

Université 20 Aout 1955-Skikda
Faculté des sciences
Département de Chimie
réf :.....



جامعة 20 أوت 1955 سكيكدة
العلوم كلية
قسم الكيمياء
المرجع:.....

Thèse de Doctorat en sciences

Spécialité : Chimie

Option : RISQUE TECHNOLOGIQUE ENVIRONNEMENTAL

Réalisée par

M^{lle} BOULAHNECHE Samia

Intitulée :

Applications des Nanomatériaux, Cas du graphène

Soutenue le 05-02-2019
Devant le jury composé de :

Prof. DJAZI Fayçal	Université 20 Aout 1955-Skikda	Président
Prof. MEDJRAM Mohamed Salah	Université 20 Aout 1955-Skikda	Rapporteur
Prof. REHAMNIA Rabah	Université Badji Mokhtar Annaba	Examineur
Prof. GHEID Abd Elhak	Université Souk Ahras	Examineur
Prof. AFFOUNE Abed Mohamed	Université 8 Mai 1945-Guelma	Examineur
D ^r . BENRABAA Rafik	Université 20 Aout 1955-Skikda	Examineur

Année universitaire : 2018 / 2019

Université 20 Aout 1955-Skikda
Faculté des sciences
Département de Chimie
réf :.....



جامعة 20 أوت 1955 سكيكدة
العلوم كلية
قسم الكيمياء
المرجع:.....

Thèse de Doctorat en sciences

Spécialité : Chimie

Option : RISQUE TECHNOLOGIQUE ENVIRONNEMENTAL

Réalisée par

M^{lle} BOULAHNECHE Samia

Intitulée :

Applications des Nanomatériaux, Cas du graphène

Soutenue le 05-02-2019

Devant le jury composé de :

Prof. DJAZI Fayçal	Université 20 Aout 1955-Skikda	Président
Prof. MEDJRAM Mohamed Salah	Université 20 Aout 1955-Skikda	Rapporteur
Prof. REHAMNIA Rabah	Université Badji Mokhtar Annaba	Examineur
Prof. GHEID Abd Elhak	Université Souk Ahras	Examineur
Prof. AFFOUNE Abed Mohamed	Université 8 Mai 1945-Guelma	Examineur
D ^r . BENRABAA Rafik	Université 20 Aout 1955-Skikda	Examineur

Année universitaire : 2018 / 2019

Résumé :

L'objectif de notre travail de thèse est, d'une part la mise en place d'une nouvelle méthode électrochimique, à base de nanoparticules de graphène, pour une détection précoce et plus efficace des agrégations de protéines, et d'autre part, l'intégration de ces mêmes nanoparticules dans les thérapies biomédicales (consommation des médicaments) afin de remplacer les méthodes classiques à risques. Trois applications biologiques du graphène ont été effectuées : La première application consiste au développement d'un biocapteur électrochimique à base d'une électrode de carbone vitreux modifiée par l'oxyde de graphène réduit poreux (GC / prGO) afin de détecter la présence précoce de l'agrégation protéique (le lysozyme, l'insuline et la calcitonine). La deuxième application est une réalisation d'un système d'administration Photothermique de l'ondanestron (ODS). Cette application a montré que l'utilisation de patch Kapton / rGO chargé de l'ODS, lors d'une irradiation laser (Proche infrarouge) continue, à 980 nm pendant 10 minutes, entraîne une pénétration accrue de l'ODS à travers la peau de l'oreille de porc (stratum-corneum très similaire à celui de l'humain). La troisième application est un développement des nouvelles interfaces électrochimiques K/ Au / prGO pour une administration efficace, et à la demande, de produits thérapeutiques. Deux médicaments l'ondanestron et l'ampicilline ont été choisis pour le chargement et à la libération électrochimique à partir d'électrodes modifiées respectivement, la K / Au-prGO / ODS et la K / Au-prGO / PEI / AM. Les différents résultats obtenus, dans ce travail, illustrent les principaux avantages des approches développées pour les applications biomédicales du graphène.

Mot clés : graphène, poreux, ondaneestron, ampicilline, agrégation, administration Photothermique, délivrance électrochimique.

Summary:

The objective of our work is, on the one hand, the implementation of a new electrochemical method, based on graphene nanoparticles, for an early and more efficient detection of protein aggregations, and on the other hand, the integration of these same nanoparticles into biomedical therapies (drug consumption) in order to replace conventional risky methods. Three biological applications of graphene have been performed: The first application consists in the development of an electrochemical biosensor based on a porous reduced graphene oxide (GC / prGO) -based glassy carbon electrode to detect the early presence of protein aggregation (lysozyme insulin and calcitonin). The second application is an implementation of a photothermal delivery system of ondansetron (ODS), this application has shown that the use of patch Kapton / rGO loaded by ODS, during a continuous laser irradiation (Near infrared),to 980 nm for 10 minutes, leads to increased penetration into the skin (pork ear skin). The third application is a development of new electrochemical interfaces K / Au / prGO for efficient administration, and on demand therapeutic products. Two drugs Ondanestron and Ampicillin were selected for loading and electrochemical delivery from modified electrodes respectively, K / Au-prGO / ODS and K / Au-prGO / PEI / AM. The different results obtained in this work illustrate the main advantages of the approaches developed for the biomedical applications of graphene.

Key words: porous graphene, ondanestron, ampicillin, aggregation, photothermal administration, electrochemical delivery.

