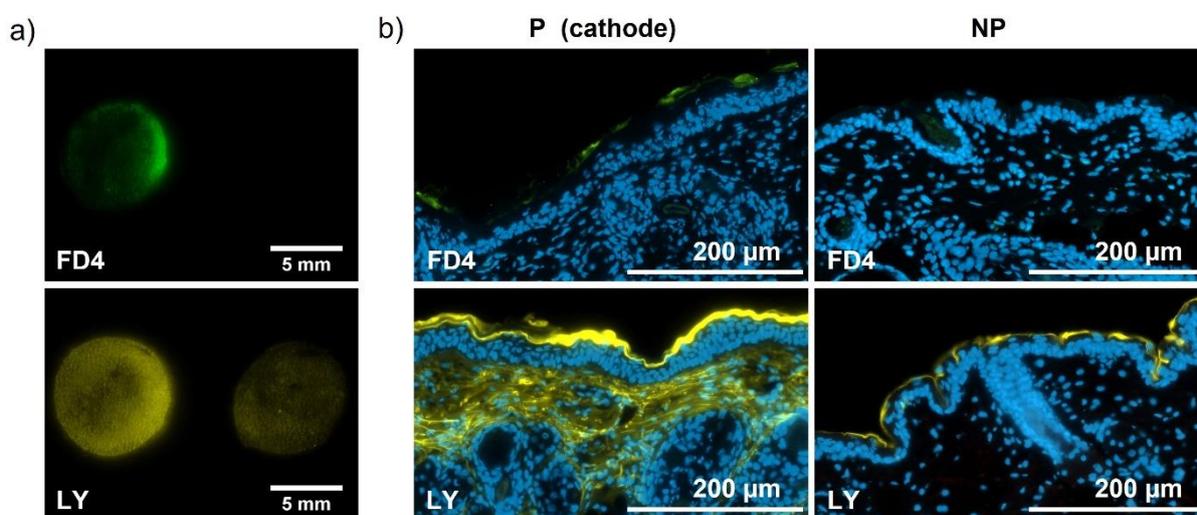
*L'asymétrie de marquage du LY renforce la seconde hypothèse émise précédemment, qui implique que l'application de pulses unipolaires génère des chemins de perméabilisation différents en fonction de la polarité de l'électrode. Ces défauts de la fonction barrière du SC subsistent encore au bout d'une heure côté cathode, permettant le passage du LY, alors qu'ils se sont résorbés côté anode. De plus, comme pour l'expérience précédente, on remarque que la délivrance n'est pas uniforme au sein de chaque électrode. La fonction barrière n'est sans doute pas affectée uniformément sur toute la surface traitée (~50mm<sup>2</sup>), l'intensité du champ électrique délivré étant dépendante avec la distance inter-électrode. Le marquage plus intense en forme de croissant sur le bord interne des zones pulsées, particulièrement observable sur l'anode Figure 4-1a, est caractéristique de notre dispositif et correspond à la zone où le champ électrique est le plus intense puisque la distance entre les plateformes est la plus faible. Des mesures d'impédance lors de traitement d'EP, avec des plateformes plus petites par exemple, pourraient nous permettre d'avoir des données plus locales et ainsi déterminer des paramètres de pulses optimisés pour rester en régime de perméabilisation totalement réversible.*

#### **4.1.3. Influence de la taille de la molécule sur sa délivrance**

Dans le but d'observer l'impact de la taille de la molécule sur sa délivrance dans la peau pendant l'EP, nous avons répété les premières expériences en intégrant le LY dans les plateformes, et en comparant avec les résultats obtenus en utilisant des plateformes regonflées avec une solution de FD4 (10 fois plus grand que le LY) dans le TE. Nous nous sommes focalisés sur les motifs de marquage, ainsi que sur les observations histologiques pour évaluer les profondeurs de pénétration des marqueurs.

D'après les résultats présentés Figure 4-4a, on constate que les deux molécules marquent préférentiellement le côté de la cathode, au contraire de ce qui est observé pour le PI. On pourrait expliquer ce résultat en considérant la charge des molécules. Le LY est un sel de lithium possédant deux fonctions sulfonate. Sa charge globale est négative en milieu aqueux.

Le FITC substitué sur le Dextran introduit lui une charge négative à pH neutre, grâce à un groupe carboxylate. Cependant, le taux de substitution de FITC est très faible (0,001 à 0,008 mol FITC/mol glucose) et il semble improbable que ces charges aient le même impact que pour le LY. La charge n'est donc qu'une partie de la réponse, et cette observation va également dans le sens de notre hypothèse de génération asymétrique de chemins de perméabilisation pendant l'EP. On pourrait le vérifier en répétant l'expérience avec une molécule de la taille du LY, mais de charge globalement neutre, ou à l'inverse utiliser des dérivés chargés du FD4. C'est cette dernière approche qui est explorée par la suite.



*Figure 4-4 Influence de la taille de la molécule sur sa délivrance. Des plateformes regonflées avec du LY ou du FD4 ont été utilisées pour l'EP d'explants de peau de souris. a) Motif de marquage de peaux traitées par EP avec des plateformes contenant du FD4 ou du LY. La cathode est toujours à gauche. b) Observations de coupes histologiques de 10µm d'échantillons traités avec des plateformes contenant du FD4 ou LY. Le FD4 est en vert, le LY en jaune et les noyaux marqués au DAPI en bleu.*

Les observations sur les coupes histologiques montrent une accumulation naturelle de LY importante dans le SC, comparée à celle du FD4 (Figure 4-4b). De plus, le LY ne pénètre pas le SC même au niveau des appendices de la peau comme le follicule pileux visible sur la coupe LY NP Figure 4-4b. Les observations sur le côté cathode des peaux pulsées démontrent que le FD4 tend aussi à s'accumuler dans le SC sous stimulation électrique, alors que le LY pour sa part peut atteindre très largement le derme en traversant le SC. Les deux molécules n'ont pas été délivrées de manière identique dans les couches de la peau. Les chemins de délivrance existent, comme démontré par la délivrance de LY dans le derme. Mais ils ne sont pas encore adaptés pour des molécules plus larges, comme le FD4. On notera tout de même que nos paramètres électriques sans optimisation nous permettent d'obtenir des résultats très

prometteurs pour la délivrance de molécules hydrophiles de petite taille, ce qui est très encourageant pour la suite de ce projet. Il pourrait être intéressant de doser le LY délivré, en utilisant une cellule de diffusion de verticale, ou en s'inspirant des travaux de Pliquet et Weaver, qui ont utilisé un gel d'agarose comme récepteur, leur permettant de visualiser et quantifier la délivrance de sulforhodamine à travers des explants de peau humaine [123].

#### **4.1.4. Influence de la charge de la molécule sur sa délivrance**

##### *4.1.4.a. Effets des pulses unipolaires*

Nos expériences précédentes ont mis en lumière une asymétrie intrinsèque structurale entre les deux électrodes pendant l'EP. Cependant, des questions sur de l'influence de forces électrophorétiques sur les molécules chargées pendant l'EP demeurent. Pour répondre à ces questions, nous avons comparé notre molécule modèle FD4 à deux de ses dérivés chargés : l'un greffé avec des groupements carboxyméthyle, FD4-CM, et l'autre avec des groupements diéthylaminoéthyle, FD4-DEAE, leur conférant respectivement une charge globale négative ou positive. Comme dit précédemment, le taux de substitution du FITC est faible, et est inférieur au taux de substitution de carboxyméthyle et d'azote de deux ordres de grandeur. Or la mobilité électrophorétique des molécules dépend directement de la concentration des formes chargées, à pH donné [289]. On considère donc le FD4 globalement neutre pour cette expérience.

Les images de macroscopie en fluorescence montrent des motifs de marquage différents en fonction des molécules (Figure 4-5a). Dans un premier temps, la quantification de l'IRF du FITC sur les peaux traitées nous permet de vérifier l'effet positif de l'EP sur l'absorption de FD4 en surface de la peau du côté de la cathode, résultat qui n'avait pas été présenté dans la partie ci-dessus. Ensuite, on remarque une absorption doublée du FD4-CM à la cathode, alors qu'elle est égale au FD4 côté anode. Ces deux molécules sont d'ailleurs significativement moins présentes côté anode, en comparaison avec les résultats NP. Un comportement opposé est observé pour le FD4-DEAE : l'absorption est 30% plus faible que pour le FD4 à la cathode, mais elle semble augmentée à l'anode (Figure 4-5b).

Ces observations peuvent être expliquées en considérant la polarité des électrodes. Dans notre configuration, la cathode est négative, de ce fait l'électrophorèse pousse les molécules chargées négativement, comme le FD4-CM, de la plateforme vers la peau. Au contraire, elles

sont « retenues » dans la plateforme côté anode. Les observations faites sur les coupes histologiques montrent une accumulation des trois molécules dans le SC, avec une intensité et une uniformité semblable à ce qui est observé sur les surfaces en macroscopie de fluorescence.

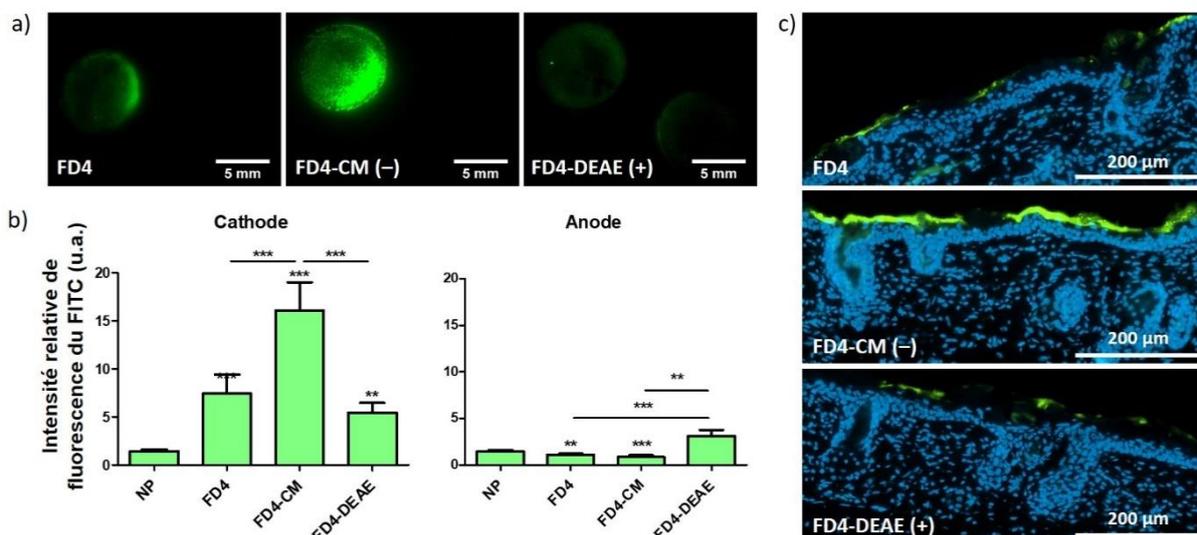


Figure 4-5 Influence de la charge de la molécule sur sa délivrance. Des plateformes regonflées avec une solution de FD4 ou d'un de ses deux dérivés chargés FD4-CM (-) et FD4-DEAE (+), ont été utilisées pour l'EP d'explants de peau de souris. a) Motifs de marquage de peaux traitées par EP avec des plateformes contenant du FD4, du FD4-CM ou du FD4-DEAE. La cathode est toujours à gauche. b) Quantification de l'IRF du FITC à la cathode et à l'anode de peaux traitées, comparé à l'IRF de FITC sur des explants NP. Analyses statistiques : ANOVA 1 facteur, post test de Tukey pour comparer les séries à la série NP puis entre elles. Codes : \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ ; sinon non significatif. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types,  $n = 3-9$ . c) Observations de coupes histologiques de 10µm d'explants de peau traitée avec des plateformes contenant du FD4, du FD4-CM (-) ou du FD4-DEAE (+). Le FITC est en vert, les noyaux marqués au DAPI en bleu.

Finalement, une comparaison de l'absorption passive des dérivés de FD4 sur des peaux NP est présentée comme expérience de contrôle Figure 4-6. L'IRF mesurée proche de 1 indique que le signal de fluorescence du FITC absorbé par les peaux non traitées est très faible et très proche de leur intensité d'autofluorescence. Aucune différence entre le marquage des trois molécules n'est observée.

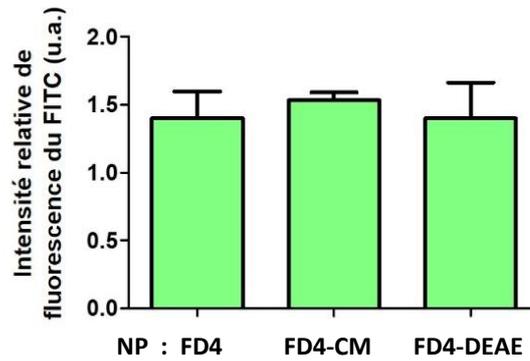


Figure 4-6 Comparaison de l'absorption naturelle des trois dérivés de FD4. Des plateformes contenant du FD4, FD4-CM ou FD4-DEAE sont laissées 30 min sur des peaux, sans EP, puis rincées avant imagerie. Analyses statistiques : ANOVA 1 facteur, post test de Tukey pour comparer les séries entre elles. Les différences sont non significatives. Les barres d'erreur représentent les écarts-types,  $n = 3$ .

#### 4.1.4.b. Effets des pulses bipolaires

Afin de vérifier notre hypothèse sur l'électrophorèse et l'asymétrie intrinsèque de perméabilisation, nous avons réalisé une expérience complémentaire où la polarité des électrodes est inversée entre chaque pulse (paramètres EGT-inv) tout en conservant un nombre total de pulses égal à 8. Les plateformes sont regonflées avec une solution de PI, petit et positivement chargé, et de FD4. La quantification des IRF du PI présentée Figure 4-7 a montré une délivrance équivalente aux deux électrodes, ce qui est différent des résultats présentés en Figure 4-1, où le PI marque préférentiellement l'anode avec des pulses unipolaires. La quantité délivrée semble réduite, mais mieux répartie. Les forces électrophorétiques poussant le PI vers la peau ou vers la plateforme, alternativement en fonction de la polarité de l'électrode, pourraient effectivement expliquer ce résultat.

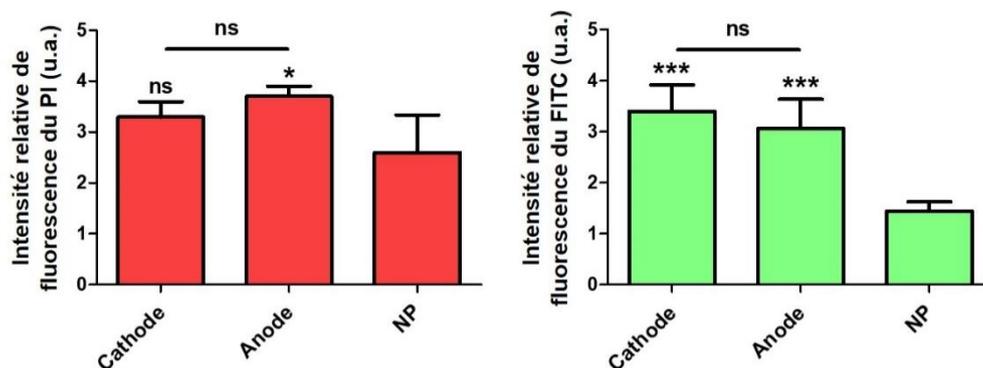


Figure 4-7 Effets des pulses bipolaires sur la délivrance de PI et DU FD4. Des plateformes regonflées avec du PI et du FD4 sont utilisées pour appliquer un traitement d'EP bipolaire à des explants de peau de souris. Le nom de l'électrode est attribué d'après sa polarité lors du premier pulse. Quantification de l'IRF du PI et du FITC. Analyses statistiques : ANOVA 1 facteur, post test de Tukey pour comparer les entre elles. Codes : \* =  $p < 0.05$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ ; ns = non significatif. Les barres d'erreur représentent les écarts-types,  $n = 3$ .

Dans le cas du FD4, la quantité délivrée côté cathode est réduite de moitié par rapport à l'expérience précédente, mais elle est équivalente à la quantité délivrée à l'anode. Comme pour le PI l'utilisation de pulses bipolaires permet une meilleure répartition de la délivrance. Dans les expériences décrites jusqu'ici, nous avons considéré le FD4 comme globalement neutre. Par conséquent, nous avons considéré l'influence des forces électrophorétiques sur cette molécule comme négligeable, comparée aux autres molécules étudiées. Cependant, cette influence n'est probablement pas inexistante, et doit jouer un rôle dans ce résultat. Une autre explication pourrait être que les chemins de perméabilisation, asymétriquement générés dans le cas de pulses unipolaires, deviennent équivalents dans le cas de pulses bipolaires. Pour continuer l'analyse, il pourrait être intéressant de répéter l'expérience des pulses bipolaires avec une molécule neutre, plus petite que le FD4, et avec les dérivés chargés du FD4.

#### **4.1.5. Durée de délivrance du principe actif après les impulsions**

Dans le but d'évaluer la durée de la délivrance et de discriminer entre les contributions respectives des forces électrophorétiques et de la diffusion passive, le temps de contact entre les plateformes et la peau après traitement par EP unipolaire a été varié. Des plateformes regonflées avec une solution de LY ou de FD4 ont été utilisées pour pulser des explants et laissées en place pour différentes durées, 0, 5, 15, 30 ou 60min avant le rinçage et l'imagerie. Les résultats montrent que l'absorption des deux molécules côté cathode est significativement supérieure à l'absorption naturelle, et ce quelle que soit la durée du contact (Figure 4-8).

Il n'y a pas d'évolution de cette quantité en fonction du temps pour les deux molécules. Une analyse statistique comparant les échantillons pulsés entre eux l'a confirmé. Concernant le côté anode, la délivrance du LY n'a pas été significativement affectée par l'EP. On observe un comportement différent pour le FD4, où la délivrance est significativement diminuée. Par conséquent, nous pouvons conclure que pour une molécule négativement chargée, la délivrance côté cathode est immédiate. Elle est également principalement assurée par l'électrophorèse puisque la fonction barrière est affectée au moins 30min de ce côté. Le caractère négligeable de la diffusion passive devant l'électrophorèse pendant l'application des pulses avait déjà été observé dans la littérature [105, 115].

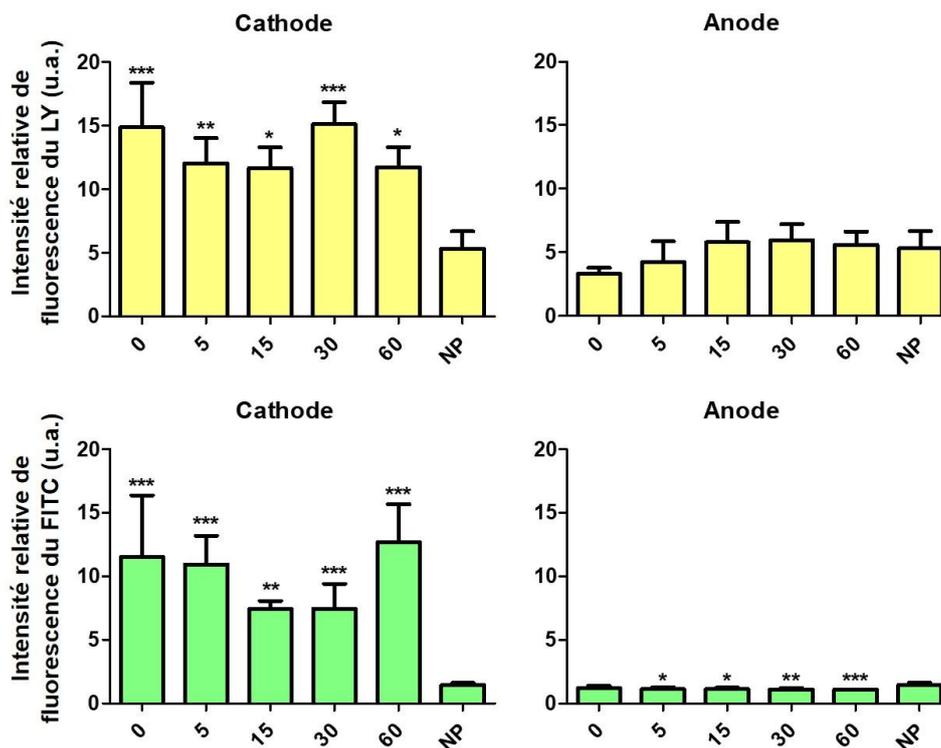
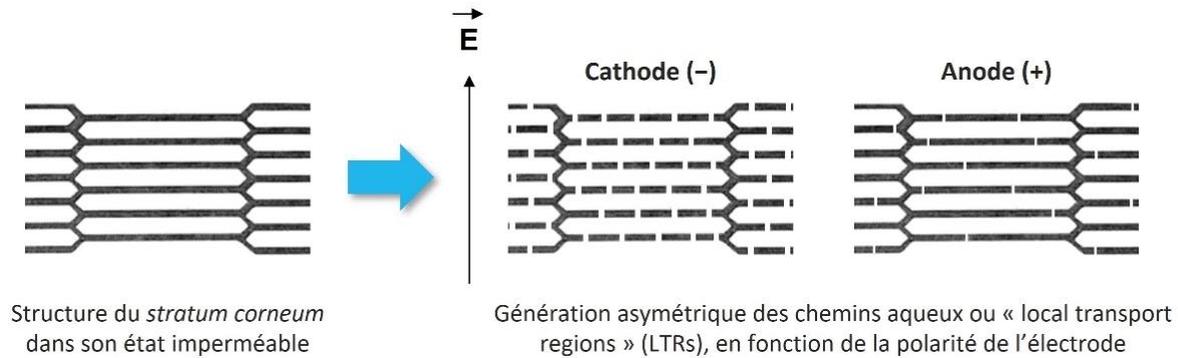


Figure 4-8. Délivrance du principe actif après électroporation. Quantification de l'IRF du LY et du FITC à la cathode et à l'anode de peaux traitées avec des plateformes regonflées avec du LY ou FD4, en fonction du temps de dépôt des plateformes. Analyses statistiques : ANOVA 1 facteur, post test de Dunnett vs NP. Codes : \* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ ; non significatif sinon. Les barres d'erreurs représentent l'écart type,  $n = 3-9$ .

#### 4.1.6. Compréhension des phénomènes observés

Nos expériences ont mis en évidence une asymétrie de l'absorption des molécules entre les deux électrodes, indépendante de la force électrophorétique (Figure 4-3). En considérant les travaux de Weaver et coll. [96], la structure du *stratum corneum* (SC) peut être décrite avec un modèle brique et mortier, où les cornéocytes sont séparés les uns des autres par des bicouches lipidiques. Des régions de transport locales (Local Transport Regions LTRs) se forment dans cette structure à partir de défauts aqueux lorsqu'elle est soumise à un champ électrique pulsé, permettant ainsi à des molécules hydrophiles de traverser le SC. À notre connaissance, nous sommes les premiers à utiliser cette configuration et cette géométrie d'électrodes, nous proposons ici l'idée que les LTR ne sont pas générées uniformément aux deux électrodes avec des pulses unipolaires. Ces LTR pourraient être plus larges et/ou plus nombreuses côté cathode (-), offrant plus de chemins aqueux adaptés au passage des molécules hydrophiles au travers du SC. Une représentation schématique de cette vision est

présentée dans la Figure 4-9. Pour approfondir cette théorie, nous souhaiterions faire des mesures électriques *in situ* du système (dispositif + peau pendant un traitement d'EP), et notamment mesurer l'impédance du tissu en fonction du temps. Ces données seront particulièrement utiles pour construire un modèle numérique du système.



*Figure 4-9 Les LTRs sont générées différemment en fonction de la polarité de l'électrode pendant le traitement par EP. Elles sont peut-être plus nombreuses et/ou plus larges côté cathode. Adapté de Weaver et coll. [96].*

Nos expériences ont également démontré une influence claire de la taille et de la charge des molécules sur leur délivrance, ce qui est tout à fait attendu d'après la littérature [105, 290]. La perméabilisation induite par l'EP s'est révélée suffisante pour délivrer des molécules de la taille du LY jusque dans le derme, et ce résultat encourageant pourrait nous permettre de passer sur des modèles de peau plus proches de la peau humaine, comme la peau de cochon, pour cette gamme de molécules (Figure 4-4). Pour des molécules plus grandes comme les différents dérivés de FD4 utilisés, les résultats ont montré une accumulation dans le SC, sans jamais le traverser. Cette accumulation est cependant significativement augmentée par le traitement signifiant qu'il y a tout de même un effet de l'EP.

La taille de la molécule est sûrement le facteur limitant pour le moment, découlant de l'asymétrie de perméabilisation du SC qui change l'équilibre entre les deux forces motrices de délivrance que sont la diffusion passive et l'électrophorèse. En effet, nous avons observé que la délivrance se produisait majoritairement pendant l'application du traitement EP, et nous en avons déduit que l'électrophorèse était la force motrice principale (Figure 4-8), ce qui est cohérent avec les travaux de Regnier et coll. [115]. Cependant, dans cette même expérience, où des plateformes regonflées avec du LY ou FD4 ont été utilisées pour l'EP, nous avons observé un comportement différent entre les deux molécules côté anode. L'absorption de FD4

a été significativement diminuée alors que celle du LY est restée inchangée. Pourtant, les résultats présentés dans la Figure 4-3 démontrent qu'il est possible d'améliorer la délivrance de LY côté anode, quand celui-ci est appliqué après l'EP. Il y a donc des LTR adaptées au passage du LY des deux coté, cathode et anode. Dans le cas d'une délivrance simultanée à l'EP, on en déduit que l'électrophorèse côté anode s'oppose et inhibe l'effet de la diffusion passive. Pour le FD4, si les LTR à l'anode ne sont pas adaptées à sa taille, il ne peut y avoir de diffusion passive. Il ne reste alors que l'électrophorèse retenant la molécule dans la plateforme (faible charge négative), et réduisant ainsi la délivrance globale.

Cette idée peut être appuyée en reprenant la délivrance du FD4-DEAE positivement chargé à la cathode (Figure 4-5). Dans cette expérience, nous avons supposé que du côté de la cathode, les charges négatives plus nombreuses dans le cas du FD4-CM renforcent l'électrophorèse et améliorent sa délivrance, comparé au FD4. On s'attendrait à observer le même résultat avec le FD4-DEAE à l'anode, cependant ce n'est pas du tout le cas. L'absorption de cette molécule n'est pas différente du contrôle. Par conséquent, nous en avons conclu que malgré la poussée électrophorétique, la délivrance n'était pas possible, car il n'y avait pas de « portes ouvertes » à savoir de LTR adaptées au passage de cette molécule. Nous avons tenté de résumer tous les phénomènes observés et expliqués ici, en fonction de la taille et de la charge des molécules dans le schéma suivant (Figure 4-10).

Pour résumer :

- FD4 : l'implication de l'électrophorèse est réduite comparée aux autres molécules. Les LTR sont suffisantes à la cathode pour permettre une délivrance par l'effet combiné de l'électrophorèse et de la diffusion passive, se limitant au SC. À l'anode, pas de diffusion passive possible, car les LTR ne sont pas adaptées. Les forces électrophorétiques retiennent le FD4 dans la plateforme réduisant la délivrance globale.
- LY : plus petit que le FD4, les LTR sont adaptées des deux côtés. À la cathode, on observe l'effet combiné l'électrophorèse et de la diffusion passive, ce qui augmente grandement la délivrance globale jusque dans le derme. Côté anode, les deux forces s'opposent et s'annulent.

- FD4-CM : la contribution des forces électrophorétiques est plus grande comparée au FD4, donc la délivrance globale est plus importante que pour le FD4 coté cathode alors qu'il n'y a pas de différence à l'anode.
- FD4-DEAE : a une charge opposée aux trois autres molécules. La contribution des forces électrophorétiques aux deux électrodes est inversée. Elle s'oppose à la diffusion passive côté cathode, réduisant la délivrance globale. À l'anode, la délivrance globale n'est pas impactée par l'électrophorèse puisque les LTR ne sont pas suffisantes laisser traverser la molécule.

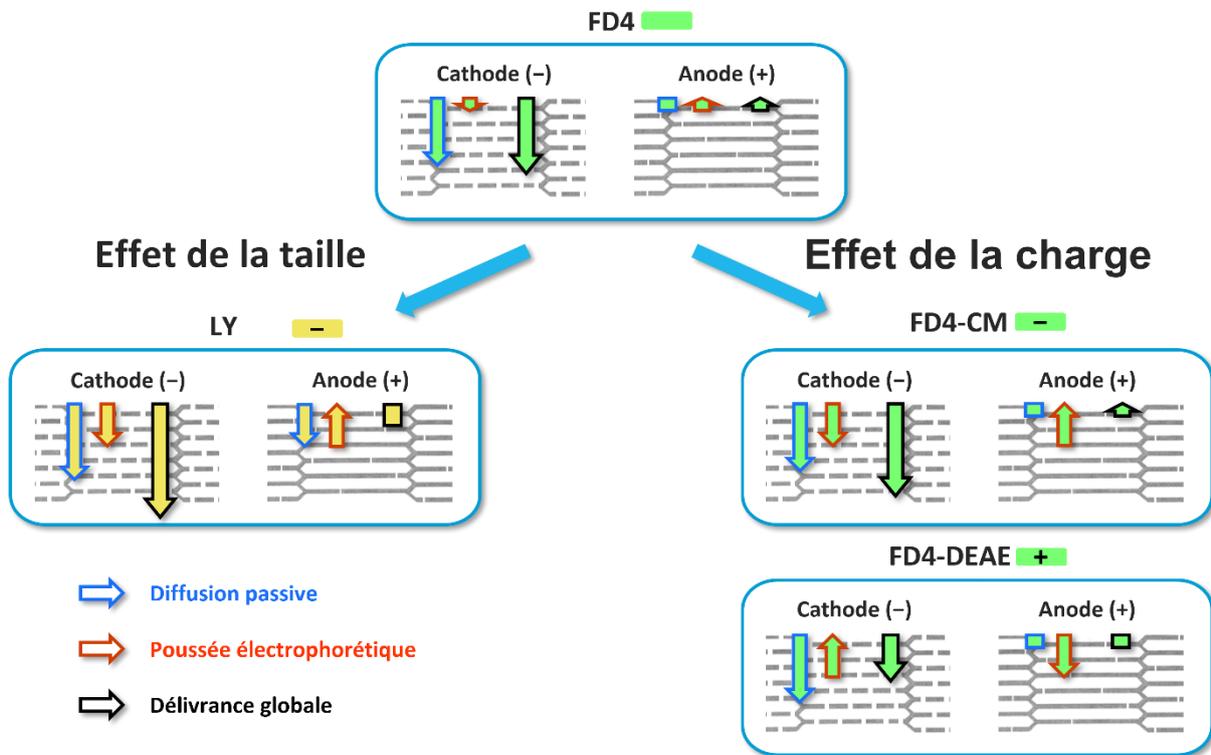


Figure 4-10 Schéma de la délivrance globale résultant de l'électrophorèse et de la diffusion passive à travers les LTR générées par EP de la peau avec des plateformes nanocomposites, en fonction de la taille et de la charge de la molécule à délivrer. La direction des flèches indique l'évolution de la délivrance dans des peaux traitées par rapport à la délivrance dans des peaux non traitées. Les rectangles signifient qu'aucune évolution liée à l'EP n'est observée.

#### 4.1.7. Validation du FD4 comme modèle pour mimer l'insuline

Le FD4 a été utilisé dans ces travaux comme molécule modèle pour mimer une macromolécule, comme l'insuline. Toutefois, le dextran et l'insuline étant respectivement un dérivé du glucose et une protéine, ils ont des fonctions chimiques différentes et une charge globale différente. Dans le but de valider si le FD4 est représentatif du comportement de l'insuline pendant l'électroporation d'explants de peau de souris avec notre dispositif, des plateformes ont été regonflées avec de l'insuline marquée avec du FITC.

Les motifs de marquage et l'IRF de l'insuline marquée après EP ont été comparés avec ceux du FD4 et du FD4-CM. Les trois molécules présentent le même motif, avec une délivrance marquée à la cathode, en particulier pour le FD4-CM, et presque aucune trace visible à l'anode (Figure 4-11a).

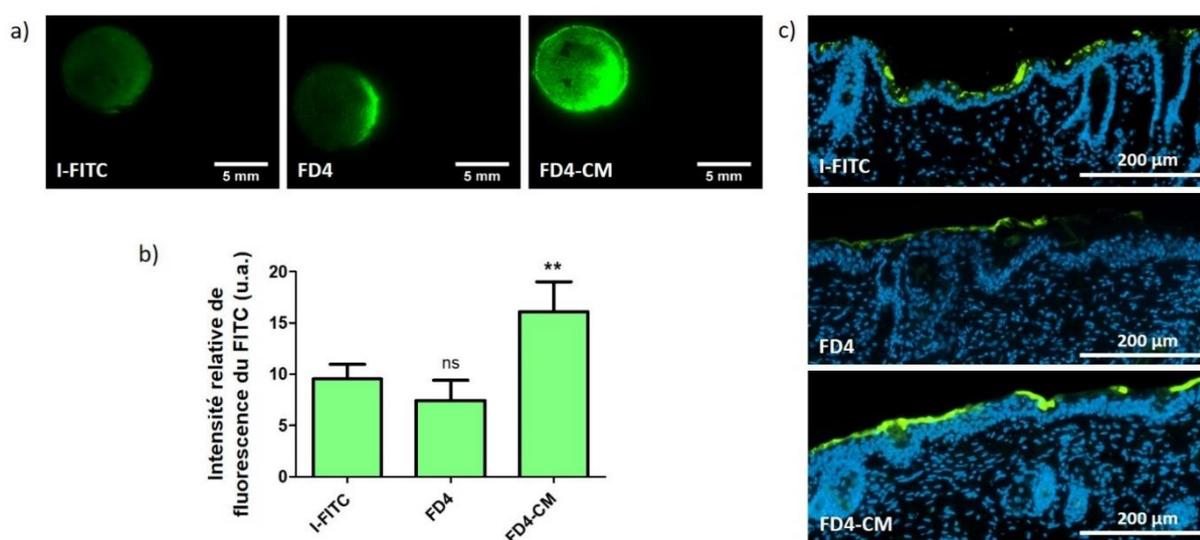


Figure 4-11 Comparaison de la délivrance assistée par EP d'insuline marquée (I-FITC) avec celle du FD4 et du FD4-CM. a) Motifs de marquage de peaux traitées par EP avec des plateformes contenant de l'I-FITC, du FD4 ou du FD4-CM. La cathode est toujours à gauche. b) Quantification de l'IRF du FITC à la cathode de peaux traitées. Analyses statistiques : ANOVA 1 facteur, post test de Dunnett vs I-FITC. Codes : \*\* =  $p < 0.01$ ; ns = non significatif. Les barres d'erreurs représentent l'erreur type,  $n = 3-9$ . c) Observations de coupes histologiques de 10µm d'explants de peau de souris traités avec des plateformes contenant l'I-FITC, du FD4 ou du FD4-CM. Le FITC est en vert, les noyaux marqués au DAPI en bleu.

La quantification a montré une différence significative d'intensité entre le marquage du FD4-CM et celui de l'I-FITC (Figure 4-11b), alors qu'il n'y en a pas entre le FD4 et l'I-FITC. Les observations des coupes histologiques nous ont permis de voir que l'I-FITC, comme les dérivés

de FD4, tendait à s'accumuler dans le SC sans le traverser (Figure 4-11c). Nous avons conclu de cette expérience que le FD4 avait un comportement identique à l'I-FITC dans nos conditions d'utilisation, et qu'il était adapté pour procéder dans de futurs travaux à l'optimisation des paramètres électriques pour la délivrance transdermique de macromolécules.

*Pour conclure sur cette partie, nous avons obtenu des résultats encourageants montrant une perméabilisation transitoire de la peau, avec une délivrance immédiate de petites molécules hydrophiles dans le derme. Nous avons démontré que l'EP de la peau avec des pulses unipolaires provoquait la génération asymétrique de LTR dans le SC, en fonction de la polarité de l'électrode. Les macromolécules, mimées par le FD4, ne peuvent pas encore être délivrées à travers le SC. Cependant, les paramètres électriques utilisés dans ces travaux sont inspirés de travaux antérieurs sur la délivrance intradermique de gènes. De ce fait, il reste une très grande marge de manœuvre pour procéder à l'optimisation de la perméabilisation du SC et l'augmentation de pénétration des macromolécules, notamment en modifiant l'amplitude et la durée des pulses.*

*La poussée électrophorétique semble être un levier puissant pour améliorer la délivrance, et il pourrait être intéressant d'augmenter à la fois la tension et la durée des pulses. Toutefois, d'après les travaux de Zorec et coll. [106], des pulses courts avec une forte tension seraient responsables de la génération d'une forte densité de petits défauts dans le SC, alors que l'application de pulses plus longs avec une tension plus faible résulterait en de moins nombreuses, mais plus larges LTR, ce qui semble plus efficace pour la délivrance transdermique de macromolécules. De ce fait, nous voudrions poursuivre l'étude en essayant des combinaisons de pulses ayant des durées et des tensions différentes. L'idée serait d'optimiser la génération des LTR avec de premiers pulses, puis d'y pousser les macromolécules par électrophorèse, et ce tout en préservant l'intégrité du tissu.*

*Enfin, des mesures d'impédance du système sont en cours d'implémentation pour poursuivre à la fois l'optimisation des paramètres et la compréhension des mécanismes de délivrance. Elles serviront notamment de base pour construire et affiner un modèle numérique de notre système. Il serait très intéressant, par exemple, de pouvoir suivre l'évolution de l'impédance de la peau pendant le traitement pour adapter les paramètres électriques, comme décrit par Atkins et coll. [291].*

## 4.2. Influence de paramètres externes au dispositif

La suite de ce chapitre sera consacrée à l'évaluation de paramètres plus environnementaux, non abordés jusqu'ici. L'exploration et la compréhension de l'influence de ces paramètres ne sont pas abouties et nécessiteraient des expériences plus approfondies. Cependant, nous avons présenté ici nos observations et conclusions préliminaires.

### 4.2.1. Influence du modèle de tissu

#### 4.2.1.a. Fraicheur du tissu

Pendant ces travaux, nous avons pu travailler avec des explants frais de peau de souris, prélevés quelques heures seulement après le sacrifice de l'animal. Pour des questions pratiques et d'économie d'échantillons, nous avons envisagé très tôt de conserver ces explants sur une gaze humidifiée au PBS pendant 24h à 4°C. Nous avons comparé les résultats de traitement d'EP avec des plateformes nanocomposites sur peaux fraîchement explantées et peaux réfrigérées 24h, pour vérifier si nous pouvions utiliser les deux indifféremment. D'après l'analyse des résultats présentés dans la Figure 4-12, les deux types de peaux sont équivalents et le temps de conservation n'a pas d'influence sur la délivrance. Cependant, les quelques mesures faites avec ces explants réfrigérés (n = 3) sont peu reproductibles. Cette variabilité pourrait probablement être diminuée avec un nombre plus grand de mesures, mais elle pourrait très bien être issue d'un « vieillissement » de l'explant.

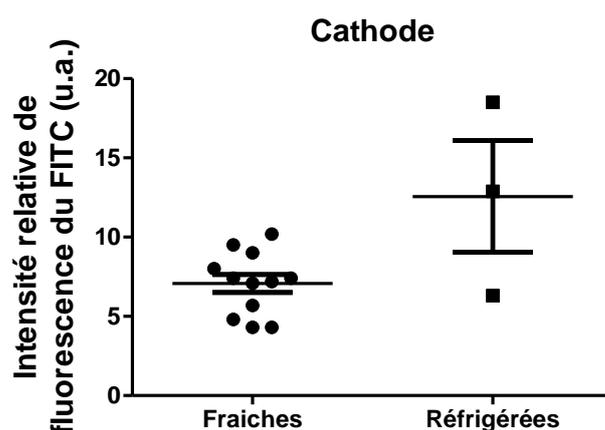


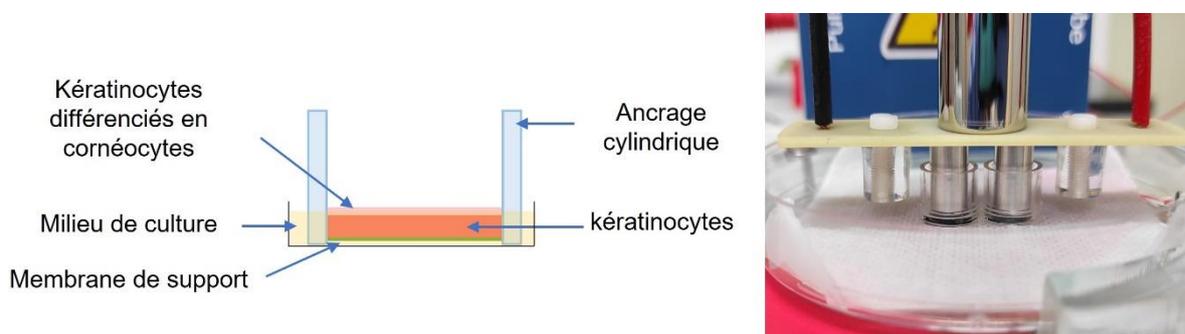
Figure 4-12 Comparaison de la délivrance FD4 assistée par EP en fonction de la fraîcheur de l'explant. Les peaux fraîches sont utilisées jusque 3h après prélèvement, les peaux dites réfrigérées ont passé 24h à 4°C avant l'EP. Les plateformes nanocomposites AGR+NTC+CMC SSC sont regonflées avec une solution TE+FD4. Quantification de l'IRF du FITC à la cathode, les barres représentent la moyenne et les écarts-types. Analyse statistique : t test avec correction de Welch, non significatif. n = 3 - 12.

Les conditions de conservation n'étaient peut-être pas adaptées puisque Pliquett et Pliquett n'ont pas observé d'altération de la fonction barrière d'explants frais de peau humaine pendant 200h, par mesure d'impédance, lorsqu'ils sont conservés hydratés à 37°C [292]. Sans pouvoir lever ce doute, nous avons préféré continuer d'utiliser des peaux les plus fraîches possibles pendant ces travaux.

*L'influence de la fraîcheur de l'explant sur la délivrance pourra être un paramètre d'importance par la suite, notamment pour le développement de modèle numérique. L'idéal pour s'en affranchir serait de passer sur un modèle in vivo, mais il faudra d'abord optimiser une première fois les paramètres d'électroporation. De plus, le modèle murin n'est pas complètement équivalent au modèle humain, en termes d'épaisseur notamment. Il est suffisant pour de premières expériences, mais il sera impératif de valider notre dispositif sur des modèles porcins, ou même si possible humains, dans la suite des travaux.*

#### 4.2.1.b. Changement de modèle – Épiderme reconstruit humain

Une autre solution pour limiter le problème de répétabilité des résultats sur le modèle *ex vivo* serait de passer sur un modèle de tissu cultivé artificiellement, dont nous contrôlerions les caractéristiques. Nous avons eu la possibilité de faire un essai d'EP avec les plateformes nanocomposites sur des épidermes reconstruits humains (ERH) cultivés dans l'équipe de biophysique cellulaire à l'IPBS. Les ERH sont cultivés à partir de kératinocytesensemencés sur une membrane en polycarbonate dans un milieu de culture. Ils sont ensuite exposés à une interface air/milieu pour provoquer la différenciation des kératinocytes en cornéocytes, et ainsi former un *stratum corneum* artificiel (Figure 4-13).



*Figure 4-13 Schéma de la culture d'un ERH et photographie du dispositif expérimental d'électroporation avec ces tissus.*

Les supports d'ancrage des ERH cultivés au laboratoire ont un diamètre interne de 8mm, ce qui correspond parfaitement à notre dispositif d'électroporation n°2. Les ERH sont disposés sur une gaze humidifiée au PBS qui servira de milieu continu pour assurer le passage du courant Figure 4-13. La Figure 4-14a présente l'image de macroscopie en fluorescence obtenue après traitement d'EP de type EGT sur deux ERH, à l'aide de plateformes regonflées avec une solution de PI et FD4 dans le TE.

Nous n'avons pas pu faire de quantification sur cet échantillon, car il n'y a pas de zone NP pour calculer une IRF, mais il est intéressant de noter qu'on observe le même comportement de délivrance des deux molécules que sur un explant de peau de souris. Le FD4 ne marque que le côté cathode et le PI majoritairement l'anode. Les coupes histologiques de ces échantillons montrent une accumulation du FD4 dans le SC, plus épais que chez la souris, côté cathode. Quelques noyaux marqués au PI peuvent être observés côté anode (Figure 4-14b). L'uniformité du marquage pourrait être améliorée en retirant l'ancrage avant le traitement, et ainsi assurer un meilleur contact électrique. Avant de continuer avec ce modèle, il serait nécessaire d'évaluer le marquage PI lié à la mort cellulaire, comme ce qui avait été fait avec les peaux de souris, mais les premiers résultats sont tout à fait encourageants.

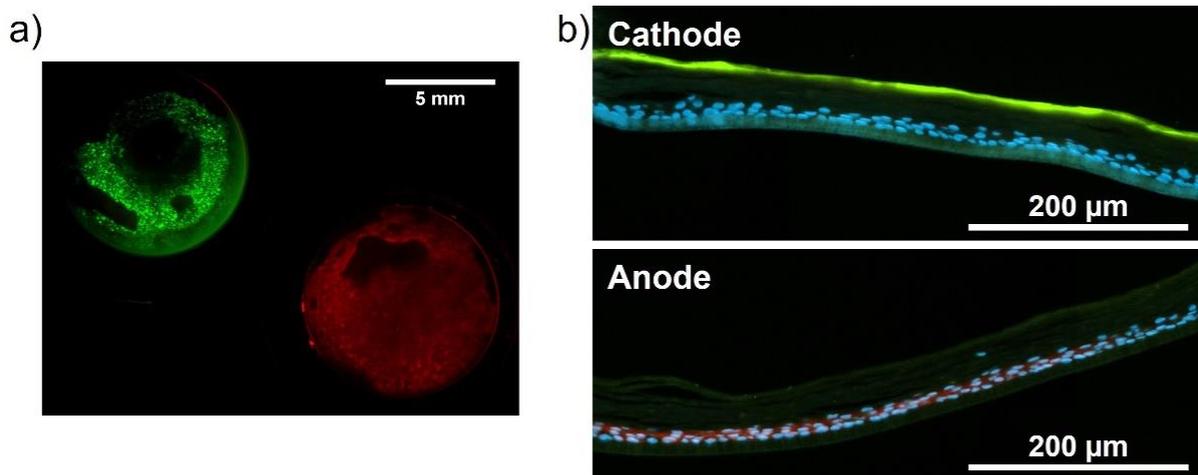


Figure 4-14 Essai de délivrance de FD4 et de PI par EP sur des épidermes reconstruits humains (ERH) à l'aide de plateformes nanocomposites. a) Signal de fluorescence du FD4 et du PI sur des ERH traités. La cathode est à gauche. b) Observations de coupes histologiques de 10µm d'ERH traités avec des plateformes contenant du FD4 et du PI. Le FITC est en vert, le PI en rouge et les noyaux marqués au DAPI en bleu.

Passer sur ce type de modèle présente plusieurs avantages. En plus de nous permettre de passer sur un modèle plus proche de la peau humaine, nous pourrions adopter une approche « couche par couche », pour la compréhension des mécanismes de délivrance et l'établissement des modèles numériques. En effet, ici nous ne présentons qu'un modèle d'épiderme, mais il est possible d'y ajouter le derme. Enfin, il nous permettrait jusqu'à un certain point de nous affranchir d'expérimentations animales. Il serait possible d'étudier la perméabilisation du SC en utilisant directement des explants de peau humaine dermatomée, c'est-à-dire que l'épiderme est séparé du derme et de l'hypoderme par traitement chimique [293, 294], mais il peut être complexe d'obtenir ces explants.

*Dans ces travaux, nous avons utilisé des explants provenant d'animaux sacrifiés dans le cadre d'autres travaux de l'équipe. Dans le but d'en faire une utilisation optimisée, nous avons tenté de les conserver d'une journée sur l'autre sans être satisfaits de la comparaison des résultats. La méthode de conservation est peut-être en cause. Une alternative à l'utilisation d'explants biologiques provenant d'animaux ou de déchets chirurgicaux humains pourrait être trouvée avec des tissus cultivés artificiellement, comme les épidermes reconstruits humains (ERH). Les ERH sont moins complexes que ne le sont les explants de peau, et pourraient nous permettre d'affiner notre compréhension des mécanismes de délivrance en adoptant une approche « couche par couche ».*

#### **4.2.2. Considérations sur les variations de pH *in situ***

Le but du dispositif et du matériau nanocomposite que nous avons élaborés est de permettre la perméabilisation de tissu et la délivrance de principe actif simultanément. Par conséquent, des réactions de type électrochimiques peuvent se produire aux électrodes pendant l'EP. Sous stimulation électrique, des espèces comme l'eau, le fer contenu dans les cylindres en acier inox, ou le cuivre, sont susceptibles d'être transformées, induisant des variations pH. En convention récepteur dans notre dispositif, la cathode négative est le siège d'une réduction, et l'anode positive, le siège d'une oxydation. Dans la littérature, dans certains dispositifs de délivrance transdermique *in vitro*, comme les cellules de diffusion verticale, ou *in vivo* comme les plis de peau, les électrodes sont immergées ou au contact des solutions donneuse ou réceptrice, et donc sont également le siège de réactions d'oxydoréductions, mais aucune variation de pH n'est observée dans ces solutions [116, 118]. Dans notre dispositif, tout le liquide est traversé par le champ électrique, nous nous attendons donc à observer une

augmentation globale du pH par réduction des ions H<sup>+</sup> coté cathode et acidification côté anode. Ces variations de pH pourraient avoir des effets sur le principe actif : sa forme prédominante pourrait changer, ce qui pourrait impacter sa délivrance, sa solubilité ou son efficacité.

#### 4.2.2.a. Traitement avec des pulses unipolaires

Le but de l'expérience présentée ici ne sera pas de proposer une compréhension approfondie des phénomènes, mais juste de les apprécier. Il n'y a pas assez de liquide au niveau des plateformes pour utiliser des méthodes accessibles, comme le papier pH ou un pH-mètre. Notre alternative a été de regonfler des plateformes en agarose avec une solution de rouge de phénol, un indicateur coloré du pH, utilisé dans les milieux de culture cellulaire. Cette molécule a une taille similaire au PI et au LY. Elle permet de repérer de manière visuelle les variations de pH entre 6.2, où il est jaune, et 8.2, où il est rose foncé. Il a une teinte rouge orangé à pH 7.4, le pH de nos solutions tampon. Une approche similaire a été utilisée par Olaiz et coll. pour le rôle du pH dans les dommages infligés aux tissus pendant le transfert de gène *in silico* et *in vivo* [295, 296]. Les plateformes ont ensuite été utilisées pour traiter des explants de peau en EP avec des paramètres EGT, classiques dans nos travaux. La méthode est assez sommaire et peu précise dans notre cas, mais nous a donné de premières indications.

La Figure 4-15a «avant» montre que les plateformes avant utilisation ont bien une couleur orangée correspondant à un pH neutre. Cette couleur vire fortement, immédiatement après application de l'EP, vers le rose côté cathode et le jaune côté anode. Nous n'avons pas d'échelle de teinte spécialement préparée pour l'expérience, mais d'après les variations classiques de couleur du rouge de phénol en solution, nous pouvons supposer que le pH atteint au moins 8 à la cathode et au moins 6 à l'anode. Il faudrait poursuivre l'étude, avec d'autres indicateurs colorés comme le rouge de méthyle et la phénolphthaléine qui ont des transitions à 6,2 et 8,3, pour avoir une valeur plus précise du pH aux électrodes [295], mais ce résultat a confirmé nos prévisions.

Le rouge de phénol a pu être délivré dans la peau, comme le montre le marquage présent sur la peau traitée, rincée après 30min (Figure 4-15b). Les traces sont de la même couleur que les plateformes correspondantes après traitement.

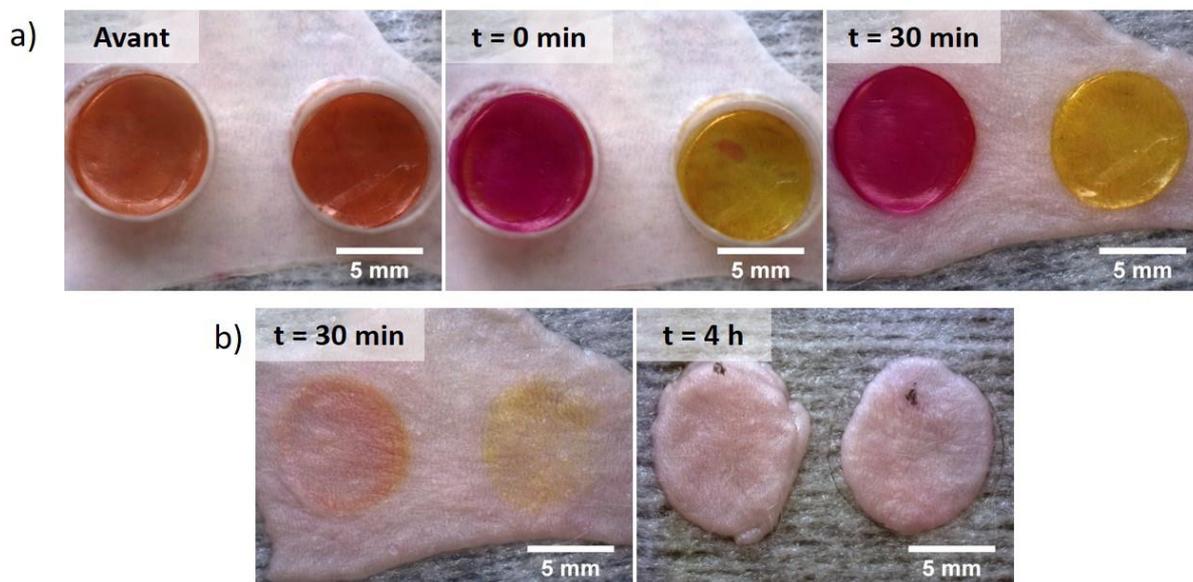


Figure 4-15 Évaluation des variations de pH pendant le traitement d'explant de peau de souris par EP. a) Observations des variations de couleur du rouge de phénol contenu dans des plateformes en agarose, avant et après traitement par EP. b) Observations de la surface d'explant de peau rincée, 30min et 4h après traitement par EP.

L'image de droite sur la Figure 4-15b montre que ces traces tendent à s'équilibrer ou disparaître 4h après traitement. Notre modèle *ex vivo* ne permet pas l'homéostasie générée par la circulation sanguine, mais ce résultat indique que les variations de pH induites par l'EP pourraient être très locales et se rééquilibrer à terme *in vivo*. Des effets du pH acide ou alcalin pendant ce laps de temps ne sont cependant pas à exclure. Une réponse préliminaire pourrait être apportée par la mesure du pH dans la partie réceptrice d'une cellule de diffusion verticale, après traitement d'EP d'un explant de peau avec des plateformes regonflées avec une solution de LY par exemple.

Par conséquent, il est fort probable que les molécules délivrées dans les expériences présentées jusque-là aient été sujettes à des variations de pH. Le rendement quantique de fluorescence du FITC y est par exemple très sensible, il faudra peut-être en tenir compte par la suite pour corriger les quantifications. Cependant le LY, lui n'y est pas sensible [297]. Par conséquent, le raisonnement que nous avons présenté dans la première partie de ce chapitre n'est pas fondamentalement remis en cause, mais il faudra l'affiner. Enfin, il a été observé que le retour de la fonction barrière du SC était plus rapide à pH acide qu'à pH neutre [298], ce qui pourrait expliquer en partie le retour total et rapide de la fonction barrière à l'anode avec notre dispositif (Figure 4-3).

#### 4.2.2.b. Traitement avec des pulses bipolaires

L'utilisation de pulses bipolaires nous a permis d'homogénéiser la délivrance de FD4 dans nos expériences précédentes (Figure 4-7). Nous avons voulu savoir si l'application de telles impulsions pourrait également permettre d'équilibrer le pH pendant la délivrance. Nous avons donc répété l'expérience présentée ci-dessus en utilisant des pulses bipolaires (EGT-inv chapitre 2, Figure 2-17). Les résultats se sont révélés assez différents de ceux présentés sur la Figure 4-15. Les photos Figure 4-16 montrent que les plateformes d'agarose ont un aspect moucheté jaune et rose après EP. Ces couleurs s'homogénéisent par diffusion au bout de 30min, vers une couleur plus proche de l'orange (Figure 4-16, t = 0 et 30min). Le résultat est beaucoup moins tranché que lorsque la polarité des électrodes n'est pas inversée pendant le traitement. Les plateformes de gauche semblent tendre vers le jaune, et celles de droite vers le rose. C'est donc le dernier pulse qui impose la tendance finale du pH. En effet, le dernier pulse étant négatif, l'électrode de gauche est le siège d'une oxydation lors de celui-ci, abaissant le pH.

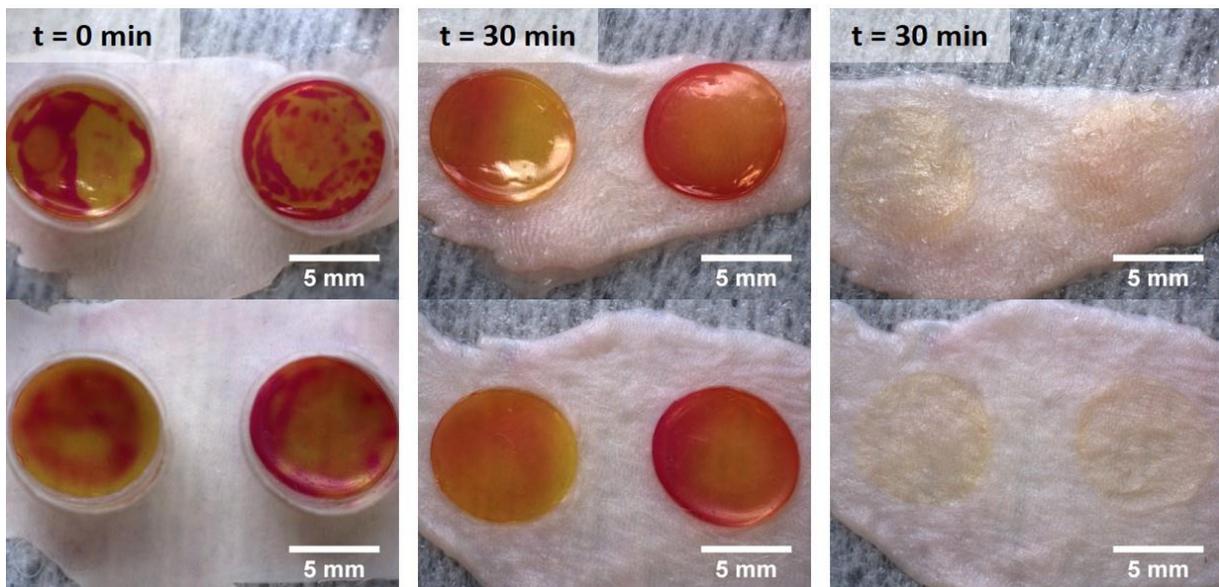


Figure 4-16 Évaluation des variations de pH pendant le traitement d'explant de peau de souris par EP avec des pulses bipolaires. Gauche et centre : observations des variations de couleur du rouge de phénol contenu dans des plateformes en agarose, à t = 0 et 30min après traitement par EP bipolaire. À droite : observations de la surface d'explants de peau rincée 30min après traitement. Les deux séries de photos correspondent à la répétition de la même expérience.

Le marquage laissé par le rouge de phénol sur les explants est moins intense que dans l'expérience précédente. Les deux côtés ne semblent pas non plus avoir des couleurs aussi différentes que sur la Figure 4-15. L'inversion de la polarité des électrodes pendant le traitement pourrait être une solution si les variations de pH s'avéraient délétères pour la délivrance transdermique de principe actif par électroporation avec notre dispositif.

*Nous avons mis en évidence une variation du pH aux électrodes pendant l'application du traitement d'EP, se répercutant jusque dans la peau. L'utilisation de pulses bipolaires semble réduire l'ampleur de ce phénomène. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour évaluer l'impact de ces variations sur la peau ainsi que leur pérennité, mais ce paramètre semble d'importance pour la délivrance transdermique avec notre dispositif.*

### **4.2.3. Influence de la conductivité de la solution d'hydratation de la gaze**

L'obtention d'un financement ANR en complément de ce projet de thèse a permis le lancement de travaux concernant l'implémentation de modèles numériques. Travailler sur ces modèles nous a poussé à prendre en considération des facteurs qui jusque-là n'avaient pas attiré notre attention.

C'est un PBS commercial qui est utilisé dans la majorité de nos travaux pour hydrater la gaze sur laquelle est déposé l'explant. Cette gaze humide avait pour but premier de garantir l'hydratation des explants pendant l'utilisation. Les premières simulations, issus des travaux de thèse de G. Kougkolos (encadré par E. Flahaut et Z. Valdez-Nava, ANR Carbo<sup>2</sup>Derm, non présentées ici) ont montré que les lignes de densité de courant lors de l'EP pourraient passer en priorité par la gaze du fait de sa conductivité de 1514mS/m, bien supérieure à celle de la peau en général. En effet, d'après les données rassemblées et utilisées par Pavšelj et Miklavčič dans leur modèle numérique de délivrance transdermique sur un pli de peau [299], la couche la plus conductrice, le derme a une conductivité d'environ 200mS/m, et le SC environ 0,5mS/m. Nous avons cherché à déterminer quel était le rôle joué par cette couche conductrice dans les résultats obtenus jusqu'à présent. Dans l'expérience présentée Figure 4-17, des plateformes nanocomposites AGR+NTC+CMC séchées sous charge ont été regonflées dans une solution de FD4 dans le TE, pour pulser des explants de peau disposés sur une gaze contenant du PBS ou du TE. Le TE a lui une conductivité plus proche du derme et de l'hypoderme (154mS/m), il représente une situation plus réaliste.

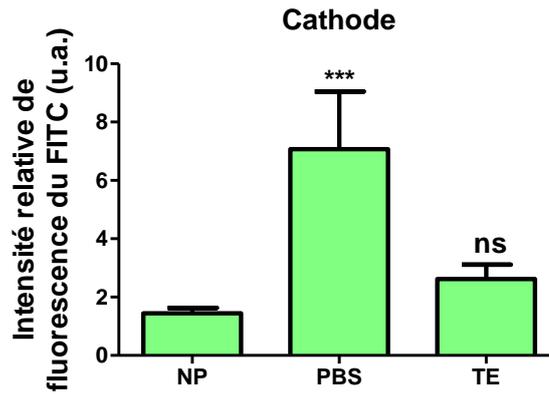


Figure 4-17 Comparaison des IRF du FITC mesurées à la cathode d'explants de peau de souris traitées avec des plateformes nanocomposites sur des gazes humidifiées avec du PBS ou du TE, comparés à l'IRF sur des peaux non pulsées. Les plateformes sont regonflées avec une solution de FD4 dans le TE. Analyses statistiques : Kruskal-Wallis avec post test de Dunn vs NP. Codes : \*\*\* =  $p < 0.001$ ; ns = non significatif. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types,  $n = 6-12$ .

La pénétration de FD4 à la cathode de peaux pulsées sur une gaze contenant du TE n'est significativement pas différente du contrôle non pulsé (NP), au contraire des résultats obtenus jusqu'à présent avec du PBS.

*La conductivité de la gaze exerce donc une influence directe sur l'efficacité de l'électroporation en influençant la trajectoire des lignes de champ. Dans le but de limiter les stimulations nerveuses et les sensations de douleurs et fonction de la visée thérapeutique, il est important de pouvoir localiser la profondeur de pénétration du champ électrique dans le SC [124]. Ce sera un critère d'optimisation des paramètres électriques d'électroporation lorsque nous pourrons travailler sur peau porcine ou humaine, ou sur des épidermes reconstruits humains, la peau murine étant plus fine.*

#### 4.2.4. Mesures de température *in situ*

Une élévation locale de la température pendant le traitement d'EP pourrait être rédhibitoire si elle résultait en un endommagement des tissus ou des molécules thérapeutiques. Dans leurs travaux, Vanbever et coll. avaient étudié la tolérance de la peau au traitement d'EP *in vivo* et avaient montré une bonne tolérance, dépendante des paramètres électriques utilisés [112]. Les travaux théoriques de Martin et coll. prédisent également que l'EP peut être appliquée sans endommager ou altérer thermiquement la peau [111]. Ici, nous avons cherché à vérifier que l'élévation de la température provoquée par notre

traitement, avec notre dispositif, n'était pas trop importante. Nous avons mesuré l'évolution de la température pendant le traitement, sous les explants de peau, au niveau de la gaze, lorsqu'elle est humidifiée avec du PBS commercial (n=4), et nous les avons comparés à celles mesurées lorsqu'on utilise du TE (seulement deux mesures par électrode, pas d'analyse statistique sur ces données). Les explants sont pulsés avec des plateformes nanocomposites AGR + NTC + CMC / SSC, regonflées avec une solution TE + FD4 + PI. La Figure 4-18 représente les écarts de température mesurée pendant les 8s de traitement. Elle montre qu'il y a effectivement une élévation de température induite pas le traitement, quel que soit le tampon utilisé. Cependant, l'écart de température mesuré est beaucoup plus important dans le cas du PBS. Nous avons mesuré une élévation d'environ 18°C à l'anode avec le PBS contre 5°C avec le TE. L'échauffement provoqué par le traitement est significativement inégal entre les deux électrodes avec le PBS, la tendance semble être la même avec le TE.

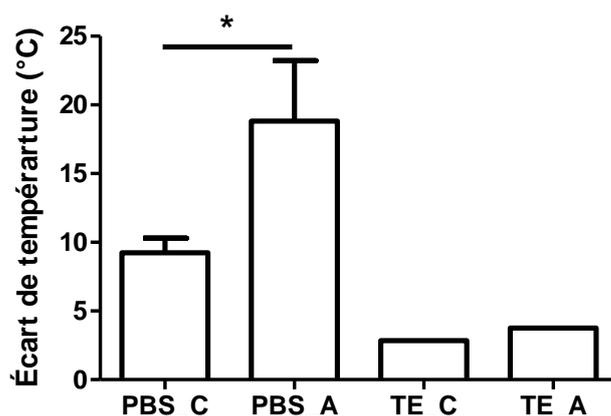


Figure 4-18 Écarts de température mesurés sous la peau au niveau des plateformes au moment de l'EP, en fonction de la solution utilisée pour humidifier la gaze, PBS ou TE, et de la polarité de l'électrode (C = cathode, A = anode). Température avant le traitement 32-35°C. Analyse statistique : t test entre les groupes PBS\_C et PBS\_A. Code : \* =  $p < 0.05$ . Les barres d'erreur représentent les écarts-types, n=2-4.

Sachant que les explants sont placés sur un tapis chauffant, la température initiale est d'environ 32-35°C avant le traitement, la température maximale mesurée a donc dépassé les 50°C. Les lipides du SC sont majoritairement organisés en phase lamellaire orthorhombique à température physiologique. Il a été montré que l'élévation de la température au-delà de 35-40°C engendrait une transition de cette phase vers une conformation hexagonale, plus libre, réduisant l'efficacité de la barrière lipidique du SC [15, 300, 301]. Il existe une seconde

transition vers une phase dite liquide vers 70°C, qui élève encore le désordre de la phase et donc la perméabilité de la barrière lipidique, mais nous ne l'atteignons pas ici.

L'échauffement provoqué par le traitement est significativement inégal entre les deux électrodes avec le PBS, la tendance semble être la même avec le TE (mais pas d'analyse possible pour deux mesures). Ce résultat nous a laissés supposer un lien entre les asymétries de délivrance observées dans la première partie de ce chapitre et les différences de température mesurées. D'après la littérature, la formation de grande LTR est plus efficace si la densité de défauts aqueux initiale est faible, car l'énergie distribuée dans ces défauts pour les élargir par effet Joule est plus importante [96, 106]. Or, la densité de ces défauts est directement liée à l'état de la barrière lipidique et notamment sa phase structurale. Plus cette phase sera désorganisée, plus il sera facile pour des défauts aqueux de nucléer. On peut donc supposer que la densité de défauts est directement liée à la température globale du SC. À l'anode si la température augmente rapidement et plus fortement qu'à la cathode dès le premier pulse, la densité de défauts générés à chaque pulse sera alors plus importante. Les LTR résultantes seront donc plus petites à l'anode, et la délivrance moins efficace, ce qui est cohérent avec nos observations.

*Nous pouvons supposer une dépendance entre les échauffements observés et la conductivité des solvants. Il faudrait poursuivre l'analyse pour déterminer si l'échauffement est la source de l'amélioration du marquage par le FD4 ou le résultat du phénomène provoquant cette amélioration., lorsqu'on utilise du PBS. Une solution pour le vérifier serait de faire varier les paramètres d'EP avec du TE pour égaler la densité de courant obtenu avec du PBS, et mesurer l'échauffement.*

#### **4.2.5. Influence de la concentration en NTC**

Finalement dans une dernière partie, nous avons traité des explants par EP en utilisant des plateformes nanocomposites avec 10% de NTC par rapport à l'agarose. Le but était de voir si la présence de NTC et l'augmentation de la conductivité des plateformes, mesurée dans le chapitre 3 Figure 3-32, avaient un impact sur la délivrance. Des plateformes nanocomposites AGR+NTC+CMC séchées sous charge avec une concentration en NTC de 0%, 1% et 10% ont été regonflées dans une solution de FD4-CM+TE. Le résultat des quantifications est présenté par la Figure 4-19a.

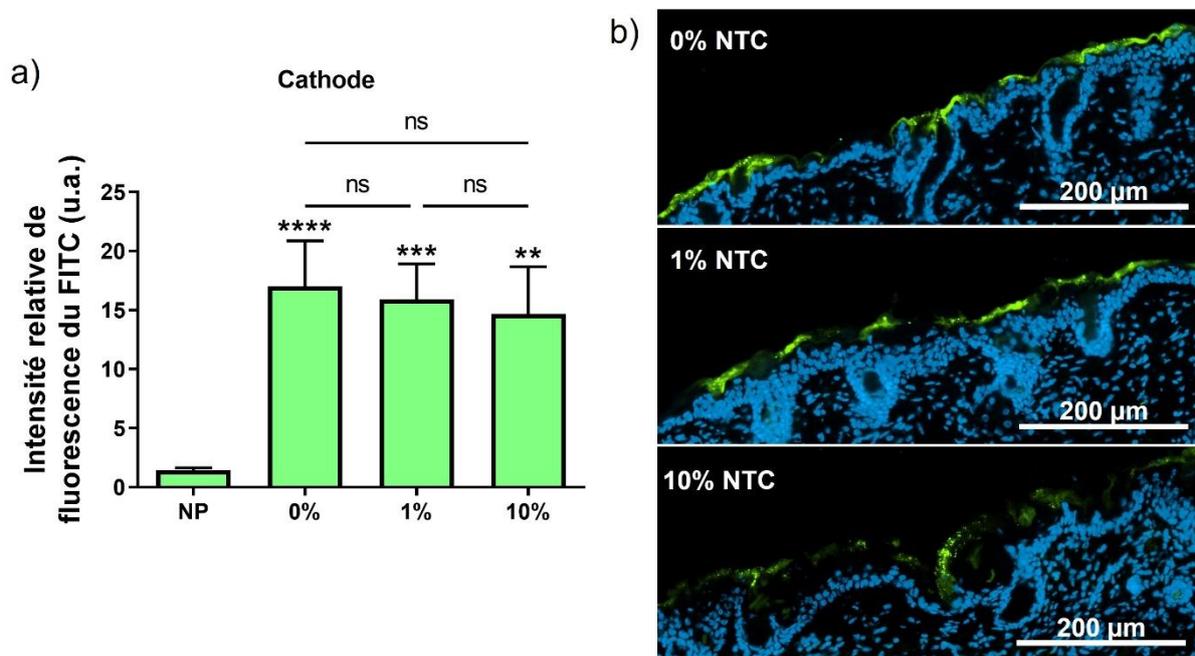


Figure 4-19 Influence de la concentration massique de NTC dans les plateformes sur la délivrance de FD4-CM assistée par EP. a) Comparaison des IRF du FITC mesurées à la cathode d'explants de peau de souris traitées avec des plateformes nanocomposites contenant 0%, 1% ou 10% de NTC en masse par rapport à la masse d'agarose, comparés à l'IRF sur des peaux non pulsées. Les plateformes sont regonflées avec une solution de FD4-CM dans le TE. Analyses statistiques : Kruskal-Wallis avec post test de Dunn pour comparer les groupes entre eux. Codes : \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0.0001$ ; ns = non significatif. Les barres d'erreur représentent les écarts-types,  $n = 6-9$ . b) Observations de coupes histologiques de  $10\mu\text{m}$  d'explants de peau de souris traitées avec des plateformes contenant 0%, 1% ou 10% de NTC et du FD4-CM. Le FITC est en vert, les noyaux marqués au DAPI en bleu.

L'analyse des résultats a de nouveau mis en évidence l'efficacité du traitement par EP. Cependant, la présence de NTC n'améliore pas significativement la pénétration de FD4-CM dans la peau, quelle que soit leur concentration. De même, les observations histologiques n'ont pas révélé de différence de délivrance du FD4-CM en fonction de la concentration en NTC, il reste localisé dans le SC dans tous les cas.

Ces résultats sont contradictoires avec ceux observés par J.F. Guillet lors de ses travaux. En effet, il avait mis en évidence une forte influence des NTC sur le marquage du FD4 lors de la visualisation de peaux traitées avec et sans NTC dans les plateformes [3]. Il avait ainsi suggéré que l'augmentation de l'intensité du marquage observé était liée à l'augmentation de la conductivité électrique des plateformes due à la présence des NTC. Cependant, les résultats présentés ici prouvent que ce n'est pas le cas. Les observations publiées sur ce sujet ne représentaient qu'une seule expérience et n'avaient pas été quantifiées. Ils correspondaient

plus à une preuve de concept du nanocomposite. L'augmentation de la conductivité des plateformes nanocomposites ainsi que la compréhension des mécanismes de conduction et la mise en évidence de la percolation des NTC est d'autant plus impérative d'après ces résultats.

*Dans cette partie, nous avons voulu observer l'influence de paramètres expérimentaux sur la délivrance. Des résultats de délivrance encourageants ont été obtenus par traitement d'EP sur des épidermes reconstruits humains, ce qui pourrait nous permettre de passer sur un modèle plus proche de la peau humaine plus facilement. Nous avons observé des variations de pH, de délivrance en fonction de la conductivité du milieu d'hydratation des explants, et de température, découlant du traitement d'EP avec nos plateformes nanocomposites. De plus amples investigations sont nécessaires pour déterminer l'effet et l'importance de ces facteurs sur la délivrance, mais il faudra les prendre en compte pour l'optimisation des paramètres d'EP. L'optimisation de la conductivité des plateformes ressort comme d'autant plus importante qu'aucune amélioration de la délivrance n'est pour le moment observée. Le dispositif fonctionne donc sans aucune optimisation pour le moment. Il pourra être intéressant de répéter les expériences de délivrance en fonction de la concentration de NTC avec une molécule que nous arrivons à délivrer dans le derme, comme le LY. Le but sera d'essayer d'observer une éventuelle amélioration qu'on ne pourrait pas détecter avec le FD4 puisqu'il reste au niveau du SC.*

### **4.3. Toxicité des NTC biparois bruts sur les cellules de la peau**

Comme il a été décrit dans le chapitre introductif, la toxicité des NTC n'est pas une question résolue et dépend fortement des propriétés des NTC (longueur, diamètre, fonctionnalisation...). Une étude de relargage des NTC dans différentes conditions avait été réalisée dans des travaux antérieurs [2]. Des plateformes nanocomposites contenant jusqu'à 40% de NTC en masse par rapport à l'agarose, avaient été plongées dans une solution de sueur artificielle, à 50°C et 80°C pendant 24h, pour observer leur potentielle dégradation et le relargage de NTC, dans les conditions extrêmes. Des mesures par spectroscopie Raman avaient permis de vérifier la stabilité et l'intégrité des plateformes jusqu'à 50°C, température finalement atteinte lors de l'EP (Figure 4-18). Toutefois, l'exposition à 80°C pendant 24h, température proche du point de solubilisation de l'agarose dans l'eau à 87°C, semble

déstabiliser la matrice et permettre la fuite de NTC. Finalement, ces mesures de relargage de de NTC n'ont pas encore été menées sous stimulations électriques, plus proches des conditions d'utilisation.

Dans la continuité de ces travaux, et dans l'idée de proposer un dispositif sûr, nous avons réalisé une étude de la toxicité de nos NTC biparois sur différentes lignées cellulaires de la peau, sur 24h.

#### 4.3.1. Évaluation de la viabilité cellulaire

La concentration de NTC maximum utilisée dans cette expérience, 50µg/ml, correspond à la quantité maximum de NTC contenus dans une plateforme nanocomposite de 10mm de diamètre et 2mm d'épaisseur. Les NTC sont dispersés dans le milieu de culture avec une concentration constante de CMC (50µg/ml). La CMC seule n'a pas eu d'impact sur la viabilité des cellules (Chapitre 2, Figure 2-24).

Le test de viabilité utilisé (WST-1) est recommandé lors de l'utilisation d'éléments interagissant avec la mesure d'absorbance du formazan par la quantification relative dans le surnageant [263]. La présence de NTC dans le milieu de culture a réduit la viabilité des trois lignées cellulaires étudiées pour les plus fortes concentrations, avec une évolution dépendante de la concentration (Figure 4-20).

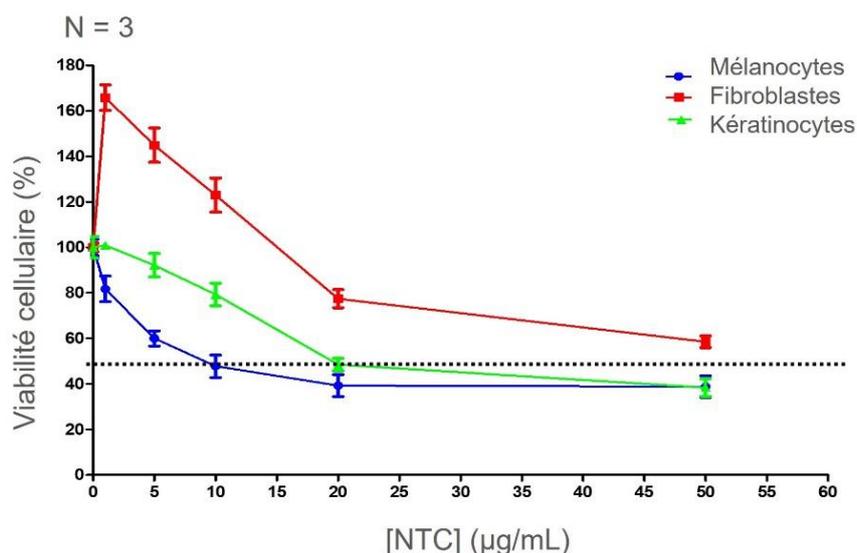


Figure 4-20 Évolution de la viabilité de mélanocytes (bleu), de fibroblastes (rouge, et de kératinocytes(vert) en fonction de la concentration de NTC à laquelle ils sont exposés (0, 1, 5, 10, 20, 50µg/ml). N=3 : 3 expériences indépendantes en triplicata.

Les mélanocytes, en bleu, ont été les plus sensibles à la présence de NTC, la valeur seuil de 50% de viabilité est atteinte pour une concentration de 10µg/ml de NTC, puis ce sont les kératinocytes (en vert) pour 20µg/ml. Enfin, les fibroblastes, en rouge, ont été les moins affectés par la présence de NTC, puisque la viabilité est presque réduite de moitié à 50µg/ml. Pour les trois lignées, on observe une rupture de pente : à 20µg/ml pour les fibroblastes et les kératinocytes et 10µg/ml pour les mélanocytes. À partir de cette concentration, la viabilité n'est plus ou peu affectée. De façon surprenante, nous avons observé une augmentation de la viabilité des fibroblastes jusqu'à 170% aux concentrations en NTC les plus faibles de 1% de NTC.

Le test WST-1 reposant sur une réaction membranaire, nous en avons déduit que cette augmentation de signal pouvait être issue soit d'une augmentation de la prolifération des fibroblastes, soit d'une activité métabolique augmentée, rendant possibles plus de réactions au niveau membranaire. Nous avons tenté d'élucider ce phénomène dans la partie suivante.

#### 4.3.2. Élaboration du comportement des fibroblastes aux faibles de concentrations de NTC

Dans un premier temps, nous avons quantifié la prolifération des fibroblastes sur 24h, après exposition aux différentes concentrations de NTC (Figure 4-21) par le comptage des noyaux présents au fond des puits de culture après rinçage des NTC, fixation membranaire et marquage des noyaux par le PI.

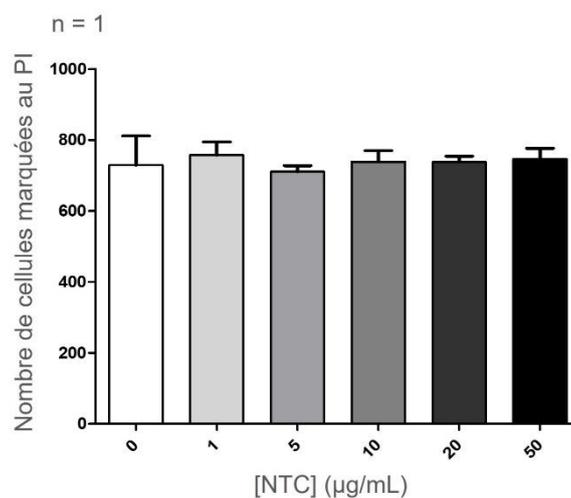
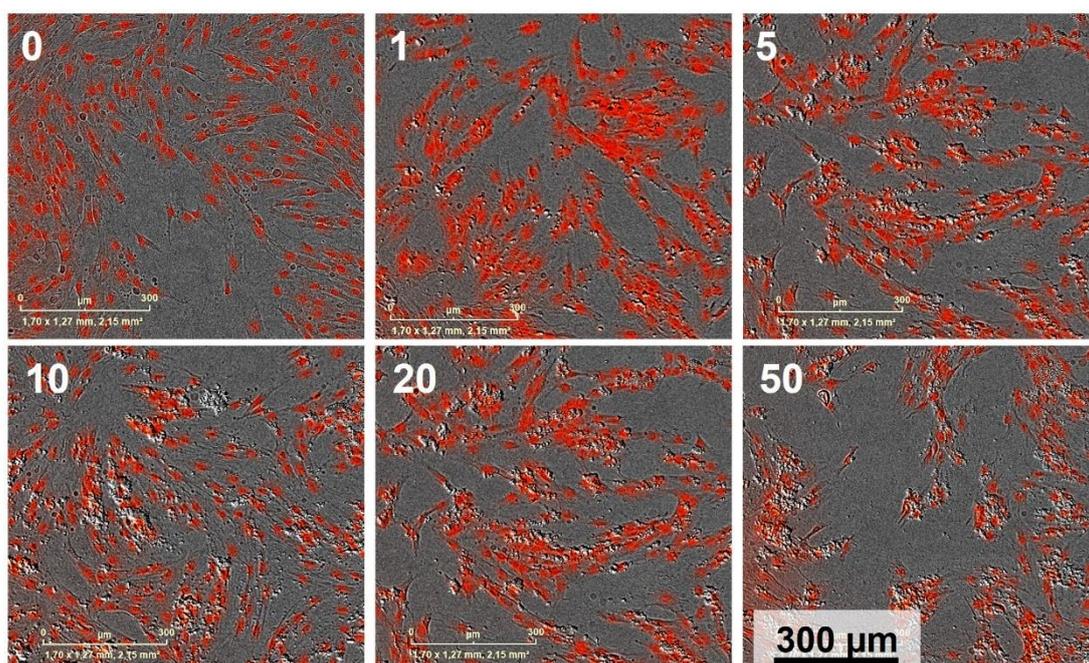


Figure 4-21 Évolution de la prolifération des fibroblastes en fonction de la concentration de NTC dans le milieu de culture (0, 1, 5, 10, 20, 50µg/ml) n= 1 triplicata.

Le comptage des cellules indique que les NTC n'ont pas eu d'effet sur la prolifération des fibroblastes sur 24h, ce qui est positif pour nos travaux. De ce fait, l'augmentation du signal WST-1 observé dans la Figure 4-20 serait donc lié à une augmentation de l'activité cellulaire, et surtout de la synthèse d'ATP par les mitochondries, stimulant la production de la protéine servant à la réduction des sels de tétrazolium. L'activité cellulaire pourrait également être impactée dans l'autre sens aux fortes concentrations.

L'observation des tapis cellulaire présentée dans la Figure 4-22 a montré une modification de la l'organisation des fibroblastes, en fonction de la concentration en NTC.



*Figure 4-22 Organisation du tapis cellulaire de fibroblastes en fonction de la concentration de NTC dans le milieu de culture (0, 1, 5, 10, 20, 50 $\mu$ g/ml). Les noyaux sont marqués au PI en rouge. L'image en fluorescence est superposée à l'image en contraste de phase.*

Les fibroblastes ont tendance à se regrouper. L'augmentation du contraste, en blanc, indique la formation de structures 3D, qui correspondraient à l'agglomération des fibroblastes sur les NTC. Ce type de comportement avait déjà été observé dans des travaux antérieurs de l'équipe NNCED au CIRIMAT [164], où des neurones avaient été localisés préférentiellement sur des NTC plutôt que sur un support en silice. Il serait tout à fait plausible que ce soit également le cas avec les fibroblastes. Cette organisation peut avoir un lien avec la diminution du signal WST-1 observé aux concentrations les plus grandes, soit par la diminution de la surface membranaire des fibroblastes agglomérés disponible pour la réaction, soit par

encombrement stérique des NTC. Ces expériences mettent une nouvelle fois en avant la difficulté de pratiquer des tests de viabilité fiables en présence de NTC [263, 302, 303]. Enfin, il faudrait répéter ces expériences avec les deux autres lignées cellulaires pour vérifier si l'on obtient la même prolifération et les mêmes organisations du tapis cellulaire.