الخلاصة:

الهدف من عملنا هذا هو ، من ناحية ، تنفيذ طريقة كهروكيميائية جديدة ، تعتمد على الجسيمات النانوية (الجرافين) ، لاكتشاف مبكر وفعال لتكتلات البروتين ، ومن ناحية أخرى ، تكامل هذه الجسيمات النانوية نفسها في العلاجات الطبية الحيوية (استهلاك الأدوية) من أجل استبدال الطرق التقليدية ذات المخاطر. في هذا العمل ، تم تنفيذ ثلاثة تطبيقات بيولوجية للجرافين: يتضمن التطبيق الأول تطوير جهاز الاستشعار البيولوجي الكهروكيميائي. بالاعتماد على قطب كربوني زجاجي معدل بأكسيد الجرافين المسامي المرجع (GC / prGO)، المستعمل للتحقق من وجود أو عدم وجود تكتل البروتين من أجل اليزوزيم والأنسولين والكالسيتونين. التطبيق الثاني هو تجسيد لنظام الاطلاق الحراري الضوئي من اجل الأوندانسيرون (ODS) ، وقد أظهر هذا التطبيق أن استخدام رقعة (Kapton/rGO) محملة بال ODS، خلال التشعيع المستمر بالليزر (أشعة ما تحت الحمراء)، عند 980 نانومتر لمدة 10 دقائق ، يؤدي إلى زيادة تغلغل (ODS) عبر الجلد (جلد أذن الخنزير) . ويتمثل التطبيق الثالث في تطوير واجهات كهروكيميائية جديدة من نوع K / Au / prGO من أجل تحرير منتجات علاجية فعالة على حسب الطلب. تم اختيار اثنين من الأدوية الأوندانسيرون والأميسيلين للتحميل والتحرير الكهروكيميائية من أقطاب كهربائية معدلة على التوالي K / Au-prGO / ODS و K / Au-prGO / PEI . AM. توضح النتائج المختلفة التي تم الحصول عليها في هذا العمل، المزايا الرئيسية للنهج التي تم تطويرها للتطبيقات الطبية الحيوية للجرافين.

الكلمات المفتاحية: الجرافين المسامي ، أونيديسرون ، أميسيلين ، تكتل البروتين ، الاطلاق الحراري الضوئي ، التحرير الكهروكيميائي.

Remerciements

Je remercie le Bon **Dieu** de m'avoir guidé pour que ce modeste travail se réalise.

Je tiens particulièrement à exprimer ma sincère reconnaissance à mon encadreur Monsieur le Professeur Mohamed Salah **MEDJRAM** , Responsable et directeur de Laboratoire de recherche LCGC, pour l'intérêt qu'il a porté à mes travaux et pour m'avoir permis de les mener à bien dans les meilleures conditions et l'aide qu'il n'a cessée de m'apporter tout au long de ma recherche.

Je remercie également mon encadreur en France ; le professeur Sabine **SZUNERITS** de m'avoir accepté dans son laboratoire à Lille et de me donner tous les moyens pour pouvoir poursuivre mes travaux et tout les conseils et les directives qu'elle m'a entouré pendant ma période de stage de 18mois.

Je suis très sensible au grand honneur que me fait Monsieur le Professeur Fayçal **DJAZI** en acceptant de présider ce jury.

Je remercie également Monsieur Abed Mohamed **AFFOUNE**, professeur à l'université de 8 mai 1945- Guelma, ainsi que le professeur Rabah **REHAMNIA** de l'université de Université Badji Mokhtar Annaba et le professeur Abd Elhak **GUEID** de l'université Souk Ahras, pour avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Je voulais également remercier Docteur Rabah **BOUKHERROUB** de m'avoir intégré dans son équipe NBI, Nanobiointerfaces à l'Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie –Lille.

Ma reconnaissance va tout particulièrement à Madame chahrazed **SAADI** pour l'aide qu'elle m'a donné pour appuyer mon départ pour la bourse, et toujours de m'encourager pour avancer.

Mes remerciements les plus distingués vont vers **tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin** à réaliser ce travail.

Dédicace

A Dieu le tout puissant, qui est toujours à mes côtés

*A mon père et A ma mère que Dieu me les garde
Sans eux je ne saurai arriver à cette vie*

A tous ceux qui m'aiment .

Abréviations

Liste d'abréviations

AFM :	Microscopie de Force Atomique
AM:	Ampicilline
ARN :	Acide ribonucléique
cfu :	Colony-forming unit
CMI ₅₀ :	Concentration minimale inhibitrice de AP à laquelle 50% des isolats de E. coli C43
sCT :	Calcitonine De Saumon
cfc :	Cubique à face centrée
CV :	Voltamétrie cycliques
DCV :	Dépôt chimique en phase vapeur
DPV :	Voltamétrie impulsionnelle différentielle
E. coli :	Escherichia coli
GC :	Electrode de carbone vitreux
GO :	Oxyde de graphène
HPLC :	Chromatographie en phase liquide à haute performance
LED :	Diode électroluminescente
MEB :	Microscopie électronique à balayage
Milli-Q :	Eau ultra-pure
NFG :	Nanomatériaux de la famille du graphène
NP :	Nanoparticules
DO ₆₀₀ :	Densité optique d'un échantillon mesuré à une longueur d'onde de 600 nm
ODS :	Ondansetrone
PBS :	Tampon phosphate salin (Phosphate-buffered saline)
PEI :	polyéthylèneimine
PIR :	Proche infrarouge
prGO :	Oxyde de graphène réduit poreux
rGO :	Oxyde de graphène réduit
RMN :	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire
SC :	stratum-corneum
SPM :	Microscopie à sonde à balayage
TEM :	Microscopie électronique à transmission
ThT :	Thioflavine T

Liste des figures et des tableaux

Liste des tableaux

Titre de tableau	Page °N
Tableau I.1. Évolution des propriétés des particules à l'échelle nanométrique.	09
Tableau I.2. Synthèse du graphène.	24
Tableau II.1. Voies et formes d'administration des médicaments.	39

Liste des figures

Titre de figure	Page N°
Figure I.1. Thérapeutiques et diagnostiques à base de nanoparticules multifonctionnelles.	12
Figure I.2. Allotropies de carbone.	13
Figure I.3. Les formes graphitiques.	15
Figure I.4. Structure du graphène.	16
Figure I.5. Diverses applications du graphène.	20
Figure I.6. Structure de l'oxyde de graphène.	21
Figure I.7. Préparation de l'oxyde de graphène.	22
Figure I.8. Illustration des différentes étapes de la méthode de Hummers.	25
Figure I.9. Images MEB de GO préparé par la version de Marcano et al.	26
Figure I.10. Présentation schématique de l'exfoliation thermique de GO.	27
Figure I.11. Images MEB de rGO exfolié thermiquement.	28
Figure II.1. Différentes voies d'administration des médicaments.	38
Figure II.2: Morphologie de la peau.	45
Figure III.1 : Agrégation des protéines.	65
Figure III.2 : Etapes de synthèse de l'oxyde de graphène réduite poreux (prGO).	59
Figure III.3: Images de microscopie électronique par transmission (TEM) d'oxyde de graphène réduit (rGO) et d'oxyde de graphène réduit poreux (prGO).	62
Figure III.4: Voltamogrammes cycliques enregistrés sur GC (noir), GC/rGO (gris) et GC/prGO (bleu) en utilisant $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (5 mM) / PBS (0,1 M), Vitesse de balayage = 50 mV s ⁻¹ .	63
Figure III.5: Images SEM des électrodes GC / rGO et GC / prGO.	63
Figure III.6: Voltamogrammes cycliques enregistrés sur GC (noir), GC / rGO (gris) et GC / prGO (bleu) dans PBS (0,1 M, pH 7,4 en présence de lysozyme (5 µM), Vitesse de balayage = 50 mV s ⁻¹ .	64
Figure III.7: Voltamogrammes cycliques de la tyrosine (1 mM, noir) et du tryptophane (1 mM, bleu) dans le PBS (0,1 M, pH = 7,4), vitesse de balayage = 50 mV s ⁻¹ , acquise avec l'électrode GC / prGO.	65
Figure III.8: Voltamogrammes d'impulsions différentielles de lysozyme (5 µM, 0,1 µM) dans du PBS (0,1M, pH 7,4) enregistrés avec des électrodes GC / prGO.	65
Figure III.9 : Changement de hauteur de crête en fonction des concentrations de lysozymes (insertion: zoom à des concentrations inférieures).	66
Figure III.10: Evolution de la fluorescence de la thioflavine T lors de l'incubation	66

du lysozyme (10 mg mL ⁻¹) à 60 ° C en présence de NaCl (5 mg ml ⁻¹) à pH 2 (noir) et pH 7,4 (gris) ; Les barres d'erreur indiquent l'écart-type des mesures triplées (n = 3).	
Figure III.11 : Les images AFM du mode contact des solutions de lysozyme sont conservées 3 jours à pH 2 et 60 ° C.	67
Figure III.12: Evolution du courant d'oxydation avec différentes électrodes de lysozyme (10 mg mL ⁻¹) dans 0,1 PBS (pH 7,4, bleu) et pH 2,0 (noir) lors de l'incubation à 60 ° C pendant plusieurs jours: (A) GC; (B) GC / rGO; (C) GC / PRGO; Les barres d'erreur indiquent l'écart type des mesures triplées (n = 3). La solution a été diluée à 5 µM pour être dans la gamme linéaire de la courbe d'étalonnage (figure III.7).	68
Figure III.13: Voltamogramme d'impulsion différentielle (DPV) de l'insuline (1 µM dans PBS (0.1M, pH 7.4) sur GC / prGO.	69
Figure III.14 : Courbe d'étalonnage pour l'insuline.	70
Figure III.15 : Evolution de la fluorescence ThT et (B) évolution du courant maximal oxydatif à E = 0,62 V, sur l'insuline (100 µM dans 0,1 PBS pH 7,4) incubation à 60 ° C. Les barres d'erreur indiquent l'écart type des mesures triplées (n = 3);	70
Figure III.16 : image AFM d'insuline agrégée (100 µM / 0,1 PBS pH 7,4) lors de l'incubation à 60 ° C pendant 60 h.	71
Figure III.17 : Evolution de la fluorescence de ThT lors de l'incubation de l'insuline d'humuline (3,4 mg mL ⁻¹) à 60 ° C pendant 60 h; Les barres d'erreur indiquent l'écart type des mesures en triplicat (n = 3),	72
Figure III.18 : Evolution du courant maximal oxydatif déterminé à E = 0,62 V après le vieillissement de l'insuline Humuline.	72
Figure III.19: mesures HPLC d'humuline fraîche (solution injectable à l'insuline, 3,4 mg . ml ⁻¹) (t = 0h) et après 3,5, 24 et 30 h à 60 ° C.	73
Figure III.20: Voltamogrammes d'impulsion différentielle de sCT (40 µg ml ⁻¹) dans du PBS (0,1 M, pH 7,4).	74
Figure III.21: Courbe d'étalonnage pour sCT (insertion: zoom à des concentrations inférieures);	75
Figure III.22: (A) Variation de l'intensité de fluorescence de ThT et (B) évolution du courant de pic oxydatif (E = 0,58 V) de calcitonine (0,59 mM) dans un tampon citrate (10 mM, pH 6) maintenu à température ambiante. La solution a été diluée à 15 µM avec PBS (0,1 M, Ph 7.4) pour être dans la gamme linéaire de la courbe d'étalonnage.	75
Figure III.23: Photos AFM des fibrilles amyloïdes sCT formées après 3 jours à température ambiante.	76
Figure III.24 : Diamètres des fibrilles de protéines de lysozyme, insuline et calcitonine mesurées par AFM. La large distribution des diamètres provient de l'hétérogénéité structurelle dans les fibrilles.	76
Figure IV.1. Illustration schématique de la fabrication d'un Patch cutané, dispositif photoactif flexible basé sur le rGO chargé d'ODS déposé sur le Kapton.	83