*D'après le test WST-1, la viabilité cellulaire des kératinocytes, qui représentent au moins 80% des cellules de l'épiderme, est peu affectée par la présence de NTC en faible concentration (de 1, 5 et 10µg/ml). Les mélanocytes, plus minoritaires, le sont plus fortement à ces mêmes concentrations (50% de viabilité atteinte pour 10µg/ml). Ces concentrations sont dites faibles ici, mais correspondraient à une fuite de 2%, 10% et 20% des NTC contenus dans une plateforme. D'après les résultats rappelés en introduction de cette partie, de telles fuites semblent invraisemblables. De plus, si les NTC venaient à être internalisés par les kératinocytes, comme ces derniers sont voués à se différencier en cornéocytes et à desquamer, les NTC seront naturellement éliminés. Nous avons donc conclu de cette expérience que les NTC avaient une toxicité très limitée sur les cellules de l'épiderme, dans nos conditions d'utilisation. Cependant, les analyses complémentaires menées sur les fibroblastes nous ont poussés à prendre du recul sur ces résultats. Si la prolifération cellulaire des fibroblastes n'est pas impactée par la présence de NTC, la modification de l'organisation du tapis cellulaire induite par la présence de NTC pourrait avoir influencé le test de viabilité. A noter que les fibroblastes sont situés uniquement dans le derme, de tels effets ne seraient observés que si les NTC arrivaient à traverser le SC, très dense et jointif, pour migrer jusqu'aux couches plus profondes. Des expériences complémentaires sur les deux premières lignées cellulaires sont donc nécessaires pour valider les résultats du test WST-1.*

## 4.4. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons mis en application les plateformes nanocomposites à base d'agarose et NTC, caractérisées dans le chapitre 3. Les expériences *ex vivo* menées pendant nos travaux ont permis d'abord de valider la preuve de concept de dispositif obtenue lors de travaux antérieurs et également de valider l'utilisation de nos plateformes nanocomposites combinée à l'électroporation comme méthode de perméabilisation réversible de la peau. La délivrance des molécules hydrophiles a été démontrée possible jusque dans le derme, mais les paramètres électriques utilisés ne sont pas encore adaptés à la délivrance de macromolécules telles que le FD4. Nous avons mis en évidence une asymétrie de la perméabilisation de la peau en fonction de la polarité de l'électrode et avons identifié les contributions des forces électrophorétiques, de la diffusion passive et des propriétés physicochimiques de molécules hydrophiles sur leur délivrance. Des mesures d'impédance *in situ* sont prévues pour la suite de l'étude ainsi que l'optimisation des paramètres électriques d'électroporation.

Ensuite, nous avons fait varier les conditions expérimentales et identifié des pistes d'amélioration. Nous avons introduit l'utilisation d'épidermes reconstruits humains pour les substituer dans une certaine mesure aux explants de provenance animale. Des variations de pH et de température ont été mesurées pendant le traitement par électroporation. La conductivité du solvant contenu dans la gaze, servant à garantir l'hydratation des explants, s'est révélée exercer une influence sur la délivrance. Il nous faudra entreprendre l'optimisation des paramètres d'EP avec un tampon ayant une conductivité plus proche de celle de la peau comme le TE. Des études plus approfondies seront nécessaires pour comprendre l'impact de chacun de ces facteurs sur la délivrance et sur la peau, et déterminer leur interdépendance pour acquérir une meilleure vue d'ensemble.

Dans une dernière partie, nous avons essayé d'évaluer la toxicité de nos nanotubes de carbone biparois bruts sur trois lignées cellulaires issues de la peau. La viabilité des trois lignées cellulaires a été réduite par la présence de NTC de manière dose-dépendante. Toutefois, l'exposition de kératinocytes à une dose représentant 2% des NTC contenus dans une plateforme ne semble pas avoir d'effet délétère sur 24h. Une étude sur la prolifération des fibroblastes n'a pas montré d'effet néfaste des NTC, quelle que soit leur concentration,

mais une modification de l'organisation du tapis cellulaire a été observée. Ce phénomène ayant pu exercer une influence sur le test utilisé pour la quantification de la viabilité, des expériences supplémentaires sont nécessaires pour valider le résultat de ce test dans le cas des kératinocytes et des mélanocytes.

Pour finir, il reste énormément de phénomènes à comprendre, de facteurs à prendre en compte et de paramètres à optimiser, mais nous espérons que le matériau nanocomposite et les résultats découlant de son utilisation, présentés dans ce manuscrit, aient participé aux efforts de développement d'une méthode de délivrance transdermique efficace et non invasive par électroporation de la peau.

## Conclusions et perspectives

Ces travaux de thèse ont porté sur le développement d'un dispositif deux-en-un pour la délivrance transdermique assistée par électroporation avec deux objectifs. Le premier était d'améliorer la préparation et de caractériser un matériau nanocomposite à base d'hydrogel biocompatible et de nanotubes de carbone (NTC), élaboré lors de travaux antérieurs. Les caractérisations devaient permettre de déterminer les axes d'optimisation en tant que réservoir et électrode pour la délivrance transdermique par EP. Le second objectif était d'approfondir notre compréhension de la délivrance transdermique mise en évidence par une preuve de concept. La première étape a été de valider le dispositif en tant que système de délivrance transdermique non invasif. Puis, nous avons tenté de déterminer les paramètres clés qui permettraient l'optimisation de la délivrance avec notre dispositif ainsi que les facteurs environnementaux pouvant l'affecter.

Le nanocomposite issu de travaux antérieurs est composé d'agarose, formant un hydrogel physique réversible stable et facilement manipulable, et de NTC biparois bien maîtrisés dans l'équipe NNCED du CIRIMAT. Le but de cette association était de fournir une matrice poreuse hydrophile pour stocker un PA et de renforcer ses propriétés mécaniques et électriques par la présence d'un réseau percolant de NTC. Il avait été déterminé que les plateformes nanocomposites ainsi obtenues devaient être séchées puis imprégnées par regonflement avec une solution de PA avant utilisation, pour en faire des dispositifs médicaux moins contraignants à commercialiser. Un cahier des charges du matériau idéal pouvant assurer le rôle de plateforme nanocomposite de délivrance transdermique avait été établi :

- Une bonne capacité de stockage pour pouvoir délivrer des quantités suffisantes de PA,
- Une vitesse de restitution relativement rapide pour être disponible pendant la délivrance par EP et ne pas être le facteur limitant de la délivrance dans la peau,
- Une résistance mécanique cohérente avec une utilisation en patch,
- Une bonne conductivité électrique pour faciliter l'EP.

Nous avons donc caractérisé nos plateformes nanocomposites pour déterminer dans quelles mesures elles répondaient à ce cahier des charges et quels étaient les axes d'amélioration. Nous avons également modifié la mise en forme de ces plateformes : dans un

souci d'amélioration de la dispersion des NTC, un critère essentiel, nous avons ajouté de la carboxyméthyle cellulose (CMC) en tant qu'agent dispersant et stabilisant. Dans un souci de conservation des échantillons, nous avons aussi introduit une étape de congélation avant le séchage. L'influence de la composition des plateformes (présence de CMC ou de NTC dans l'agarose) ainsi que du type de séchage utilisé a été étudiée au travers des différentes caractérisations pour discriminer la meilleure combinaison.

Les plateformes nanocomposites sont très poreuses (90-95%), elles peuvent stocker l'équivalent de 6 à 8 fois leur masse sèche en eau, et permettent de restituer un traceur par diffusion relativement rapidement : ~80% dans le cas d'une diffusion en volume, et 35% dans le cas d'une diffusion uniquement en surface (plus proche de l'application visée), en 30 minutes dans ce cas de la meilleure combinaison composition/type de séchage. Les plateformes ont un comportement plutôt élastique et les différents modules mesurés sont en accord avec la bibliographie. Il manque cependant quelques caractérisations pour compléter ces observations : une mesure de la taille des pores et/ou des distances inter-réticulaires ; des cinétiques de séchage et regonflement pour vérifier que les équilibres sont bien atteints dans les deux cas, ainsi que des cinétiques de relargage sous stimulation électrique, pour se rapprocher des conditions d'utilisation. La fonction réservoir des plateformes pourrait être améliorée en augmentant le facteur d'incorporation, en jouant par exemple sur la concentration de l'hydrogel pour augmenter la porosité, ou encore en changeant de polymère (ex : polymère super absorbant). Il faudra cependant s'assurer de l'impact de ces modifications sur les autres propriétés (relargage et tenue mécanique). Des polymères électro-stimulables seraient également intéressants à explorer pour stimuler le relargage du PA de la plateforme vers la peau. De plus, plus en aval de ces travaux, les plateformes que nous étudions seront destinées à vectoriser différents types de molécules, ayant des tailles et des fonctions chimiques différentes (ex, hormones, protéines, plasmides). Il faudra donc garder à l'esprit les potentielles interactions entre la matrice et ces molécules lors de l'optimisation du polymère réservoir. Plusieurs nanocomposites de compositions différentes seront peut-être nécessaires pour répondre à cette problématique.

L'une des conclusions majeures qui ressort de ces travaux est le faible impact des NTC sur l'ensemble des propriétés des nanocomposites à la concentration de 1%<sub>m</sub> par rapport à l'agarose (soit 0,025%<sub>m</sub> ou environ 0,013% vol. par rapport à l'hydrogel hydraté). Rappelons

que la valeur de 1%*m* par rapport à l'agarose avait été sélectionnée en faisant l'hypothèse que les NTC étaient uniquement présents dans la matrice polymère – ce que nous avons vérifié – et que cette valeur est généralement largement suffisante pour atteindre le seuil de percolation électrique dans les cas des DWCNT. Le seuil de percolation n'a cependant pas pu être déterminé par des mesures de conductivité en tension continue et la conductivité mesurée n'est pas aussi spectaculairement augmentée que ce que rapporte la littérature. La fonction électrode est donc à retravailler. Une bascule entre la conduction ionique par la phase liquide (qui représente ~97% de la masse des hydrogels frais) et la conduction électronique par les NTC a peut-être été observée à 10%*m*, mais il faudra poursuivre l'augmentation de la concentration de NTC et réaliser des mesures par spectroscopie d'impédance pour le vérifier. Une étude des interactions entre les NTC, l'agarose et la CMC permettra peut-être d'apporter des réponses. Quoi qu'il en soit, un compromis entre la rigidification des nanocomposites (risque de limitation de la quantité qui peut être stockée puis relarguée) et l'augmentation de la conductivité électrique devra être trouvé.

Par ailleurs, le type de séchage utilisé a pu apporter des améliorations significatives. Nous avons déterminé que l'utilisation d'une étape de congélation avant le séchage (CSA) donnait les meilleurs résultats. Nous avons mesuré une très bonne conservation des dimensions de l'échantillon après un cycle séchage/regonflement, nécessaire à la reproductibilité des expériences *ex vivo* et une tenue mécanique cohérente avec la sollicitation appliquée par le dispositif actuel. De plus, le meilleur facteur d'incorporation a été mesuré avec ce type de séchage (~8), et les cinétiques de relargage sont parmi les plus rapides. Le type de séchage CSA sera donc à conserver pour la suite des travaux. Cependant, l'étude de la microstructure n'a pas permis de déterminer pourquoi ce type de séchage était plus intéressant que les autres, il faudra donc approfondir cette question.

La faible influence des NTC sur les propriétés des plateformes nanocomposites est finalement très encourageante, lorsque l'on considère les résultats de délivrance obtenus avec le dispositif *ex vivo*. Le but des plateformes que nous avons développées et caractérisées est de servir de réservoir de PA, et d'électrode pour la délivrance transdermique par EP. Les premières investigations, avec notamment du PI et du LY, nous ont permis de montrer que l'utilisation du dispositif et des plateformes nanocomposites permettait réellement de perméabiliser des cellules de l'épiderme. De plus, la perméabilisation du SC a été montrée

comme partiellement réversible sur une heure *ex vivo*, donc sans homéostasie possible. Cependant, cette dernière expérience a mis en avant une asymétrie de délivrance non motivée par l'électrophorèse. L'étude de l'influence de la taille et de la charge du PA, ainsi que des deux forces motrices de délivrance, l'électrophorèse et la diffusion passive dans la peau perméabilisée a apporté des réponses. Nous avons mis en lumière une asymétrie des chemins de perméabilisation ou LTR, entre les deux électrodes, intrinsèque à l'utilisation d'un champ électrique pulsé unipolaire dans notre configuration. De plus, même si des macromolécules comme le FD4 ou l'insuline pénètrent dans le SC, elles y restent encore bloquées. Pour une petite molécule hydrophile, le LY, nous avons réussi à montrer sa délivrance jusque dans le derme en quelques minutes grâce à notre dispositif.

Les paramètres électriques que nous avons utilisés n'ont pas été modifiés pendant cette étude et sont issus de travaux précédents de l'équipe de l'IPBS en EGT : il reste donc un important travail d'optimisation de ces paramètres pour permettre la délivrance de macromolécules à travers le SC. Les paramètres idéaux permettraient d'appliquer un champ électrique localisé dans le derme, pour limiter la sensation de douleur et les contractions musculaires, et ouvriraient des chemins aqueux dans le SC adaptés au passage des macromolécules poussées par électrophorèse. Pour guider ces optimisations, hormis l'appui sur une littérature fournie, des mesures d'impédances *in situ* ainsi que le développement de simulations numériques de notre système sont en cours dans le cadre d'une autre thèse en cours (projet ANR Carbo<sup>2</sup>Derm). L'utilisation de la combinaison de pulses d'amplitude et de durées différentes nous semble être une piste à privilégier. Lorsqu'une première phase d'optimisation des paramètres électrique sur peau de souris aura été réalisée, il faudra passer un modèle de peau plus épais, comme la peau de porc et y confronter de nouveau notre dispositif de délivrance. L'étape suivante consistera au passage sur des modèles *in vivo*. De plus en fonction de la délivrance ciblée, topique, dermique ou transdermique, les paramètres électriques seront sûrement à adapter.

Par la suite, nous avons tenté de prendre en compte l'influence des paramètres environnementaux sur la délivrance. Des observations très préliminaires de variations de pH, et de température et de l'influence de la conductivité des différentes strates du système (ici surtout celle du milieu permettant l'humidification du tissu) nous ont fait prendre conscience de leur importance. Il sera primordial de poursuivre ces investigations, notamment avec du LY

pour lequel la délivrance a été démontrée, pour à la fois préciser les mécanismes de délivrance et développer des modèles numériques les plus réalistes possibles. Des modèles de tissus cultivés artificiellement, les épidermes reconstruits humains, alternatifs aux modèles animaux et plus proches de la peau humaine ont été testés et semblent très prometteurs pour la suite des travaux. De plus amples investigations sur ces tissus sont également en cours dans le cadre du projet ANR Carbo<sup>2</sup>Derm.

Enfin pour considérer la toxicité potentielle de nos NTC à court terme, dans le cas où notre approche « safer by design » d'utilisation des NTC dans un hydrogel ne serait pas infaillible, nous avons exposé différentes cellules de la peau à ces nanoparticules. Nous avons conclu de ces tests, pour les fibroblastes en particulier, que les NTC n'affectaient pas leur prolifération, mais modifiaient l'organisation du tapis cellulaire ainsi que potentiellement leur activité métabolique. Il faudra pousser ces analyses sur les autres lignées cellulaires et sur une plus longue durée. Il pourra être intéressant de tester la toxicité des NTC sur les modèles de peaux artificielles. De plus, des réponses cellulaires n'ont été observées que pour des doses correspondant au relargage de plus de 2% des NTC contenus dans une plateforme. Le relargage d'une telle quantité nous semble invraisemblable d'après les résultats de relargage en température issus des travaux antérieurs. Il faudra cependant le vérifier sous stimulations électriques, en en traitant par EP un second gel d'agarose pour recueillir les NTC par exemple.

Pour conclure, ces travaux de thèse ont été menés dans le but de fournir des bases ainsi que des directions d'améliorations, tant sur le plan de l'élaboration du nanocomposite, que sur le plan de la délivrance par électroporation avec notre dispositif. Plusieurs aspects ont été explorés, et si les optimisations sont encore à réaliser, les résultats que nous avons obtenus nous semblent prometteurs pour le futur du projet ANR Carbo<sup>2</sup>Derm.



# Références

- [1] Organisation mondiale de la Santé. Lignes directrices de l'OMS sur l'utilisation de seringues sécurisées pour les injections intramusculaires, intradermiques et sous-cutanées dans les structures de soins; Organisation mondiale de la Santé: Genève, 2016.
- [2] Guillet, J.-F. Nanotubes de carbone pour la délivrance transdermique électro-stimulée de substances biologiquement actives, Université Fédérale de Toulouse Midi-Pyrénées, Toulouse III Paul Sabatier: Toulouse, 2017.
- [3] Guillet, J.-F.; Flahaut, E.; Golzio, M. A Hydrogel/Carbon-Nanotube Needle-Free Device for Electrostimulated Skin Drug Delivery. *ChemPhysChem* **2017**, 18 (19), 2715–2723. <https://doi.org/10.1002/cphc.201700517>.
- [4] Guillet, J.-F.; Valdez-Nava, Z.; Golzio, M.; Flahaut, E. Electrical Properties of Double-Wall Carbon Nanotubes Nanocomposite Hydrogels. *Carbon* **2019**. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2019.01.090>.
- [5] Simon, J.; Flahaut, E.; Golzio, M. Overview of Carbon Nanotubes for Biomedical Applications. *Materials* **2019**, 12 (4), 624. <https://doi.org/10.3390/ma12040624>.
- [6] Simon, J.; Jouanmiquéou, B.; Rols, M.-P.; Flahaut, E.; Golzio, M. Transdermal Delivery of Macromolecules Using Two-in-One Nanocomposite Device for Skin Electroporation. **2021**, 13.
- [7] Nanoscience in Dermatology; Hamblin, M. R., Avci, P., Prow, T., Eds.; Elsevier, 2016.
- [8] Kolarsick, P. A. J.; Kolarsick, M. A.; Goodwin, C. Anatomy and Physiology of the Skin: *J. Dermatol. Nurses Assoc.* **2011**, 3 (4), 203–213. <https://doi.org/10.1097/JDN.0b013e3182274a98>.
- [9] Lai-Cheong, J. E.; McGrath, J. A. Structure and Function of Skin, Hair and Nails. *Medicine (Baltimore)* **2013**, 41 (6), 317–320. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2013.04.017>.
- [10] Ng, K. W.; Lau, W. M. Skin Deep: The Basics of Human Skin Structure and Drug Penetration. In *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement*; Dragicevic, N., Maibach, H. I., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2015; pp 3–11. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-45013-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-662-45013-0_1).
- [11] Sunberg, J. P.; Booth, C. J.; Nanney, L. B.; Fleckman, P.; King Jr., L. E. Skin and Adnexa. In *Comparative Anatomy and Histology A Mouse Rat and Human Atlas*; Treuting, P. M., Dintzis, S. M., Montine, K. S., Eds.; Elsevier Science, 2017.
- [12] Proksch, E.; Brandner, J. M.; Jensen, J.-M. The Skin: An Indispensable Barrier. *Exp. Dermatol.* **2008**, 17 (12), 1063–1072. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x>.
- [13] Brandner, J. M. Importance of Tight Junctions in Relation to Skin Barrier Function. In *Current Problems in Dermatology*; Agner, T., Ed.; S. Karger AG, 2016; Vol. 49, pp 27–37. <https://doi.org/10.1159/000441541>.
- [14] Janssens, M.; van Smeden, J.; Gooris, G. S.; Bras, W.; Portale, G.; Caspers, P. J.; Vreeken, R. J.; Hankemeier, T.; Kezic, S.; Wolterbeek, R.; et al. Increase in Short-Chain Ceramides Correlates with an Altered Lipid Organization and Decreased Barrier Function in Atopic Eczema Patients. *J. Lipid Res.* **2012**, 53 (12), 2755–2766. <https://doi.org/10.1194/jlr.P030338>.
- [15] Boncheva, M. The Physical Chemistry of the Stratum Corneum Lipids. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2014**, 11.

- [16] Verdier-Sévrain, S.; Bonté, F. Skin Hydration: A Review on Its Molecular Mechanisms. *J. Cosmet. Dermatol.* **2007**, *6* (2), 75–82. <https://doi.org/10.1111/j.1473-2165.2007.00300.x>.
- [17] Antonov, D.; Schliemann, S.; Elsner, P. Methods for the Assessment of Barrier Function. In *Current Problems in Dermatology*; Agner, T., Ed.; S. Karger AG, 2016; Vol. 49, pp 61–70. <https://doi.org/10.1159/000441546>.
- [18] Lambers, H.; Piessens, S.; Bloem, A.; Pronk, H.; Finkel, P. Natural Skin Surface PH Is on Average below 5, Which Is Beneficial for Its Resident Flora. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2006**, *28* (5), 359–370. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.2006.00344.x>.
- [19] Plasencia, I.; Norlén, L.; Bagatolli, L. A. Direct Visualization of Lipid Domains in Human Skin Stratum Corneum's Lipid Membranes: Effect of PH and Temperature. *Biophys. J.* **14**.
- [20] Fluhr, J. W.; Elias, P. M. Stratum Corneum PH: Formation and Function of the 'Acid Mantle.' *Exog. Dermatol.* **2002**, *1* (4), 163–175. <https://doi.org/10.1159/000066140>.
- [21] Clausen, M.-L.; Agner, T. Antimicrobial Peptides, Infections and the Skin Barrier. In *Current Problems in Dermatology*; Agner, T., Ed.; S. Karger AG, 2016; Vol. 49, pp 38–46. <https://doi.org/10.1159/000441543>.
- [22] Ono, S.; Kabashima, K. Skin Immune System: Microanatomy. In *Encyclopedia of immunobiology*; Ratcliffe, M. J. H., Ed.; Elsevier Science, 2016; Vol. 3, pp 443–452.
- [23] Godin, B.; Tuitou, E. Dermal and Transdermal Delivery. In *Encyclopedia of Nanotechnology*; Bhushan, B., Ed.; Springer Dordrecht, 2012.
- [24] Benson, H. Transdermal Drug Delivery: Penetration Enhancement Techniques. *Curr. Drug Deliv.* **2005**, *2* (1), 23–33. <https://doi.org/10.2174/1567201052772915>.
- [25] Mitragotri, S.; Anissimov, Y. G.; Bunge, A. L.; Frasch, H. F.; Guy, R. H.; Hadgraft, J.; Kasting, G. B.; Lane, M. E.; Roberts, M. S. Mathematical Models of Skin Permeability: An Overview. *Int. J. Pharm.* **2011**, *418* (1), 115–129. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.02.023>.
- [26] Nielsen, J. B.; Benfeldt, E.; Holmgaard, R. Penetration through the Skin Barrier. In *Current Problems in Dermatology*; Agner, T., Ed.; S. Karger AG, 2016; Vol. 49, pp 103–111. <https://doi.org/10.1159/000441549>.
- [27] Barrière cutanée - Absorption percutanée. *Ann. Dermatol. Vénérologie* **2005**, *132* (11), 51–52. [https://doi.org/10.1016/S0151-9638\(05\)79535-1](https://doi.org/10.1016/S0151-9638(05)79535-1).
- [28] Naik, A.; Kalia, Y. N.; Guy, R. H. Transdermal Drug Delivery: Overcoming the Skin's Barrier Function. *Pharm. Sci. Technol. Today* **2000**, *3* (9), 318–326. [https://doi.org/10.1016/S1461-5347\(00\)00295-9](https://doi.org/10.1016/S1461-5347(00)00295-9).
- [29] Brown, M. B.; Martin, G. P.; Jones, S. A.; Akomeah, F. K. Dermal and Transdermal Drug Delivery Systems: Current and Future Prospects. *Drug Deliv.* **2006**, *13* (3), 175–187. <https://doi.org/10.1080/10717540500455975>.
- [30] Kalluri, H.; Banga, A. K. Transdermal Delivery of Proteins. *AAPS PharmSciTech* **2011**, *12* (1), 431–441. <https://doi.org/10.1208/s12249-011-9601-6>.
- [31] Alexander, A.; Dwivedi, S.; Ajazuddin; Giri, T. K.; Saraf, S.; Saraf, S.; Tripathi, D. K. Approaches for Breaking the Barriers of Drug Permeation through Transdermal Drug Delivery. *J. Controlled Release* **2012**, *164* (1), 26–40. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.09.017>.
- [32] Alkilani, A.; McCrudden, M. T.; Donnelly, R. Transdermal Drug Delivery: Innovative Pharmaceutical Developments Based on Disruption of the Barrier Properties of the

- Stratum Corneum. *Pharmaceutics* **2015**, *7* (4), 438–470. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics7040438>.
- [33] Engelke, L.; Winter, G.; Hook, S.; Engert, J. Recent Insights into Cutaneous Immunization: How to Vaccinate via the Skin. *Vaccine* **2015**, *33* (37), 4663–4674. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.05.012>.
- [34] Prausnitz, M. R.; Mitragotri, S.; Langer, R. Current Status and Future Potential of Transdermal Drug Delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3* (2), 115–124. <https://doi.org/10.1038/nrd1304>.
- [35] Prausnitz, M. R.; Langer, R. Transdermal Drug Delivery. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26* (11), 1261–1268. <https://doi.org/10.1038/nbt.1504>.
- [36] Ramadan, D.; McCrudden, M. T. C.; Courtenay, A. J.; Donnelly, R. F. Enhancement Strategies for Transdermal Drug Delivery Systems: Current Trends and Applications. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2021**. <https://doi.org/10.1007/s13346-021-00909-6>.
- [37] Jeong, W. Y.; Kwon, M.; Choi, H. E.; Kim, K. S. Recent Advances in Transdermal Drug Delivery Systems: A Review. *Biomater. Res.* **2021**, *25* (1), 24. <https://doi.org/10.1186/s40824-021-00226-6>.
- [38] Williams, A. C.; Barry, B. W. Penetration Enhancers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 128–137. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.032>.
- [39] Karande, P.; Jain, A.; Ergun, K.; Kispersky, V.; Mitragotri, S. Design Principles of Chemical Penetration Enhancers for Transdermal Drug Delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102* (13), 4688–4693. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501176102>.
- [40] Mitragotri, S. Devices for Overcoming Biological Barriers: The Use of Physical Forces to Disrupt the Barriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65* (1), 100–103. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.07.016>.
- [41] 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.* **2007**, *104* (11), 4255–4260. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700182104>.
- [42] Shapiro, J. R.; Hodgins, B.; Hendin, H. E.; Patel, A.; Menassa, K.; Menassa, C.; Menassa, M.; Pereira, J. A.; Ward, B. J. Needle-Free Delivery of Influenza Vaccine Using the Med-Jet® H4 Is Efficient and Elicits the Same Humoral and Cellular Responses as Standard IM Injection: A Randomized Trial. *Vaccine* **2019**, *37* (10), 1332–1339. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.01.039>.
- [43] Park, J.-H.; Lee, J.-W.; Kim, Y.-C.; Prausnitz, M. R. The Effect of Heat on Skin Permeability. *Int. J. Pharm.* **2008**, *359* (1–2), 94–103. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.03.032>.
- [44] Lee, J. W.; Gadiraju, P.; Park, J.-H.; Allen, M. G.; Prausnitz, M. R. Microsecond Thermal Ablation of Skin for Transdermal Drug Delivery. *J. Controlled Release* **2011**, *154* (1), 58–68. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.05.003>.
- [45] Prausnitz, M. R. Microneedles for Transdermal Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56* (5), 581–587. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.10.023>.
- [46] Oberli, M. A.; Schoellhammer, C. M.; Langer, R.; Blankschtein, D. Ultrasound-Enhanced Transdermal Delivery: Recent Advances and Future Challenges. *Ther. Deliv.* **2014**, *5* (7), 843–857. <https://doi.org/10.4155/tde.14.32>.
- [47] Neumann, E.; Rosenheck, K. Permeability Changes Induced by Electric Impulses in Vesicular Membranes. *J. Membr. Biol.* **1972**, *10* (1), 279–290. <https://doi.org/10.1007/BF01867861>.

- [48] Kolosnjaj-Tabi, J.; Gibot, L.; Fourquaux, I.; Golzio, M.; Rols, M.-P. Electric Field-Responsive Nanoparticles and Electric Fields: Physical, Chemical, Biological Mechanisms and Therapeutic Prospects. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.10.017>.
- [49] Golzio, M.; Gabriel, B.; Boissier, F.; Deuwille, J.; Rols, M. P.; Teissié, J. Calcium et cellules électropermeabilisées. *J. Société Biol.* **2003**, 197 (3), 301–310. <https://doi.org/10.1051/jbio/2003197030301>.
- [50] 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.* **2012**, 72 (6), 1336–1341. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3782>.
- [51] Mir, L. M.; Orłowski, S. Mechanisms of Electrochemotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, 35 (1), 107–118. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(98\)00066-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(98)00066-0).
- [52] Golzio, M.; Teissie, J.; Rols, M.-P. Direct Visualization at the Single-Cell Level of Electrically Mediated Gene Delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, 99 (3), 1292–1297. <https://doi.org/10.1073/pnas.022646499>.
- [53] Sutter, O.; Calvo, J.; N’Kontchou, G.; Nault, J.-C.; Ourabia, R.; Nahon, P.; Ganne-Carrié, N.; Bourcier, V.; Zentar, N.; Bouhafs, F.; et al. Safety and Efficacy of Irreversible Electroporation for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma Not Amenable to Thermal Ablation Techniques: A Retrospective Single-Center Case Series. *Radiology* **2017**, 284 (3), 877–886. <https://doi.org/10.1148/radiol.2017161413>.
- [54] Niessen, C.; Thumann, S.; Beyer, L.; Pregler, B.; Kramer, J.; Lang, S.; Teufel, A.; Jung, E. M.; Stroszczyński, C.; Wiggermann, P. Percutaneous Irreversible Electroporation: Long-Term Survival Analysis of 71 Patients with Inoperable Malignant Hepatic Tumors. *Sci. Rep.* **2017**, 7 (1), 43687. <https://doi.org/10.1038/srep43687>.
- [55] Mahnič-Kalamiza, S.; Vorobiev, E.; Miklavčič, D. Electroporation in Food Processing and Biorefinery. *J. Membr. Biol.* **2014**, 247 (12), 1279–1304. <https://doi.org/10.1007/s00232-014-9737-x>.
- [56] Loste, F.; Eynard, N.; Teissié, J. Direct Monitoring of the Field Strength during Electropulsation. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1998**, 47 (1), 119–127. [https://doi.org/10.1016/S0302-4598\(98\)00183-4](https://doi.org/10.1016/S0302-4598(98)00183-4).
- [57] Kinosita, K.; Tsong, T. Y. Formation and Resealing of Pores of Controlled Sizes in Human Erythrocyte Membrane. *Nature* **1977**, 268 (5619), 438–441. <https://doi.org/10.1038/268438a0>.
- [58] Friedrich, U.; Stachowicz, N.; Simm, A.; Fuhr, G.; Lucas, K.; Zimmermann, U. High Efficiency Electrotransfection with Aluminum Electrodes Using Microsecond Controlled Pulses. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1998**, 47 (1), 103–111. [https://doi.org/10.1016/S0302-4598\(98\)00163-9](https://doi.org/10.1016/S0302-4598(98)00163-9).
- [59] Edebo, L.; Holme, T.; Selin, I. Microbicidal Action of Compounds Generated by Transient Electric Arcs in Aqueous Systems. *J. Gen. Microbiol.* **1968**, 53 (1), 1–7. <https://doi.org/10.1099/00221287-53-1-1>.
- [60] Orida, N.; Feldman, J. D. Directional Protrusive Pseudopodial Activity and Motility in Macrophages Induced by Extracellular Electric Fields. *Cell Motil.* **1982**, 2 (3), 243–255. <https://doi.org/10.1002/cm.970020305>.
- [61] Hille, B. Ionic Channels in Excitable Membranes. Current Problems and Biophysical Approaches. *Biophys. J.* **1978**, 22 (2), 283–294. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(78\)85489-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(78)85489-7).

- [62] Teissié, J.; Eynard, N.; Gabriel, B.; Rols, M. P. Electroporation of Cell Membranes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, 35 (1), 3–19. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(98\)00060-X](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(98)00060-X).
- [63] Gabriel, B.; Teissié, J. Direct Observation in the Millisecond Time Range of Fluorescent Molecule Asymmetrical Interaction with the Electroporated Cell Membrane. *Biophys. J.* **1997**, 73 (5), 2630–2637. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78292-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78292-4).
- [64] Teissie, J.; Tsong, T. Y. Electric Field Induced Transient Pores in Phospholipid Bilayer Vesicles. *Biochemistry* **1981**, 20 (6), 1548–1554. <https://doi.org/10.1021/bi00509a022>.
- [65] Teissié, J.; Rols, M. P. An Experimental Evaluation of the Critical Potential Difference Inducing Cell Membrane Electroporation. *Biophys. J.* **1993**, 65 (1), 409–413. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(93\)81052-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(93)81052-X).
- [66] Escande-Géraud, M. L.; Rols, M. P.; Dupont, M. A.; Gas, N.; Teissié, J. Reversible Plasma Membrane Ultrastructural Changes Correlated with Electroporation in Chinese Hamster Ovary Cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1988**, 939 (2), 247–259. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(88\)90068-5](https://doi.org/10.1016/0005-2736(88)90068-5).
- [67] Weaver, J. C. Electroporation of Biological Membranes from Multicellular to Nano Scales. *IEEE Trans. Dielectr. Electr. Insul.* **2003**, 10 (5), 754–768. <https://doi.org/10.1109/TDEI.2003.1237325>.
- [68] Rols, M.-P. Electroporation, a Physical Method for the Delivery of Therapeutic Molecules into Cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2006**, 1758 (3), 423–428. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.01.005>.
- [69] Rols, M.-P. Electroporation, a Physical Method for the Delivery of Therapeutic Molecules into Cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2006**, 1758 (3), 423–428. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.01.005>.
- [70] Kanthou, C.; Kranjc, S.; Sersa, G.; Tozer, G.; Zupanic, A.; Cemazar, M. The Endothelial Cytoskeleton as a Target of Electroporation-Based Therapies. *Mol. Cancer Ther.* **2006**, 5 (12), 3145–3152. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0410>.
- [71] Gabriel, B.; Teissie, J. Generation of Reactive-Oxygen Species Induced by Electroporation of Chinese Hamster Ovary Cells and Their Consequence on Cell Viability. *Eur. J. Biochem.* **1994**, 223 (1), 25–33. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18962.x>.
- [72] Gabriel, B.; Teissié, J. Control by Electrical Parameters of Short- and Long-Term Cell Death Resulting from Electroporation of Chinese Hamster Ovary Cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1995**, 1266 (2), 171–178. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(95\)00021-J](https://doi.org/10.1016/0167-4889(95)00021-J).
- [73] Gabriel, B. Electroporation de Cellules de Mammifères. Analyse Des Réponses Cellulaires, En Particulier Du Stress Oxydatif, Université Fédérale de Toulouse Midi-Pyrénées, Toulouse III Paul Sabatier, 1992.
- [74] Escoffre, J.-M.; Bellard, E.; Faurie, C.; Sébaï, S. C.; Golzio, M.; Teissié, J.; Rols, M.-P. Membrane Disorder and Phospholipid Scrambling in Electroporated and Viable Cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2014**, 1838 (7), 1701–1709. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.02.013>.
- [75] Miklavčič, D.; Beravs, K.; Šemrov, D.; Čemažar, M.; Demšar, F.; Serša, G. The Importance of Electric Field Distribution for Effective *In Vivo* Electroporation of Tissues. *Biophys. J.* **1998**, 74 (5), 2152–2158. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77924-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77924-X).

- [76] 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.* **2005**, *52* (8), 1373–1381. <https://doi.org/10.1109/TBME.2005.851524>.
- [77] Miklavčič, D.; Šemrov, D.; Mekid, H.; Mir, L. M. A Validated Model of in Vivo Electric Field Distribution in Tissues for Electrochemotherapy and for DNA Electrotransfer for Gene Therapy. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1523* (1), 73–83. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(00\)00101-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(00)00101-X).
- [78] Orłowski, S.; Belehradec, J.; Paoletti, C.; Mir, L. M. Transient Electroporation of Cells in Culture. *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37* (24), 4727–4733. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(88\)90344-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(88)90344-9).
- [79] Mir, L. M.; Glass, L. F.; Sersa, G.; Teissie, J.; Domenge, C.; Miklavcic, D.; Jaroszeski, M.; Orłowski, S.; Reintgen, D. S.; Rudolf, Z.; et al. Effective Treatment of Cutaneous and Subcutaneous Malignant Tumours by Electrochemotherapy. *Br. J. Cancer* **1998**, *77*, 2336–2342. <https://doi.org/10.1038/bjc.1998.388>.
- [80] Rols, M. P.; Tamzali, Y.; Teissié, J. Electrochemotherapy of Horses. A Preliminary Clinical Report. *Bioelectrochemistry* **2002**, *55* (1–2), 101–105. [https://doi.org/10.1016/S1567-5394\(01\)00156-6](https://doi.org/10.1016/S1567-5394(01)00156-6).
- [81] Tamzali, Y.; Borde, L.; Rols, M. P.; Golzio, M.; Lyazrhi, F.; Teissie, J. Successful Treatment of Equine Sarcoids with Cisplatin Electrochemotherapy: A Retrospective Study of 48 Cases: Cisplatin Electrochemotherapy of Equine Sarcoid. *Equine Vet. J.* **2012**, *44* (2), 214–220. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2011.00425.x>.
- [82] Cemazar, M.; Tamzali, Y.; Sersa, G.; Tozon, N.; Mir, L. M.; Miklavcic, D.; Lowe, R.; Teissie, J. Electrochemotherapy in Veterinary Oncology. *J. Vet. Intern. Med.* **2008**, *22* (4), 826–831. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.01117.x>.
- [83] Rols, M.-P.; Golzio, M.; Teissié, J. Electroporation: Technology and Science. In *Electroporation in Veterinary Oncology Practice*; Impellizeri, J. A., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2021.
- [84] Ágoston, D.; Baltás, E.; Ócsai, H.; Rátkai, S.; Lázár, P. G.; Korom, I.; Varga, E.; Németh, I. B.; Dósa-Rácz Viharosné, É.; Gehl, J.; et al. Evaluation of Calcium Electroporation for the Treatment of Cutaneous Metastases: A Double Blinded Randomised Controlled Phase II Trial. *Cancers* **2020**, *12* (1), 179. <https://doi.org/10.3390/cancers12010179>.
- [85] Robertis, M. D.; Pasquet, L.; Loiacono, L.; Bellard, E.; Messina, L.; Vaccaro, S.; Pasquale, R. D.; Fazio, V. M.; Rols, M.-P.; Teissie, J.; et al. In Vivo Evaluation of a New Recombinant Hyaluronidase to Improve Gene Electro-Transfer Protocols for DNA-Based Drug Delivery against Cancer. *Cancers* **2018**, *10* (11), 405. <https://doi.org/10.3390/cancers10110405>.
- [86] Neumann, E.; Schaefer-Ridder, M.; Wang, Y.; Hofschneider, P. H. Gene Transfer into Mouse Lyoma Cells by Electroporation in High Electric Fields. *EMBO* **1982**, *1* (7), 5. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1982.tb01257.x>.
- [87] Daud, A. I.; DeConti, R. C.; Andrews, S.; Urbas, P.; Riker, A. I.; Sondak, V. K.; Munster, P. N.; Sullivan, D. M.; Ugen, K. E.; Messina, J. L.; et al. Phase I Trial of Interleukin-12 Plasmid Electroporation in Patients With Metastatic Melanoma. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26* (36), 5896–5903. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.6794>.
- [88] Bose, V. G. Electrical Characterization of Electroporation of Human Stratum Corneum. **1994**, 80.

- [89] Pliquett, U.; Langer, R.; Weaver, J. C. Changes in the Passive Electrical Properties of Human Stratum Corneum Due to Electroporation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1995**, 1239 (2), 111–121. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(95\)00139-T](https://doi.org/10.1016/0005-2736(95)00139-T).
- [90] Chizmadzhev, Y. A.; Zarnitsin, V. G.; Weaver, J. C.; Potts, R. O. Mechanism of Electroinduced Ionic Species Transport through a Multilamellar Lipid System. *Biophys. J.* **1995**, 68 (3), 749–765. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(95\)80250-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(95)80250-X).
- [91] Chizmadzhev, Y. A.; Indenbom, A. V.; Kuzmin, P. I.; Galichenko, S. V.; Weaver, J. C.; Potts, R. O. Electrical Properties of Skin at Moderate Voltages: Contribution of Appendageal Macropores. *Biophys. J.* **1998**, 74, 14.
- [92] Miklavcic, D.; Pavselj, N.; Hart, F. X. ELECTRIC PROPERTIES OF TISSUES. In *Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering*; Akay, M., Ed.; John Wiley & Sons, Inc., 2006; p 12.
- [93] Pavšelj, N.; Pr at, V.; Miklav ci , D. A Numerical Model of Skin Electroporabilization Based on In Vivo Experiments. *Ann. Biomed. Eng.* **2007**, 35 (12), 2138–2144. <https://doi.org/10.1007/s10439-007-9378-7>.
- [94] Jadoul, A.; Bouwstra, J.; Preat, V. Effects of Iontophoresis and Electroporation on the Stratum Corneum Review of the Biophysical Studies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, 17.
- [95] Pr at, V.; Vanbever, R.; Jadoul, A.; Regnier, V. Comparison of Iontophoresis and Electroporation: Mechanisms and Tolerance. In *Electricity and Magnetism in Biology and Medicine*; Bersani, F., Ed.; Springer US: Boston, MA, 1999; pp 145–147. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4867-6\\_30](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4867-6_30).
- [96] Weaver, J. C.; Vaughan, T. E.; Chizmadzhev, Y. Theory of Electrical Creation of Aqueous Pathways across Skin Transport Barriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, 35 (1), 21–39. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(98\)00061-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(98)00061-1).
- [97] Pliquett, U. F.; Vanbever, R.; Preat, V.; Weaver, J. C. Local Transport Regions (LTRs) in Human Stratum Corneum Due to Long and Short ‘High Voltage’ Pulses. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1998**, No. 47, 151–161.
- [98] Chen, T.; Langer, R.; Weaver, J. C. Skin Electroporation Causes Molecular Transport Across the Stratum Corneum through Localized Transport Regions. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **1998**, 3 (2), 159–165. <https://doi.org/10.1038/jidsymp.1998.32>.
- [99] Pikal, M. J. The Role of Electroosmotic Flow in Transdermal Iontophoresis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, 25.
- [100] Lombry, C.; Dujardin, N.; Pr at, V. Transdermal Delivery of Macromolecules Using Skin Electroporation. *Pharm. Res.* **2000**, 17 (1), 32–37. <https://doi.org/10.1023/A:1007510323344>.
- [101] Pliquett, U. F.; Gusbeth, C. A. Perturbation of Human Skin Due to Application of High Voltage. *Bioelectrochemistry* **2000**, 51 (1), 41–51. [https://doi.org/10.1016/S0302-4598\(99\)00070-7](https://doi.org/10.1016/S0302-4598(99)00070-7).
- [102] Pliquett, U.; Gallo, S.; Hui, S. W.; Gusbeth, Ch.; Neumann, E. Local and Transient Structural Changes in Stratum Corneum at High Electric Fields: Contribution of Joule Heating. *Bioelectrochemistry* **2005**, 67 (1), 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2004.12.003>.
- [103] 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* **2002**, 57 (1), 65–72. [https://doi.org/10.1016/S1567-5394\(01\)00177-3](https://doi.org/10.1016/S1567-5394(01)00177-3).