Figure IV .2. Cellules statiques de diffusion Franz (SES GmbH, Analyse System, Bechenheim, Allemagne).	86
Figure IV.3. Les étapes de l'expérience de libération photothermique de l'ODS à partir d'un patch Kp / rGO / ODS.	87
Figure IV.3. B. Les étapes de irradiation des patches Kp / rGO / ODS pour administration photothermique de l'ODS.	88
Figure IV.4. Spectres d'absorption UV / Vis d'une solution aqueuse de GO (2mgmL ⁻¹ , vert), interfaces quartz recouvertes de films minces rGO par le dépôt à la goutte (2 mg mL ⁻¹ , trois fois) (gris), film Kapton (Rouge) et Kapton revêtu par le dépôt à la goutte avec du rGO (2mg mL ⁻¹ , trois fois)(noir).	90
Figure IV.5. Image SEM du patch Kapton chargé de rGO.	90
Figure IV.6. Comparaison de la capacité de chauffage photothermique en verre (gris), Kapton (rouge), verre / rGO (bleu) et Kapton / rGO (noir) d'eau sous éclairage NIR (980 nm) pendant 10 min à 4Wcm ⁻² (A) avec Température finale sous la forme d'un diagramme à barres (B).	92
Figure IV.7. Spectre UV / Vis de la solution ODS, courbe d'étalonnage de l'ODS.	93
Figure IV.8. Capacité de chargement ODS (500 µg mL ⁻¹) de rGO en fonction du rGO content à pH 7.	93
Figure IV.9. Efficacité de chargement de l'ODS.	94
Figure IV.10. Influence du pH sur le chargement des ODS (500 µg mL ⁻¹) sur le RGO (2 mg mL ⁻¹);	94
Figure IV.11. Courbes de chauffage photothermique de l'eau à l'aide d'un patch Kapton / rGO sous éclairage NIR (980 nm) à différentes densités de puissance laser à l'aide d'un laser à ondes continues.	95
Figure IV.12. Changement de la température de la solution d'eau (1 mL) lors de l'illumination du patch Kapton-rGO à 980 nm pendant 10 minutes en fonction de la densité de puissance du laser.	95
Figure IV.13. températures sont atteintes à 4 W cm ⁻² pour Kapton / rGO/ODS et Kapton/rGO.	96
Figure IV.14. Concentration de ODS libérée par voie photothermique dans l'eau (pH 7) à partir du patch Kapton / rGO (formé en mélangeant 500 µg mL ⁻¹ ODS avec 1 mg mL ⁻¹ rGO) à l'aide d'un laser continu à 980 Nm, 0,7-10 W cm ⁻² avec un temps d'éclairage de 10 min.	97
Figure IV.15. Rechargement (à pH 7 avec 500 µg mL ⁻¹) et libération d'ODS (980 nm, 10 min, 3 W cm ⁻²) du patch pendant 6 cycles.	98
Figure IV.16. Décharge fractionnaire cumulative de ODS pendant 9 jours après activation une fois par jour pendant 10 min (980 nm, 3 W cm ⁻²).	98
Figure IV.17. Concentration de l'ODS libérée par voie photothermique dans l'eau (pH 7) à partir du patch Kapton / rGO lors d'une irradiation à la lumière pulsée à 980 nm et 3Wcm ⁻² .	99
Figure IV.18 (A) Profils de perméation in vitro de ODS (quantité cumulée perméable par rapport au temps) par la peau porcine à partir des taches Kapton / rGO-ODS formées en mélangeant 500 µg mL ⁻¹ ODS avec 1 mg mL ⁻¹ rGO par	100

irradiation lumineuse pendant 10 Min à l'aide d'un laser à onde continue à 980 nm à différentes densités de puissance laser. (B)Flux de l'ODS	
Figure IV.19 Photographies de peau de cochon avant et après irradiation au laser à 5 et 10Wcm ⁻² pendant 10 min.	101
Figure IV.120. Des photographies représentatives et l'histologie de la peau de l'oreille du cochon après un traitement avec différentes densités de puissance laser à 980 nm pendant 10 min. Barre d'échelle = 0,5 mm; Les taches noires sur la peau sont dues à rGO.	103
Figure IV .21. Profils de perméation in vitro des ODS imprégnés cumulés par la peau porcine lors d'une irradiation lumineuse pendant 10 minutes à l'aide d'un laser continu à 980nm à 5Wcm ⁻² de Kapton / rGO-ODS (rouge, formé en mélangeant 500 µg/mL d'ODS avec 1 mg/mL de rGO), Kapton / rGO-ODS -tween 20 patches imprégnés (gris, formées en mélangeant 500 µg/mL ODS avec 500 µg/mL tween 20 et 1 mg mL ⁻¹ rGO) et de Kapton / rGO-ODS par mouillage de la peau avec tween 20 (200 µL, 15% en poids dans l'eau);	104
Figure IV.22. Flux d'ODS.	104
Figure V.1. Illustration schématique de la préparation d'interfaces flexibles à base de Kapton / Au modifiées avec de l'oxyde de graphène réduit poreux (prGO) chargé d'ondanestronne (ODS) et de prGO modifié avec polyéthylèneimine (PEI) chargé d'ampicilline (AP) pour l'administration électrochimique à demande .	111
Figure V.2. Microscopie électronique à transmission électronique (TEM) images de (A) oxyde de graphène réduit (rGO), (B) oxyde de graphène réduit poreux (prGO).	116
Figure V.3. Photo d'électrode flexible avant et après revêtement avec prGO par la technique goutte par goutte (drop casting).	116
Figure V.4. Images SEM de K / Au-rGO et K / Au-prGO.	117
Figure V.5. Voltamogrammes cycliques de K/Au (noir), K/Au- rGO (gris) et K/Au- prGO (vert) en utilisant [Fe (CN) ₆] ^{3-/4-} (5 mM) / PBS (0,1 M), taux de balayage = 50 mV s ⁻¹ .	117
Figure V.6. Spectre UV / Vis de différentes concentrations d'ODS et de la courbe d'étalonnage correspondante.	118
Figure V.7. Capacité de chargement de rGO (gris) et prGO (bleu) par ODS (500 µg mL ⁻¹) à pH =7 en modifiant les rapports rGO / ODS et prGO / ODS;	119
Figure V.8. Influence du pH sur le chargement de l'ODS (500 µg mL ⁻¹) sur le prGO (500 µg mL ⁻¹).	119
Figure V.9. Voltamogrammes cycliques de K / Au (noir), K / Au-PRGO / OD (vert) dans PBS (0,1 M, pH 7,4), taux de balayage = 50 mV s ⁻¹ .	120
Figure V.10. La libération d'ODS déclenchée électrochimique dans le temps dans PBS (0,1 M, pH 7,4) après application de +0,8 V (vert), -0,8 V (bleu) et sous diffusion passive (aucun potentiel appliqué).	121
Figure V.11. Quantité de ODS libérée lors du rechargement du K / Au avec prGO / ODS pour plusieurs fois.	122
Figure V.12. Courbe HPLC d'ampicilline à différentes concentrations et courbe d'étalonnage correspondante.	123

Figure V.13. Capacité de chargement de la matrice prGO (gris) et prGO / PEI avec AP ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) (bleu) lors de la variation des rapports prGO et prGO / PEI-AP.	124
Figure V.14. Stabilité d'une interface électrochimique modifiée par drop-casing avec prGO / AP (gris) ou prGO / PEI / AP (bleu) lors de l'immersion pendant 2 h dans PBS (0,1 M, pH 7.4) sans application d'un potentiel (diffusion passive).	124
Figure V.15. Libération électrochimique de l'AP dans PBS (0,1 M, pH 7.4) à partir d'une matrice de l'AP à $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ lors de l'application de +0,8 V (vert), -0,8 V (noir).	125
Figure V.16. Croissance planctonique de l'E. coli (inoculum de 1×10^8 cfu mL^{-1}) en l'absence et présence de différentes concentrations d'AP (0-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$),	125
Figure V.17. Changement d'OD600 à 2 h (extrait de la Figure 6B).	126
Figure V.18. Comparaison de l'action de l'AP gratuit ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$, contrôle négatif), AP ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$, contrôle positif) et AP libéré électrochimiquement à différents intervalles de temps lorsqu'ils sont incubés avec E. coli (1×10^8 ufc- mL^{-1}) pendant 2 h.	127

Sommaire

Sommaire

Introduction générale	1
Chapitre I : Généralités sur le graphène	
Introduction	6
I.1. Historique des nanoparticules	6
I.2. Classification des nanomatériaux	7
I.2.1. Les nanomatériaux à base de carbone	7
I.2.2. Les nanoparticules inorganiques	7
I.2.3. Les nanoparticules organiques	8
I.3. Propriétés des nanomatériaux	8
I.4. Applications des nanomatériaux	9
I.5. Nanomatériaux. Cas d'étude « la famille du graphène »	12
I.5.1. Allotropies de carbone et matériaux connexes	13
I.5.2. Cas d'étude : Les nanomatériaux de la famille du graphène (NFG)	14
I.5.2.1. Le graphène	15
I.5.2.2. Propriétés du graphène	16
I.5.2.3. Diverses applications des nanomatériaux à base de graphène	18
I.5.2.4. Application de graphène	20
I.5.3. Oxyde de graphène (GO)	21
I.5.3.1. Synthèse Oxyde de graphène (GO)	22
I.5.3.2. Méthodes de synthèse chimique de l'oxyde de graphène	24
I.5.3.3. Exfoliation et réduction de GO	26
I.5.3.4. Fonctionnalisation de GO (FGO)	28
Conclusion	29
Références bibliographiques	29
Chapitre II : Les voies d'administration des médicaments	
Introduction	37
II.1. Définition d'un médicament	37
II.2. Historique des médicaments	37
II.3. Voies d'administration des médicaments	38
II.4. L'administration transdermique de médicament	43
II.4.1. Généralités sur l'administration transdermique de médicament	43
II.4.2. Les avantages de l'administration transdermique de médicament	44
II.4.3. Les désavantages de l'administration transdermique de médicament	44
II.4.4. Morphologie de la peau	45
II.4.5. Classification des patchs transdermiques	45
II.4.6. Classification systèmes d'administration transdermiques de médicaments	46
II.4.7. Composants du patch transdermique	47
II.4.8. Facteurs affectant la perméabilité transdermique	49
II.4.8.1. Propriétés physicochimiques des pénétrants	49
II.4.8.2. Système de délivrance de médicament et ses propriétés physicochimiques	49
II.4.9. Les conditions d'utilisation d'un système d'administration de médicament	50
Conclusion	50
Références bibliographiques	51

Chapitre III : Détermination de l'Agrégation des protéines par une électrode de GC/prGO

Introduction	56
III.1. L'agrégation des protéines	56
III.2. Méthodes de détermination de l'agrégation des protéines	57
III.2.1. La Fluorescence ThT (Thioflavine T)	57
III.2.2. Les techniques électrochimiques	57
III.3. Etude de l'agrégation des protéines sur les électrodes modifiées à base d'oxyde de graphène réduit poreux	58
III.3.1. Les trois protéines utilisées dans les testes électrochimiques d'agrégation	58
III.3.2. Matériaux utilisés	59
III.3.3. Synthèses de rGO et prGO	59
III.3.4. Préparation des électrodes de carbone vitreux modifiées par rGO et prGO (GC/rGO, GC/prGO)	60
III.3.5. Agrégation des échantillons de protéines	60
III.3.6. Mesures de l'agrégation	60
III.4. Méthodes de Caractérisation	61
III.4.1. Microscopie électronique par transmission (TEM)	61
III.4.2. La Microscopie de Force Atomique (AFM)	61
III.5. Résultats et discussion	62
III.5.1. Développement d'interfaces de détection électrochimique pour l'agrégation des protéines	62
III.5.2. Agrégation de lysozyme	64
III.5.3. Agrégation de l'insuline et des formulations pharmaceutiques d'insuline	69
III.5.3.1. Insuline humaine	69
III.5.3.2. L'insuline humaine: une formulation pharmaceutique	72
III.5.4. Agrégation de la calcitonine (<i>Calcitonine De Saumon</i>)	74
Conclusions	77
Références bibliographiques	77

Chapitre IV : Administration photothermique de l'ODS

Introduction	80
IV.1. Historique de la délivrance photothermique des médicaments	80
IV.2. Les systèmes thérapeutiques transdermiques ou patchs transdermiques	81
IV.4. Critique de choix du médicament ODS dans les essais	82
IV.5. Section expérimentale	83
IV.5.1. Matériaux utilisés	83
IV.5.2. Synthèse de l'oxyde de graphène réduit (rGO)	83
IV.5.3. Chargement de rGO avec Ondansetron (ODS)	84
IV.5.4. Préparation du patch cutané flexible : Kapton / rGO-ODS	84
IV.5.5. Les méthodes de caractérisation de l'ondansetron chargé sur Kapton / rGO	84
IV.6. Résultats et discussion	89
IV.6.1. Conception et caractéristiques des patchs cutanés flexibles et photo-actifs rGO / Kapton	89
IV.6.2. Propriétés photothermiques du patch cutané	91
IV.6.3. Chargement du patch cutané avec ODS	92
IV.6.4. Le rapport [rGO] / [ODS]	93
IV.6.5. Etude de chauffage photothermique d'un patch Kapton /rGO/ODS	95
IV.6.6. Délivrance d'ondansetron (ODS) à partir des patchs de Kapton / rGO-ODS	96