- [104] Prausnitz, M. R. Do High-Voltage Pulses Cause Changes in Skin Structure? *J. Controlled Release* **1996**, 40 (3), 321–326. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(95\)00199-9](https://doi.org/10.1016/0168-3659(95)00199-9).
- [105] Denet, A.-R.; Vanbever, R.; Pr at, V. Skin Electroporation for Transdermal and Topical Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, 56 (5), 659–674. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.10.027>.
- [106] Zorec, B.; Becker, S.; Reber sek, M.; Miklav ci c, D.; Pav selj, N. Skin Electroporation for Transdermal Drug Delivery: The Influence of the Order of Different Square Wave Electric Pulses. *Int. J. Pharm.* **2013**, 457 (1), 214–223. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.09.020>.
- [107] Becker, S.; Zorec, B.; Miklav ci c, D.; Pav selj, N. Transdermal Transport Pathway Creation: Electroporation Pulse Order. *Math. Biosci.* **2014**, 257, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2014.07.001>.
- [108] 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.* **1993**, 90 (22), 10504–10508. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.22.10504>.
- [109] Vanbever, R.; Lecouturier, N.; Pr at, V. Transdermal Delivery of Metoprolol by Electroporation. *Pharm. Res.* **1994**, 11 (11), 1657–1662. <https://doi.org/10.1023/A:1018930425591>.
- [110] Vanbever, R.; Le Bouleng e, E.; Pr at, V. Transdermal Delivery of Fentanyl by Electroporation I. Influence of Electrical Factors. *Pharm. Res.* **1996**, 13 (4), 559–565. <https://doi.org/10.1023/A:1016093920875>.
- [111] Martin, G. T.; Pliquett, U. F.; Weaver, J. C. Theoretical Analysis of Localized Heating in Human Skin Subjected to High Voltage Pulses. *Bioelectrochemistry* **2002**, 57 (1), 55–64. [https://doi.org/10.1016/S1567-5394\(01\)00176-1](https://doi.org/10.1016/S1567-5394(01)00176-1).
- [112] Vanbever, R.; Fouchard, D.; Jadoul, A.; De Morre, N.; Pr at, V.; Marty, J.-P. In Vivo Noninvasive Evaluation of Hairless Rat Skin after High-Voltage Pulse Exposure. *Skin Pharmacol. Physiol.* **1998**, 11 (1), 23–34. <https://doi.org/10.1159/000029805>.
- [113] Vanbever, R.; De Morre, N.; Pr at, V. Transdermal Delivery of Fentanyl by Electroporation II. Mechanisms Involved in Drug Transport. *Pharm. Res.* **1996**, 13 (9), 1360–1366. <https://doi.org/10.1023/A:1016073917125>.
- [114] Prausnitz, M. R.; Edelman, E. R.; Gimm, J. A.; Langer, R.; Weaver, J. C. Transdermal Delivery of Heparin by Skin Electroporation. *Nat. Biotechnol.* **1995**, 13 (11), 1205–1209. <https://doi.org/10.1038/nbt1195-1205>.
- [115] Regnier, V.; De Morre, N.; Jadoul, A.; Pr at, V. Mechanisms of a Phosphorothioate Oligonucleotide Delivery by Skin Electroporation. *Int. J. Pharm.* **1999**, 184 (2), 147–156. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(98\)00085-4](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(98)00085-4).
- [116] Regnier, V.; Pr at, V. Localization of a FITC-Labeled Phosphorothioate Oligodeoxynucleotide in the Skin After Topical Delivery by Iontophoresis and Electroporation. *Pharm. Res.* **1998**, 15 (10), 1596–1602. <https://doi.org/10.1023/A:1011963318843>.
- [117] 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. Controlled Release* **1999**, 13.
- [118] Dujardin, N. In Vivo Assessment of Skin Electroporation Using Square Wave Pulses. *J. Controlled Release* **2002**, 79 (1–3), 219–227. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00548-X](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00548-X).

- [119] Vanbever, R. Transdermal Delivery of Fentanyl: Rapid Onset of Analgesia Using Skin Electroporation. *J. Controlled Release* **1998**, 50 (1–3), 225–235. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(97\)00147-8](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(97)00147-8).
- [120] Thysman, S.; Pr eat, V. In Vivo Iontophoresis of Fentanyl and Sufentanil in Rats: Pharmacokinetics and Acute Antinociceptive Effects. *Anesth. Analg.* **1993**, 77 (1). <https://doi.org/10.1213/00000539-199307000-00012>.
- [121] Escobar-Ch avez, J. J.; Bonilla-Mart inez, D.; Villegas-Gonz alez, M. A.; Revilla-V azquez, A. L. Electroporation as an Efficient Physical Enhancer for Skin Drug Delivery. *J. Clin. Pharmacol.* **2009**, 49 (11), 1262–1283. <https://doi.org/10.1177/0091270009344984>.
- [122] Blagus, T.; Markelc, B.; Cemazar, M.; Kosjek, T.; Preat, V.; Miklavcic, D.; Sersa, G. In Vivo Real-Time Monitoring System of Electroporation Mediated Control of Transdermal and Topical Drug Delivery. *J. Controlled Release* **2013**, 172 (3), 862–871. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.09.030>.
- [123] Pliquett, U.; Weaver, J. C. Feasibility of an Electrode-Reservoir Device for Transdermal Drug Delivery by Noninvasive Skin Electroporation. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **2007**, 54 (3), 536–538. <https://doi.org/10.1109/TBME.2006.886828>.
- [124] Weaver, J. C.; Pliquett, U. F.; Zewert, T. E.; Vanbever, R.; Herndon, T. O.; Gowrishankar, T. R.; Chen, T.; Prausnitz, M. R.; Vaughan, T. E.; Chizmadzhev, Y.; et al. Recent Advances in Skin Electroporation: Mechanism and Efficacy. In *Electricity and Magnetism in Biology and Medicine*; Bersani, F., Ed.; Springer US: Boston, MA, 1999; pp 149–152. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4867-6\\_31](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4867-6_31).
- [125] Tokumoto, S.; Higo, N.; Sugibayashi, K. Effect of Electroporation and PH on the Iontophoretic Transdermal Delivery of Human Insulin. *Int. J. Pharm.* **2006**, 326 (1–2), 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.07.002>.
- [126] Mohammad, E. A.; Elshemey, W. M.; Elsayed, A. A.; Abd-Elghany, A. A. Electroporation Parameters for Successful Transdermal Delivery of Insulin. *Am. J. Ther.* **2016**, 23 (6), e1560–e1567. <https://doi.org/10.1097/MJT.000000000000198>.
- [127] Monthieux, M.; Serp, P.; Caussat, B.; Flahaut, E.; Razafinimanana, M.; Valensi, F.; Laurent, C.; Peigney, A.; Mesguich, D.; Weibel, A.; et al. Introduction to Carbon Nanotubes. In *Springer handbook of nanotechnology*; Bhushan, B., Ed.; Springer: Berlin ; New York, 2010; pp 43–112.
- [128] Kroto, H. W.; Heath, J. R.; O’Brien, S. C.; Curl, R. F.; Smalley, R. E. C60: Buckminsterfullerene. *Nature* **1985**, 318 (6042), 162–163. <https://doi.org/10.1038/318162a0>.
- [129] Iijima, S. Helical Microtubules of Graphitic Carbon. *Nature* **1991**, 354 (6348), 56–58. <https://doi.org/10.1038/354056a0>.
- [130] Monthieux, M.; Kuznetsov, V. L. Who Should Be given the Credit for the Discovery of Carbon Nanotubes? *Carbon* **2006**, 44 (9), 1621–1623. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2006.03.019>.
- [131] Dresselhaus, M. S.; Dresselhaus, G.; Saito, R. Physics of Carbon Nanotubes. *Carbon* **1995**, 33 (7), 883–891. [https://doi.org/10.1016/0008-6223\(95\)00017-8](https://doi.org/10.1016/0008-6223(95)00017-8).
- [132] 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* **2013**, 7 (7), 6156–6161. <https://doi.org/10.1021/nn401995z>.
- [133] Iijima, S.; Ichihashi, T. Single-Shell Carbon Nanotubes of 1-Nm Diameter. *Nature* **1993**, 363 (6430), 603–605. <https://doi.org/10.1038/363603a0>.

- [134] Flahaut, E.; Bacsa, R.; Peigney, A.; Laurent, C. Gram-Scale CCVD Synthesis of Double-Walled Carbon Nanotubes. *Chem. Commun.* **2003**, No. 12, 1442. <https://doi.org/10.1039/b301514a>.
- [135] Roche, S. Carbon Nanotubes: Exceptional Mechanical and Electronic Properties. *Ann. Chim. Sci. Matér.* **2000**, 25 (7), 529–532. [https://doi.org/10.1016/S0151-9107\(01\)80005-2](https://doi.org/10.1016/S0151-9107(01)80005-2).
- [136] Iijima, S.; Brabec, C.; Maiti, A.; Bernholc, J. Structural Flexibility of Carbon Nanotubes. *J. Chem. Phys.* **1996**, 104 (5), 2089–2092. <https://doi.org/10.1063/1.470966>.
- [137] Laurent, Ch.; Flahaut, E.; Peigney, A. The Weight and Density of Carbon Nanotubes versus the Number of Walls and Diameter. *Carbon* **2010**, 48 (10), 2994–2996. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2010.04.010>.
- [138] Monthieux, M.; Serp, P.; Caussat, B.; Flahaut, E.; Razafinimanana, M.; Valensi, F.; Laurent, C.; Peigney, A.; Mesguich, D.; Weibel, A.; et al. Carbon Nanotubes. In *Springer Handbook of Nanotechnology*; Bhushan, B., Ed.; Springer Handbooks; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2017; pp 193–247. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-54357-3\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-662-54357-3_8).
- [139] Qi, P.; Javey, A.; Rolandi, M.; Wang, Q.; Yenilmez, E.; Dai, H. Miniature Organic Transistors with Carbon Nanotubes as Quasi-One-Dimensional Electrodes. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126 (38), 11774–11775. <https://doi.org/10.1021/ja045900k>.
- [140] 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.* **2004**, 14 (4), 646. <https://doi.org/10.1039/b312367g>.
- [141] Ando, Y.; Zhao, X.; Shimoyama, H.; Sakai, G.; Kaneto, K. Physical Properties of Multiwalled Carbon Nanotubes. *Int. J. Inorg. Mater.* **1999**, 1 (1), 77–82. [https://doi.org/10.1016/S1463-0176\(99\)00012-5](https://doi.org/10.1016/S1463-0176(99)00012-5).
- [142] Wei, B. Q.; Vajtai, R.; Ajayan, P. M. Reliability and Current Carrying Capacity of Carbon Nanotubes. *Appl. Phys. Lett.* **2001**, 79 (8), 1172–1174. <https://doi.org/10.1063/1.1396632>.
- [143] 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.* **2011**, 88 (7), 1637–1639. <https://doi.org/10.1016/j.mee.2011.01.081>.
- [144] Souza, V. H. R.; Flahaut, E.; Zarbin, A. J. G. Conducting, Transparent and Flexible Substrates Obtained from Interfacial Thin Films of Double-Walled Carbon Nanotubes. *J. Colloid Interface Sci.* **2017**, 502, 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.04.084>.
- [145] Gohardani, O.; Elola, M. C.; Elizetxea, C. Potential and Prospective Implementation of Carbon Nanotubes on next Generation Aircraft and Space Vehicles: A Review of Current and Expected Applications in Aerospace Sciences. *Prog. Aerosp. Sci.* **2014**, 70, 42–68. <https://doi.org/10.1016/j.paerosci.2014.05.002>.
- [146] Yu, Zechuan; Lau, Denvid. Evaluation on Mechanical Enhancement and Fire Resistance of Carbon Nanotube (CNT) Reinforced Concrete. *Coupled Syst. Mech.* **2017**, 6 (3), 335–349. <https://doi.org/10.12989/CSM.2017.6.3.335>.
- [147] Lagoutte, S.; Aubert, P.-H.; Pinault, M.; Tran-Van, F.; Mayne-L’Hermite, M.; Chevrot, C. Poly(3-Methylthiophene)/Vertically Aligned Multi-Walled Carbon Nanotubes: Electrochemical Synthesis, Characterizations and Electrochemical Storage Properties

- in Ionic Liquids. *Electrochimica Acta* **2014**, 130, 754–765. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.03.097>.
- [148] Vignal, T.; Banet, P.; Pinault, M.; Lafourcade, R.; Descarpentries, J.; Darchy, L.; Hauf, H.; Reynaud, C.; Mayne-L’Hermite, M.; Aubert, P.-H. Electropolymerized Poly(3-Methylthiophene) onto High Density Vertically Aligned Carbon Nanotubes Directly Grown on Aluminum Substrate: Application to Electrochemical Capacitors. *Electrochimica Acta* **2020**, 350, 136377. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.136377>.
- [149] Mohajeri, M.; Behnam, B.; Sahebkar, A. Biomedical Applications of Carbon Nanomaterials: Drug and Gene Delivery Potentials. *J. Cell. Physiol.* **2018**. <https://doi.org/10.1002/jcp.26899>.
- [150] Punbusayakul, N.; Talapatra, S.; Ajayan, P. M.; Surareungchai, W. Label-Free as-Grown Double Wall Carbon Nanotubes Bundles for Salmonella Typhimurium Immunoassay. *Chem. Cent. J.* **2013**, 7 (1), 102. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-102>.
- [151] Ojeda, I.; Barrejón, M.; Arellano, L. M.; González-Cortés, A.; Yáñez-Sedeño, P.; Langa, F.; Pingarrón, J. M. Grafted-Double Walled Carbon Nanotubes as Electrochemical Platforms for Immobilization of Antibodies Using a Metallic-Complex Chelating Polymer: Application to the Determination of Adiponectin Cytokine in Serum. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, 74, 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.06.001>.
- [152] Wayu, M. B.; Pannell, M. J.; Labban, N.; Case, W. S.; Pollock, J. A.; Leopold, M. C. Functionalized Carbon Nanotube Adsorption Interfaces for Electron Transfer Studies of Galactose Oxidase. *Bioelectrochemistry* **2019**, 125, 116–126. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2018.10.003>.
- [153] Chen, H.; Huang, J.; Fam, D.; Tok, A. Horizontally Aligned Carbon Nanotube Based Biosensors for Protein Detection. *Bioengineering* **2016**, 3 (4), 23. <https://doi.org/10.3390/bioengineering3040023>.
- [154] Mansouri Majd, S.; Salimi, A. Ultrasensitive Flexible FET-Type Aptasensor for CA 125 Cancer Marker Detection Based on Carboxylated Multiwalled Carbon Nanotubes Immobilized onto Reduced Graphene Oxide Film. *Anal. Chim. Acta* **2018**, 1000, 273–282. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.11.008>.
- [155] Ramnani, P.; Gao, Y.; Ozsoz, M.; Mulchandani, A. Electronic Detection of MicroRNA at Attomolar Level with High Specificity. *Anal. Chem.* **2013**, 85 (17), 8061–8064. <https://doi.org/10.1021/ac4018346>.
- [156] Peng, R.; Tang, X. S.; Li, D. Detection of Individual Molecules and Ions by Carbon Nanotube-Based Differential Resistive Pulse Sensor. *Small* **2018**, 14 (15), 1800013. <https://doi.org/10.1002/sml.201800013>.
- [157] Welsher, K.; Liu, Z.; Sherlock, S. P.; Robinson, J. T.; Chen, Z.; Daranciang, D.; Dai, H. A Route to Brightly Fluorescent Carbon Nanotubes for Near-Infrared Imaging in Mice. *Nat. Nanotechnol.* **2009**, 4 (11), 773–780. <https://doi.org/10.1038/nnano.2009.294>.
- [158] Welsher, K.; Sherlock, S. P.; Dai, H. Deep-Tissue Anatomical Imaging of Mice Using Carbon Nanotube Fluorophores in the Second near-Infrared Window. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, 108 (22), 8943–8948. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014501108>.
- [159] Hong, G.; Shuo, D.; Antaris, A. L.; Chen, C.; Zhang, B.; Zhao, S.; Atochin, D. N.; Huang, P. L.; Andreasson, K. I.; Kuo, C. J.; et al. Through-Skull Fluorescence Imaging of the Brain in a New near-Infrared Window. *Nat. Photonics* **2014**, 8, 723–730. <https://doi.org/10.1038/NPHOTON.2014.166>.

- [160] Pan, J.; Li, F.; Choi, J. H. Single-Walled Carbon Nanotubes as Optical Probes for Bio-Sensing and Imaging. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5* (32), 6511–6522. <https://doi.org/10.1039/C7TB00748E>.
- [161] Lovat, V.; Pantarotto, D.; Lagostena, L.; Cacciari, B.; Grandolfo, M.; Righi, M.; Spalluto, G.; Prato, M.; Ballerini, L. Carbon Nanotube Substrates Boost Neuronal Electrical Signaling. *Nano Lett.* **2005**, *5* (6), 1107–1110. <https://doi.org/10.1021/nl050637m>.
- [162] Mazzatenta, A.; Giugliano, M.; Campidelli, S.; Gambazzi, L.; Businaro, L.; Markram, H.; Prato, M.; Ballerini, L. Interfacing Neurons with Carbon Nanotubes: Electrical Signal Transfer and Synaptic Stimulation in Cultured Brain Circuits. *J. Neurosci.* **2007**, *27* (26), 6931–6936. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1051-07.2007>.
- [163] Matta-Domjan, B.; King, A.; Totti, S.; Matta, C.; Dover, G.; Martinez, P.; Zakhidov, A.; La Ragione, R.; Macedo, H.; Jurewicz, I.; et al. Biophysical Interactions between Pancreatic Cancer Cells and Pristine Carbon Nanotube Substrates: Potential Application for Pancreatic Cancer Tissue Engineering: PANCREATIC CANCER ON PRISTINE CNT SUBSTRATES. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2018**, *106* (5), 1637–1644. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34012>.
- [164] Bédrier, 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* **2012**, *28* (50), 17363–17371. <https://doi.org/10.1021/la304278n>.
- [165] Correa-Duarte, M. A.; Wagner, N.; Rojas-Chapana, J.; Morscheck, C.; Thie, M.; Giersig, M. Fabrication and Biocompatibility of Carbon Nanotube-Based 3D Networks as Scaffolds for Cell Seeding and Growth. *Nano Lett.* **2004**, *4* (11), 2233–2236. <https://doi.org/10.1021/nl048574f>.
- [166] Abarrategi, A.; Gutiérrez, M. C.; Moreno-Vicente, C.; Hortigüela, M. J.; Ramos, V.; López-Lacomba, J. L.; Ferrer, M. L.; del Monte, F. Multiwall Carbon Nanotube Scaffolds for Tissue Engineering Purposes. *Biomaterials* **2008**, *29* (1), 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.09.021>.
- [167] Jun Han, Z.; Rider, A. E.; Ishaq, M.; Kumar, S.; Kondyurin, A.; Bilek, M. M. M.; Levchenko, I.; Ostrikov, K. (Ken). Carbon Nanostructures for Hard Tissue Engineering. *RSC Adv.* **2013**, *3* (28), 11058. <https://doi.org/10.1039/c2ra23306a>.
- [168] Shi Kam, N. W.; Jessop, T. C.; Wender, P. A.; Dai, H. Nanotube Molecular Transporters: Internalization of Carbon Nanotube–Protein Conjugates into Mammalian Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (22), 6850–6851. <https://doi.org/10.1021/ja0486059>.
- [169] Kostarelos, K.; Lacerda, L.; Pastorin, G.; Wu, W.; Wieckowski, S.; Luangsivilay, J.; Godefroy, S.; Pantarotto, D.; Briand, J.-P.; Muller, S.; et al. Cellular Uptake of Functionalized Carbon Nanotubes Is Independent of Functional Group and Cell Type. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2* (2), 108–113. <https://doi.org/10.1038/nnano.2006.209>.
- [170] Kong, F.; Liu, F.; Li, W.; Guo, X.; Wang, Z.; Zhang, H.; Li, Q.; Luo, L.; Du, Y.; Jin, Y.; et al. Smart Carbon Nanotubes with Laser-Controlled Behavior in Gene Delivery and Therapy through a Non-Digestive Trafficking Pathway. *Small* **2016**, *12* (48), 6753–6766. <https://doi.org/10.1002/smll.201601092>.
- [171] Liu, Z.; Sun, X.; Nakayama-Ratchford, N.; Dai, H. Supramolecular Chemistry on Water-Soluble Carbon Nanotubes for Drug Loading and Delivery. *ACS Nano* **2007**, *1* (1), 50–56. <https://doi.org/10.1021/nn700040t>.
- [172] Liu, Z.; Fan, A. C.; Rakhra, K.; Sherlock, S.; Goodwin, A.; Chen, X.; Yang, Q.; Felsher, D. W.; Dai, H. Supramolecular Stacking of Doxorubicin on Carbon Nanotubes for In Vivo

- Cancer Therapy. *Angew. Chem.* **2009**, 121 (41), 7804–7808. <https://doi.org/10.1002/ange.200902612>.
- [173] Bartholomeusz, G.; Cherukuri, P.; Kingston, J.; Cognet, L.; Jr, R. L.; Leeuw, T. K.; Gumbiner-Russo, L.; Weisman, R. B.; Powis, G. In Vivo Therapeutic Silencing of Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha (HIF-1 ) Using Single-Walled Carbon Nanotubes Noncovalently Coated with siRNA. *Nano Res* **2009**, 13.
- [174] Ladeira, M. S.; Andrade, V. A.; Gomes, E. R. M.; Aguiar, C. J.; Moraes, E. R.; Soares, J. S.; Silva, E. E.; Lacerda, R. G.; Ladeira, L. O.; Jorio, A.; et al. Highly Efficient siRNA Delivery System into Human and Murine Cells Using Single-Wall Carbon Nanotubes. *Nanotechnology* **2010**, 21 (38), 385101. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/21/38/385101>.
- [175] Sanz, V.; Tilmaciu, C.; Soula, B.; Flahaut, E.; Coley, H. M.; Silva, S. R. P.; McFadden, J. Chloroquine-Enhanced Gene Delivery Mediated by Carbon Nanotubes. *Carbon* **2011**, 49 (15), 5348–5358. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2011.08.001>.
- [176] Kaboudin, B.; Saghatchi, F.; Kazemi, F.; Akbari-Birgani, S. A Novel Magnetic Carbon Nanotubes Functionalized with Pyridine Groups: Synthesis, Characterization and Their Application as an Efficient Carrier for Plasmid DNA and Aptamer. *ChemistrySelect* **2018**, 3 (24), 6743–6749. <https://doi.org/10.1002/slct.201800708>.
- [177] Burke, A.; Ding, X.; Singh, R.; Kraft, R. A.; Levi-Polyachenko, N.; Rylander, M. N.; Szot, C.; Buchanan, C.; Whitney, J.; Fisher, J.; et al. Long-Term Survival Following a Single Treatment of Kidney Tumors with Multiwalled Carbon Nanotubes and near-Infrared Radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, 106 (31), 12897–12902. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905195106>.
- [178] Wang, C.; Xu, L.; Liang, C.; Xiang, J.; Peng, R.; Liu, Z. Immunological Responses Triggered by Photothermal Therapy with Carbon Nanotubes in Combination with Anti-CTLA-4 Therapy to Inhibit Cancer Metastasis. *Adv. Mater.* **2014**, 26 (48), 8154–8162. <https://doi.org/10.1002/adma.201402996>.
- [179] Flahaut, E.; Evariste, L.; Gauthier, L.; Larue, C.; Line, C.; Meunier, É.; Mouchet, F. Toxicité des nanotubes de carbone envers l’homme et l’environnement. *Tech. Ing.* **2018**, 22. <https://doi.org/NM8155 V1>.
- [180] Madani, S. Y.; Mandel, A.; Seifalian, A. M. A Concise Review of Carbon Nanotube’s Toxicology. *Nano Rev.* **2013**, 4 (1), 21521. <https://doi.org/10.3402/nano.v4i0.21521>.
- [181] Cui, H.-F.; Vashist, S. K.; Al-Rubeaan, K.; Luong, J. H. T.; Sheu, F.-S. Interfacing Carbon Nanotubes with Living Mammalian Cells and Cytotoxicity Issues. *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, 23 (7), 1131–1147. <https://doi.org/10.1021/tx100050h>.
- [182] Ali-Boucetta, H.; Kostarelos, K. Pharmacology of Carbon Nanotubes: Toxicokinetics, Excretion and Tissue Accumulation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, 65 (15), 2111–2119. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.10.004>.
- [183] Yang, M.; Zhang, M. Biodegradation of Carbon Nanotubes by Macrophages. *Front. Mater.* **2019**, 6, 225. <https://doi.org/10.3389/fmats.2019.00225>.
- [184] Georgin, D.; Czarny, B.; Botquin, M.; Mayne-L’Hermite, M.; Pinault, M.; Bouchet-Fabre, B.; Carriere, M.; Poncy, J.-L.; Chau, Q.; Maximilien, R.; et al. Preparation of <sup>14</sup>C-Labeled Multiwalled Carbon Nanotubes for Biodistribution Investigations. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131 (41), 14658–14659. <https://doi.org/10.1021/ja906319z>.
- [185] Wang, J. T.-W.; Fabbro, C.; Venturelli, E.; Ménard-Moyon, C.; Chaloin, O.; Da Ros, T.; Methven, L.; Nunes, A.; Sosabowski, J. K.; Mather, S. J.; et al. The Relationship between the Diameter of Chemically-Functionalized Multi-Walled Carbon Nanotubes and Their

- Organ Biodistribution Profiles in Vivo. *Biomaterials* **2014**, 35, 9517–9528. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.07.054>.
- [186] Czarny, B.; Georgan, D.; Berthon, F.; Plastow, G.; Pinault, M.; Patriarche, G.; Thuleau, A.; L'Hermite, M. M.; Taran, F.; Dive, V. Carbon Nanotube Translocation to Distant Organs after Pulmonary Exposure: Insights from in Situ <sup>14</sup>C-Radiolabeling and Tissue Radioimaging. *ACS Nano* **2014**, 8 (6), 5715–5724. <https://doi.org/10.1021/nn500475u>.
- [187] Murphy, F. A.; Poland, C. A.; Duffin, R.; Al-Jamal, K. T.; Ali-Boucetta, H.; Nunes, A.; Byrne, F.; Prina-Mello, A.; Volkov, Y.; Li, S.; et al. Length-Dependent Retention of Carbon Nanotubes in the Pleural Space of Mice Initiates Sustained Inflammation and Progressive Fibrosis on the Parietal Pleura. *Am. J. Pathol.* **2011**, 178 (6), 2587–2600. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.02.040>.
- [188] Cheng, J.; Cheng, S. H. Influence of Carbon Nanotube Length on Toxicity to Zebrafish Embryos. *Int. J. Nanomedicine* **2012**, 3731. <https://doi.org/10.2147/IJN.S30459>.
- [189] Alshehri, R.; Ilyas, A. M.; Hasan, A.; Arnaout, A.; Ahmed, F.; Memic, A. Carbon Nanotubes in Biomedical Applications: Factors, Mechanisms, and Remedies of Toxicity: Miniperspective. *J. Med. Chem.* **2016**, 59 (18), 8149–8167. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01770>.
- [190] Meunier, É.; Coste, A.; Olagnier, D.; Auhtier, H.; Lefèvre, L.; Dardenne, C.; Bernad, J.; Béraud, M.; Flahaut, E.; Pipy, B. Double-Walled Carbon Nanotubes Trigger IL-1 $\beta$  Release in Human Monocytes through Nlrp3 Inflammasome Activation. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2012**, 8 (6), 987–995. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.11.004>.
- [191] Kostarelos, K. The Long and Short of Carbon Nanotube Toxicity. *Nat. Biotechnol.* **2008**, 26 (7), 774–776. <https://doi.org/10.1038/nbt0708-774>.
- [192] Guo, Y.; Wu, K.; Huo, X.; Xu, X. INTERNATIONAL PERSPECTIVES: Sources, Distribution, and Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *J. Environ. Health* **2011**, 73 (9), 5.
- [193] Allen, B. L.; Kotchey, G. P.; Chen, Y.; Yanamala, N. V. K.; Klein-Seetharaman, J.; Kagan, V. E.; Star, A. Mechanistic Investigations of Horseradish Peroxidase-Catalyzed Degradation of Single-Walled Carbon Nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131 (47), 17194–17205. <https://doi.org/10.1021/ja9083623>.
- [194] Kagan, V. E.; Konduru, N. V.; Feng, W.; Allen, B. L.; Conroy, J.; Volkov, Y.; Vlasova, I. I.; Belikova, N. A.; Yanamala, N.; Kapralov, A.; et al. Carbon Nanotubes Degraded by Neutrophil Myeloperoxidase Induce Less Pulmonary Inflammation. *Nat. Nanotechnol.* **2010**, 5 (5), 354–359. <https://doi.org/10.1038/nnano.2010.44>.
- [195] Mottier, A.; Mouchet, F.; Laplanche, C.; Cadarsi, S.; Lagier, L.; Arnault, J.-C.; Girard, H.; Leon, V.; Vazquez, E.; Sarrieu, C.; et al. Surface Area of Carbon Nanoparticles: A Dose Metric for a More Realistic Ecotoxicological Assessment. *Nano Lett.* **2016**, 16 (6), 3514–3518. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.6b00348>.
- [196] Bellingeri, R.; Alustiza, F.; Picco, N.; Acevedo, D.; Molina, M. A.; Rivero, R.; Grosso, C.; Motta, C.; Barbero, C.; Vivas, A. In Vitro Toxicity Evaluation of Hydrogel-Carbon Nanotubes Composites on Intestinal Cells. *J. Appl. Polym. Sci.* **2015**, 132 (5), n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/app.41370>.
- [197] H. Gulrez, S. K.; Al-Assaf, S.; O, G. Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications. In *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications*; Carpi, A., Ed.; InTech, 2011. <https://doi.org/10.5772/24553>.

- [198] Hoffman, A. S. Hydrogels for Biomedical Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, 64, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.010>.
- [199] Biomedical Applications of Hydrogels Handbook; Ottenbrite, R. M., Park, K., Okano, T., Eds.; Springer New York: New York, NY, 2010. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5919-5>.
- [200] Lin, C.-C.; Metters, A. T. Hydrogels in Controlled Release Formulations: Network Design and Mathematical Modeling. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, 58 (12–13), 1379–1408. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.004>.
- [201] Kalia, S. *Polymeric Hydrogels as Smart Biomaterials*; 2016.
- [202] 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.* **2013**, 77 (6), 1920–1929. <https://doi.org/10.2136/sssaj2013.01.0089>.
- [203] Barrau, S.; Demont, P.; Peigney, A.; Laurent, C.; Lacabanne, C. DC and AC Conductivity of Carbon Nanotubes–Polyepoxy Composites. *Macromolecules* **2003**, 36 (14), 5187–5194. <https://doi.org/10.1021/ma021263b>.
- [204] 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 Appl. Sci. Manuf.* **2010**, 41 (10), 1345–1367. <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2010.07.003>.
- [205] Spizzirri, U.; Curcio, M.; Cirillo, G.; Spataro, T.; Vittorio, O.; Picci, N.; Hampel, S.; Iemma, F.; Nicoletta, F. Recent Advances in the Synthesis and Biomedical Applications of Nanocomposite Hydrogels. *Pharmaceutics* **2015**, 7 (4), 413–437. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics7040413>.
- [206] Bourdiol, F.; Mouchet, F.; Perrault, A.; Fourquaux, I.; Datas, L.; Gancet, C.; Boutonnet, J.-C.; Pinelli, E.; Gauthier, L.; 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* **2013**, 54, 175–191. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2012.11.024>.
- [207] Bauhofer, W.; Kovacs, J. Z. A Review and Analysis of Electrical Percolation in Carbon Nanotube Polymer Composites. *Compos. Sci. Technol.* **2009**, 69 (10), 1486–1498. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2008.06.018>.
- [208] Spitalsky, Z.; Tasis, D.; Papagelis, K.; Galiotis, C. Carbon Nanotube–Polymer Composites: Chemistry, Processing, Mechanical and Electrical Properties. *Prog. Polym. Sci.* **2010**, 35 (3), 357–401. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2009.09.003>.
- [209] Andrews, R.; Weisenberger, M. C. Carbon Nanotube Polymer Composites. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2004**, 8 (1), 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.cossms.2003.10.006>.
- [210] Du, F.; Fischer, J. E.; Winey, K. I. Coagulation Method for Preparing Single-Walled Carbon Nanotube/Poly(Methyl Methacrylate) Composites and Their Modulus, Electrical Conductivity, and Thermal Stability. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **2003**, 41 (24), 3333–3338. <https://doi.org/10.1002/polb.10701>.
- [211] Shin, S. R.; Bae, H.; Cha, J. M.; Mun, J. Y.; Chen, Y.-C.; Tekin, H.; Shin, H.; Farshchi, S.; Dokmeci, M. R.; Tang, S.; et al. Carbon Nanotube Reinforced Hybrid Microgels as Scaffold Materials for Cell Encapsulation. *ACS Nano* **2012**, 6 (1), 362–372. <https://doi.org/10.1021/nn203711s>.

- [212] Ahadian, S.; Ramón-Azcón, J.; Estili, M.; Liang, X.; Ostrovidov, S.; Shiku, H.; Ramalingam, M.; Nakajima, K.; Sakka, Y.; Bae, H.; et al. Hybrid Hydrogels Containing Vertically Aligned Carbon Nanotubes with Anisotropic Electrical Conductivity for Muscle Myofiber Fabrication. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 4271. <https://doi.org/10.1038/srep04271>.
- [213] Ahadian, S.; Yamada, S.; Ramón-Azcón, J.; Estili, M.; Liang, X.; Nakajima, K.; Shiku, H.; Khademhosseini, A.; Matsue, T. Hybrid Hydrogel-Aligned Carbon Nanotube Scaffolds to Enhance Cardiac Differentiation of Embryoid Bodies. *Acta Biomater.* **2016**, *31*, 134–143. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.11.047>.
- [214] Ramón-Azcón, J.; Ahadian, S.; Estili, M.; Liang, X.; Ostrovidov, S.; Kaji, H.; Shiku, H.; Ramalingam, M.; Nakajima, K.; Sakka, Y.; et al. Dielectrophoretically Aligned Carbon Nanotubes to Control Electrical and Mechanical Properties of Hydrogels to Fabricate Contractile Muscle Myofibers. *Adv. Mater.* **2013**, *25* (29), 4028–4034. <https://doi.org/10.1002/adma.201301300>.
- [215] Tong, X.; Zheng, J.; Lu, Y.; Zhang, Z.; Cheng, H. Swelling and Mechanical Behaviors of Carbon Nanotube/Poly(Vinyl Alcohol) Hybrid Hydrogels. *Mater. Lett.* **2007**, *61* (8–9), 1704–1706. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2006.07.115>.
- [216] Adewunmi, A. A.; Ismail, S.; Sultan, A. S. Carbon Nanotubes (CNTs) Nanocomposite Hydrogels Developed for Various Applications: A Critical Review. *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* **2016**, *26* (4), 717–737. <https://doi.org/10.1007/s10904-016-0379-6>.
- [217] Drury, J. L.; Mooney, D. J. Hydrogels for Tissue Engineering: Scaffold Design Variables and Applications. *Biomaterials* **2003**, *24* (24), 4337–4351. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00340-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00340-5).
- [218] Bhattarai, N.; Gunn, J.; Zhang, M. Chitosan-Based Hydrogels for Controlled, Localized Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62* (1), 83–99. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.07.019>.
- [219] Qiu, Y.; Park, K. Environment-Sensitive Hydrogels for Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.024>.
- [220] Peppas, N.; Bures, P.; Leobandung, W.; Ichikawa, H. Hydrogels in Pharmaceutical Formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *50* (1), 27–46. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(00\)00090-4](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(00)00090-4).
- [221] Cirillo, G.; Hampel, S.; Spizzirri, U. G.; Parisi, O. I.; Picci, N.; Iemma, F. Carbon Nanotubes Hybrid Hydrogels in Drug Delivery: A Perspective Review. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2014/825017>.
- [222] Kim, Y.-H.; Park, S.; Won, K.; Kim, H. J.; Lee, S. H. Bacterial Cellulose-Carbon Nanotube Composite as a Biocompatible Electrode for the Direct Electron Transfer of Glucose Oxidase: Biocompatible Electrode for Direct Electron Transfer of Glucose Oxidase. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2013**, *88* (6), 1067–1070. <https://doi.org/10.1002/jctb.3939>.
- [223] Comba, F. N.; Romero, M. R.; Garay, F. S.; Baruzzi, A. M. Mucin and Carbon Nanotube-Based Biosensor for Detection of Glucose in Human Plasma. *Anal. Biochem.* **2018**, *550*, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.04.006>.
- [224] Fatoni, A.; Numnuam, A.; Kanatharana, P.; Limbut, W.; Thammakhet, C.; Thavarungkul, P. A Highly Stable Oxygen-Independent Glucose Biosensor Based on a Chitosan-Albumin Cryogel Incorporated with Carbon Nanotubes and Ferrocene. *Sens. Actuators B Chem.* **2013**, *185*, 725–734. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.05.056>.

- [225] Barone, P. W.; Yoon, H.; Ortiz-García, R.; Zhang, J.; Ahn, J.-H.; Kim, J.-H.; Strano, M. S. Modulation of Single-Walled Carbon Nanotube Photoluminescence by Hydrogel Swelling. *ACS Nano* **2009**, 3 (12), 3869–3877. <https://doi.org/10.1021/nn901025x>.
- [226] Hosseini, H.; Kokabi, M.; Mousavi, S. M. Conductive Bacterial Cellulose/Multiwall Carbon Nanotubes Nanocomposite Aerogel as a Potentially Flexible Lightweight Strain Sensor. *Carbohydr. Polym.* **2018**, 201, 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.08.054>.
- [227] Han, Q.; Wang, A.; Song, W.; Zhang, M.; Wang, S.; Ren, P.; Hao, L.; Yin, J.; Bai, S. Fabrication of Conductive, Adhesive, and Stretchable Agarose-Based Hydrogels for a Wearable Biosensor. *ACS Appl. Bio Mater.* **2021**, 4 (8), 6148–6156. <https://doi.org/10.1021/acsabm.1c00501>.
- [228] Yu, H.; Zhao, H.; Huang, C.; Du, Y. Mechanically and Electrically Enhanced CNT–Collagen Hydrogels As Potential Scaffolds for Engineered Cardiac Constructs. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2017**, 3 (11), 3017–3021. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00620>.
- [229] Yildirim, E. D.; Yin, X.; Nair, K.; Sun, W. Fabrication, Characterization, and Biocompatibility of Single-Walled Carbon Nanotube-Reinforced Alginate Composite Scaffolds Manufactured Using Freeform Fabrication Technique. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2008**, 87B (2), 406–414. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31118>.
- [230] Pok, S.; Vitale, F.; Eichmann, S. L.; Benavides, O. M.; Pasquali, M.; Jacot, J. G. Biocompatible Carbon Nanotube–Chitosan Scaffold Matching the Electrical Conductivity of the Heart. *ACS Nano* **2014**, 8 (10), 9822–9832. <https://doi.org/10.1021/nn503693h>.
- [231] Zhang, L. G.; Im, O.; Li, J.; Keidar, M. Biomimetic Three-Dimensional Nanocrystalline Hydroxyapatite and Magnetically Synthesized Single-Walled Carbon Nanotube Chitosan Nanocomposite for Bone Regeneration. *Int. J. Nanomedicine* **2012**, 2087. <https://doi.org/10.2147/IJN.S29743>.
- [232] Cancian, G.; Tozzi, G.; Hussain, A. A. B.; De Mori, A.; Roldo, M. Carbon Nanotubes Play an Important Role in the Spatial Arrangement of Calcium Deposits in Hydrogels for Bone Regeneration. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2016**, 27 (8). <https://doi.org/10.1007/s10856-016-5740-3>.
- [233] Liu, X.; Kim, J. C.; Miller, A. L.; Waletzki, B. E.; Lu, L. Electrically Conductive Nanocomposite Hydrogels Embedded with Functionalized Carbon Nanotubes for Spinal Cord Injury. *New J. Chem.* **2018**. <https://doi.org/10.1039/C8NJ03038C>.
- [234] Sheikholeslam, M.; Wheeler, S. D.; Duke, K. G.; Marsden, M.; Pritzker, M.; Chen, P. Peptide and Peptide–Carbon Nanotube Hydrogels as Scaffolds for Tissue & 3D Tumor Engineering. *Acta Biomater.* **2018**, 69, 107–119. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.12.012>.
- [235] Bordoni, M.; Karabulut, E.; Kuzmenko, V.; Fantini, V.; Pansarasa, O.; Cereda, C.; Gatenholm, P. 3D Printed Conductive Nanocellulose Scaffolds for the Differentiation of Human Neuroblastoma Cells. *Cells* **2020**, 9 (3), 682. <https://doi.org/10.3390/cells9030682>.
- [236] Puoci, F.; Hampel, S.; Parisi, O. I.; Hassan, A.; Cirillo, G.; Picci, N. Imprinted Microspheres Doped with Carbon Nanotubes as Novel Electroresponsive Drug-Delivery Systems. *J. Appl. Polym. Sci.* **2013**, 130 (2), 829–834. <https://doi.org/10.1002/app.39212>.
- [237] Choi, E. J.; Shin, J.; Khaleel, Z. H.; Cha, I.; Yun, S.-H.; Cho, S.-W.; Song, C. Synthesis of Electroconductive Hydrogel Films by an Electro-Controlled Click Reaction and Their

- Application to Drug Delivery Systems. *Polym. Chem.* **2015**, 6 (24), 4473–4478. <https://doi.org/10.1039/C5PY00545K>.
- [238] Shi, X.; Zheng, Y.; Wang, C.; Yue, L.; Qiao, K.; Wang, G.; Wang, L.; Quan, H. Dual Stimulus Responsive Drug Release under the Interaction of PH Value and Pulsatile Electric Field for a Bacterial Cellulose/Sodium Alginate/Multi-Walled Carbon Nanotube Hybrid Hydrogel. *RSC Adv.* **2015**, 5 (52), 41820–41829. <https://doi.org/10.1039/C5RA04897D>.
- [239] Spizzirri, U. G.; Hampel, S.; Cirillo, G.; Nicoletta, F. P.; Hassan, A.; Vittorio, O.; Picci, N.; Iemma, F. Spherical Gelatin/CNTs Hybrid Microgels as Electro-Responsive Drug Delivery Systems. *Int. J. Pharm.* **2013**, 448 (1), 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.03.013>.
- [240] Curcio, M.; Spizzirri, U. G.; Cirillo, G.; Vittorio, O.; Picci, N.; Nicoletta, F. P.; Iemma, F.; Hampel, S. On Demand Delivery of Ionic Drugs from Electro-Responsive CNT Hybrid Films. *RSC Adv.* **2015**, 5 (56), 44902–44911. <https://doi.org/10.1039/C5RA05484B>.
- [241] Servant, A.; Methven, L.; Williams, R. P.; Kostarelos, K. Electroresponsive Polymer-Carbon Nanotube Hydrogel Hybrids for Pulsatile Drug Delivery In Vivo. *Adv. Healthc. Mater.* **2013**, 2 (6), 806–811. <https://doi.org/10.1002/adhm.201200193>.
- [242] Servant, A.; Bussy, C.; Al-Jamal, K.; Kostarelos, K. Design, Engineering and Structural Integrity of Electro-Responsive Carbon Nanotube- Based Hydrogels for Pulsatile Drug Release. *J. Mater. Chem. B* **2013**, 1 (36), 4593. <https://doi.org/10.1039/c3tb20614a>.
- [243] Im, J. S.; Bai, B. Ch.; Lee, Y.-S. The Effect of Carbon Nanotubes on Drug Delivery in an Electro-Sensitive Transdermal Drug Delivery System. *Biomaterials* **2010**, 31 (6), 1414–1419. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.004>.
- [244] Yun, J.; Im, J. S.; Lee, Y.-S.; Kim, H.-I. Electro-Responsive Transdermal Drug Delivery Behavior of PVA/PAA/MWCNT Nanofibers. *Eur. Polym. J.* **2011**, 47 (10), 1893–1902. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2011.07.024>.
- [245] Bhunia, T.; Giri, A.; Nasim, T.; Chattopadhyay, D.; Bandyopadhyay, A. A Transdermal Diltiazem Hydrochloride Delivery Device Using Multi-Walled Carbon Nanotube/Poly(Vinyl Alcohol) Composites. *Carbon* **2013**, 52, 305–315. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2012.09.032>.
- [246] Giri, A.; Bhunia, T.; Mishra, S. R.; Goswami, L.; Panda, A. B.; Bandyopadhyay, A. A Transdermal Device from 2-Hydroxyethyl Methacrylate Grafted Carboxymethyl Guar Gum–Multi-Walled Carbon Nanotube Composites. *RSC Adv.* **2014**, 4 (26), 13546. <https://doi.org/10.1039/c3ra47511e>.
- [247] Kuche, K.; Maheshwari, R.; Tambe, V.; Mak, K.-K.; Jogi, H.; Raval, N.; Pichika, M. R.; Kumar Tekade, R. Carbon Nanotubes (CNTs) Based Advanced Dermal Therapeutics: Current Trends and Future Potential. *Nanoscale* **2018**, 10 (19), 8911–8937. <https://doi.org/10.1039/C8NR01383G>.
- [248] Renn, D. W. Agar and Agarose: Indispensable Partners in Biotechnology. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* **1984**, 23 (1), 17–21. <https://doi.org/10.1021/i300013a004>.
- [249] Mao, B. Dynamics of Agar-Based Gels in Contact with Solid Surfaces: Gelation, Adhesion, Drying and Formulation, Université de Bordeaux, 2017.
- [250] Agarose. In *Thermoreversible Networks*; Abe, A., Cantow, H.-J., Corradini, P., Dušek, K., Edwards, S., Fujita, H., Glöckner, G., Höckner, H., Hörhold, H.-H., Kausch, H.-H., et al., Series Eds.; *Advances in Polymer Science*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1997; Vol. 130, pp 194–202. <https://doi.org/10.1007/BFb0008710>.
- [251] Tako, M.; Nakamura, S. Gelation Mechanism of Agarose. *Carbohydr. Res.* **1988**, 180 (2), 277–284. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(88\)80084-3](https://doi.org/10.1016/0008-6215(88)80084-3).