IV.6.7. Délivrance transdermique de l'ODS à travers la peau du porc	99
IV.6.7.1. Le choix de la densité de puissance laser	100
IV.6.7.2. La quantité de l'ODS retenue dans la peau	101
IV.6.7.3. Le flux de l'ODS (J) à travers la peau de porc sous irradiation laser de 5Wcm^{-2}	102
IV.7.8. Analyse histologique de la peau de porc irradiée au laser	102
IV.7.9. Effet de l'ajout d'un amplificateur de pénétration sur le flux ODS	103
Conclusion	105
Références bibliographiques	106

Chapitre V: Libération contrôlée des médicaments (ODS - AP) par voie électrochimique

Introduction	110
V.1. Le contrôle électrochimique de la libération des médicaments	110
V.1.1. L'utilisation de l'oxyde de graphène réduit poreux (prGO) pour délivrance des médicaments	110
V.1.2. Le chargement et la délivrance électrochimique des médicaments sur prGO	111
V.1.3. Le choix des médicaments utilisés pour le relargage	112
V.2. Protocole expérimentale	112
V.2.1. Matériaux utilisés	112
V.2.2. Synthèse des matériaux (rGO, prGO) voire le chapitre III	113
V.2.3. Chargement de rGO ou de prGO avec des médicaments	113
V.2.3.1. Ondansetron (ODS)	113
V.2.3.2. Ampicilline (AM)	113
V.2.4. Modification des feuilles de Kapton revêtues d'or avec rGO / ODS, prGO / ODS, prGO / AM ou prGO / PEI / AM	113
V.2.5. Instrumentation	113
V.2.6. Quantification des doses des médicaments	114
V.2.6.1. Quantification d'ODS par UV-Vis	114
V.2.6.2. Quantification de l'ampicilline (AM) par HPLC	114
V.2.7. La libération électrochimique des médicaments	114
V.2.7.1. Ondansetron (ODS)	114
V.2.7. 2. Ampicilline (AM)	115
V.2.8. Conditions de croissance bactérienne	115
V.2.9. Viabilité des cellules bactériennes	115
V.3. Résultats et discussion	115
V.3.1. Caractérisation des électrodes modifiée par rGO et prGO	115
V.3.2. Chargement et libération électrochimique de l'ODS	118
V.3.2.1. Chargement de l'ODS sur rGO et prGO	118
V.3.2.2. Quantification de l'ODS chargé par le rGO et prGO par utilisation de UV/ Vis	118
V.3.2.3. Libération électrochimique de l'ODS	119
V.3.3. Chargement et libération de l'AM d'ampicilline à partir d'électrodes modifiées prGO / PEI / AM	122
V.3.3.1. Chargement de prGO / PEI par AM	122
V.3.3.2. Libération de l'AM à partir de la matrice prGO / PEI / AM	124
V.3.3.3. Contrôle de l'activation de l'AM libéré à partir de la matrice prGO / PEI / AM	125
Conclusion	127
Références bibliographiques	128
Conclusion générale	130

Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

Les nanomatériaux offrent des propriétés physicochimiques et biologiques intéressantes pour les applications biomédicales. Les nanomatériaux à base de graphène émergent rapidement en tant que «matériaux de merveille bidimensionnels» en raison de leur structure unique qui possède d'excellentes propriétés mécaniques, optiques et électriques, et ils sont exploités dans l'électronique et d'autres domaines. Les tendances émergentes montrent que les propriétés exceptionnelles de ces nanomatériaux peuvent être exploitées pour des applications biomédicales, en particulier dans l'administration de médicaments [1].

Le graphène, une fine couche atomique de carbone graphitique, isolé pour la première fois il y a quatorze ans [2], est rapidement devenu un matériau d'intérêt pour effectuer des dispositifs microélectroniques. Le graphène, en particulier, est une plateforme prometteuse pour la bioélectronique [3], car il regroupe dans un matériau de nombreuses propriétés uniques, telles qu'une conductivité électrique élevée, une inertie chimique, une transparence optique et une flexibilité avec une rigidité de flexion comparable à la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire [4]. Comme ce matériau devient de plus en plus facilement disponible, et peut-être produit à grande échelle [5, 6], son intégration prometteuse dans les dispositifs de biocapteurs et biomédicaux est maintenant étudiée [7 - 9].

Un médicament est un produit destiné à traiter une affection médicale grâce aux principes actifs qu'il contient. Il peut être administré par voie orale, par injection, par voie rectale, par voie cutanée. Il peut se présenter sous forme de comprimés, d'ampoules, de suppositoires, de pommades ou de sirops, entre autres [10]. Il peut être utilisé pour détruire des bactéries, pour soulager une douleur, pour diminuer un symptôme ou pour pallier une carence. Certains médicaments nécessitent une prescription médicale pour être délivrés, notamment en raison de leurs effets secondaires, de leur toxicité ou de leurs propriétés additives [11].

Les médicaments sont efficaces contre la plupart des maladies mais leur usage n'est pas anodin (sans risques). Ils peuvent parfois avoir des effets indésirables graves. Les risques liés à la prise de médicaments sont divers, il y a ceux liés à l'administration par voie sous-cutanée (les injections blessent, causent des contusions et font peur aux enfants), et la plupart des médicaments administrés par voie orale sont absorbés lentement et peuvent être dégradés par l'acide gastrique et les enzymes [3].

L'agrégation des protéines dans les produits biopharmaceutiques, est un autre type de risque qui peut être également très grave [13]. L'instabilité des protéines basée sur le mauvais repliement des protéines et l'agrégation est une grande préoccupation pour les thérapies à base de protéines en raison de leur perte de biodisponibilité associée. Le développement de méthodes simples et rentables pour l'analyse de formulations pharmaceutiques, indiquant la présence et l'absence d'agrégats protéiques, devient de la plus haute importance. L'agrégation des protéines est une question répandue et troublante car ses structures supramoléculaires sont capables d'induire des réponses biologiques significatives et de modifier les réactions moléculaires [13-15].