- [252] Arnott, S.; Fulmer, A.; Scott, W. E. The Agarose Double Helix and Its Function in Agarose Gel Structure. *J. Mol. Biol.* **1974**, *90* (2), 269–272. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(74\)90372-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(74)90372-6).
- [253] Marques, M. R. C.; Loebenberg, R.; Almukainzi, M. Simulated Biological Fluids with Possible Application in Dissolution Testing. *Dissolution Technol.* **2011**, *18* (3), 15–28. <https://doi.org/10.14227/DT180311P15>.
- [254] Klonis, N.; Sawyer, W. H. Spectral Properties of the Prototropic Forms of Fluorescein in Aqueous Solution. *J. Fluoresc.* **1996**, *6* (3), 147–157. <https://doi.org/10.1007/BF00732054>.
- [255] Korsmeyer, R. W.; Gurny, R.; Doelker, E.; Buri, P.; Peppas, N. A. Mechanisms of Solute Release from Porous Hydrophilic Polymers. *Int. J. Pharm.* **1983**, *15* (1), 25–35. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(83\)90064-9](https://doi.org/10.1016/0378-5173(83)90064-9).
- [256] Dash, S.; Murthy, P. N.; Nath, L.; Chowdhury, P. KINETIC MODELING ON DRUG RELEASE FROM CONTROLLED DRUG DELIVERY SYSTEMS. *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.* **2010**, *67* (3), 217–223.
- [257] Siepmann, J.; Peppas, N. A. Higuchi Equation: Derivation, Applications, Use and Misuse. *Int. J. Pharm.* **2011**, *418* (1), 6–12. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.03.051>.
- [258] Ritger, P. L.; Peppas, N. A. A Simple Equation for Description of Solute Release I. Fickian and Non-Fickian Release from Non-Swellable Devices in the Form of Slabs, Spheres, Cylinders or Discs. *J. Controlled Release* **1987**, *5* (1), 23–36. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(87\)90034-4](https://doi.org/10.1016/0168-3659(87)90034-4).
- [259] Ritger, P. L.; Peppas, N. A. A Simple Equation for Description of Solute Release II. Fickian and Anomalous Release from Swellable Devices. *J. Controlled Release* **1987**, *5* (1), 37–42. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(87\)90035-6](https://doi.org/10.1016/0168-3659(87)90035-6).
- [260] Halary, J. L.; Lauprêtre, F.; Monnerie, L. *Mécanique des matériaux polymères*, Belin.; Échelles; 2008.
- [261] Pedron-Mazoyer, S.; Plouët, J.; Hellaudais, L.; Teissie, J.; Golzio, M. New Anti Angiogenesis Developments through Electro-Immune: Optimization by in Vivo Optical Imaging of Intradermal Electrogen Transfer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **2007**, *1770* (1), 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.09.014>.
- [262] Leclerc, E. A.; Huchencq, A.; Kezic, S.; Serre, G.; Jonca, N. Mice Deficient for the Epidermal Dermokine and Isoforms Display Transient Cornification Defects. *J. Cell Sci.* **2014**, *127* (13), 2862–2872. <https://doi.org/10.1242/jcs.144808>.
- [263] Wörle-Knirsch, J. M.; Pulskamp, K.; Krug, H. F. Oops They Did It Again! Carbon Nanotubes Hoax Scientists in Viability Assays. *Nano Lett.* **2006**, *6* (6), 1261–1268. <https://doi.org/10.1021/nl060177c>.
- [264] Riou, I.; Bertoncini, P.; Bizot, H.; Mevellec, J. Y.; Buléon, A.; Chauvet, O. Carboxymethylcellulose/Single Walled Carbon Nanotube Complexes. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2009**, *9* (10), 6176–6180. <https://doi.org/10.1166/jnn.2009.1573>.
- [265] Flahaut, E.; Agnoli, F.; Sloan, J.; O'Connor, C.; Green, M. L. H. CCVD Synthesis and Characterization of Cobalt-Encapsulated Nanoparticles. *Chem. Mater.* **2002**, *14* (6), 2553–2558. <https://doi.org/10.1021/cm011287h>.
- [266] Desforges, A.; Bridi, A. V.; Kadok, J.; Flahaut, E.; Le Normand, F.; Gleize, J.; Bellouard, C.; Ghanbaja, J.; Vigolo, B. Dramatic Enhancement of Double-Walled Carbon Nanotube Quality through a One-Pot Tunable Purification Method. *Carbon* **2016**, *110*, 292–303. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2016.09.033>.

- [267] Bortolamiol, T.; Lukanov, P.; Galibert, A.-M.; Soula, B.; Lonchambon, P.; Datas, L.; Flahaut, E. Double-Walled Carbon Nanotubes: Quantitative Purification Assessment, Balance between Purification and Degradation and Solution Filling as an Evidence of Opening. *Carbon* **2014**, *78*, 79–90. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2014.06.051>.
- [268] Bertula, K.; Martikainen, L.; Munne, P.; Hietala, S.; Klefström, J.; Ikkala, O.; Nonappa. Strain-Stiffening of Agarose Gels. *ACS Macro Lett.* **2019**, *8* (6), 670–675. <https://doi.org/10.1021/acsmacrolett.9b00258>.
- [269] Rahbani, J.; Behzad, A. R.; Khashab, N. M.; Al-Ghoul, M. Characterization of Internal Structure of Hydrated Agar and Gelatin Matrices by Cryo-SEM: General. *ELECTROPHORESIS* **2013**, *34* (3), 405–408. <https://doi.org/10.1002/elps.201200434>.
- [270] Sivashankari, P. R.; Prabakaran, M. Three-Dimensional Porous Scaffolds Based on Agarose/Chitosan/Graphene Oxide Composite for Tissue Engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *146*, 222–231. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.219>.
- [271] Conzatti, G.; Faucon, D.; Castel, M.; Ayadi, F.; Cavalie, S.; Tourrette, A. Alginate/Chitosan Polyelectrolyte Complexes: A Comparative Study of the Influence of the Drying Step on Physicochemical Properties. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *172*, 142–151. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.05.023>.
- [272] Chui, M.; Ronald J., P.; Michael J., M. Measurement of the Porous Microstructure of Hydrogels by Nuclear Magnetic Resonance. *J. Colloid Interface Sci.* **1995**, *174* (2), 336–344. <https://doi.org/10.1006/jcis.1995.1399>.
- [273] Narayanan, J.; Xiong, J.-Y.; Liu, X.-Y. Determination of Agarose Gel Pore Size: Absorbance Measurements Vis a Vis Other Techniques. *J. Phys. Conf. Ser.* **2006**, *28*, 83–86. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/28/1/017>.
- [274] Pernodet, N.; Maaloum, M.; Tinland, B. Pore Size of Agarose Gels by Atomic Force Microscopy. *Electrophoresis* **1997**, *18* (1), 55–58. <https://doi.org/10.1002/elps.1150180111>.
- [275] Bertasa, M.; Poli, T.; Riedo, C.; Di Tullio, V.; Capitani, D.; Proietti, N.; Canevali, C.; Sansonetti, A.; Scalarone, D. A Study of Non-Bounded/Bounded Water and Water Mobility in Different Agar Gels. *Microchem. J.* **2018**, *139*, 306–314. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.03.016>.
- [276] Awadhiya, A.; Tyeb, S.; Rathore, K.; Verma, V. Agarose Bioplastic-Based Drug Delivery System for Surgical and Wound Dressings. *Eng. Life Sci.* **2017**, *17* (2), 204–214. <https://doi.org/10.1002/elsc.201500116>.
- [277] Yuan, Y.; Wang, L.; Mu, R.-J.; Gong, J.; Wang, Y.; Li, Y.; Ma, J.; Pang, J.; Wu, C. Effects of Konjac Glucomannan on the Structure, Properties, and Drug Release Characteristics of Agarose Hydrogels. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *190*, 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.049>.
- [278] Servant, A.; Leon, V.; Jasim, D.; Methven, L.; Limousin, P.; Fernandez-Pacheco, E. V.; Prato, M.; Kostarelos, K. Graphene-Based Electroresponsive Scaffolds as Polymeric Implants for On-Demand Drug Delivery. *Adv. Healthc. Mater.* **2014**, *3* (8), 1334–1343. <https://doi.org/10.1002/adhm.201400016>.
- [279] Peppas, N. A.; Sahlin, J. J. A Simple Equation for the Description of Solute Release. III. Coupling of Diffusion and Relaxation. *Int. J. Pharm.* **1989**, *57* (2), 169–172. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90306-2](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90306-2).
- [280] Fernández, E.; López, 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. **2008**, 46 (3), 322–328. <https://doi.org/10.1002/polb.21370>.
- [281] Kingsley, D. M.; McCleery, C. H.; Johnson, C. D. L.; Bramson, M. T. K.; Rende, D.; Gilbert, R. J.; Corr, D. T. Multi-Modal Characterization of Polymeric Gels to Determine the Influence of Testing Method on Observed Elastic Modulus. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2019**, 92, 152–161. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2019.01.003>.
- [282] Mao, B.; Bentaleb, A.; Louerat, F.; Divoux, T.; Snabre, P. Heat-Induced Aging of Agar Solutions: Impact on the Structural and Mechanical Properties of Agar Gels. *Food Hydrocoll.* **2017**, 64, 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.020>.
- [283] Normand, V.; Lootens, D. L.; Amici, E.; Plucknett, K. P.; Aymard, P. New Insight into Agarose Gel Mechanical Properties. *Biomacromolecules* **2000**, 1 (4), 730–738. <https://doi.org/10.1021/bm005583j>.
- [284] Felfel, R. M.; Gideon-Adeniyi, M. J.; Zakir Hossain, K. M.; Roberts, G. A. F.; Grant, D. M. Structural, Mechanical and Swelling Characteristics of 3D Scaffolds from Chitosan-Agarose Blends. *Carbohydr. Polym.* **2019**, 204, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.002>.
- [285] Ramasubramaniam, R.; Chen, J.; Liu, H. Homogeneous Carbon Nanotube/Polymer Composites for Electrical Applications. *Appl. Phys. Lett.* **2003**, 83 (14), 2928–2930. <https://doi.org/10.1063/1.1616976>.
- [286] Bonnet, P.; Sireude, D.; Garnier, B.; Chauvet, O. Thermal Properties and Percolation in Carbon Nanotube-Polymer Composites. *Appl. Phys. Lett.* **2007**, 91 (20), 201910. <https://doi.org/10.1063/1.2813625>.
- [287] Benoit, J.-M.; Corraze, B.; Lefrant, S.; Bernier, P.; Chauvet, O. Electric Transport Properties and Percolation in Carbon Nanotubes / PMMA Composites. *MRS Proc.* **2001**, 706, Z3.28.1. <https://doi.org/10.1557/PROC-706-Z3.28.1>.
- [288] Golzio, M.; Mora, M.-P.; Raynaud, C.; Delteil, C.; Teissié, J.; Rols, M.-P. Control by Osmotic Pressure of Voltage-Induced Permeabilization and Gene Transfer in Mammalian Cells. *Biophys. J.* **1998**, 74 (6), 3015–3022. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)78009-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)78009-9).
- [289] Gareil, Pi.; Peltre, G. Électrophorèse. *Tech. Ingénieur* **1995**, No. P1815 V2.
- [290] Vanbever, R.; Weaver, J. C.; Pr at, V. Skin Electroporation for Transdermal Drug Delivery. In *Electricity and Magnetism in Biology and Medicine*; Bersani, F., Ed.; Springer US: Boston, MA, 1999; pp 907–910.
- [291] Atkins, R. M.; Fawcett, T. J.; Gilbert, R.; Hoff, A. M.; Connolly, R.; Brown, D. W.; Jaroszeski, M. J. Real-Time Impedance Feedback to Enhance Cutaneous Gene Electrotransfer in a Murine Skin Model. *Bioelectrochemistry* **2021**, 142, 107885. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.107885>.
- [292] Pliquett, F.; Pliquett, U. Passive Electrical Properties of Human Stratum Corneum in Vitro Depending on Time after Separation. *Biophys. Chem.* **1996**, 58 (1–2), 205–210. [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(95\)00099-2](https://doi.org/10.1016/0301-4622(95)00099-2).
- [293] Denet, A.-R.; Pr at, V. Transdermal Delivery of Timolol by Electroporation through Human Skin. *J. Controlled Release* **2003**, 88 (2), 253–262. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(03\)00010-5](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(03)00010-5).
- [294] Denet, A.-R.; Ucakar, B.; Pr at, V. Transdermal Delivery of Timolol and Atenolol Using Electroporation and Iontophoresis in Combination: A Mechanistic Approach. *Pharm. Res.* **2003**, 20 (12), 1946–1951. <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000008041.86042.c0>.

- [295] Turjanski, P.; Olaiz, N.; Maglietti, F.; Michinski, S.; Suárez, C.; Molina, F. V.; Marshall, G. The Role of PH Fronts in Reversible Electroporation. *PLoS ONE* **2011**, 6 (4), e17303. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017303>.
- [296] Olaiz, N.; Signori, E.; Maglietti, F.; Soba, A.; Suárez, C.; Turjanski, P.; Michinski, S.; Marshall, G. Tissue Damage Modeling in Gene Electrotransfer: The Role of PH. *Bioelectrochemistry* **2014**, 100, 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2014.05.001>.
- [297] Coppeta, J.; Rogers, C. Dual Emission Laser Induced Fluorescence for Direct Planar Scalar Behavior Measurements. *Exp. Fluids* **1998**, 25 (1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s003480050202>.
- [298] Mauro, T.; Grayson, S.; Gao, W. N.; Man, M.-Q.; Kriehuber, E.; Behne, M.; Feingold, K. R.; Elias, P. M. Barrier Recovery Is Impeded at Neutral PH, Independent of Ionic Effects: Implications for Extracellular Lipid Processing. **8**.
- [299] Pavselj, N.; Miklavcic, D. A Numerical Model of Permeabilized Skin With Local Transport Regions. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **2008**, 55 (7), 1927–1930. <https://doi.org/10.1109/TBME.2008.919730>.
- [300] Mojumdar, E. H.; Helder, R. W. J.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A. Monounsaturated Fatty Acids Reduce the Barrier of Stratum Corneum Lipid Membranes by Enhancing the Formation of a Hexagonal Lateral Packing. **2014**, 10.
- [301] van Smeden, J.; Bouwstra, J. A. Stratum Corneum Lipids: Their Role for the Skin Barrier Function in Healthy Subjects and Atopic Dermatitis Patients. In *Current Problems in Dermatology*; Agner, T., Ed.; S. Karger AG, 2016; Vol. 49, pp 8–26. <https://doi.org/10.1159/000441540>.
- [302] Breznan, D.; Das, D.; MacKinnon-Roy, C.; Simard, B.; Kumarathasan, P.; Vincent, R. Non-Specific Interaction of Carbon Nanotubes with the Resazurin Assay Reagent: Impact on in Vitro Assessment of Nanoparticle Cytotoxicity. *Toxicol. In Vitro* **2015**, 29 (1), 142–147. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.09.009>.
- [303] Ong, K. J.; MacCormack, T. J.; Clark, R. J.; Ede, J. D.; Ortega, V. A.; Felix, L. C.; Dang, M. K. M.; Ma, G.; Fenniri, H.; Veinot, J. G. C.; et al. Widespread Nanoparticle-Assay Interference: Implications for Nanotoxicity Testing. *PLoS ONE* **2014**, 9 (3), e90650. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090650>.

# Annexes



Review

# Overview of Carbon Nanotubes for Biomedical Applications

Juliette Simon <sup>1,2</sup>, Emmanuel Flahaut <sup>1,\*</sup>  and Muriel Golzio <sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> CIRIMAT, Université Toulouse Paul Sabatier, B.t. CIRIMAT, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse CEDEX 9, France; juliette.simon@chimie.ups-tlse.fr

<sup>2</sup> Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, IPBS, Université de Toulouse Paul Sabatier, 205, Route de Narbonne, 31077 Toulouse CEDEX 4, France

\* Correspondence: emmanuel.flahaut@univ-tlse3.fr (E.F.); Muriel.Golzio@ipbs.fr (M.G.); Tel.: +33-561-55-6970 (E.F.); +33-561-17-5813 (M.G.)

Received: 16 January 2019; Accepted: 14 February 2019; Published: 20 February 2019



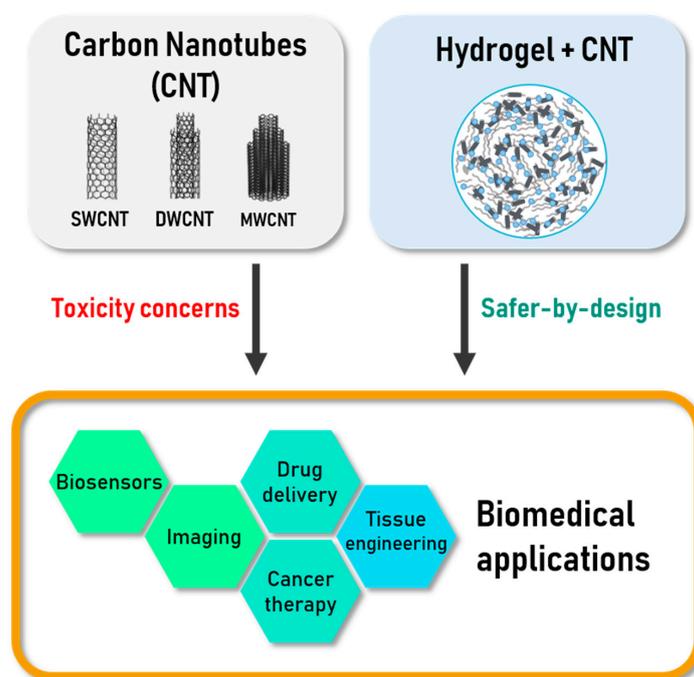
**Abstract:** The unique combination of mechanical, optical and electrical properties offered by carbon nanotubes has fostered research for their use in many kinds of applications, including the biomedical field. However, due to persisting outstanding questions regarding their potential toxicity when considered as free particles, the research is now focusing on their immobilization on substrates for interface tuning or as biosensors, as load in nanocomposite materials where they improve both mechanical and electrical properties or even for direct use as scaffolds for tissue engineering. After a brief introduction to carbon nanotubes in general and their proposed applications in the biomedical field, this review will focus on nanocomposite materials with hydrogel-based matrices and especially their potential future use for diagnostics, tissue engineering or targeted drug delivery. The toxicity issue will also be briefly described in order to justify the safe(r)-by-design approach offered by carbon nanotubes-based hydrogels.

**Keywords:** nanocomposites; hydrogels; diagnostic; drug delivery; tissue engineering

## 1. Introduction

Biomaterials are a key element of medical devices. Due to their specific properties related to the nanoscale [1], nanoparticles have progressively been introduced in biomaterials. The large ratio of surface atoms, compared to those in the bulk, increases their chemical reactivity and significantly modifies their physico-chemical properties in general (modified photocatalytic activity or even transparency for example in the case of nano TiO<sub>2</sub>, faster dissolution in most cases, modified electronic properties, etc.), which can be very useful in biomedical applications. If they are designed to be released, their size also allows a much faster distribution in the body. Among nanoparticles in general, carbon nanomaterials combine interesting properties such as a very high chemical resistance (no dissolution even in aggressive environments), excellent mechanical properties and a very light weight. The most used carbon nanomaterials include nanodiamonds (ND), carbon nanotubes (CNT) and graphene and its related materials (GRM: few-layer graphene (FLG), graphene oxide (GO), reduced graphene oxide (rGO)) [2]. Carbon nanomaterials also exhibit a wide range of morphologies from 0D (nanodiamonds) to nanowires (1D: carbon nanotubes) and nanosheets or nanoplatelets (2D: GRM). Among carbon nanomaterials, CNT exhibit a unique combination of mechanical, electrical and optical properties with also the possibility to fill them with different compounds including drugs [3] and are thus among the most promising nanomaterials for biomedical applications. Because of potential toxicity issues for nanomaterials in general when used as free particles, the current strategy is to favour their use in nanocomposite materials (Figure 1), as load in a biocompatible matrix (safe(r) by design approach).

In this review, we have focused especially on hydrogel matrices, which are currently intensively investigated for biomedical applications.



**Figure 1.** Scheme of the topics addressed in this review: Carbon nanotubes (CNTs) are good materials for various biomedical applications but they raise several question about toxicity. Their utilization as component in nanocomposites like CNTs-based hydrogels could limit those concerns.

## 2. Carbon Nanotubes (CNT) for Biomedical Applications

Carbon nanotubes are an allotropic form of carbon identified in 1991 by Iijima and since widely studied and used for a wide range of applications such as materials reinforcement, electrode materials and/or components for nanoelectronics (biosensors) or even (which could be remotely activated in some cases) drug carriers in biomedicine. They can be synthesized by different methods which will not be described in detail here but include the historical electric-arc discharge, laser ablation and the wide family of catalytic chemical vapour deposition (CCVD) techniques [4]. CNT can be described as a rolled-up graphene layer, sometimes closed at the end by fullerene caps. The number of concentric walls composing a CNT (if more than one) is an essential parameter that determines many properties. Single-wall CNT (SWCNT) have a small diameter, most often between 1 and 2 nm, whereas multi-walled CNT (MWCNT) outer diameter can reach ca. 100 nm. Increasing the number of layers in MWCNT inevitably also increases the number of defects and thus makes them easier to modify and to functionalise, most of the time at the cost of a degradation of their physical properties. Double-wall CNT (DWCNT) are at the interface between SWCNT and MWCNT: they exhibit many characteristics of SWCNT, such as a very narrow diameter and excellent mechanical properties but can, as MWCNT, be covalently functionalised without degrading much their electrical conductivity thanks to the presence of a second outer wall. Indeed, the question of role played by the surface chemistry of nanoparticles in general is a crucial one and CNT are no exception to the rule. It is well known that the intrinsic chemical composition and crystal structure of a nanoparticle will lead to different surface properties such as charge, hydrophobicity or hydrophilicity, possible dissolution, (photo)catalytic activity and so forth [5]. This will drive the interactions of the nanoparticle with its environment and especially the adsorption of proteins (corona). On the other hand, it has also been demonstrated that the decoration of the surface of any nanoparticle can modify their surface properties and finally lead to a rather different biological behaviour, with a marked impact on their

biodistribution [6]. Similar results have also been described for CNT, which will be discussed in detail in the final section. In many cases, CNT are covalently functionalized by oxidation ( $\text{HNO}_3$  alone or mixed with  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), leading to the grafting of oxygen-containing functional groups (hydroxyl, carboxylic acid) at the surface of the outer wall, as well as to the opening of the CNT [7]. However, in many other cases, the functionalization is non-covalent, by simple adsorption of different kinds of molecules including polymers, DNA as well as carbohydrates and derivatives [8–10].

Application of CNT in the biomedical field requires a few challenges to be met. The first one is related to safety and implies to use very high purity CNT in order to limit potential release of toxic ions during operation in any biological environment. This is a real challenge because high purity CNT samples usually cannot be prepared in very large scale and a compromise between quality and quantity often has to be made. The other main challenges are more related to formulation issues, not only in the biomedical field. Being able to achieve good dispersions of CNT in solvents and especially in water is one of the major ones. The strong hydrophobicity of CNT make them not only difficult to separate/individualize in a solvent but also to stabilize the suspension. This can be achieved through functionalization (covalently by chemical oxidation for example or most often non-covalently by addition of a dispersing agent or a surfactant), as has already been discussed. Another strategy, because CNT are always difficult to disperse when starting from a dry powder, is to limit or avoid drying steps during their processing. Another challenge is the typical viscosity increase related to the proper dispersion of CNT in a fluid, even at low concentration [11], which can make difficult to prepare nanocomposite materials with a high volume fraction of well-dispersed CNT.

Depending on their electronic structure, SWCNT can behave either as semiconductors or as metals. Within a random SWCNT population, there is a statistical distribution of 2/3 of semiconducting ones and 1/3 metallic of metallic ones [4]. When the number of concentric walls increases, the inter-wall interactions lead to a progressive increase in the population of metallic MWCNT. In terms of mechanical performances, they can exhibit a large surface area up to  $1000 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  in the case of DWCNT [12], a very high aspect ratio and low density [13] as well as an excellent mechanical resistance (better than steel along their axis) and an excellent flexibility when the number of walls is low (this is especially true for CCVD CNT). As described by Mohajeri et al. [14], CNT are more and more used for biomedical purposes due to their rather good biocompatibility, either for diagnostics or for the treatment of various diseases.

### 2.1. CNT Use for Diagnostic

As early diagnostic is a key point for an efficient treatment, the improvement of detection methods is especially relevant. In vitro analysis of biomarkers is already possible with good accuracy thanks to the detection immune complexes but can be time consuming and also require large amounts of biological samples when using classical dosage strategies. Due to their electronic properties, several teams have considered using CNTs as the key element of electrochemical sensors and different kind of label-free CNT-based biosensors were developed.

CNT can also act as contrast agents in different bio imaging methods [15]. Functionalised and conjugated with various biomarkers they can point out the presence and localisation of targeted cells with a rather good spatial resolution.

#### 2.1.1. Biosensors Based on CNT

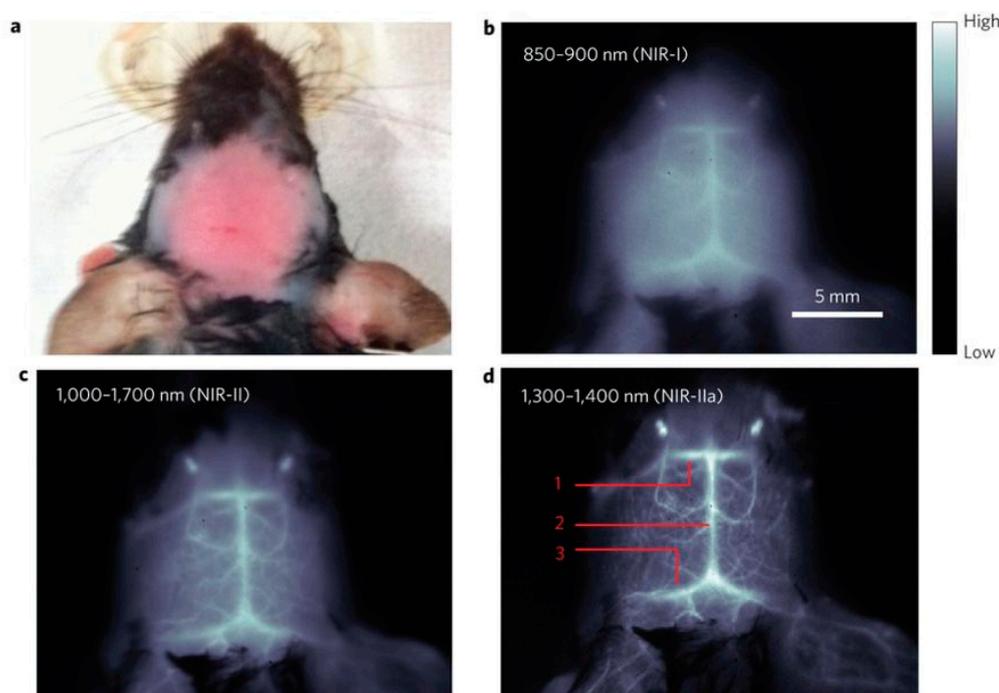
In the biosensors field, CNT have been proposed as sensing element to detect and monitor several diseases, especially diabetes but also bacterial infection. For instance, Punbusayakul et al. used electrochemical monitoring of immune complexes for salmonella detection, reducing thus the detection time and facilitating the sample preparation compared to existing methods [16]. An immunosensor for adiponectin—an obesity biomarker—was also obtained by grafting oriented antibodies on DWCNT surface in order to immobilise them. A second antibody, conjugated with horse radish peroxidase (HRP)-streptavidin binds to adiponectin and reacts with the substrate during cyclic voltammetry monitoring, allowing thereby fast detection and quantification [17].

Generally speaking, the presence of CNT at the surface of the electrodes allows faster electron transfer and improves the sensitivity for electrochemical detection [18]. Field-Effect Transistor (FET)-based sensors have been reported to have excellent sensitivity [19,20], sometimes as low as attomole according to Ramnani et al. [21]. Recently resistive sensors and more precisely differential resistive pulse sensors (RPS) based on MWCNT, proved their great utility reaching the single molecule detection threshold [22].

Another recent approach demonstrated the interest of porosity as a way to immobilize molecules on biosensor electrode. Zhang et al. described a non-enzymatic glucose detector composed of porous nickel-based metal oxide framework (Ni-MOF), where the electrical conductivity was enhanced by addition of CNT. These electrodes exhibit a high glucose selectivity and this method is proposed as a relevant alternative to detection through immune complexes immobilisation [23].

### 2.1.2. Imaging Methods Based on CNT

Various technologies based on CNT are available in the imaging field. For example, photoluminescent imaging takes advantage of the fluorescence of excited SWCNT in the Near InfraRed-I (700–900 nm) and NIR-II (1100–1400 nm) ranges, wavelengths at which tissues and water are almost transparent, making possible to reach deeper penetration depths. Welsher et al. used this property to optically track in real time the biodistribution of injected SCWNTs in mice deep tissues and vessels [24,25]. SWCNT fluorescence is emerging as a reliable optical imaging method for vessels observation [26,27] (Figure 2) and was more recently used as an optical alternative to the expensive positron emission tomography-computed tomography for brown fat detection [28].



**Figure 2.** In vivo mouse brain imaging with SWNT-IRDye800 in different Near InfraRed (NIR) sub regions. (a) A C57Bl/6 mouse head with hair removed. (b–d), Fluorescence images of the same mouse head in the NIR-I, NIR-II and NIR-IIa regions. In (d), the inferior cerebral vein, superior sagittal sinus and transverse sinus are labelled 1, 2 and 3, respectively. Reprinted with permission [26].

The photoacoustic effect is another interesting way to use CNT NIR absorption. Photoacoustic imaging measures the ultrasounds produced by tissues expansion around heat emitting CNT exposed to NIR stimulation. De La Zerda et al. obtained improved contrast on targeted tumour cells thanks

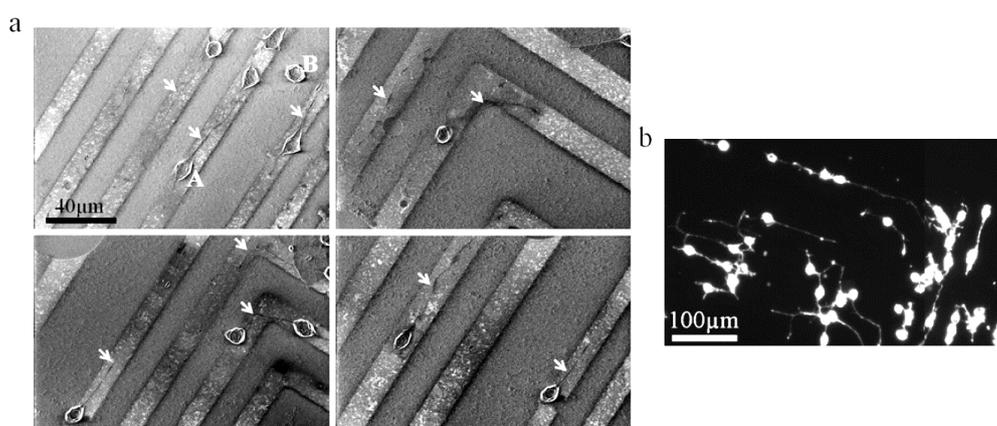
to SWCNT conjugated with Arg-Gly-Asp peptides as well as an enhanced sensitivity and detection threshold, compare to pristine SWCNT [29,30].

Raman scattering is also an imaging option, thanks to the G band exhibited by SWCNT around  $1580\text{ cm}^{-1}$ . Liu et al. demonstrated the use of the combination of peak shifting for SWCNT depending on the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotopic ratio with the labelling by different targeting ligands, leading to five-colour multiplexed Raman imaging [31]. Furthermore one of the major drawback of Raman imaging, the acquisition time, may have found a major improvement with the recent development of Raman hyperspectral instrument with Bragg tuneable filter, thereby increasing impressively the scan speed and scanned surface [32]. MWCNT usually exhibit a lower signal/noise ratio compared to SWCNT and DWCNT and the sensitivity of this approach thus depends on the nature of the biological matrix.

The radioprobes presented by Hong et al. used for single-photon emission computed tomography imaging (SPECT) and composed of metal halides encapsulated within CNT, illustrate another application of CNT in bioimaging [33]. Furthermore, the proposed 1,3-dipolar cycloaddition of CNT represents a promising substitute option to widespread CNT surface oxidation as it enables the functionalisation without opening the closed ends and should thus prevent the release of radionuclides and their accumulation in thyroid and stomach. This functionalisation method was also utilised to conjugate oxidised MWCNT with gadolinium, which is an element commonly used as contrast agent for magnetic resonance imaging (MRI). Gd-MWCNT exhibited enhanced MRI contrast compared to actual commercial ones [34].

## 2.2. CNT Use for Tissue Engineering

Influence of CNT on living cells draws more and more attention as utilisation of CNT as base material for biomedical applications is increasing. Lovat et al. shown that CNT represent a good surface for cellular growth and have a promoting effect on neural signal transmission [35]. Moreover, Mazzatenta et al., by investigating the coupling model between SWCNT and hippocampal cells, have proved that SWCNT may directly stimulate brain circuit activity, highlighting SWCNT as a promising material [36]. Béduer et al. obtained similar results. They demonstrated that neurons would preferentially grow on DWCNT compared to  $\text{SiO}_2$  surface, due to a favourable surface texture and better adsorption of culture medium proteins, allowing patterning of neurons networks as illustrated in Figure 3. Cell differentiation was also enhanced when the growth took place on DWCNT [37]. Raw (non-functionalised) aligned MWCNT successfully sustained the growth and proliferation of pancreatic cancer cells, exhibiting a new approach for the study of this kind of cancer [38].



**Figure 3.** Neuro2a cells culture on a  $\text{SiO}_2/\text{CNT}$  micropatterned surface. (a) SEM images of neuro2a cells cultured on patterned surfaces after 2 days of differentiation. Arrows point to neurites developed on CNT patterns. The letter A indicates a specific cell body on a CNT feature and the letter B points out a specific cell body outside of a CNT feature (on a  $\text{SiO}_2$  feature). (b) Optical fluorescence image of neural cells grown on CNT patterns after phalloidin staining. Note that neurites follow the CNT lines turning at an angle of  $90^\circ$ . Reprinted with permission [37].

The ability of CNT to form 3D architecture described by Correa-Duarte et al. is equally interesting for cell proliferation enhancement and tissue engineering. The proposed MWCNT network could be shaped to fit best natural tissue morphology but also remained stable in vivo [39]. Abarategi et al. developed CNT/chitosan meshes to support cell recolonization and observed their disassembly in vivo through dispersion in newly grown tissue [40]. Different kinds of CNT-based scaffold supporting cell colonisation were reported since [41]. The question of the potential release of CNT in case of biodegradation and the possible related toxicity issues will be discussed later on.

### 2.3. CNT Use for Targeted Therapies

Efficient drug administration is a real concern in the medical field. Indeed, low selectivity and low half-life time may lead to multiply the administrations, resulting in secondary effects and sometimes, fatal issues. Due to their expected biocompatibility and suitable size, CNT are widely studied as nanocarriers for drug and gene delivery as well as cancer treatment.

#### 2.3.1. CNT as Carrier for Drugs and Gene Delivery

The use of CNT as nanocarriers has drawn more and more attention in last years since CNT exhibit exceptional cell transfection capabilities. Liu et al. have shown that drugs such as doxorubicin (DOX) can be loaded onto the surface of poly(ethylene glycol) (PEG) conjugated SWCNT thanks to non-covalent bounds and can reach the tumorous tissue thanks to the enhanced permeability and retention (EPR) effect. A pH - release dependency would also permit delivery close to the tumour tissues [42,43]. Wells et al. relied on a mesoporous silica coating to load drugs on CNT [44]. In those examples, DOX was easily released in the acidic environment found in tumorous tissues but stayed bound to CNT at neutral and alkaline pH, limiting toxicity within the healthy body parts [42–44]. PEG branches also increased the hydrophilicity of SWCNT and protected the DOX bound to the nanotubes, extending its stability and lifetime in blood circulation. Another anticancer drug, 10-hydroxycamptothecin (HCPT) was successfully covalently linked to MWCNT and also exhibited the enhanced efficiency of CNT-conjugated drugs, as well as the possibility to couple imaging to this kind of treatment (theranostic approach) [45]. Recently, hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD)-modified SWCNT-COOH also exhibited a rather good formononetin entrapment and a slow and sustained release [46] which might be useful for enhanced cancer treatment.

CNT have also the capacity to enter cells [47], independently of the functional groups they may have on the surface [48], allowing intracellular drugs delivery but also genes and proteins delivery. This is of particular interest for the development of gene silencing therapy, thanks to short interfering RNA (siRNA) delivery inside cytoplasm. Bartholomeusz et al. successfully dispersed SWCNT in siRNA solutions, without using any functionalisation of the nanotubes and demonstrated 90% of transfected cells within 6 h, associated with 70–80% of HIF-1 silencing and more importantly without the disadvantage of viral vectors, such as inflammation or immune response [49]. Ladeira et al. introduced siRNA in rather hard-to-transfect cells thanks to carboxyl-functionalised SWCNT with an efficiency of 96% of silencing [50]. Sanz et al. used a combination of functionalisation both outside (polyethyleneimine) and inside (chloroquine) for DNA plasmid delivery [51] In this work, the chloroquine, a lysosomotropic compound, was released from the CNT only at the low pH inside lysosomes, making possible the delivery of the DNA plasmid within the cytoplasm and finally to the cell nucleus. Gene silencing represents a concrete alternative treatment for pathologies and particularly for those localised in delicate zones such as the brain, since it has better efficiency than direct inhibitor injection [52]. The cellular uptake pathway of MWCNT  $\beta$ -cyclodextrin nanoplatform with branched poly(ethylenimine) (MWCNT-CD-PEI) loaded with cidofovir (Cid) was recently elucidated thanks to rhodamine (Rhod) doping and imaging by Mazzaglia et al. [53]. MWCNT-CD-PEI-Rhod were internalised through endocytosis and small drugs like Cid would escape lysosomes vesicles.

Kaboudin et al. demonstrated transfection of nucleic acid through another mechanism than endocytosis in a recent work. MWCNT functionalised with pyridine and magnetic particles transported

nucleic acids bound by  $\pi$ - $\pi$  interactions through the cell membrane and released them in the cytoplasm. A magnetic field was then applied to remove the nanocarriers from the cell, thus limiting their cytotoxicity [54]. Magnetically guided nanocarriers were also considered by Xu et al. through the one-step preparation of magnetic MWCNT using a paramagnetic surfactant coating. DNA is compacted thanks to electrostatic forces allowing the endocytosis transfection of the nanoplatform [55]. Salts shielding the interaction between the cargo and the CNT permitted the release of DNA inside the cytoplasm.

Using another strategy, Kong et al. considered the use of NIR light irradiation to help the DNA delivery. Laser stimulation of SWCNT coated by poly(ethyleneimine)-cholesterol (PEI-Chol) induced membrane permeabilization due to SWCNT photothermal activity, promoting cellular uptake and DNA release [56]. However, as remarked, further works are still needed to determine CNT pathways and fate inside tissues depending on their formulation.

### 2.3.2. Anticancer Therapies Based on CNT

Taking advantage of CNT photothermal properties with NIR laser stimulation was considered as an elegant way for directly treating cancer. Burke et al. showed that intra-tumoral injection of MWCNT suspension, followed by short laser excitation resulted in tumour ablation in mice and enhanced survival [57]. On the other hand, intravenous injection of SWCNT conjugated with anti-CTLA-4 described by Wang et al. triggered immune reaction and enhanced cytotoxic activity additionally to the Photothermal Therapy (PTT), resulting in the destruction of the remaining nodules/metastasis [58]. The coupling of imaging methods with PTT was also proposed to promote treatment of primary tumours and detection of connected lymph nodes in a single step as illustrated [59]. Recently, MWCNT/gold nanostars hybrids have provided significant improvement in terms of photothermal conversion, making it possible to limit laser stimulation time during the therapy [60]. Furthermore, the combination of molecules delivery and PTT described by Wang et al., also used by Wells et al., broadens the application range of this cancer therapy method [44,61]. CNT-assisted PTT is however limited by laser penetration depth in tissues and still needs to prove its efficacy for thicker samples.

Most of the works presented in this section have determined the toxicity of CNT on cells during their utilisation but the fate and possible degradation of those objects were not thoroughly examined. This concern, still controversial, could be the most important drawback of CNT application in biomedicine when the nanotubes are not trapped within or at the surface of a device.

## 3. CNT-based Hydrogels for Biomedical Applications

Hydrogels are 3D polymeric cross-linked edifices where water absorption is made possible thanks to hydrophilic functional groups. Those materials can be classified in two groups depending of the nature of the cross-linking interactions. In chemical hydrogel, obtained for instance by radical polymerization or UV irradiation, the cross-linking is permanent and of covalent nature. Physical cross-linking is about electrostatic interactions and thus induces a possible reversibility aspect [62]. Hydrogels are not the only polymers used in CNT-based nanocomposites synthesis. For instance, Martinelli et al. developed cardiac tissue scaffolds composed of polydimethylsiloxane [63] and Mamidi et al. evaluated the cytotoxicity of CNT in ultrahigh molecular weight polyethylene on fibroblasts [64]. However, the following paragraphs will focus only on CNT-Hydrogel nanocomposites.

### 3.1. Biopolymer-Based Hydrogels

Hydrogels are widely used in the biomedical field due to their biocompatibility and the low inflammatory responses they induce [65]. Their porosity and hydrophilicity allow cargo molecules to be loaded, for drug delivery or for biosensing purposes [66] and their mechanical properties can be suitable for applications in tissue engineering [67]. The reversibility of physical hydrogels is also quite interesting as it can be the source of phase transitions, exploitable for in situ injection [68]. Several hydrogels can respond to different stimuli like temperature or pH variation [69], light exposure or

electric field application. They represent thereby promising materials for targeted and controlled drug delivery, especially as, in some case, it can also be operated remotely.

Several polymers are suitable for hydrogel synthesis but natural polymers are more often selected for biomedical application because most are biocompatible and renewable. Some synthetic polymer also fit biocompatibility criteria (nontoxic and inducing low inflammation). Those polymers or monomers are often used combined with others, Table 1 gathers the main monomer/polymer families used for the synthesis of hydrogels. It is the reticulation of those polymers which determines the final properties of the gel. However, in spite of their potential for the various applications cited in the previous paragraph, the intrinsic properties of hydrogel matrices are limited. Their enhancement was thus investigated through the use of additional polymers or the inclusion of nanoparticles such as CNT.

**Table 1.** Bio-sourced polymers and synthetic monomers used for the synthesis of hydrogel matrices for biomedical applications [62,66,70,71].

Bio-Sourced Polymers	Synthetic Monomers
Agarose	Acrylamide (AM)
Alginate	Acrylic acid (AA)
Chitosan	Ethylene glycol (EG)
Collagen	Hydroxyethyl methacrylate (HEMA)
Dextran	Lactic acid (LA)
Fibrin	Methyl methacrylate (MMA)
Hyaluronic acid	Vinyl alcohol (VA)
Pectin	-

### 3.2. CNT-Based Hydrogels for Diagnostic

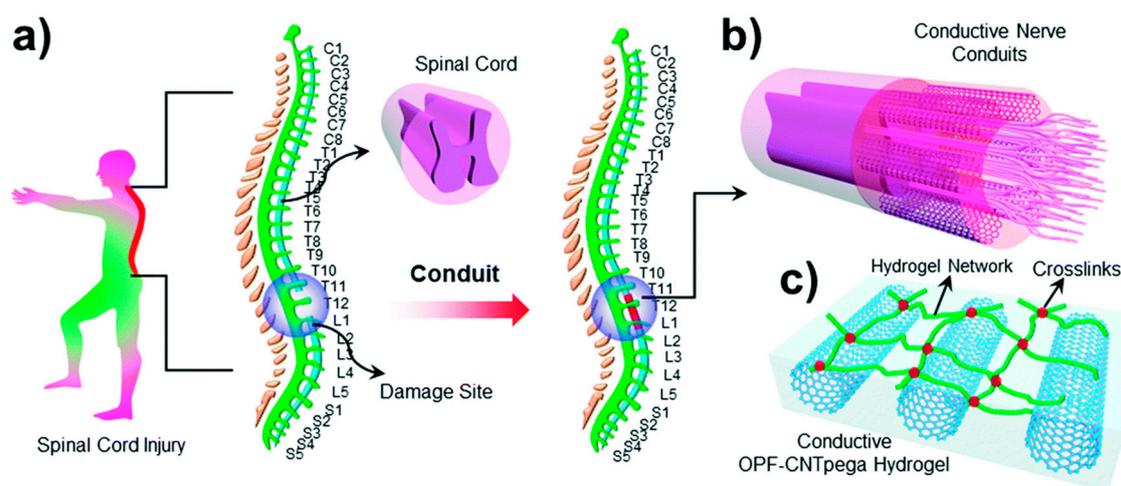
Most biosensors developed using CNT based-hydrogel focused on glucose detection, as it is well documented. Several of them consist of electrodes allowing the monitoring of electron transfers within the redox couple glucose oxidase (GOx)-glucose. Conductive Bacterial cellulose (BC)-CNT-GOx films were directly used as electrodes by Kim et al., offering a simple and biocompatible material for cyclic voltammetry monitoring [72]. Comba et al. developed a very reliable glucose biosensor, with long-term stability using a sandwich configuration. In their work, the biosensor matrix was composed of albumin (alb), GOx and carbon nanotubes-mucin composite (CNT-muc) crosslinked with glutaraldehyde were inserted between two polycarbonate membranes [73]. Fatoni et al. used porosity to entrap the enzyme using a chitosan-bovine serum albumin (Chi-BSA) cryogel where embedded MWCNT enhanced electron transfer. The redox reaction was followed by amperometry [74].

The 3D architecture and mechanical properties of CNT-based hydrogels allow the design of different types of sensing methods. The optical glucose sensor presented by Barone et al. was based on a shift of photoluminescence (PL) emission of CNT embedded in poly(vinyl alcohol) (PVA) hydrogel, induced by apo-glucose oxidase (apoGOx) and glucose interaction. ApoGOx attached to PVA contributed to the cross-linking of the hydrogel and its interaction with glucose modified PVA conformation and hydrostatic pressure, resulting in CNT lattice deformation and change of the environment [75]. This work demonstrated the *in vivo* use of CNT PL with the perspective of limiting CNT release and associated toxicity concerns. Two different teams recently developed sensor-actuators reacting to glucose-GOx. In both works, hydrogel particles inserted in MWCNT twist yarn provoked swelling/de-swelling in the presence of glucose. Lee et al. took advantage of the exothermal character of the enzymatic reaction to activate the fast shrinkage of a thermally sensitive hydrogel, the poly(N-isopropylacrylamide) [76] adsorbed on MWCNT yarn. For the other team it was the binding of glucose with the boronic acid-conjugated with hyaluronic acid/cholesterol nanogel, which changed molecular interactions and swell the MWCNT yarn [77]. In the latter report, the authors observed a linear relationship between glucose concentration and the yarn's rotation angle. A flexible and light strain sensor, suitable for human motion detection, was recently reported by Hosseini et al.

Bacterial cellulose (BC)/(MWCNT) hydrogel was dried into a piezoresistive aerogel using supercritical CO<sub>2</sub> drying [78].

### 3.3. CNT-Based Hydrogels Use for Tissue Engineering

Maintaining the recolonization of cells in order to replace dead or harmed tissues requires scaffolding materials that respect certain properties. They should be able to form cross-linked networks, be mechanically resistant, biocompatible and should allow good cell adhesion. For such purposes, hydrogels based on biopolymers are often preferred. Furthermore, the inclusion of nanofillers such as CNT in those matrices enhance the mechanical properties [79] but also improves the electrical conductivity (when needed). For example, the regulation of the electroactive behaviour of cardiac or nervous cells during the tissue regeneration process is very important. For instance, Yildirim et al. demonstrated that the inclusion of 1 wt.% of SWCNT in an alginate scaffold was enough to improve the tensile strength close to that displayed by natural tissues, as well as increasing cell attachment and proliferation [80]. Mechanical and electrical properties of scaffolds can be tuned by modifying the CNT concentration [81] and/or orientation inside the hydrogel [82]. Ahadian et al. reported a tuneable gelatine methacryloyl (GelMA)/aligned MWCNT scaffold which enhanced the differentiation of embryoid bodies into cardiac cells, meaning this could represent a suitable support for any tissue regeneration based on stem cells therapy [82,83]. The enhancement of physical properties is particularly promising for cardiac reinforcement application, where electrical conductivity is essential but also for bone tissue regeneration. In that way, different works show that the CNT incorporation in biopolymer-based hydrogels could support the growth of cardiomyocytes fitting for cardiac tissue engineering [84] or cardiac patches [85]. Furthermore, Zhang et al. have shown the promoting effect of SWCNT on osteoblast proliferation in chitosan scaffold containing crystalline hydroxyapatite, compare to pristine hydrogels, as well as enhanced tensile and compressive modulus [86]. The scaffolds presented by Cancian et al., composed of non-covalently included CNT in thermosensitive chitosan hydrogels, exhibited appropriate viscosity for local injection, a method which could replace invasive surgeries like bone grafts [87]. Recently, Liu et al. described a promising method aiming to fill in the gap resulting of spinal cord injury (Figure 4). Nerve conduits composed of PEG functionalised CNT/oligo (poly(ethylene glycol)fumarate) (OPF) nanocomposite were generated using injection moulding technique. The described hydrogel demonstrates the enhancement of cell attachment and proliferation, confirming that the nerve conduits could help axon recovery [88].



**Figure 4.** (a) Schematic demonstration of the spinal cord in the human body. (b) Conductive nerve conduits for spinal cord injury treatment. (c) Structure of the conductive OPF-CNT/pega hydrogel. Reproduced from [88] with permission from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and The Royal Society of Chemistry.

In the field of cancer engineering, intensified cell proliferation linked to the presence of CNT can also be exploited for patterning cells growth, as shown by cancer spheroid formation in the report by Sheikholeslam et al. [89].

### 3.4. CNT-Based Hydrogels for Targeted Therapies

The use of CNT-based hydrogels for drug delivery is quite new but was investigated by many authors, as reported in the extensive review of Cirillo et al. [71]. The porous structure of biocompatible hydrogels combined with the mechanical and electrical properties improvement brought by CNT were shown to increase drug molecules stability and allow for more sustained delivery, which is of a great interest for efficient therapies [90,91]. Furthermore, this kind of material permits the development of other delivery methods, such as transdermal delivery patches.

#### 3.4.1. CNT-Based Hydrogels Use for Drug Delivery

Several teams investigated the possibility of electro-responsive CNT-based hydrogels for drug delivery. For instance, Spizzirri et al. synthesised microspheres through the polymerisation of gelatine containing MWCNT with the help of sodium methacrylate and *N,N'*-ethylenebisacrylamide. The drug, diclofenac sodium salt, was loaded by soaking of microspheres into a concentrated solution. The authors shown that the application of a 9V tension on the beads induced a shrinkage and thus increased the drug release [92]. This team also brought to light that the drug release behaviour was different depending on the charge of the drug. Experiments carried out on acrylamide and *N,N'*-ethylenebisacrylamide film polymerised by UV stimulation containing covalently introduced MWCNT, revealed that the release rate of anionic drug increased under 12V stimulation while cationic drugs were retained and released faster without electrical stimulation [93]. This was explained by the accumulation of negative charges on CNT when under 12V stimulation. Servant et al. considered the use of implantable CNT-based hydrogels for remote electrically controlled delivery. They reported methacrylic acid free-radical polymerisation in presence of pristine MWCNT to allow pulsatile drug release. The application of electrical pulses stimulated the drug release; however, they shown that the delivery rate turned back to normal quickly after the pulse end, offering more accuracy [94,95].

As for CNT-based drug carriers, pH-controlled drug delivery systems based on CNT/hydrogel nanocomposites were also considered. Peng et al. reported a different swelling of MWCNT/chitosan hydrogel depending of the pH of buffers mimicking two gastrointestinal environments, impacting the release rate [96]. Ye et al. also shown that pH had an influence on wettability and swelling of vertically aligned CNT covered by poly(methacrylic acid-co-ethylene glycol diacrylate) (P(MAA-co-EGDA)), which could lead to controlled release [97].

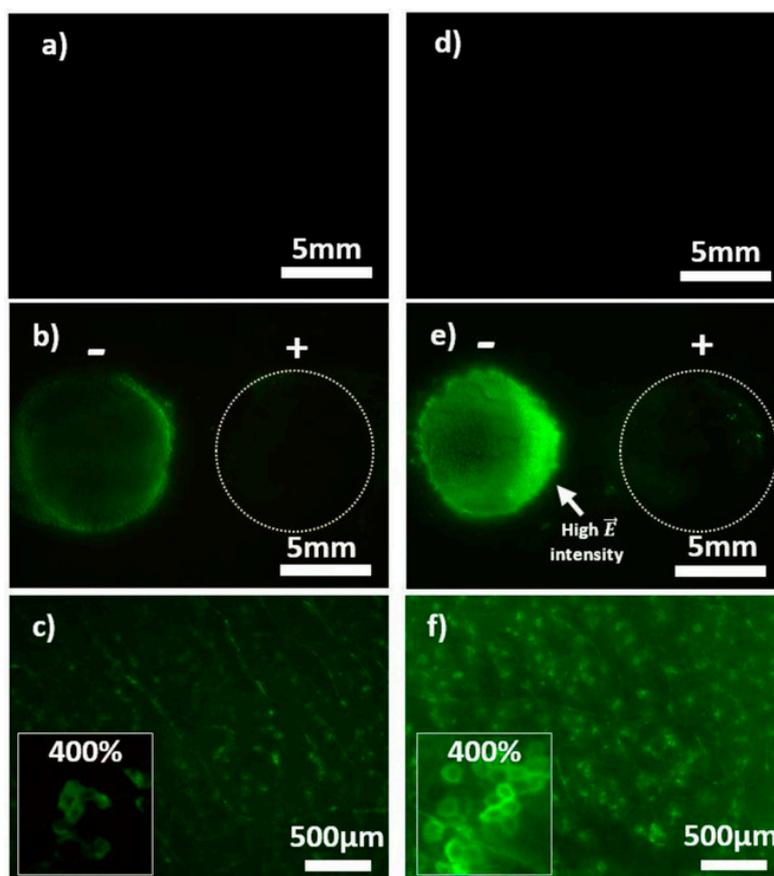
Wei et al. designed a dual release carrier with CNT/polycaprolactone (PCL)-PEG-PCL thermosensitive hydrogel, where DOX was loaded on CNT while Rhod was within the hydrogel. The difference of drug loading is pointed out as the source of the observed release rate. Furthermore, pH dependency was also noticed [98]. CNT based-hydrogels could also find applications in cancer therapy: Hindumathi et al. confined CNT inside a PEG cocoon in order to load drugs such as curcumin, allowing curcumin cellular uptake [99].

#### 3.4.2. CNT-Based Hydrogels Use for Skin Delivery

As Kuche et al. explained in their review work, the major drawbacks of existing transdermal delivery patches are the low drug release rate and the poor skin permeability [100]. CNT based nanocomposites could bring an innovative solution to both problems thanks to their intrinsic properties. As shown previously, this kind of hydrogel could improve drug stability through time and grant more control on the release rate. Im et al. were able to make such a patch by the electrospinning of a polyethylene oxide/pentaerythritol triacrylate/MWCNT hydrogel and they observed a correlation between drug release and applied voltage [101]. Membranes developed by Bhunia et al., made of PVA and carboxy-functionalised MWCNT [102], or by Giri et al., composed of 2-hydroxyethyl methacrylate

grafted carboxymethyl guar gum and functionalised MWCNT [103], both exhibited encouraging performances for diltiazem and diclofenac release, respectively.

The recent work of Guillet et al. opens a new route to solving both problems at once using CNT-based hydrogels directly as an electrode for skin electroporation. The application of high voltage electrical pulses through the skin was shown to temporarily create pores within the *stratum corneum*, which large molecules like insulin, carried by electrophoretic forces, may use to cross this natural barrier. The developed agarose/DWCNT hydrogel was used directly on mice skin as both drug storage system and electrode and demonstrated preserved mechanical properties but most importantly enhanced drug penetration into the skin, as shown in Figure 5 [104]. This work represents a promising application of CNT-based hydrogels with a very clear improvement and practical use.



**Figure 5.** Visualization of skin electroporation. Representative pictures of mouse skin after electroporation with CTRL-AG and DWCNT-AG (1 wt. % DWCNT) containing 4 kDa FITC-dextran at 1 mm. Images (a,d) show CTRL-AG and DWCNT-AG without electrical stimulation under identical conditions at the same intensity level ( $\times 0.57$ ). Images in (b,e) are with electrical stimulation: The anode is on the left-hand side and the cathode on the right-hand side (magnification  $\times 0.57$ ). (c,f) Magnifications ( $\times 4$ ) of the anode area of (b,e), respectively. The frame on the left side of (c,f) pictures shows a numerical magnification  $\times 400$ . Reprinted with permission [104].

Table 2 summarizes the different application fields addressed in this review and the corresponding reference of cited works. In addition to this academic work, it is important to note that a few patents are also available. They all correspond to (potential) applications in the biomedical field in which CNT are included mainly to enhance the performances of existing medical devices and not for the development of new specific “nano-related” applications [105–111]. Furthermore, there are only few clinical trials involving CNT-based materials for biomedical applications and they mainly deal with

biosensor for in vitro detection [112]. The main reason identified for this lack of practical application is most probably the toxicity issue of CNT which will be discussed in the last section.

**Table 2.** Summary of the cited works sorted by application field.

CNT		CNT-Based Hydrogels	
Biosensors	[15–23]	Diagnostic	[72–78]
Imaging	[24–34]		
Cells guidance and tissue scaffolds	[35–41]	Cells guidance and tissue scaffolds	[79–89]
Drugs and gene delivery	[42–56]	Drugs delivery	[71,90–99]
Anticancer therapies	[44,57–61]	Skin delivery	[100–104]

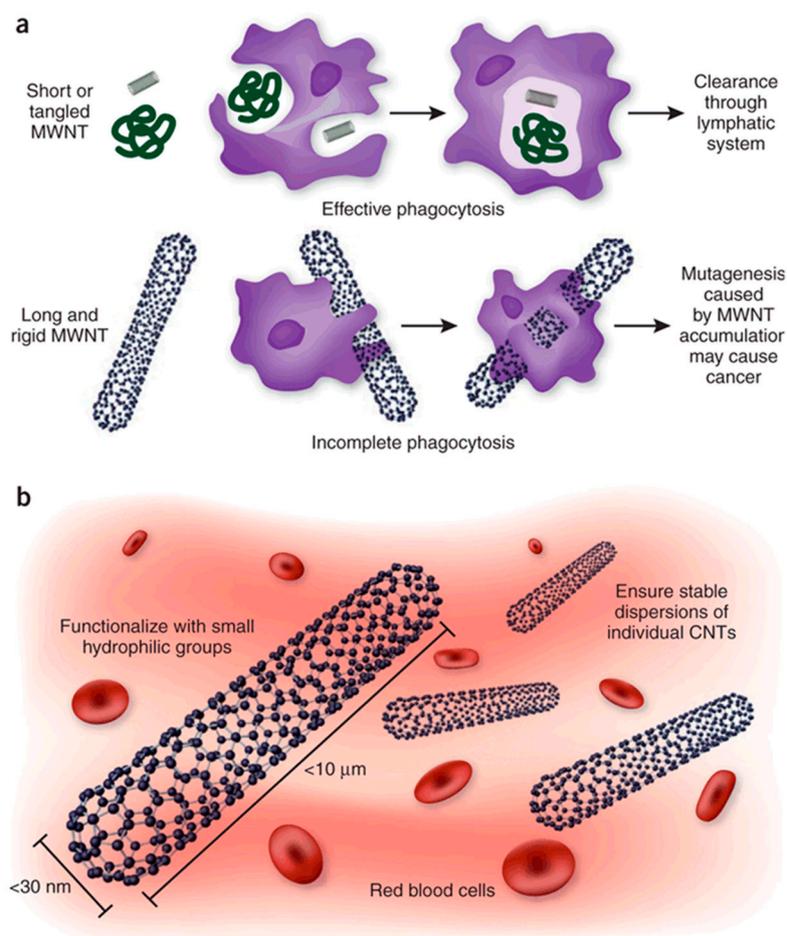
#### 4. Potential Toxicity Issues Related to CNT

The toxicity of CNT is a complex subject to address as CNT actually gather a family of nanoparticles, which properties and behaviour are related non-exhaustively to their structure, number of walls, chirality, diameter and length [113]. However, several observations can be made from the different studies which try to answer to that question. CNT may enter the organism through three different pathways: injection, ingestion and inhalation. The interferences between those nanoparticles and organs or cells exist and could be the source the varying severity and sometimes fatal issues of disease development, as described in the review work of Madani et al. [114]. Effect of several CNT on different targeted cells were also compared by Cui et al. Yet this team, as others, insists on the need of more toxicity studies on the long term in order to get more perspective on this subject [115,116].

As described earlier in this work, CNT can transfect cells. Thanks to labelled MWCNT and further imaging it was proved that once inside the body, they could cross barriers, reach blood circulation and thus, spread within the organism [117,118]. CNT can either exit the body via urinary excretion or accumulate in secondary organs, staying indefinitely if the immune system fails to eliminate them [116]. Their biopersistence was demonstrated by Czarny and co-workers up to 12 months, without decrease [119]. CNT biodistribution is linked to several parameters such as functionalisation, dispersion and length. According to the review by Ali-Boucetta et al. on CNT toxicokinetics, covalently functionalised CNT tend to be excreted through urine whereas pristine and non-covalently functionalised CNT would accumulate in liver and spleen. CNT ability to disperse seems also a key parameter to take into consideration in toxicity. Functionalisation with small hydrophilic groups like PEG allows good and stable CNT dispersion. It is however important to know that most functionalisation processes require a former purification or activation by oxidation and that most MWCNT (in particular but not only) are significantly cut during the process, meaning in the end that it is very difficult to decorrelate the relative influence of length and functionalisation on the toxicity. The formation of CNT bundles is usually an unwanted issue as bigger agglomerate accumulate quickly, possibly leading to damages to neighbouring cells as they are easily detect by the immune system but not always phagocytosed because the length of the particles mays prevent macrophages from engulfing them properly [116,120]. Those observations are illustrated in Figure 6. The parallel is often made between CNT and asbestos as both particles are non-biodegradable fibres that the immune system fails to deal with. However, there are important differences between the two and the analogy is probably limited to the morphology and non-biodegradability as well as the activation of inflammation mechanisms when able to get within cells [121]. As evidenced by some groups, CNT may however exhibit an anti-oxidant activity when they are outside the cells, by trapping of reactive oxygen species [122]. Quarantine of CNT by fibrosis could causes discomfort yet put an end to the inflammation triggered by immune system overactivity. Otherwise, the prolonged inflammation tends to degrade environment cells and lead to the development of cancer [123]. Purification step of CNT appear necessary, as the presence of metallic particles is source of oxidative stress and thus cells damaging [124,125]. Furthermore, purification method often results in CNT shortening.

A study of Allen et al. on horseradish peroxidase (HRP) degradation effect on carboxylated SWCNT suggested that polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) may be found among the degradation products [126]. Moreover, carboxylated SWCNT are significantly more impacted by the HRP than pristine SWCNT which is important to consider as carboxylation is a common consequence of the purification step(s) [7]. In this sense, pristine CNT are less prone to biodegradation by peroxidases and thus more stable, while oxidized CNT biodegradation may lead to the release of toxic by-products in case of (very likely) incomplete degradation.

The use of different kinds of CNT with different morphologies and purities, with different biological models (cancer cell lines versus primary cells; in vitro versus in vivo; different animal models) at different doses using different dispersion/exposure/characterisation protocols certainly explains why the answer about the potential toxicity of CNT is still not available. The question of suitable doses for toxicity assessment is also a delicate matter. The actual exposure to CNT in real conditions is hard to quantify and concentrations used for testing the toxicity of CNT is generally far from reality. Finally the use of the weight concentration to express the exposure dose, although very practical to use, is rather irrelevant especially for comparison purposes and should be replaced by the surface concentration which is much more relevant [127].



**Figure 6.** (a) The effect of CNT structure on phagocytosis by macrophages and clearing from tissues. Whereas macrophages can engulf MWNTs with a low aspect ratio (ratio of length to width) before their clearance by draining lymph vessels, MWNTs with a high aspect ratio cannot be cleared and accumulate in tissues, where they promote carcinogenesis. (b) In addition to their dimensions, other considerations relevant to the safety of CNT include increasing their solubility and preventing their aggregation, to facilitate urinary excretion and thereby prevent tissue accumulation. Reprinted with permission [123].

In regard of those observations, the most cautious way to use CNT would be to prevent them from entering freely the organism. As such, trapping of CNT inside hydrogels contributes to limit the risk of direct interaction with CNT, promoting a safe-by-design development direction, while improving hydrogel properties [128]. However, to ensure no CNT release, the biocompatible polymer should be non-biodegradable and remain unaffected within the body.

## 5. Conclusions

CNT are promising materials in the biomedical field. Once functionalised to ensure their biocompatibility and conjugated with organic compounds or metallic nanoparticles, they can be used as efficient biocompatible biosensors or contrast agent for imaging but could also increase drugs lifetime within the body and facilitate their direct delivery within cells. Their usefulness in cell growth and recolonization is well illustrated, in particular for nervous cells. The use of CNT as additives inside matrices, especially biocompatible hydrogels, is an encouraging alternative way of taking advantage of their extraordinary properties while limiting the risk of direct exposure. It was shown that mechanical and electrical properties of hydrogels could be greatly improved by embedding CNT and that those nanocomposites could be used for biosensing, tissue engineering and drug delivery without the risk of CNT release into cells. Furthermore, the 3D porous structure of hydrogel widens the possible range of applications, offering more versatility, as shown by the recent development of injectable tissue scaffolds or drug delivery patches.

If the investigation of CNT local cytotoxicity is often included in recent in vivo biomedical application works and CNT generally shown not to be harmful for neighbouring cells, their fate on long term within the body is unfortunately the subject of less attention. CNT situation after they completed their intended task depends of many parameters including concentration, size and functionalisation and if most of them are generally quickly excreted, the remaining part is to stay in the body and accumulate leading to unknown long-term effects. However, as described in this work, CNT confinement inside hydrogels is a good way to limit their scattering inside the organism (as long as the hydrogel itself is not biodegradable), representing a promising way of taking advantages of those carbon nanoparticles for biomedical applications.

**Author Contributions:** Writing—original draft preparation, J.S.; writing—review and editing, M.G., E.F.

**Funding:** This research was funded by Région Occitanie and Université Fédérale de Toulouse, grant number 2018 001260/ALDOC-000423.

**Acknowledgments:** Research was conducted in the scope of the EBAM European Associated Laboratory (LEA) and resulted from the networking efforts of the COST Action TD1104 (<http://www.electroporation.net>).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Auffan, M.; Rose, J.; Bottero, J.-Y.; Lowry, G.V.; Jolivet, J.-P.; Wiesner, M.R. Towards a Definition of Inorganic Nanoparticles from an Environmental, Health and Safety Perspective. *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 634–641. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Wick, P.; Louw-Gaume, A.; Kucki, M.; Krug, H.; Kostarelos, K.; Fadeel, B.; Dawson, K.; Salvati, A.; Vazquez, E.; Ballerini, L.; et al. Classification Framework for Graphene-Based Materials. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 149–158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Neves, V.; Heister, E.; Costa, S.; Tilmaciu, C.; Flahaut, E.; Soula, B.; Coley, H.M.; McFadden, J.; Silva, S.R.P. Design of Double-Walled Carbon Nanotubes for Biomedical Applications. *Nanotechnology* **2012**, *23*, 365102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Monthieux, M.; Serp, P.; Caussat, B.; Flahaut, E.; Razafinimanana, M.; Valensi, F.; Laurent, C.; Peigney, A.; Mesguich, D.; Weibel, A.; et al. Carbon Nanotubes. In *Springer Handbook of Nanotechnology*; Bhushan, B., Ed.; Springer Handbooks: Berlin, Germany, 2017; pp. 193–247.

5. Nel, A.E.; Mädler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E.M.V.; Somasundaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M. Understanding Biophysicochemical Interactions at the Nano–Bio Interface. *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 543–557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Aggarwal, P.; Hall, J.B.; McLeland, C.B.; Dobrovolskaia, M.A.; McNeil, S.E. Nanoparticle Interaction with Plasma Proteins as It Relates to Particle Biodistribution, Biocompatibility and Therapeutic Efficacy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 428–437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Bortolamiol, T.; Lukanov, P.; Galibert, A.-M.; Soula, B.; Lonchambon, P.; Datas, L.; Flahaut, E. Double-Walled Carbon Nanotubes: Quantitative Purification Assessment, Balance between Purification and Degradation and Solution Filling as an Evidence of Opening. *Carbon* **2014**, *78*, 79–90. [[CrossRef](#)]
8. Zhou, Y.; Fang, Y.; Ramasamy, R.P. Non-Covalent Functionalization of Carbon Nanotubes for Electrochemical Biosensor Development. *Sensors* **2019**, *19*, 392. [[CrossRef](#)]
9. Oliveira, S.F.; Bisker, G.; Bakh, N.A.; Gibbs, S.L.; Landry, M.P.; Strano, M.S. Protein Functionalized Carbon Nanomaterials for Biomedical Applications. *Carbon* **2015**, *95*, 767–779. [[CrossRef](#)]
10. Sajid, M.I.; Jamshaid, U.; Jamshaid, T.; Zafar, N.; Fessi, H.; Elaissari, A. Carbon Nanotubes from Synthesis to in Vivo Biomedical Applications. *Int. J. Pharm.* **2016**, *501*, 278–299. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Grady, B.P. The Use of Solution Viscosity to Characterize Single-Walled Carbon Nanotube Dispersions. *Macromol. Chem. Phys.* **2006**, *207*, 2167–2169. [[CrossRef](#)]
12. Flahaut, E.; Bacsá, R.; Peigney, A.; Laurent, C. Gram-Scale CCVD Synthesis of Double-Walled Carbon Nanotubes. *Chem. Commun.* **2003**, *12*, 1442. [[CrossRef](#)]
13. Laurent, C.; Flahaut, E.; Peigney, A. The Weight and Density of Carbon Nanotubes versus the Number of Walls and Diameter. *Carbon* **2010**, *48*, 2994–2996. [[CrossRef](#)]
14. Mohajeri, M.; Behnam, B.; Sahebkar, A. Biomedical Applications of Carbon Nanomaterials: Drug and Gene Delivery Potentials. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *234*, 298–319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Gong, H.; Peng, R.; Liu, Z. Carbon Nanotubes for Biomedical Imaging: The Recent Advances. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 1951–1963. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Punbusayakul, N.; Talapatra, S.; Ajayan, P.M.; Surareungchai, W. Label-Free as-Grown Double Wall Carbon Nanotubes Bundles for Salmonella Typhimurium Immunoassay. *Chem. Cent. J.* **2013**, *7*, 102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Ojeda, I.; Barrejón, M.; Arellano, L.M.; González-Cortés, A.; Yáñez-Sedeño, P.; Langa, F.; Pingarrón, J.M. Grafted-Double Walled Carbon Nanotubes as Electrochemical Platforms for Immobilization of Antibodies Using a Metallic-Complex Chelating Polymer: Application to the Determination of Adiponectin Cytokine in Serum. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *74*, 24–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Wayu, M.B.; Pannell, M.J.; Labban, N.; Case, W.S.; Pollock, J.A.; Leopold, M.C. Functionalized Carbon Nanotube Adsorption Interfaces for Electron Transfer Studies of Galactose Oxidase. *Bioelectrochemistry* **2019**, *125*, 116–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Chen, H.; Huang, J.; Fam, D.; Tok, A. Horizontally Aligned Carbon Nanotube Based Biosensors for Protein Detection. *Bioengineering* **2016**, *3*, 23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Mansouri Majd, S.; Salimi, A. Ultrasensitive Flexible FET-Type Aptasensor for CA 125 Cancer Marker Detection Based on Carboxylated Multiwalled Carbon Nanotubes Immobilized onto Reduced Graphene Oxide Film. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1000*, 273–282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Ramnani, P.; Gao, Y.; Ozsoz, M.; Mulchandani, A. Electronic Detection of MicroRNA at Attomolar Level with High Specificity. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 8061–8064. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Peng, R.; Tang, X.S.; Li, D. Detection of Individual Molecules and Ions by Carbon Nanotube-Based Differential Resistive Pulse Sensor. *Small* **2018**, *14*, 1800013. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Zhang, X.; Xu, Y.; Ye, B. An Efficient Electrochemical Glucose Sensor Based on Porous Nickel-Based Metal Organic Framework/Carbon Nanotubes Composite (Ni-MOF/CNTs). *J. Alloys Compd.* **2018**, *767*, 651–656. [[CrossRef](#)]
24. Welsher, K.; Liu, Z.; Sherlock, S.P.; Robinson, J.T.; Chen, Z.; Daranciang, D.; Dai, H. A Route to Brightly Fluorescent Carbon Nanotubes for Near-Infrared Imaging in Mice. *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 773–780. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Welsher, K.; Sherlock, S.P.; Dai, H. Deep-Tissue Anatomical Imaging of Mice Using Carbon Nanotube Fluorophores in the Second Near-Infrared Window. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 8943–8948. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

26. Hong, G.; Shuo, D.; Antaris, A.L.; Chen, C.; Zhang, B.; Zhao, S.; Atochin, D.N.; Huang, P.L.; Andreasson, K.I.; Kuo, C.J.; et al. Through-Skull Fluorescence Imaging of the Brain in a New Near-Infrared Window. *Nat. Photonics* **2014**, *8*, 723–730. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Pan, J.; Li, F.; Choi, J.H. Single-Walled Carbon Nanotubes as Optical Probes for Bio-Sensing and Imaging. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 6511–6522. [[CrossRef](#)]
28. Yudasaka, M.; Yomogida, Y.; Zhang, M.; Tanaka, T.; Nakahara, M.; Kobayashi, N.; Okamatsu-Ogura, Y.; Machida, K.; Ishihara, K.; Saeki, K.; et al. Near-Infrared Photoluminescent Carbon Nanotubes for Imaging of Brown Fat. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 6272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. De La Zerda, A.; Zavaleta, C.; Keren, S.; Vaithilingam, S.; Bodapati, S.; Liu, Z.; Levi, J.; Smith, B.R.; Ma, T.-J.; Oralkan, O.; et al. Carbon Nanotubes as Photoacoustic Molecular Imaging Agents in Living Mice. *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 557–562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. De La Zerda, A.; Liu, Z.; Bodapati, S.; Teed, R.; Vaithilingam, S.; Khuri-Yakub, B.T.; Chen, X.; Dai, H.; Gambhir, S.S. Ultrahigh Sensitivity Carbon Nanotube Agents for Photoacoustic Molecular Imaging in Living Mice. *Nano Lett.* **2010**, *10*, 2168–2172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Liu, Z.; Tabakman, S.; Sherlock, S.; Li, X.; Chen, Z.; Jiang, K.; Fan, S.; Dai, H. Multiplexed Five-Color Molecular Imaging of Cancer Cells and Tumor Tissues with Carbon Nanotube Raman Tags in the near-Infrared. *Nano Res.* **2010**, *3*, 222–233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Gaufres, E.; Marcet, S.; Aymong, V.; Tang, N.Y.-W.; Favron, A.; Thouin, F.; Allard, C.; Rioux, D.; Cottenye, N.; Verhaegen, M.; et al. Hyperspectral Raman Imaging Using Bragg Tunable Filters of Graphene and Other Low-Dimensional Materials: Hyperspectral Raman Imaging Using Bragg Tunable Filters of Graphene and Other Low-Dimensional Materials. *J. Raman Spectrosc.* **2018**, *49*, 174–182. [[CrossRef](#)]
33. Hong, S.Y.; Tobias, G.; Al-Jamal, K.T.; Ballesteros, B.; Ali-Boucetta, H.; Lozano-Perez, S.; Nellist, P.D.; Sim, R.B.; Finucane, C.; Mather, S.J.; et al. Filled and Glycosylated Carbon Nanotubes for in Vivo Radioemitter Localization and Imaging. *Nat. Mater.* **2010**, *9*, 485–490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Servant, A.; Jacobs, I.; Bussy, C.; Fabbro, C.; da Ros, T.; Pach, E.; Ballesteros, B.; Prato, M.; Nicolay, K.; Kostarelos, K. Gadolinium-Functionalised Multi-Walled Carbon Nanotubes as a T1 Contrast Agent for MRI Cell Labelling and Tracking. *Carbon* **2016**, *97*, 126–133. [[CrossRef](#)]
35. Lovat, V.; Pantarotto, D.; Lagostena, L.; Cacciari, B.; Grandolfo, M.; Righi, M.; Spalluto, G.; Prato, M.; Ballerini, L. Carbon Nanotube Substrates Boost Neuronal Electrical Signaling. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 1107–1110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Mazzatenta, A.; Giugliano, M.; Campidelli, S.; Gambazzi, L.; Businaro, L.; Markram, H.; Prato, M.; Ballerini, L. Interfacing Neurons with Carbon Nanotubes: Electrical Signal Transfer and Synaptic Stimulation in Cultured Brain Circuits. *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 6931–6936. [[CrossRef](#)]
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* **2012**, *28*, 17363–17371. [[CrossRef](#)]
38. Matta-Domjan, B.; King, A.; Totti, S.; Matta, C.; Dover, G.; Martinez, P.; Zakhidov, A.; La Ragione, R.; Macedo, H.; Jurewicz, I.; et al. Biophysical Interactions between Pancreatic Cancer Cells and Pristine Carbon Nanotube Substrates: Potential Application for Pancreatic Cancer Tissue Engineering: pancreatic Cancer on Pristine CNT Substrates. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2018**, *106*, 1637–1644. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Correa-Duarte, M.A.; Wagner, N.; Rojas-Chapana, J.; Morsczech, C.; Thie, M.; Giersig, M. Fabrication and Biocompatibility of Carbon Nanotube-Based 3D Networks as Scaffolds for Cell Seeding and Growth. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 2233–2236. [[CrossRef](#)]
40. Abarrategi, A.; Gutiérrez, M.C.; Moreno-Vicente, C.; Hortigüela, M.J.; Ramos, V.; López-Lacomba, J.L.; Ferrer, M.L.; Del Monte, F. Multiwall Carbon Nanotube Scaffolds for Tissue Engineering Purposes. *Biomaterials* **2008**, *29*, 94–102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Han, J.Z.; Rider, A.E.; Ishaq, M.; Kumar, S.; Kondyurin, A.; Bilek, M.M.M.; Levchenko, I.; Ostrikov, K.K. Carbon Nanostructures for Hard Tissue Engineering. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 11058. [[CrossRef](#)]
42. Liu, Z.; Sun, X.; Nakayama-Ratchford, N.; Dai, H. Supramolecular Chemistry on Water-Soluble Carbon Nanotubes for Drug Loading and Delivery. *ACS Nano* **2007**, *1*, 50–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Liu, Z.; Fan, A.C.; Rakhra, K.; Sherlock, S.; Goodwin, A.; Chen, X.; Yang, Q.; Felsner, D.W.; Dai, H. Supramolecular Stacking of Doxorubicin on Carbon Nanotubes for In Vivo Cancer Therapy. *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7804–7808. [[CrossRef](#)]

44. Wells, C.; Vollin-Bringel, O.; Fiegel, V.; Harlepp, S.; Van der Schueren, B.; Bégin-Colin, S.; Bégin, D.; Mertz, D. Engineering of Mesoporous Silica Coated Carbon-Based Materials Optimized for an Ultrahigh Doxorubicin Payload and a Drug Release Activated by PH, T, and NIR-Light. *Adv. Funct. Mater.* **2018**, *28*, 1706996. [[CrossRef](#)]
45. Wu, W.; Li, R.; Bian, X.; Zhu, Z.; Ding, D.; Li, X.; Jia, Z.; Jiang, X.; Hu, Y. Covalently Combining Carbon Nanotubes with Anticancer Agent: Preparation and Antitumor Activity. *ACS Nano* **2009**, *3*, 2740–2750. [[CrossRef](#)]
46. Liu, X.; Xu, D.; Liao, C.; Fang, Y.; Guo, B. Development of a Promising Drug Delivery for Formononetin: Cyclodextrin-Modified Single-Walled Carbon Nanotubes. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2018**, *43*, 461–468. [[CrossRef](#)]
47. Shi Kam, N.W.; Jessop, T.C.; Wender, P.A.; Dai, H. Nanotube Molecular Transporters: Internalization of Carbon Nanotube–Protein Conjugates into Mammalian Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6850–6851. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Kostarelos, K.; Lacerda, L.; Pastorin, G.; Wu, W.; Wieckowski, S.; Luangsivilay, J.; Godefroy, S.; Pantarotto, D.; Briand, J.-P.; Muller, S.; et al. Cellular Uptake of Functionalized Carbon Nanotubes Is Independent of Functional Group and Cell Type. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 108–113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Bartholomeusz, G.; Cherukuri, P.; Kingston, J.; Cognet, L.; Jr, R.L.; Leeuw, T.K.; Gumbiner-Russo, L.; Weisman, R.B.; Powis, G. In Vivo Therapeutic Silencing of Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha (HIF-1) Using Single-Walled Carbon Nanotubes Noncovalently Coated with siRNA. *Nano Res.* **2009**, *13*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Ladeira, M.S.; Andrade, V.A.; Gomes, E.R.M.; Aguiar, C.J.; Moraes, E.R.; Soares, J.S.; Silva, E.E.; Lacerda, R.G.; Ladeira, L.O.; Jorio, A.; et al. Highly Efficient siRNA Delivery System into Human and Murine Cells Using Single-Wall Carbon Nanotubes. *Nanotechnology* **2010**, *21*, 385101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Sanz, V.; Tilmaciu, C.; Soula, B.; Flahaut, E.; Coley, H.M.; Silva, S.R.P.; McFadden, J. Chloroquine-Enhanced Gene Delivery Mediated by Carbon Nanotubes. *Carbon* **2011**, *49*, 5348–5358. [[CrossRef](#)]
52. Al-Jamal, K.T.; Gherardini, L.; Bardi, G.; Nunes, A.; Guo, C.; Bussy, C.; Herrero, M.A.; Bianco, A.; Prato, M.; Kostarelos, K.; et al. Functional Motor Recovery from Brain Ischemic Insult by Carbon Nanotube-Mediated siRNA Silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 10952–10957. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Mazzaglia, A.; Scala, A.; Sortino, G.; Zagami, R.; Zhu, Y.; Sciortino, M.T.; Pennisi, R.; Pizzo, M.M.; Neri, G.; Grassi, G.; et al. Intracellular Trafficking and Therapeutic Outcome of Multiwalled Carbon Nanotubes Modified with Cyclodextrins and Polyethylenimine. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2018**, *163*, 55–63. [[CrossRef](#)]
54. Kaboudin, B.; Saghatchi, F.; Kazemi, F.; Akbari-Birgani, S. A Novel Magnetic Carbon Nanotubes Functionalized with Pyridine Groups: Synthesis, Characterization and Their Application as an Efficient Carrier for Plasmid DNA and Aptamer. *ChemistrySelect* **2018**, *3*, 6743–6749. [[CrossRef](#)]
55. Xu, L.; Feng, L.; Dong, S.; Hao, J.; Yu, Q. Carbon Nanotubes Modified by a Paramagnetic Cationic Surfactant for Migration of DNA and Proteins. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2018**, *559*, 201–208. [[CrossRef](#)]
56. Kong, F.; Liu, F.; Li, W.; Guo, X.; Wang, Z.; Zhang, H.; Li, Q.; Luo, L.; Du, Y.; Jin, Y.; et al. Smart Carbon Nanotubes with Laser-Controlled Behavior in Gene Delivery and Therapy through a Non-Digestive Trafficking Pathway. *Small* **2016**, *12*, 6753–6766. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Burke, A.; Ding, X.; Singh, R.; Kraft, R.A.; Levi-Polyachenko, N.; Rylander, M.N.; Szot, C.; Buchanan, C.; Whitney, J.; Fisher, J.; et al. Long-Term Survival Following a Single Treatment of Kidney Tumors with Multiwalled Carbon Nanotubes and near-Infrared Radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 12897–12902. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Wang, C.; Xu, L.; Liang, C.; Xiang, J.; Peng, R.; Liu, Z. Immunological Responses Triggered by Photothermal Therapy with Carbon Nanotubes in Combination with Anti-CTLA-4 Therapy to Inhibit Cancer Metastasis. *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 8154–8162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Wang, S.; Lin, Q.; Chen, J.; Gao, H.; Fu, D.; Shen, S. Biocompatible Polydopamine-Encapsulated Gadolinium-Loaded Carbon Nanotubes for MRI and Color Mapping Guided Photothermal Dissection of Tumor Metastasis. *Carbon* **2017**, *112*, 53–62. [[CrossRef](#)]
60. Zhu, Y.; Sun, Q.; Liu, Y.; Ma, T.; Su, L.; Liu, S.; Shi, X.; Han, D.; Liang, F. Decorating Gold Nanostars with Multiwalled Carbon Nanotubes for Photothermal Therapy. *R. Soc. Open Sci.* **2018**, *5*, 180159. [[CrossRef](#)]