La pathogénèse de plusieurs maladies connues : telles que la maladie de Parkinson, d'Alzheimer, la maladie de Huntington, Creutzfeld Jacob etc..., est connue pour être liée à l'agrégation des protéines. Outre les implications de l'agrégation des protéines en tant que biomarqueur général pour la santé humaine, il existe un intérêt continu à détecter les agrégats solubles dans les produits biopharmaceutiques. Un obstacle majeur pour le développement de nombreuses thérapies à base de protéines est l'immunogénicité potentielle des agrégats de protéines chez les humains [16]. La détermination des niveaux acceptables d'agrégation des protéines dans les formulations médicamenteuses devient ainsi d'une grande importance avec le nombre croissant de produits biopharmaceutiques sur le marché [17].

L'administration transdermique de médicaments est une stratégie prospective qui complète les limites des systèmes d'administration de médicaments classiques, notamment l'administration de médicaments par voie orale (Risques liés aux interactions avec les aliments, et avec d'autres médicaments dans le tube digestif, difficultés d'utilisation en cas de nausées, vomissements, ou inconscience,...) et par voie sous-cutanée (Risques d'infections, douleur,...)[18].

La demande croissante de thérapies adaptées aux patients a conduit au développement de l'administration transdermique de médicaments qui présente plusieurs avantages par rapport à l'administration conventionnelle des médicaments. L'administration transdermique permet une libération prolongée et contrôlée du médicament, et favorise la conformité et la commodité des patients avec son caractère non invasif et indolore [19]. En particulier, la voie transdermique est une bonne alternative à l'injection d'aiguille ou la prise orale de médicaments. L'administration transdermique nécessite souvent une dose plus faible de médicaments que celle par voie orale. Avec une courte voie de diffusion pour atteindre le système vasculaire, le mode transdermique aide les patients à contourner les effets

secondaires dus à la digestion et au métabolisme du médicament dans le tractus gastro-intestinal. L'administration transdermique est indolore et non invasive, avantage qui est important contre l'administration intraveineuse ou intramusculaire. Les médicaments non invasifs permettent l'administration répétée du médicament sur la même région du corps en vue d'un traitement à long terme, offrant ainsi aux patients la conformité et la commodité [20].

Le but de notre travail, décrit dans ce manuscrit, est d'une part l'utilisation d'une méthode électrochimique à base d'un nouveau dérivé de nanoparticules de graphène, l'oxyde de graphène réduit poreux (porous reduced graphene oxide) « prGO », pour une détection précoce et plus précise des agrégations de protéines, et d'autre part, l'intégration des nanoparticules à base de graphène, l'oxyde de graphène réduit (reduced graphene oxide) « rGO » et le « prGO », dans les thérapies biomédicales (consommation des médicaments) afin de remplacer les méthodes classiques à risques.

La première partie de ce travail consiste au développement d'un biocapteur électrochimique à base d'une électrode de carbone vitreux (Glassy Carbon) modifié par le prGO (GC / prGO), afin de vérifier la présence ou non de l'agrégation protéique (agrégation des médicaments).

La deuxième partie porte sur la réalisation d'un système d'administration des médicaments (drug delivery) à base de nanoparticules, le rGO et le prGO, par deux méthodes différentes : Photothermale et Electrochimique.

Le travail présenté dans ce manuscrit s'articule autour de cinq chapitres :

Après une introduction générale où est abordé le contexte de notre étude ainsi que ses objectifs.

Le premier chapitre est une synthèse bibliographique sur les nanoparticules, en général et le graphène, en particulier, où ses propriétés et ses domaines d'utilisation sont détaillés.

Le second chapitre expose dans un premier lieu les risques liés à l'utilisation des médicaments par les voies classiques, puis évoque l'importance de la méthode d'administration transdermique pour réduire ces risques.

Le troisième chapitre est consacré à la description d'une nouvelle méthode électrochimique qui s'intéresse à la voltamétrie d'impulsion différentielle (DPV) de détection d'agrégats protéiques, à base de prGO, dans certains médicaments (insuline, calcitonine et lysozyme).

Le quatrième chapitre décrit l'élaboration des patches flexibles, qui fournissent l'ondansétron (ODS) à travers la peau, à partir du rGO chargé par l'ondansétron (ODS) puis déposé sur un film de polymère (poly 4,4'-oxydiphénylène-pyromellitimide) appelé kapton. La technique de la lumière du proche infrarouge (NIR) pour l'administration transdermique photothermale à travers la peau est utilisée et est également décrite.

Le cinquième chapitre est consacré à la description d'un système de libération électrochimique contrôlé pour l'administration, à la demande, de médicaments (l'ondansétron (ODS) et l'ampicilline (AP)), réalisé par le captage de ces médicaments sur l'oxyde de graphène réduit poreux (prGO), puis déposé sur une électrode flexible de kapton revêtue d'un film mince d'or. Dans le cas de l'AP, un test de l'activité de l'antibiotique, après administration électrochimique sur une bactérie (E-coil), est également décrit.

Signalons que l'ensemble des méthodes électrochimiques et physiques et les différentes techniques d'élaboration et de caractérisation, ainsi que les autres techniques analytiques et les différents matériaux, notamment les dérivés de graphène (GO, rGO et prGO) utilisés au cours de cette étude, ainsi que le protocole expérimental de synthèse et de caractérisation sont insérés, selon le cas, dans les chapitres de la partie expérimentale.

Enfin, notre travail se termine par une conclusion générale.

Références bibliographiques

1. C. Mc Callion et al, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 104 235–250p (2016).
2. KS Novoselov , AK Geim , SV Morozov , D Jiang, Y Zhang, SV Dubonos, IV Grigorieva, AA Firsov., Science, 80, vol. 306, 666–669p (2004).
3. M. Pumera, Materials Today. Vol 14, 7-8 308-315p (2011).
4. Y. Wei, B. Wang, J. Wu, R. Yang, and M. L. Dunn, Nano Lett., vol. 13, no. 1, 26–30 p (2013).
5. V. C. Tung, M. J. Allen, Y. Yang, and R. B. Kaner, Nat. Nanotechnol., vol. 4, no. 1, 25–29 p (2009).