61. Wang, L.; Shi, J.; Zhang, H.; Li, H.; Gao, Y.; Wang, Z.; Wang, H.; Li, L.; Zhang, C.; Chen, C.; et al. Synergistic Anticancer Effect of RNAi and Photothermal Therapy Mediated by Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes. *Biomaterials* **2013**, *34*, 262–274. [[CrossRef](#)]
62. Hoffman, A.S. Hydrogels for Biomedical Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 18–23. [[CrossRef](#)]
63. Martinelli, V.; Bosi, S.; Peña, B.; Baj, G.; Long, C.S.; Sbaizero, O.; Giacca, M.; Prato, M.; Mestroni, L. 3D Carbon-Nanotube-Based Composites for Cardiac Tissue Engineering. *ACS Appl. Bio Mater.* **2018**, *1*, 1530–1537. [[CrossRef](#)]
64. Mamidi, N.; Leija, H.M.; Diabb, J.M.; Lopez Romo, I.; Hernandez, D.; Castrejón, J.V.; Martinez Romero, O.; Barrera, E.V.; Elias Zúñiga, A. Cytotoxicity Evaluation of Unfunctionalized Multiwall Carbon Nanotubes-Ultrahigh Molecular Weight Polyethylene Nanocomposites. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2017**, *105*, 3042–3049. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Vashist, A.; Kaushik, A.; Vashist, A.; Sagar, V.; Ghosal, A.; Gupta, Y.K.; Ahmad, S.; Nair, M. Advances in Carbon Nanotubes-Hydrogel Hybrids in Nanomedicine for Therapeutics. *Adv. Healthc. Mater.* **2018**, *7*, 1701213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Lin, C.-C.; Metters, A.T. Hydrogels in Controlled Release Formulations: Network Design and Mathematical Modeling. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, *58*, 1379–1408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Drury, J.L.; Mooney, D.J. Hydrogels for Tissue Engineering: Scaffold Design Variables and Applications. *Biomaterials* **2003**, *24*, 4337–4351. [[CrossRef](#)]
68. Bhattarai, N.; Gunn, J.; Zhang, M. Chitosan-Based Hydrogels for Controlled, Localized Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 83–99. [[CrossRef](#)]
69. Qiu, Y.; Park, K. Environment-Sensitive Hydrogels for Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 49–60. [[CrossRef](#)]
70. Peppas, N.; Bures, P.; Leobandung, W.; Ichikawa, H. Hydrogels in Pharmaceutical Formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *50*, 27–46. [[CrossRef](#)]
71. Cirillo, G.; Hampel, S.; Spizzirri, U.G.; Parisi, O.I.; Picci, N.; Iemma, F. Carbon Nanotubes Hybrid Hydrogels in Drug Delivery: A Perspective Review. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 1–17. [[CrossRef](#)]
72. Kim, Y.-H.; Park, S.; Won, K.; Kim, H.J.; Lee, S.H. Bacterial Cellulose-Carbon Nanotube Composite as a Biocompatible Electrode for the Direct Electron Transfer of Glucose Oxidase: Biocompatible Electrode for Direct Electron Transfer of Glucose Oxidase. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2013**, *88*, 1067–1070. [[CrossRef](#)]
73. Comba, F.N.; Romero, M.R.; Garay, F.S.; Baruzzi, A.M. Mucin and Carbon Nanotube-Based Biosensor for Detection of Glucose in Human Plasma. *Anal. Biochem.* **2018**, *550*, 34–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Fatoni, A.; Numnuam, A.; Kanatharana, P.; Limbut, W.; Thammakhet, C.; Thavarungkul, P. A Highly Stable Oxygen-Independent Glucose Biosensor Based on a Chitosan-Albumin Cryogel Incorporated with Carbon Nanotubes and Ferrocene. *Sens. Actuators B Chem.* **2013**, *185*, 725–734. [[CrossRef](#)]
75. Barone, P.W.; Yoon, H.; Ortiz-García, R.; Zhang, J.; Ahn, J.-H.; Kim, J.-H.; Strano, M.S. Modulation of Single-Walled Carbon Nanotube Photoluminescence by Hydrogel Swelling. *ACS Nano* **2009**, *3*, 3869–3877. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Lee, S.-H.; Kim, T.H.; Lima, M.D.; Baughman, R.H.; Kim, S.J. Biothermal Sensing of a Torsional Artificial Muscle. *Nanoscale* **2016**, *8*, 3248–3253. [[CrossRef](#)]
77. Lee, J.; Ko, S.; Kwon, C.H.; Lima, M.D.; Baughman, R.H.; Kim, S.J. Carbon Nanotube Yarn-Based Glucose Sensing Artificial Muscle. *Small* **2016**, *12*, 2085–2091. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Hosseini, H.; Kokabi, M.; Mousavi, S.M. Conductive Bacterial Cellulose/Multiwall Carbon Nanotubes Nanocomposite Aerogel as a Potentially Flexible Lightweight Strain Sensor. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *201*, 228–235. [[CrossRef](#)]
79. Andrews, R.; Weisenberger, M.C. Carbon Nanotube Polymer Composites. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2004**, *8*, 31–37. [[CrossRef](#)]
80. Yildirim, E.D.; Yin, X.; Nair, K.; Sun, W. Fabrication, Characterization and Biocompatibility of Single-Walled Carbon Nanotube-Reinforced Alginate Composite Scaffolds Manufactured Using Freeform Fabrication Technique. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2008**, *87B*, 406–414. [[CrossRef](#)]
81. Shin, S.R.; Bae, H.; Cha, J.M.; Mun, J.Y.; Chen, Y.-C.; Tekin, H.; Shin, H.; Farshchi, S.; Dokmeci, M.R.; Tang, S.; et al. Carbon Nanotube Reinforced Hybrid Microgels as Scaffold Materials for Cell Encapsulation. *ACS Nano* **2012**, *6*, 362–372. [[CrossRef](#)]

82. Ahadian, S.; Ramón-Azcón, J.; Estili, M.; Liang, X.; Ostrovidov, S.; Shiku, H.; Ramalingam, M.; Nakajima, K.; Sakka, Y.; Bae, H.; et al. Hybrid Hydrogels Containing Vertically Aligned Carbon Nanotubes with Anisotropic Electrical Conductivity for Muscle Myofiber Fabrication. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 4271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Ahadian, S.; Yamada, S.; Ramón-Azcón, J.; Estili, M.; Liang, X.; Nakajima, K.; Shiku, H.; Khademhosseini, A.; Matsue, T. Hybrid Hydrogel-Aligned Carbon Nanotube Scaffolds to Enhance Cardiac Differentiation of Embryoid Bodies. *Acta Biomater.* **2016**, *31*, 134–143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Yu, H.; Zhao, H.; Huang, C.; Du, Y. Mechanically and Electrically Enhanced CNT–Collagen Hydrogels As Potential Scaffolds for Engineered Cardiac Constructs. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2017**, *3*, 3017–3021. [[CrossRef](#)]
85. Pok, S.; Vitale, F.; Eichmann, S.L.; Benavides, O.M.; Pasquali, M.; Jacot, J.G. Biocompatible Carbon Nanotube–Chitosan Scaffold Matching the Electrical Conductivity of the Heart. *ACS Nano* **2014**, *8*, 9822–9832. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Zhang, L.G.; Im, O.; Li, J.; Keidar, M. Biomimetic Three-Dimensional Nanocrystalline Hydroxyapatite and Magnetically Synthesized Single-Walled Carbon Nanotube Chitosan Nanocomposite for Bone Regeneration. *Int. J. Nanomed.* **2012**, *7*, 2087–2099. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Cancian, G.; Tozzi, G.; Hussain, A.A.B.; De Mori, A.; Roldo, M. Carbon Nanotubes Play an Important Role in the Spatial Arrangement of Calcium Deposits in Hydrogels for Bone Regeneration. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2016**, *27*, 126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Liu, X.; Kim, J.C.; Miller, A.L.; Waletzki, B.E.; Lu, L. Electrically Conductive Nanocomposite Hydrogels Embedded with Functionalized Carbon Nanotubes for Spinal Cord Injury. *New J. Chem.* **2018**, *42*, 17671–17681. [[CrossRef](#)]
89. Sheikholeslam, M.; Wheeler, S.D.; Duke, K.G.; Marsden, M.; Pritzker, M.; Chen, P. Peptide and Peptide–Carbon Nanotube Hydrogels as Scaffolds for Tissue & 3D Tumor Engineering. *Acta Biomater.* **2018**, *69*, 107–119. [[CrossRef](#)]
90. Li, H.; He, J.; Zhao, Y.; Wang, G.; Wei, Q. The Effect of Carbon Nanotubes Added into Bullfrog Collagen Hydrogel on Gentamicin Sulphate Release: In Vitro. *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* **2011**, *21*, 890–892. [[CrossRef](#)]
91. Cirillo, G.; Vittorio, O.; Hampel, S.; Iemma, F.; Parchi, P.; Cecchini, M.; Puoci, F.; Picci, N. Quercetin Nanocomposite as Novel Anticancer Therapeutic: Improved Efficiency and Reduced Toxicity. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *49*, 359–365. [[CrossRef](#)]
92. Spizzirri, U.G.; Hampel, S.; Cirillo, G.; Nicoletta, F.P.; Hassan, A.; Vittorio, O.; Picci, N.; Iemma, F. Spherical Gelatin/CNTs Hybrid Microgels as Electro-Responsive Drug Delivery Systems. *Int. J. Pharm.* **2013**, *448*, 115–122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Curcio, M.; Spizzirri, U.G.; Cirillo, G.; Vittorio, O.; Picci, N.; Nicoletta, F.P.; Iemma, F.; Hampel, S. On Demand Delivery of Ionic Drugs from Electro-Responsive CNT Hybrid Films. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 44902–44911. [[CrossRef](#)]
94. Servant, A.; Bussy, C.; Al-Jamal, K.; Kostarelos, K. Design, Engineering and Structural Integrity of Electro-Responsive Carbon Nanotube- Based Hydrogels for Pulsatile Drug Release. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 4593. [[CrossRef](#)]
95. Servant, A.; Methven, L.; Williams, R.P.; Kostarelos, K. Electroresponsive Polymer–Carbon Nanotube Hydrogel Hybrids for Pulsatile Drug Delivery In Vivo. *Adv. Healthc. Mater.* **2013**, *2*, 806–811. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Peng, X.; Zhuang, Q.; Peng, D.; Dong, Q.; Tan, L.; Jiao, F.; Liu, L. Sustained Release of Naproxen in a New Kind Delivery System of Carbon Nanotubes Hydrogel. *Iran. J. Pharm. Res.* **2013**, *12*, 581–586.
97. Ye, Y.; Mao, Y.; Wang, H.; Ren, Z. Hybrid Structure of PH-Responsive Hydrogel and Carbon Nanotube Array with Superwettability. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 2449–2455. [[CrossRef](#)]
98. Wei, C.; Dong, X.; Zhang, Y.; Liang, J.; Yang, A.; Zhu, D.; Liu, T.; Kong, D.; Lv, F. Simultaneous Fluorescence Imaging Monitoring of the Programmed Release of Dual Drugs from a Hydrogel–Carbon Nanotube Delivery System. *Sens. Actuators B Chem.* **2018**, *273*, 264–275. [[CrossRef](#)]
99. Hindumathi, R.; Jagannatham, M.; Haridoss, P.; Sharma, C.P. Novel Nano-Cocoon like Structures of Polyethylene Glycol–Multiwalled Carbon Nanotubes for Biomedical Applications. *Nano-Struct. Nano-Objects* **2018**, *13*, 30–35. [[CrossRef](#)]

100. Kuche, K.; Maheshwari, R.; Tambe, V.; Mak, K.-K.; Jogi, H.; Raval, N.; Pichika, M.R.; Kumar Tekade, R. Carbon Nanotubes (CNTs) Based Advanced Dermal Therapeutics: Current Trends and Future Potential. *Nanoscale* **2018**, *10*, 8911–8937. [[CrossRef](#)]
101. Im, J.S.; Bai, B.C.; Lee, Y.-S. The Effect of Carbon Nanotubes on Drug Delivery in an Electro-Sensitive Transdermal Drug Delivery System. *Biomaterials* **2010**, *31*, 1414–1419. [[CrossRef](#)]
102. Bhunia, T.; Giri, A.; Nasim, T.; Chattopadhyay, D.; Bandyopadhyay, A. A Transdermal Diltiazem Hydrochloride Delivery Device Using Multi-Walled Carbon Nanotube/Poly(Vinyl Alcohol) Composites. *Carbon* **2013**, *52*, 305–315. [[CrossRef](#)]
103. Giri, A.; Bhunia, T.; Mishra, S.R.; Goswami, L.; Panda, A.B.; Bandyopadhyay, A. A Transdermal Device from 2-Hydroxyethyl Methacrylate Grafted Carboxymethyl Guar Gum–Multi-Walled Carbon Nanotube Composites. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 13546. [[CrossRef](#)]
104. Guillet, J.-F.; Flahaut, E.; Golzio, M. A Hydrogel/Carbon-Nanotube Needle-Free Device for Electrostimulated Skin Drug Delivery. *ChemPhysChem* **2017**, *18*, 2715–2723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Liang, F.; Billups, E. Water-Soluble Single-Wall Carbon Nanotubes as a Platform Technology for Biomedical Applications. U.S. Patent 2007/0110658 A1, 17 May 2007.
106. Harmon, J.P.; Clayton, L.M. Polymer/Carbon Nanotube Composites, Methods of Use and Methods of Synthesis Thereof. U.S. Patent 7,754,055 B2, 13 July 2010.
107. Sheng, X.H.; Coates, D.; Dong, L.; Xia, F.G.; Chung, G.Q. Methods to Improve the Electrical Conductivity for Moulded Plastic Parts. U.S. Patent 2014/0001415 A1, 2 January 2014.
108. Wallace, G.G.; Chen, J.; Minett, A.I.; Clark, G.M. Nanostructured Composites. U.S. Patent 2010/0068461 A1, 18 March 2010.
109. Argenta, L.; Levi, N.H.; Morykwas, M.; Walles, E.; McGee, M.; Wagner, W.D.; Graham, E. Methods and Compositions for Inhibiting Fibrosis, Scarring and/or Fbrotc Contractures. U.S. Patent 2015/0367031 A1, 24 December 2015.
110. Ko, F.K.; Sukigara, S.; Gandhi, M.; Ayutsede, J. Electrospun Carbon Nanotube Reinforced Silk Fibers. U.S. Patent 2007/0082197 A1, 12 April 2007.
111. Harmon, J.P.; Muisener, P.A.O.; Clayton, L.M.; D'Angelo, J. Carbon Nanotubeapolymer Composites Resistant to Ionzing Radiation. U.S. Patent 8,815,144 B2, 26 October 2014.
112. Li, G.; Liao, J.M.; Hu, G.Q.; Ma, N.Z.; Wu, P.J. Study of Carbon Nanotube Modified Biosensor for Monitoring Total Cholesterol in Blood. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 2140–2144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Flahaut, E.; Evariste, L.; Gauthier, L.; Larue, C.; Line, C.; Meunier, É.; Mouchet, F. Toxicité des nanotubes de carbone envers l'homme et l'environnement. *Tech. L'ingénieur* **2018**, *22*, NM8155 v1.
114. Madani, S.Y.; Mandel, A.; Seifalian, A.M. A Concise Review of Carbon Nanotube's Toxicology. *Nano Rev.* **2013**, *4*, 21521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Cui, H.-F.; Vashist, S.K.; Al-Rubeaan, K.; Luong, J.H.T.; Sheu, F.-S. Interfacing Carbon Nanotubes with Living Mammalian Cells and Cytotoxicity Issues. *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23*, 1131–1147. [[CrossRef](#)]
116. Ali-Boucetta, H.; Kostarelos, K. Pharmacology of Carbon Nanotubes: Toxicokinetics, Excretion and Tissue Accumulation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 2111–2119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Georgin, D.; Czarny, B.; Botquin, M.; Mayne-L'Hermite, M.; Pinault, M.; Bouchet-Fabre, B.; Carriere, M.; Poncy, J.-L.; Chau, Q.; Maximilien, R.; et al. Preparation of <sup>14</sup>C-Labeled Multiwalled Carbon Nanotubes for Biodistribution Investigations. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14658–14659. [[CrossRef](#)]
118. Wang, J.T.-W.; Fabbro, C.; Venturelli, E.; Ménard-Moyon, C.; Chaloin, O.; Da Ros, T.; Methven, L.; Nunes, A.; Sosabowski, J.K.; Mather, S.J.; et al. The Relationship between the Diameter of Chemically-Functionalized Multi-Walled Carbon Nanotubes and Their Organ Biodistribution Profiles in Vivo. *Biomaterials* **2014**, *35*, 9517–9528. [[CrossRef](#)]
119. Czarny, B.; Georgin, D.; Berthon, F.; Plastow, G.; Pinault, M.; Patriarche, G.; Thuleau, A.; L'Hermite, M.M.; Taran, F.; Dive, V. Carbon Nanotube Translocation to Distant Organs after Pulmonary Exposure: Insights from in Situ <sup>14</sup>C-Radiolabeling and Tissue Radioimaging. *ACS Nano* **2014**, *8*, 5715–5724. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Alshehri, R.; Ilyas, A.M.; Hasan, A.; Arnaout, A.; Ahmed, F.; Memic, A. Carbon Nanotubes in Biomedical Applications: Factors, Mechanisms and Remedies of Toxicity: Miniperspective. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 8149–8167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

121. Meunier, É.; Coste, A.; Olganier, D.; Auhtier, H.; Lefèvre, L.; Dardenne, C.; Bernad, J.; Béraud, M.; Flahaut, E.; Pipy, B. Double-Walled Carbon Nanotubes Trigger IL-1 $\beta$  Release in Human Monocytes through Nlrp3 Inflammasome Activation. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2012**, *8*, 987–995. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Crouzier, D.; Follot, S.; Gentilhomme, E.; Flahaut, E.; Arnaud, R.; Dabouis, V.; Castellarin, C.; Debouzy, J.C. Carbon Nanotubes Induce Inflammation but Decrease the Production of Reactive Oxygen Species in Lung. *Toxicology* **2010**, *272*, 39–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Kostarelos, K. The Long and Short of Carbon Nanotube Toxicity. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 774–776. [[CrossRef](#)]
124. Pumera, M. Nanotoxicology: The Molecular Science Point of View. *Chem. Asian J.* **2011**, *6*, 340–348. [[CrossRef](#)]
125. Papanikolaou, G.; Pantopoulos, K. Iron Metabolism and Toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, *202*, 199–211. [[CrossRef](#)]
126. Allen, B.L.; Kotchey, G.P.; Chen, Y.; Yanamala, N.V.K.; Klein-Seetharaman, J.; Kagan, V.E.; Star, A. Mechanistic Investigations of Horseradish Peroxidase-Catalyzed Degradation of Single-Walled Carbon Nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17194–17205. [[CrossRef](#)]
127. Mottier, A.; Mouchet, F.; Laplanche, C.; Cadarsi, S.; Lagier, L.; Arnault, J.-C.; Girard, H.; Leon, V.; Vazquez, E.; Sarrieu, C.; et al. Surface Area of Carbon Nanoparticles: A Dose Metric for a More Realistic Ecotoxicological Assessment. *Nano Lett.* **2016**, *16*, 3514–3518. [[CrossRef](#)]
128. Bellingeri, R.; Alustiza, F.; Picco, N.; Acevedo, D.; Molina, M.A.; Rivero, R.; Grosso, C.; Motta, C.; Barbero, C.; Vivas, A. In Vitro Toxicity Evaluation of Hydrogel-Carbon Nanotubes Composites on Intestinal Cells. *J. Appl. Polym. Sci.* **2015**, *132*, 41370. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



## Article

# Transdermal Delivery of Macromolecules Using Two-in-One Nanocomposite Device for Skin Electroporation

Juliette Simon <sup>1,2</sup>, Bastien Jouanmiquéou <sup>1</sup>, Marie-Pierre Rols <sup>1</sup> , Emmanuel Flahaut <sup>2,\*</sup> and Muriel Golzio <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, IPBS, Université de Toulouse, CNRS, UPS, Université Toulouse 3—Paul Sabatier, 205 Route de Narbonne, CEDEX 4, 31077 Toulouse, France; juliette.simon@univ-tlse3.fr (J.S.); bastien.jouanmiquéou@ipbs.fr (B.J.); rols@ipbs.fr (M.-P.R.)

<sup>2</sup> Centre Interuniversitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux, CIRIMAT, Université de Toulouse, CNRS, Université Toulouse 3—Paul Sabatier, 118 Route de Narbonne, CEDEX 9, 31062 Toulouse, France

\* Correspondence: flahaut@chimie.ups-tlse.fr (E.F.); muriel.golzio@ipbs.fr (M.G.); Tel.: +33-561-55-6970 (E.F.); +33-561-17-5813 (M.G.)

**Abstract:** Delivery of hydrophilic molecules through the skin using electroporation is a promising alternative approach to intradermal injection. Recently, we developed a two-in-one electrode/reservoir material composed of carbon nanotubes and agarose hydrogel. In this work, we evaluated the potential of the device to achieve non-invasive transdermal drug delivery using skin electroporation. As it involved an electrode configuration different from the literature, critical questions were raised. First, we demonstrated the efficiency of the device to permeabilize the skin of hairless mice, as observed by propidium iodide (PI) uptake in the nuclei of the epidermis cells through macro fluorescence imaging and histology. Application of Lucifer yellow (LY) at different times after unipolar electroporation treatment demonstrated the partial reversibility of the skin permeabilization after 30 min, and as such, that barrier function properties tended to be restored. We uncovered, for the first time to our knowledge, an intrinsic asymmetry of permeation pathways generated in the *stratum corneum* during treatment. Electrophoresis was here the main driving force for macromolecule delivery, but it competed with passive diffusion through the generated aqueous pathways for smaller molecules. Finally, we validated 4 kDa dextran labelled with fluorescein isothiocyanate (FD4) as a model molecule to optimize the electrical parameters, needed to improve macromolecule delivery.

**Keywords:** skin electroporation; macromolecule delivery; carbon nanotubes; hydrogel composite



**Citation:** Simon, J.; Jouanmiquéou, B.; Rols, M.-P.; Flahaut, E.; Golzio, M. Transdermal Delivery of Macromolecules Using Two-in-One Nanocomposite Device for Skin Electroporation. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1805. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111805>

Academic Editor: Bozena B. Michniak-Kohn

Received: 29 September 2021

Accepted: 23 October 2021

Published: 28 October 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Transdermal delivery is a very interesting route to explore for drug delivery. Compared to other routes, it can be fast and allow longer-term delivery. As an example, it can be considered a suitable substitute for oral delivery when drug degradation occurring during digestion hinders its efficiency too much. However, to achieve transdermal delivery it needs to cross the *stratum corneum* (SC), the most external layer of the epidermis. The SC is composed of corneocytes and lipids organized in multilamellar bilayers, and plays a major role in the skin barrier properties. Consequently, skin is impermeable to the passive diffusion of most hydrophilic and high molecular weight drugs, leading to the use of needles for direct injection [1]. The crossing of that hydrophobic protective layer is the main challenge for the development of alternative transdermal delivery methods and particularly for those intended to be non-invasive. Through the years, many technologies were considered for transdermal delivery, relying on chemical enhancers, physical approaches such as ultrasound and iontophoresis, or microporation techniques involving microneedles, which were widely studied for the variety of composition and shaping they offer [2–4].

Among the physical methods, electroporation (EP) consists of the application of high voltage pulses resulting in the reversible destabilization of the cell bilayer membrane, allowing molecule exchanges. Its efficiency was demonstrated in vivo to potentiate the

uptake of anticancer drugs or even DNA [5–8]. The application of EP to a complex structure like skin has been investigated since the last two decades, allowing us to have now a better insight of permeabilization mechanisms. According to Pliquett et al. [9], application of high voltage pulses induced stochastic pores formation within the SC multilamellar lipid bilayers. The formation of those pores, or aqueous pathways, combined with Joules effects, resulted in the expansion of permeable regions, called local transport regions (LTRs), whose size and number depended on pulses voltage and duration [9–11]. Several works also focused on the development of mathematical and numerical models [12–14]. The feasibility of skin EP for transdermal delivery was also widely studied. Lombry et al. [15] demonstrated that the transdermal delivery of molecules sometimes up to 40 kDa using EP was possible *in vitro*. Further investigations pointed out the importance of the electrical parameters' optimization, as well as the physicochemical properties of the drug [10]. *In vivo* studies demonstrated that the delivery of fentanyl in rats was reduced from hours to a few minutes using skin fold configuration [16]. Enhanced delivery of fluorescein isothiocyanate-labelled 4 kDa dextran compared to passive diffusion was achieved using a patch, removed during EP with multiarray electrodes, and reapplied afterward [17]. However, for more convenience, electrode configuration and reservoir availability need to be optimized.

The use of carbon nanotubes-based nanocomposites for biomedical applications has recently been spreading. Carbon nanotubes (CNT) alone were shown to be promising for biosensors [18,19], drug delivery [20] and tissue engineering [21,22], but toxicity concerns prevent most of their utilization in clinical trials [23]. An alternative to make the best of CNT outstanding mechanical and electrical properties while avoiding CNT exposure to tissue is to embed them in a biocompatible matrix, such as hydrogels. These CNT-based nanocomposites exhibited an even wider application range, thanks to the 3D porous structure provided by the hydrogel matrix [24]. We drew inspiration from this strategy to address the non-invasive transdermal delivery challenge. We developed a two-in-one material, a CNT-agarose nanocomposite, which would play both roles of being electrodes for skin EP and a reservoir for the drug. The application of two of those nanocomposite electrodes, directly on skin, enabled us to perform simultaneous skin permeabilization and drug delivery. The utilization of such platforms with unipolar pulses allowed us to obtain promising preliminary *ex vivo* results in a previous work [25]. The electrical characterization of the nanocomposite was also presented elsewhere [26].

In this study, we went a step further in the validation of the developed nanocomposite as a suitable solution to achieve transdermal delivery of hydrophilic molecules and macromolecules through skin permeabilization. We validated the actual permeabilization of the skin using propidium iodide (PI) and evaluated using the Lucifer yellow (LY) transitory nature of the permeabilization, vital to achieve fully non-invasive delivery. We also investigated the effect of the size and the charge of the loaded molecules using fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled 4 kDa dextran (FD4) and charged derivatives as models for hydrophilic macromolecules. As a conclusion, we proposed a mechanistic explanation of the phenomena involved and further developments that would be needed to improve further this two-in-one platform for electro-stimulated delivery.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Platform Preparation

The nanocomposite synthesis was already reported elsewhere [25,26]. Briefly, a solution of agarose at 25 g/L was mixed at 90 °C with a suspension at 0.25 g/L in water of doubled-walled CNT synthesized in our lab [27]. Carboxymethylcellulose with ultra-low viscosity was used to ensure homogeneity of highly hydrophobic carbon nanotubes in the hydrogels [28] and to facilitate the dispersion steps of sonication and shear mixing. The suspension was casted into 10 mm-diameter cylindrical molds (2 mm height) and left to cool down at room temperature. The obtained hydrogels were fully dried at 30 °C and finally swelled into electroporation buffer containing fluorescent markers. Their final diameter

was  $d = 8.4 \pm 0.4$  mm. A schematic representation of the process, adapted from [25], can be found Figure S1. Propidium iodide (PI), at 100  $\mu$ M, was used here as a permeabilization marker. We used 4 kDa FITC Dextran (FD4), at 1 mM to mimic macromolecule size. Lucifer yellow (LY), at 1 mM, following the work of Leclerc et al. [29], was used to study the reversibility of the skin permeation and the influence of the molecule size. FD4 grafted with carboxymethyl groups to be negatively charged (FD4-CM) at 1 mM, and FD4 grafted with diethylaminoethyl groups to be positively charged (FD4-DEAE) at 1 mM, were used to study the influence of the molecule charge. Finally, we challenged our model molecules by comparing it to insulin-FITC (I-FITC) at 0.111 mM. We took into account the FITC substitution ratio in each molecule to ensure to have the same FITC molar concentration in the different solutions. All reagents and fluorescent markers were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and diluted in 10 mM phosphate buffer.

### 2.2. Electroporation Treatment on Mice Skins

Explanted skins from different mice strains were obtained less than 1 h before experiment, depending on availability: Female nude Balb/c AnNRj-Foxn1nu mice (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) aged of 10 to 12 weeks and weighing between 20 and 24 g; female nude NMRI-nu mice (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) aged of 8 to 16 weeks and weighing between 25 and 35 g; female hairless SKH1 mice (Charles River, Écully, France) aged of 8 to 16 weeks and weighing between 25 and 35 g. Dorsal skins were placed on a gauze soaked with commercial PBS solution without Ca<sup>+</sup> and Mg<sup>+</sup> (Eurobio, Les Ulis, France) in a petri dish, SC facing upward. Molecule-loaded platforms were placed directly on top of the skins. We used a custom-made electroporation support to ensure a constant 0.5 cm gap between the edges of both platforms. Stainless steel cylinders were used to ensure a homogeneous contact between the platform and the skin, and to electrically connect the platforms to the generator. Unipolar square wave pulses were delivered by a ELECTRO cell B10 HVLV, (Betatech, Saint-Orens-de-Gameville, France): set voltage = 300 V, duration = 20 ms, frequency = 1 Hz, 8 pulses, inspired from [30]. In all our experiments, the cathode side was defined as the negative pole. Treated skins were rinsed three times with PBS before imaging to remove non-absorbed markers on the skin.

### 2.3. Mice Skin Surface Fluorescence Imaging

Samples were observed with an upright Macrofluor fluorescence microscope, EL6000 source (Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France), equipped with a Cool Snap HQ Camera (Roper Scientific, Ottobrunn, Germany), and Metamorph (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) image acquisition software was used. Samples were imaged by fluorescence using appropriate filters: Leica L5 filter (excitation filter BP: 480/40 nm, dich. 505LP, emission filter BP: 527/30 nm) was used for FITC and LY, and Leica 49,008 ET mCH/TR filter (excitation filter BP: 560/40 nm, dich. 585LP, emission filter BP: 630/75 nm) was used for PI imaging (exposure time = 1 s). All filters were purchased from Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France. Images were processed for contrast and brightness, and analyzed with ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Quantification of fluorescent marker uptake was corrected using a ratio between the mean intensity of treated and non-treated areas in the same image, to avoid any bias induced by skins autofluorescence variability. All following graphics display the calculated relative fluorescence intensity (RFI) of each marker.

### 2.4. Histology

Immediately after imaging, the treated areas were removed and fixed overnight at 4 °C in periodate-lysine-paraformaldehyde buffer (PLP). The PLP was rinsed three times with PBS and samples were left for 24 h in successive sucrose baths of 15% and 30%, before being embedded in OCT for cryo-conservation (Shandon Cryomatrix, Richard-Allan Scientific, Subsidiary of Thermo Fisher Scientific, Kalamazoo, MI, USA). Slices of 10- $\mu$ m were sectioned and DAPI was used for nuclei labelling (Mounting Medium with DAPI—

Aqueous, Fluoroshield, Abcam, Cambridge, UK). To evaluate the penetration depths of the different fluorescent markers, the slices were observed with an AxioImager M2 equipped with a plan apochromat 40×/0.95 korr M27 objective and an AxioCam 503 color camera (Zeiss, Jena, Germany). Slides were imaged by fluorescence using appropriate filters: Zeiss 96 HE BP (excitation filter BP: 370–410 nm, emission filter BP: 430–470 nm) was used for DAPI observation, Zeiss 38 HE Green Fluorescent Prot. (excitation filter BP: 450–490 nm, emission filter BP: 500–550 nm) was used for FITC and LY, and Zeiss 20 HE Rhodamine (excitation filter BP: 540–552 nm, emission filter BP: 575–640 nm) was for used PI. All filters were purchased from Zeiss, Jena, Germany.

### 2.5. Statistical Analysis

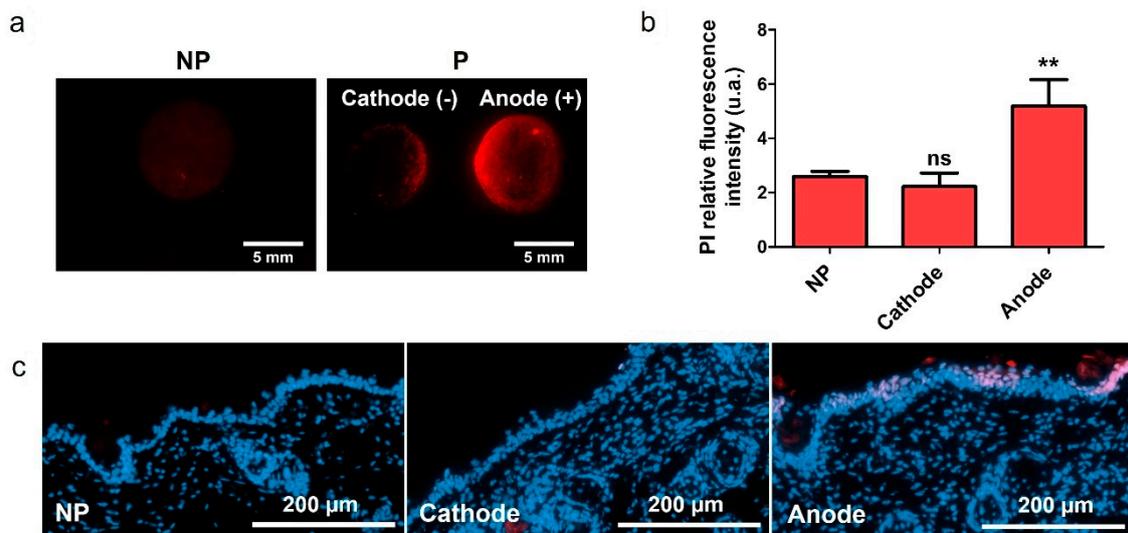
Data analyses were performed using GraphPad Prism 5.04 program (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) and data were expressed as means ± SEM for the number of experiments indicated in the legends of the figures. Multiple comparisons were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post-tests: Turkey's multiple comparisons or Dunnett's comparison against control.

## 3. Results

### 3.1. Two-in-One Device Allows Skin Electroporation

In our previous work, we demonstrated that the proposed device was able to increase the uptake of FD4 in the skin [25]. In this work, we tried to deepen our understanding of the phenomena involved, and the first step was to demonstrate that we achieve skin permeabilization. To do so, platforms loaded with PI were used to treat hairless mice skins. The marking pattern evidenced differences, we observed an asymmetry of PI delivery between the anode and the cathode, but also a non-uniformity of the delivery into the skin below the electrodes (Figure 1a). The quantification of the relative fluorescence intensity (RFI) confirmed the observed increased uptake of PI on the anode side, compared to the natural uptake that was obtained after 30 min (Figure 1b). The uptake on the cathode side was not significantly different from the control (non-pulsed platform). We performed histological observations on those samples (Figure 1c). The presence of red nuclei in the epidermis on the anode side demonstrated that PI was able to cross the SC. On the other hand, red nuclei were rarely observed on the cathode side.

PI is a red DNA intercalant, which labels the nucleus of cells with a permeable plasma membrane. As such, it is not only a useful marker to detect and quantify electroporation, but it can also be used to reveal cell death. To determine if the electroporation treatment was inducing cellular death, skins were treated with platform loaded with buffer only, and 30 min after, to allow potential resealing to occur, 100 µL of PI at 100 µM was applied. In parallel, the same amount of PI was directly applied on non-pulsed skin to compare the uptake. In both cases, PI was left for 30 min at 37 °C and rinsed before imaging. The quantification of PI RFI revealed no significant differences between the skin PI natural uptake and the uptake 30 min after treatment (Figure S2). We concluded that cell death was not involved in a significant way during our experiments. From this point, histological observations indicated that the device used with unipolar pulses allowed us to achieve skin permeabilization. However, an asymmetry of the delivery was still present and might be related to several phenomena. It could be the result of electrophoretic forces, pushing or pulling positively charged PI depending on the electrode. Our second hypothesis was that the use of unipolar pulses might generate asymmetric permeation structures in the skin, leading to more or less available pathways for the drug to be delivered.



**Figure 1.** Evaluation of skin permeabilization using the two-in-one nanocomposite device for EP. Platforms loaded with PI (100 µM) were used to apply unipolar EP treatment on fresh hairless mice skin explants. Skins were imaged 30 min after. (a) Marking pattern of skins treated with unipolar-pulsed electric field, platforms loaded with PI. (b) Quantification of PI RFI at the cathode and anode of treated skins (P), compared to the PI RFI of non-pulsed (NP) skins. Statistical analysis: one-way ANOVA, with Dunnett's post-test vs. NP. (Codes signification: \*\* =  $p > 0.01$ ; ns = non-significant).  $n = 9$ . (c) Histological observations of 10 µm slices of skin treated with EP using platforms loaded with PI. PI is in red, and nuclei are labelled in blue by DAPI.

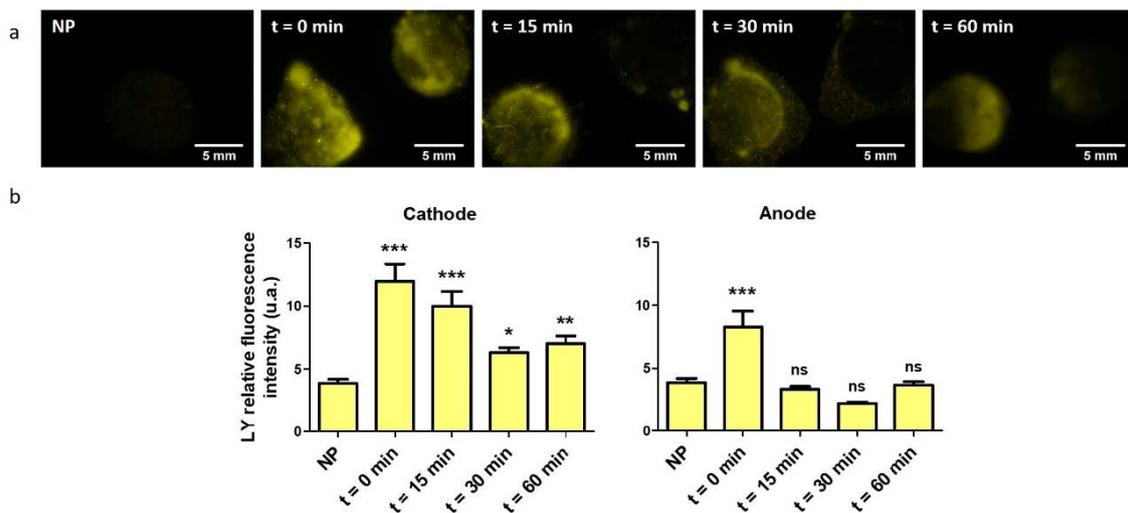
### 3.2. Evaluation of the Skin Permeabilization Transitory Nature

The reversibility of the skin permeabilization is a compulsory feature to develop a fully non-invasive delivery method through EP. To evaluate it, we used a second fluorescent smaller molecule, Lucifer yellow (LY), already used in the literature to assess the state of skin barrier function [29]. Here, platforms loaded with electroporation buffer were used to perform EP treatment, and 100 µL of LY were spread on top of the treated area after 0, 15, 30 or 60 min. The samples were left for 1 h at 37 °C, before rinsing and imaging. The marking pattern showed an equivalent and intense marking at both electrodes when LY was applied directly after treatment (Figure 2a). The fluorescence intensity decreased at the anode when 15 min was waited before application, an equivalent pattern was observed for a 30 min and 60 min delay. RFI quantification was done for the different time points (Figure 2b). The results showed a decrease of the LY uptake at both electrodes as a function of time, which hinted that the skin tended to retrieve its original impermeability. Nevertheless, the return at the cathode side was not complete, as the uptake stagnated between 30 and 60 min after EP. On the contrary, the statistical analysis demonstrated that the skin original impermeability was reached after 15 min at the anode side (Figure 2b). This experiment also evidenced an asymmetric uptake between both electrodes. It was approximately 1.5 times higher at the cathode directly after treatment, and there was no more improved delivery at the anode side after 15 min. The LY uptake in this experiment occurred without the presence of an electric field, meaning the only driving force allowing fluorescent dye to penetrate the skin was passive diffusion. This result could imply that unipolar pulses generate different pathways depending on the electrode polarity.

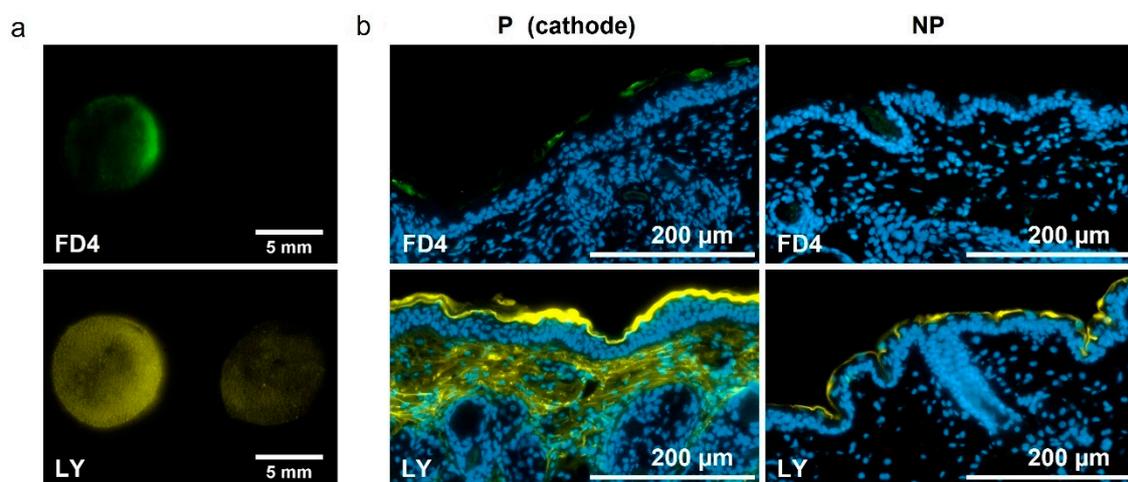
### 3.3. Influence of the Molecule Size on Delivery

In order to observe the influence of the molecule size during skin electroporation-assisted delivery, we repeated the experiment using LY inside the platforms and compared with platforms loaded with FD4, which is ten times bigger than LY. We evaluated their marking pattern and we performed histological observations to evaluate their penetration depths into the skin. The delivery pattern demonstrated that both molecules were preferentially marking the cathode side on the contrary of PI (Figure 3a). This can be explained

when considering the charges of the molecules; LY has a negative charge and the FITC group substituted on the dextran also introduces negative charge at neutral pH. Histological observations showed an important natural accumulation of LY in the SC (Figure 3b). The observation on the cathode side demonstrated that FD4 tended to accumulate in the SC at the cathode side, while LY could be found in the dermis upon treatment. Both molecules were not delivered similarly into the layers of the skin. Pathways exist, as demonstrated by the delivery of LY in the dermis. However, they might not yet be suitable for the delivery of molecules of bigger size, like FD4.



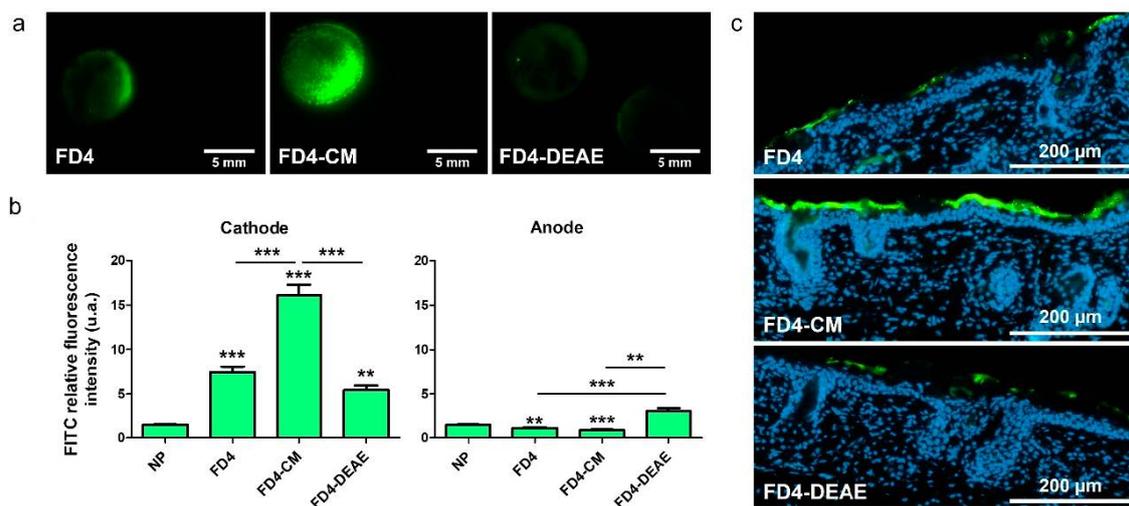
**Figure 2.** Evaluation of the skin permeabilization reversibility using the two-in-one nanocomposite device for EP. Platforms loaded with buffer only were used to apply unipolar EP treatment on hairless mice skin explants. One hundred microliters of LY (1 mM) were applied 0, 5, 15, 30 and 60 min after EP treatment, and left for 1 h at 37 °C to assess the evolution of skin permeability through time. (a) Delivery pattern of LY applied at 0, 5, 15, 30 and 60 min after treatment with unipolar-pulsed electric field, compared to non-pulsed (NP) skin, platforms loaded with buffer. Cathode side was always on the left. (b) Quantification of LY RFI at the cathode and anode side of treated skin, depending on the time waited before LY application, compared to the LY RFI of non-pulsed skin. Statistical analysis: one-way ANOVA, Dunnett post-test vs. NP data. (Codes signification: \* =  $p > 0.05$ ; \*\* =  $p > 0.01$ ; \*\*\* =  $p > 0.001$ ; ns = non-significant). Error bars indicate SEM.  $n = 3-4$ .



**Figure 3.** Influence of the molecule size on delivery. Platforms loaded with either LY or FD4 (1 mM), were used to apply unipolar EP treatment on hairless mice skin explants. Skins were imaged 30 min after. (a) Marking pattern of skins treated with unipolar-pulsed electric field, platforms loaded with either FD4 or LY. Cathode side is always on the left. (b) Histological observations of 10 µm slices of skins pulsed (P) with EP treatment or non-pulsed (NP), using platforms loaded with either FD4 or LY. FD4 is in green, LY in yellow, and nuclei are labeled in blue by DAPI.

### 3.4. Influence of the Molecule Charge on Delivery

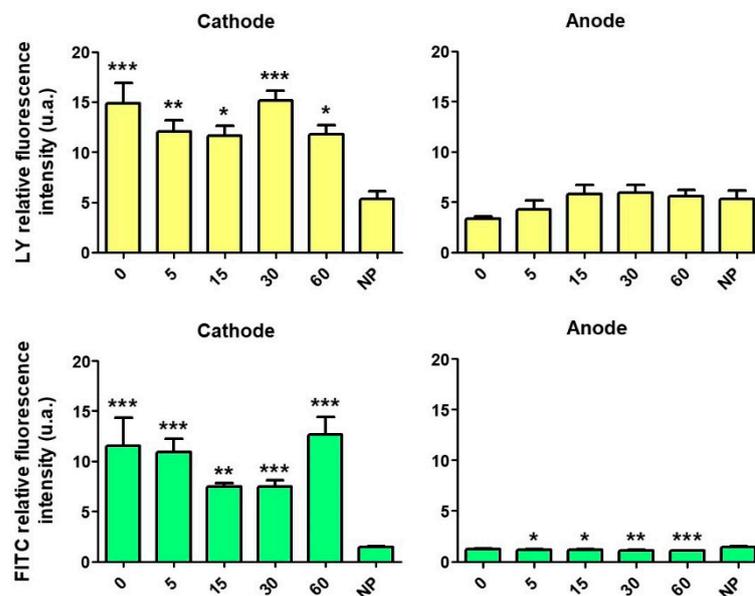
Our experiments brought into focus an inherent structural asymmetry between the two electrodes. However, questions about the influence of the electrophoretic forces on the loaded molecules during EP remained. To answer those questions, we compared our model molecule, FD4, with two of its derivate forms: one was a 4 kDa dextran grafted with carboxymethyl group to bring in negative charges (FD4-CM), and the other was grafted with diethylaminoethyl groups to positively charge it (FD4-DEAE). The FITC substitution ratio was the same for the three molecules and is two orders of magnitude smaller than the nitrogen or carboxymethyl substitution ratio. Therefore, FD4 charge was negligible when compared to its derivatives, and FD4 could be consider as a neutral molecule. The fluorescence macrographs of the differently charged FD4 showed different marking patterns (Figure 4a). Quantification of FITC RFI on treated skin revealed a doubled uptake of FD4-CM at the cathode and an equal uptake at the anode compared to FD4. We could also observe a weaker uptake of those two molecules at the anode side compared to the FD4 uptake on non-treated skin. An opposite behavior was observed for FD4-DEAE. Namely, the uptake was 30% weaker than FD4 at the cathode but seemed to be increased at the anode (Figure 4b). As a control experiment, the comparison of the uptake of each molecule on non-pulsed skin did not show statistically significant differences (Figure S3). Those behaviors were in agreement with the electrode's polarity. In our configuration, the cathode was the negative and thus, electrophoretic forces dragged negatively charged molecules into the skin. On the contrary, they could be retained inside the platform at the anode side. We performed complementary experiments where the polarity of the electrodes was reversed between each pulse (Figure S4). No statistically significant difference of the labelling between the two electrodes was observed for FD4 nor FD4-CM molecules. The electrophoretic forces alternatively pushing and pulling the molecules depending on its current polarity could explain these results. Histological observations gave evidence of an accumulation of molecules in the SC, consistent in intensity and uniformity with the labelling already observed by macro-fluorescence imaging of the skin (Figure 4c).



**Figure 4.** Influence of the molecule charge on delivery. Platforms loaded with either FD4, FD4 substituted with carboxymethyl groups (FD4-CM), or diethylaminoethyl groups (FD4-DEAE) (1 mM) were used to apply unipolar EP treatment on hairless mice skin explants. Skins were imaged 30 min after. (a) Marking patterns on skin of FD4, FD4-CM and FD-DEAE loaded on the platforms after treatment with a unipolar-pulsed electric field. Cathode is always on the left. (b) Quantification of FITC RFI at the cathode and anode side of treated skins, compared to the matched RFI on non-pulsed skins (NP). Statistical analysis: one-way ANOVA, Turkey's post-test comparison between NP, FD4, FD4-CM and FD4-DEAE. (Codes signification: \*\* =  $p > 0.01$ ; \*\*\* =  $p > 0.001$ ; else is non-significant). Error bars indicate SEM.  $n = 4-9$ . (c) Histological observations of 10 μm slices of skin treated with EP using platforms loaded with either FD4, FD4-CM or FD4-DEAE. Only the cathodes are displayed. FITC is green and nuclei are labelled in blue by DAPI.

### 3.5. Two-in-One Device Allowed Immediate Delivery with Skin Electroporation

To evaluate the contribution of electrophoresis and passive diffusion in the delivery process, the duration of contact between skin and platforms after treatment was increased. Platforms loaded with LY or FD4 were used for electroporation treatment and left in place for different durations, 0, 5, 15, 30 or 60 min, before rinsing and imaging. Results showed that the uptake at the cathode of pulsed skin for any duration was significantly superior to non-pulsed skins uptake (Figure 5). However, there was no evolution of the uptake of both molecules with time. Considering the anode side, the delivery of LY was not significantly modified by the EP treatment. A different behavior was observed for FD4 where the uptake at the anode was significantly decreased. Therefore, we could conclude that for a positively charged molecule, the delivery at the cathode side was immediate and mainly provided by electrophoresis.

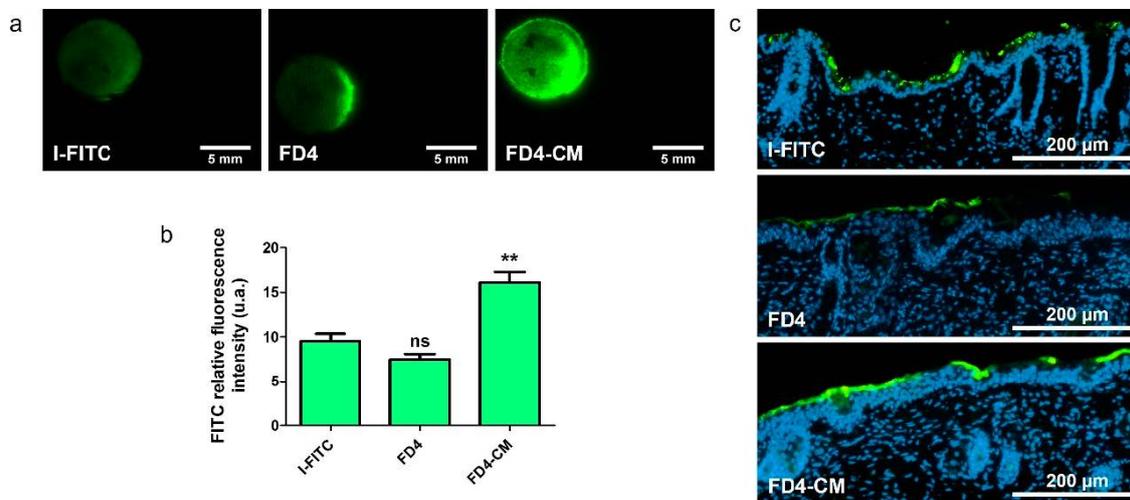


**Figure 5.** Effect of the duration of contact between skin and platforms after EP treatment. Platforms loaded with either LY or FD4 (1 mM), were used to apply unipolar EP treatment on hairless mice skin explants. The duration of contact between skin and platforms after treatment was increased to see the contribution of electrophoresis and passive diffusion. Quantification of LY and FITC RFI at the cathode and anode of skins treated with unipolar-pulsed electric field and platforms loaded with either LY or FD4. Platforms were left 0, 5, 15, 30 or 60 min on the skin after treatment. Statistical analysis: one-way ANOVA, Dunnett's post-test vs. NP data. Codes signification: \* =  $p > 0.05$ ; \*\* =  $p > 0.01$ ; \*\*\* =  $p > 0.001$ ; else is non-significant. Error bars indicate SEM.  $n = 3-9$ .

### 3.6. Validation of FD4 as a Model Molecule for Insulin Delivery Using Skin Electroporation

FD4 was used as a model drug to mimic macromolecules, such as insulin. Nevertheless, dextran and insulin, as a glucose derivative and protein, have different chemical functions and a different global charge. In order to check if the simple approximation of the size was a sufficient criterion for FD4 to mimic the behavior of insulin during electroporation treatment, platforms were loaded with insulin labelled with FITC (I-FITC) and compared to FD4 and its negative derivative FD4-CM, in terms of delivery pattern and uptake on skin after EP treatment. I-FITC concentration was calculated to be the same than the FITC molar concentration of FD4 and FD4-CM. The three macromolecules had the same delivery pattern (Figure 6a), but we observed a significant uptake difference at the cathode between FD4-CM and I-FITC (Figure 6b). The mean fluorescence intensity of I-FITC was more similar to the mean fluorescence of the FD4 than the FD4-CM. Histological observation demonstrated that, like FD4, I-FITC tended to accumulate in the SC without

crossing it (Figure 6c). Those results indicated that FD4 can be used for our future works on skin EP electrical parameters optimization.



**Figure 6.** Comparison of FITC labelled insulin (I-FITC) with FD4 and FD4-CM behavior during delivery through skin EP. Platforms loaded with either I-FITC, FD4 or FD4-CM (1 mM), were used to apply unipolar EP treatment on hairless mice skin explants. Skins were imaged 30 min after. (a) Delivery pattern of I-FITC, FD4 and FD4-CM loaded in platforms after treatment with unipolar pulsed electric field. (b) Quantification of FITC RFI of the three molecules at the cathode of treated skin. Statistical analysis: one-way ANOVA, Dunnett post-test vs. I-FITC data. (Codes signification: \*\* =  $p > 0.01$ ; ns = non-significant).  $n = 3-9$ . (c) Histological observations of 10 μm slices of skin treated with EP using platforms loaded with either FD4, FD4-CM or I-FITC. Only the cathodes are displayed. FITC is green and nuclei are labelled in blue by DAPI.

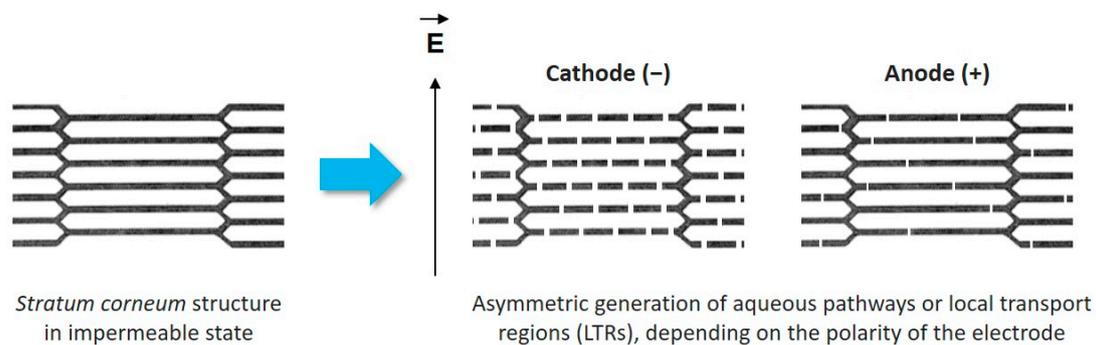
#### 4. Discussion

Transdermal delivery is a crucial route to explore in order to elaborate efficient treatment protocol; however, the development of non-invasive methods alternative to injection are challenged by the impermeable and hydrophobic *stratum corneum* (SC) skin layer. In this work, we evaluated the ex vivo application of a custom two-in-one nanocomposite material designed to be simultaneously a drug reservoir and an electrode for skin EP. The first experiment presented demonstrated the actual permeabilization of viable cells of the epidermis as their nuclei were labelled with PI (Figure 1b). Therefore, the electric field was sufficient in this area to destabilize the cell plasma membrane and allow PI uptake in the permeabilized cells, and SC was also permeable enough to allow PI to reach deeper layers. Additionally, we observed an asymmetry of PI uptake, that was hardly observed in cathode histology slices. We suggested two possible explanations for this asymmetry as we dismissed cellular death: the occurrence of structural asymmetry, or the effects of electrophoretic forces.

As skin barrier function assayed using LY was shown to partially return to normal, we considered the device could be non-invasive for on shot uses (Figure 2). This recovery was however incomplete, which was in accordance with the work of Dujardin et al. on skin EP [31]. They measured the impedance of rats' skin in vivo after treatment with 10 pulses of 335 V—5 ms and they observed a dramatic decrease compared to the control. The skin impedance tended to increase with time after treatment, but the skin original state was still not recovered after six hours. However, a good recovery was observed using 10 pulses of 1000 V—100 μs. Similar results were obtained in vitro [32]. It would be necessary in further works to move to in vivo studies to evaluate more precisely the skin resealing after treatment. Indeed, ex vivo, the lack of blood circulation to provide nutriment to the tissue essential to maintain homeostasis could impair the recovery. Cycles of EP treatment, spaced by several hours, could be used to assess if skin EP induces irreversible damages in the SC and what would be the effects of its repeated utilization on the same area. Finally, the

non-uniformity of the electrical field received by the skin, evidenced by the non-uniform delivery pattern in every macrograph presented in this work, could also suggest that the skin barrier properties were not affected or impaired equally over all of the 50 mm<sup>2</sup> treated area. Impedance measurements performed with a smaller platform could help us to determine the voltage and pulses duration range to apply to stay in a fully reversible state. It would also be interesting to proceed to the optimization of those electrical parameters using in situ skin impedance measurements to get real-time feedback and immediately adjust parameters, as recently reported in the work of Atkins et al. [33].

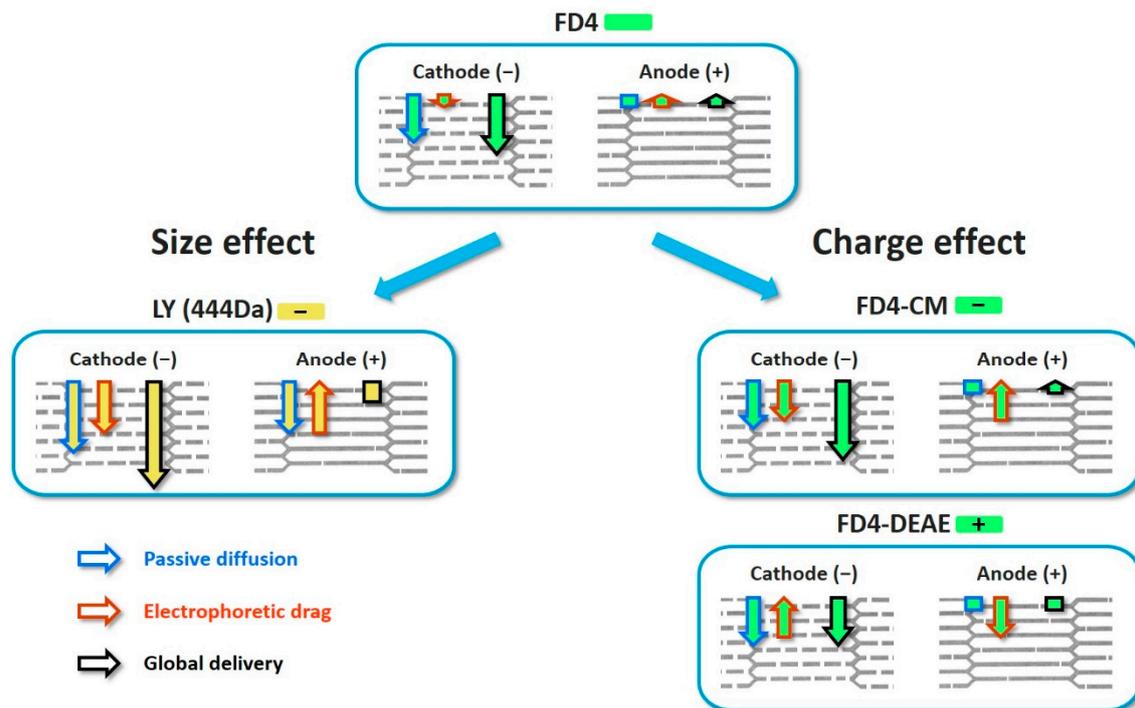
We evidenced an uptake asymmetry between the two electrodes, which was independent from electrophoretic forces (Figure 2). Considering the work of Weaver et al. [11], the SC structure could be described with a brick-and-mortar model, where corneocytes were separated one from another by lipid bilayers. LTRs would form in those layers upon electroporation treatment, allowing hydrophilic molecules to go through the SC. To the best of our knowledge, we were the first to use this electrode configuration, and we suggested here that LTRs were not uniformly generated depending on the electrode polarity. They could be wider and/or more numerous at the cathode side, offering more available aqueous pathways for the drug to cross the SC. A schematic description is proposed in Figure 7. We are willing to perform in situ electrical measurements of the system device including the skin during EP treatment to investigate that theory. Those data will be useful in particular to build numerical model of our system.



**Figure 7.** LTRs are generated differently depending on the electrode polarity upon application of EP treatment. They might be more numerous and/or wider at the cathode side. Adapted from [11].

Experiments demonstrated a clear influence of the molecule size and charge on the delivery, which was expected according to literature [10]. The permeabilization was sufficient to allow the delivery of LY in the dermis. These encouraging results allow us to move towards models closer to human skin for this range of molecule sizes (Figure 3). FD4 tended to accumulate in the SC, but that accumulation was nevertheless significantly improved upon EP treatment. The size of the molecule could be the limiting factor for now, ensued from the asymmetric SC permeabilization that has changed the balance between the two delivery forces, namely passive diffusion and electrophoresis. We observed that most of the delivery occurred during the application of the EP treatment; therefore, electrophoresis would be the major driving force (Figure 5), which is consistent with the work of Regnier et al. [34]. However, the utilization of loaded platforms for EP treatment showed different behaviors at the anode side between LY and FD4. LY uptake was unchanged upon treatment, while FD4 delivery was decreased. Considering the LY case, both delivery forces might have been nullifying each other. Indeed, results presented in Figure 2 demonstrated that when LY was applied after EP, its uptake was significantly increased at the anode. As such, LY delivery is possible through passive diffusion into the generated LTRs so opposing electrophoresis might result in an unchanged uptake. Considering FD4, its delivery was probably impaired by its size and blocked by SC at the anode side. Therefore, the electrophoresis was the only remaining force dragging the FD4 up in the platform and reducing the uptake below the negative control. This could be verified remembering the delivery

of positively charged FD4-DEAE to the anode side presented Figure 4. We observed an increased delivery of FD4-CM compared to FD4 at the cathode, resulting from the addition of electrophoresis forces to passive diffusion, repulsing the negatively charged molecules from the negative electrode into the skin. We would expect the same phenomenon to occur on the anode side for positively charged molecules if the SC permeabilization was uniform between electrodes. However, the uptake of FD4-DEAE was not significantly different from the control; consequently, we concluded that smaller available permeable pathways at the anode side limited the delivery of the macromolecule. A schematic sketch of those phenomena depending on the molecules size and charge is presented in Figure 8.



**Figure 8.** Scheme of the global delivery resulting from passive diffusion through aqueous pathways generated upon EP treatment and electrophoresis, depending on molecule size and charge. FD4 global charge was considered negligible compared to other presented molecules and results in a reduced electrophoresis contribution. At the cathode, LTRs were sufficient for FD4 to accumulate in the SC. Passive diffusion and electrophoresis combined for an improved delivery. At the anode, LTRs were not sufficient to allow passive diffusion, and the remaining electrophoresis opposed global delivery and reduced the uptake. LY is smaller than FD4 and the generated LTRs are sufficient for its passive diffusion at both electrodes. At the cathode, both forces combined to greatly improve the delivery while they nullified each other at the anode. For FD4-CM, the electrophoresis had a higher contribution, so the uptake was higher at the cathode, while unchanged at the anode, compared to FD4. Finally, FD4-DEAE charge was the opposite of the three other molecules. As such, the electrophoresis contribution on each side was reversed. It opposed passive diffusion at the cathode resulting in a decreased delivery compared to FD4. The delivery at the anode was however unaffected by the electrophoretic drag, since LTRs were not sufficient to allow passage to the macromolecule.

To conclude, the device we presented in this work showed promising results of transitory skin permeabilization and immediate small molecule delivery into the dermis. We demonstrated that skin EP with unipolar pulses and non-invasive electrodes induced the asymmetrical generation of aqueous pathways (LTRs) in the SC between the electrodes side. Macromolecules, using FD4 as a model, could not yet be delivered across SC. However, the electrical parameters we used in this work were inspired from our previous work on intradermal gene delivery. As such, it exists a wide margin for optimization, aiming to improve SC permeabilization and macromolecules penetration depth by modifying pulses voltage and duration. The electrophoretic drag appeared to be a powerful lever to improve delivery, and it could be interesting to increase both pulse voltage and duration to intensify

it. However, according to the work reported by Zorec et al. [35], short pulses of high voltage might be responsible for the generation of small defects with a high density. Meanwhile, lower voltage and longer pulses result in fewer, but wider LTR, which seems to be more efficient for delivery. Therefore, we might investigate the combination of different voltages and pulse duration, to first optimize LTRs generation and then push macromolecules thanks to electrophoresis, while preserving tissue integrity. Finally, the implementation of in situ electrical measurements to help us optimize electrical parameters might also help us to deepen our understanding of the delivery mechanisms, especially if combined with numerical models.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pharmaceutics13111805/s1>, Figure S1: Nanocomposites' preparation; Figure S2: Evaluation of cell death upon EP treatment; Figure S3: Comparison of the natural uptake of the three FD4 derivatives; Figure S4: Effect of bipolar pulses on delivery.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.S., M.G. and E.F.; Methodology, J.S. and M.G.; Validation, M.G., E.F. and M.-P.R.; Formal Analysis, J.S.; Investigation, J.S. and B.J.; Resources, J.S. and B.J.; Data Curation, J.S.; Writing—Original Draft Preparation, J.S.; Writing—Review and Editing, M.G., E.F. and M.-P.R.; Visualization, J.S.; Supervision, M.G. and E.F.; Project Administration, J.S., M.G. and E.F.; Funding Acquisition, M.G. and E.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was jointly funded by the Région Occitanie/Pyrénées-Méditerranée and the Université Toulouse III—Paul Sabatier, grant number 2018 001260/ALDOCT-000423, and by the Agence Nationale de la Recherche, grant number ANR-19-CE09-0007.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data are available upon request.

**Acknowledgments:** We would like to thank Zarel Valdez-Nava, Lionel Laudebat and Sorin Dinulescu (LAPLACE, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, France) for their helpful discussions and the elaboration of the electroporation support. We also thank Elisabeth Bellard (IPBS, Université de Toulouse, CNRS, UPS, France) for her help and advice on fluorescence imagery.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Prausnitz, M.R.; Elias, P.M.; Franz, T.J.; Schmuth, M.; Tsai, J.-C.; Menon, G.K.; Holleran, W.M.; Feingold, K.R. Skin Barrier and Transdermal Drug Delivery. In *Dermatology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2018; pp. 2176–2185.
2. Prausnitz, M.R.; Langer, R. Transdermal Drug Delivery. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 1261–1268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Engelke, L.; Winter, G.; Hook, S.; Engert, J. Recent Insights into Cutaneous Immunization: How to Vaccinate via the Skin. *Vaccine* **2015**, *33*, 4663–4674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Ramadan, D.; McCrudden, M.T.C.; Courtenay, A.J.; Donnelly, R.F. Enhancement Strategies for Transdermal Drug Delivery Systems: Current Trends and Applications. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2021**, 1–34. [[CrossRef](#)]
5. Neumann, E.; Schaefer-Ridder, M.; Wang, Y.; Hofschneider, P.H. Gene Transfer into Mouse Lyoma Cells by Electroporation in High Electric Fields. *EMBO J.* **1982**, *1*, 841–845. [[CrossRef](#)]
6. Mir, L.M.; Orlowski, S. Mechanisms of Electrochemotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, *35*, 107–118. [[CrossRef](#)]
7. André, F.M.; Gehl, J.; Sersa, G.; Prémat, V.; Hojman, P.; Eriksen, J.; Golzio, M.; Cemazar, M.; Pavselj, N.; Rols, M.-P.; et al. Efficiency of High- and Low-Voltage Pulse Combinations for Gene Electrotransfer in Muscle, Liver, Tumor, and Skin. *Hum. Gene Ther.* **2008**, *19*, 1261–1272. [[CrossRef](#)]
8. Cemazar, M.; Golzio, M.; Sersa, G.; Rols, M.P.; Teissie, J. Electrically-Assisted Nucleic Acids Delivery to Tissues In Vivo: Where Do We Stand? *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 3817–3825. [[CrossRef](#)]
9. Pliquett, U.F.; Vanbever, R.; Prémat, V.; Weaver, J.C. Local Transport Regions (LTRs) in Human Stratum Corneum Due to Long and Short 'High Voltage' Pulses. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1998**, *47*, 151–161. [[CrossRef](#)]
10. Denet, A.-R.; Vanbever, R.; Prémat, V. Skin Electroporation for Transdermal and Topical Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 659–674. [[CrossRef](#)]
11. Weaver, J.C.; Vaughan, T.E.; Chizmadzhev, Y. Theory of Electrical Creation of Aqueous Pathways across Skin Transport Barriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, *35*, 21–39. [[CrossRef](#)]

12. Chizmadzhev, Y.A.; Zarnitsin, V.G.; Weaver, J.C.; Potts, R.O. Mechanism of Electroinduced Ionic Species Transport through a Multilamellar Lipid System. *Biophys. J.* **1995**, *68*, 749–765. [[CrossRef](#)]
13. Pavšelj, N.; Pr eat, V.; Miklav ci c, D. A Numerical Model of Skin Electroporabilization Based on In Vivo Experiments. *Ann. Biomed. Eng.* **2007**, *35*, 2138–2144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Pavšelj, N.; Miklav ci c, D. Resistive Heating and Electroporabilization of Skin Tissue during in Vivo Electroporation: A Coupled Nonlinear Finite Element Model. *Int. J. Heat Mass Transf.* **2011**, *54*, 2294–2302. [[CrossRef](#)]
15. Lombry, C.; Dujardin, N.; Preat, V. Transdermal Delivery of Macromolecules Using Skin Electroporation. *Pharm. Res.* **2000**, *17*, 32–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Vanbever, R. Transdermal Delivery of Fentanyl: Rapid Onset of Analgesia Using Skin Electroporation. *J. Control. Release* **1998**, *50*, 225–235. [[CrossRef](#)]
17. Blagus, T.; Markelc, B.; Cemazar, M.; Kosjek, T.; Preat, V.; Miklavcic, D.; Sersa, G. In Vivo Real-Time Monitoring System of Electroporation Mediated Control of Transdermal and Topical Drug Delivery. *J. Control. Release* **2013**, *172*, 862–871. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Zhang, X.; Xu, Y.; Ye, B. An Efficient Electrochemical Glucose Sensor Based on Porous Nickel-Based Metal Organic Framework/Carbon Nanotubes Composite (Ni-MOF/CNTs). *J. Alloys Compd.* **2018**, *767*, 651–656. [[CrossRef](#)]
19. Hong, G.; Shuo, D.; Antaris, A.L.; Chen, C.; Zhang, B.; Zhao, S.; Atochin, D.N.; Huang, P.L.; Andreasson, K.I.; Kuo, C.J.; et al. Through-Skull Fluorescence Imaging of the Brain in a New near-Infrared Window. *Nat. Photonics* **2014**, *8*, 723–730. [[CrossRef](#)]
20. Wells, C.; Vollin-Bringel, O.; Fiegel, V.; Harlepp, S.; Van der Schueren, B.; B egin-Colin, S.; B egin, D.; Mertz, D. Engineering of Mesoporous Silica Coated Carbon-Based Materials Optimized for an Ultrahigh Doxorubicin Payload and a Drug Release Activated by PH, T, and NIR-Light. *Adv. Funct. Mater.* **2018**, *28*, 1706996. [[CrossRef](#)]
21. B eduer, 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* **2012**, *28*, 17363–17371. [[CrossRef](#)]
22. Correa-Duarte, M.A.; Wagner, N.; Rojas-Chapana, J.; Morsczeck, C.; Thie, M.; Giersig, M. Fabrication and Biocompatibility of Carbon Nanotube-Based 3D Networks as Scaffolds for Cell Seeding and Growth. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 2233–2236. [[CrossRef](#)]
23. Kostarelos, K. The Long and Short of Carbon Nanotube Toxicity. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 774–776. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Simon, J.; Flahaut, E.; Golzio, M. Overview of Carbon Nanotubes for Biomedical Applications. *Materials* **2019**, *12*, 624. [[CrossRef](#)]
25. Guillet, J.-F.; Flahaut, E.; Golzio, M. A Hydrogel/Carbon-Nanotube Needle-Free Device for Electrostimulated Skin Drug Delivery. *ChemPhysChem* **2017**, *18*, 2715–2723. [[CrossRef](#)]
26. Guillet, J.-F.; Valdez-Nava, Z.; Golzio, M.; Flahaut, E. Electrical Properties of Double-Wall Carbon Nanotubes Nanocomposite Hydrogels. *Carbon* **2019**, *146*, 542–548. [[CrossRef](#)]
27. Flahaut, E.; Bacs a, R.; Peigney, A.; Laurent, C. Gram-Scale CCVD Synthesis of Double-Walled Carbon Nanotubes. *Chem. Commun.* **2003**, *12*, 1442–1443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Bourdiol, F.; Mouchet, F.; Perrault, A.; Fourquaux, I.; Datas, L.; Gancet, C.; Boutonnet, J.-C.; Pinelli, E.; Gauthier, L.; 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* **2013**, *54*, 175–191. [[CrossRef](#)]
29. Leclerc, E.A.; Huch enq, A.; Kezic, S.; Serre, G.; Jonca, N. Mice Deficient for the Epidermal Dermokine and Isoforms Display Transient Cornification Defects. *J. Cell Sci.* **2014**, *127*, 2862–2872. [[CrossRef](#)]
30. Pedron-Mazoyer, S.; Plou et, J.; Hellaudais, L.; Teissie, J.; Golzio, M. New Anti Angiogenesis Developments through Electro-Immunization: Optimization by in Vivo Optical Imaging of Intradermal Electrotransfer. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Gen. Subj.* **2007**, *1770*, 137–142. [[CrossRef](#)]
31. Dujardin, N. In Vivo Assessment of Skin Electroporation Using Square Wave Pulses. *J. Control. Release* **2002**, *79*, 219–227. [[CrossRef](#)]
32. Pliquett, U.; Langer, R.; Weaver, J.C. Changes in the Passive Electrical Properties of Human Stratum Corneum Due to Electroporation. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Biomembr.* **1995**, *1239*, 111–121. [[CrossRef](#)]
33. Atkins, R.M.; Fawcett, T.J.; Gilbert, R.; Hoff, A.M.; Connolly, R.; Brown, D.W.; Jaroszeski, M.J. Real-Time Impedance Feedback to Enhance Cutaneous Gene Electrotransfer in a Murine Skin Model. *Bioelectrochemistry* **2021**, *142*, 107885. [[CrossRef](#)]
34. Regnier, V.; De Morre, N.; Jadoul, A.; Pr eat, V. Mechanisms of a Phosphorothioate Oligonucleotide Delivery by Skin Electroporation. *Int. J. Pharm.* **1999**, *184*, 147–156. [[CrossRef](#)]
35. Zorec, B.; Becker, S.; Reber sek, M.; Miklav ci c, D.; Pavšelj, N. Skin Electroporation for Transdermal Drug Delivery: The Influence of the Order of Different Square Wave Electric Pulses. *Int. J. Pharm.* **2013**, *457*, 214–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



## Abstract

The delivery of hydrophilic molecules and macromolecules through the skin thanks to electroporation is a promising alternative approach to intradermal injection. Recently, we developed a nanocomposite material composed of double-walled carbon nanotubes (CNT) and an agarose hydrogel that can be used as both an electrode and a reservoir to apply this technique. In this material, CNT are entrapped in the agarose matrix in order to exploit their mechanical and electrical properties, while avoiding the toxicity concerns possibly raised by their use. In the work presented here, we deepened the characterization of such a two-in-one device and evaluated its potential for non-invasive transdermal drug delivery using skin electroporation.

The first part of this work details the improvement of the nanocomposite elaboration and the characterization of its properties. At first, we evaluated the impact of the addition of a CNT dispersant (Carboxymethyl cellulose, CMC) on the nanocomposites' preparation and properties. Furthermore, others nanocomposite processing methods were explored, aiming to improve the uniformity of the samples. Subsequently, we used a 4kDa fluorescent dextran (FD4) as a model molecule to assess and compare the capacity of those different nanocomposites to store and release a drug. We measured the mechanical properties of the materials using rheometry. Finally, we compared their electrical conduction properties. Those analyses confirmed that the addition of CMC led to a better dispersion of CNT within the nanocomposites. However, the CNT concentration mostly used in this work revealed itself not enough to cause significant variations of the properties of the material.

The second part of this work focuses on the use of those nanocomposites as delivery platforms in hairless mice skin model *ex vivo*. The electrodes layout and configuration used here are different from the literature relative to electroporation. As such, the first step was to answer fundamental questions. We first demonstrated the efficiency of the device to permeabilize cells located in the epidermis of murine skin and identified the reversible nature of the induced permeability. In a second step, we investigated how the physicochemical properties (mass and charge) of the molecules influence their delivery. We also studied the respective role of phenomena driving the delivery such as electrophoresis and passive diffusion. Our observations allowed us to uncover for the first time to our knowledge, an asymmetry between the cathode and the anode in the permeabilization pathways generated inside the stratum corneum during skin electroporation. Finally, we assayed CNT toxicity on different skin cell lines and did not observe any harmful effects of the latter in our experimental conditions.

The work conducted during this thesis allowed us to demonstrate the relevance of a two-in-one device for non-invasive transdermal delivery of hydrophilic molecules using skin electroporation. We were able to determine the available levers for the optimization of the properties of the electrodes/reservoir nanocomposites. Finally, we deepened our understanding of the mechanisms involved during transdermal drug delivery assisted by electroporation, paving the way for further works.

## Résumé de la thèse

La délivrance de molécules hydrophiles et de macromolécules à travers la peau grâce à l'électroporation est une approche alternative prometteuse à l'injection intradermique. Récemment, nous avons développé un matériau nanocomposite composé de nanotubes de carbone biparois (NTC) et d'un hydrogel d'agarose, pouvant servir à la fois d'électrode et de réservoir adapté à cet objectif. Dans ce matériau, les NTC sont piégés au sein de la matrice d'agarose afin de pouvoir exploiter leurs propriétés mécaniques et électriques, tout en s'affranchissant des questions de toxicité potentielle que leur utilisation soulève. Dans les travaux présentés ici, nous avons approfondi la caractérisation de ce dispositif deux-en-un et évalué son potentiel pour permettre la délivrance transdermique non-invasive de principes actifs par électroporation de la peau.

La première partie de ces travaux détaille l'amélioration de l'élaboration du matériau nanocomposite et la caractérisation de ses propriétés. Dans un premier temps, nous avons étudié l'impact de l'ajout d'un dispersant des NTC (Carboxyméthylcellulose ou CMC) sur la préparation du nanocomposite et sur ses différentes propriétés. D'autres procédés visant à améliorer et uniformiser la mise en forme des échantillons obtenus ont aussi été explorés. Nous avons ensuite évalué et comparé la capacité de ces différents nanocomposites à stocker puis restituer un principe actif en utilisant un dextran fluorescent de 4kDa comme molécule modèle (FD4). Enfin nous avons mesuré leurs propriétés mécaniques par rhéométrie ainsi que leurs propriétés de conduction électrique. L'ensemble de ces analyses a confirmé que la présence de CMC permettait une meilleure dispersion des NTC dans les nanocomposites. Cependant, la concentration massique de NTC majoritairement utilisée lors de ces travaux s'est révélée insuffisante pour engendrer des variations significatives des propriétés du matériau.

La deuxième partie de ces travaux concerne l'utilisation de ces nanocomposites comme plateforme de délivrance sur des peaux de souris « hairless » *ex-vivo*. Premièrement, la disposition et la configuration des électrodes utilisées étant différentes de celles de la littérature relative à l'électroporation, nous avons répondu à des questions fondamentales. Nous avons démontré l'efficacité du dispositif à perméabiliser les cellules de l'épiderme de la peau, et identifié le caractère réversible de cette perméabilité induite. Dans une seconde étape, nous avons étudié l'effet des propriétés physico-chimiques (masse et charge) des molécules, ainsi que le rôle respectif des forces motrices de délivrance que sont l'électrophorèse et la diffusion passive. Ces observations nous ont permis de mettre en évidence, pour la première fois à notre connaissance, une asymétrie entre la cathode et l'anode dans la génération des chemins de perméabilisation dans le *stratum corneum* lors de l'électroporation. Finalement, nous avons évalué la toxicité des NTC sur plusieurs lignées cellulaires de la peau et n'avons observé aucun effet néfaste de ces derniers, dans nos conditions expérimentales.

Les travaux effectués au cours de cette thèse nous ont permis de montrer la pertinence d'un dispositif deux-en-un pour la délivrance transdermique non-invasive de molécules hydrophiles par électroporation. Nous avons pu déterminer les leviers disponibles pour l'optimisation des propriétés d'électrodes et de réservoir du nanocomposite. Enfin notre compréhension des mécanismes mis en jeu lors de la délivrance transdermique par électroporation a pu être approfondi, posant ainsi des bases solides pour de futurs travaux.