6. S Bae, H Kim, Y Lee, X Xu, J-S Park, Y Zheng, J Balakrishnan, T Lei, H R Kim, Y I Song, Y-J Kim, KS. Kim, B Özyilmaz, J-H Ahn, B HHong and S IijimaS., Nature Nanotechnology volume 5, 574–578p (2010).
7. L. H. Hess et al., Adv. Mater., vol. 23, no. 43, 5045–5049p (2011).
8. B. M. Blaschke, M Lottner, S Drieschner, A Bonaccini, K Stoiber, L Rousseau, G Lissourges and J A. Garrido., Mater., vol. 3, no. 2, 25007 p (2016).
9. M. D. Angione, R Pilolli , SCotrone , M Magliulo , A Mallardi , G Palazzo, L Sabbatini, D Fine , A.Dodabalapur, N Cioffi, and L Torsi., Mater. Today, vol. 14, no. 9, 424–433p (2011).
10. Y TOUITOU, Pharmacologie, r, 11^e édition, Elsevier Masson SAS, Copyright ©, Pierre, 2007.
11. P Gregory, Case-Lo, Medication Administration: Why It's Important to Take Drugs the Right Way, PharmD, 2016.
12. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9782294700545500041>, Voies d'administration des médicaments, Pharmacologie et thérapeutiques, Elsevier Masson SAS, 2013.
13. T Frachon, Agrégation des protéines thérapeutiques à l'interface triple solide/liquide/air : application aux procédés industriels de production, stockage et d'administration, Thèse de doctorat en Physique pour les sciences du vivant, École doctorale physique (Grenoble), Soutenue en 2017 .
14. K. Turoverov, I. M. Kuznetsova and V. N. Uversky, Prog Biophys Mol Biol. , 102, 73-84p (2010).
15. W. Wang, Int. J. Pharmaceutics, 289, 1-30p (2005).
16. Edward H. Koo, Peter T. Lansbury, Jr., and Jeffery W. Kelly, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 96, 9989 –9990p (1999).
17. F. R. Brennan, L. Dill Morton, S. Spindeldreher, A. Kiessling, R. Allenspach, A. Hey, P. Y. Muller, W. Frings and J. Sims, MAbs, 2, 233-255p (2010).
18. M.R. Prausnitz, R. Langer, Nat. Biotechnol. 26, 1261-1268p (2008).
19. A.W. Oosten, J.A. Abrantes, S. Jonsson, P. de Bruijn, E.J. Kuip, A. Falcao, C.C. van der Rijt, R.H. Mathijssen, Eur. J. Clin. Pharmacol. 72 , 459- 467p (2016).
20. D. Son, J. Lee, S. Qiao, R. Ghaffari, J. Kim, J.E. Lee, C. Song, S.J. Kim, D.J. Lee, S.W. Jun, S. Yang, M. Park, J. Shin, K. Do, M. Lee, K. Kang, C.S. Hwang, N. Lu, T. Hyeon, D.H. Kim, Nat. Nanotech. 9, 397-404p (2014)

Chapitre I :
Généralités sur les
nanoparticules

Introduction

Le terme «nanotechnologie» a été défini par Norio Taniguchi de l'Université des sciences de Tokyo en 1974. La nanotechnologie [1-3], abrégée en «nanotech», est l'étude de la manipulation de la matière à l'échelle atomique et moléculaire. Généralement, la nanotechnologie traite des structures de taille comprise entre un et cent nm et implique le développement de matériaux ou de dispositifs dans cette taille. A titre de comparaison, dix nanomètres est mille fois plus petit que le diamètre d'un cheveu humain.

La nanotechnologie a la capacité d'améliorer notre aptitude à prévenir, à détecter et à éliminer les contaminants environnementaux dans l'air, l'eau et le sol d'une manière rentable et écologique. Les nanosciences et les nanotechnologies révolutionnent notre compréhension de la matière et auront des implications profondes pour tous les secteurs de l'économie [4-6], y compris l'agriculture et l'alimentation, la production et l'efficacité énergétique, l'industrie automobile, les cosmétiques, les appareils médicaux et les médicaments, ainsi que les ordinateurs et les armes [7].

I.1. Historique des nanoparticules

L'application des nanomatériaux peut être retracée historiquement avant même la génération de la science et de la technologie modernes. En 1857, Michael Faraday a publié un article qui explique comment les nanoparticules de métal affectent la couleur des fenêtres de l'église. En 1959, Richard Feynman (prix Nobel de physique en 1965) a donné une conférence intitulée «Il y a beaucoup de place au fond», suggérant la possibilité de manipuler les choses au niveau atomique. Il a spéculé sur la possibilité et le potentiel des matériaux nanométriques. Ceci est généralement considéré comme la prévision de la nanotechnologie. Beaucoup de ses spéculations [8-12] sont devenues réalité maintenant. Cependant, la véritable explosion de la nanotechnologie ne s'est pas produite avant le début des années 1990. Au cours des dernières décennies, des instruments sophistiqués de caractérisation et de manipulation [13-16] comme la microscopie électronique à balayage (MEB), la microscopie électronique à transmission (TEM) et la microscopie à sonde à balayage (SPM) sont devenus plus accessibles aux chercheurs.

Au début des années 1990, Huffman et Kraetschmer ont découvert comment synthétiser et purifier de grandes quantités de fullerènes [17-22]. Cela a ouvert la porte à leur caractérisation et à leur fonctionnalisation par des centaines d'enquêteurs dans les laboratoires. Peu de temps après, lors d'une réunion de la Materials Research Society en 1992, Dr. Ebbesen décrit à un public fasciné, sa découverte et sa caractérisation des nanotubes de carbone [23]. En utilisant des outils identiques ou similaires à ceux utilisés par Huffman et Kratschmer, des centaines de chercheurs ont développé le domaine de la nanotechnologie [24-27]. Personne ne sait combien de produits sur le marché contiennent aujourd'hui des nanoparticules ou sont fabriqués à l'aide des nanotechnologies.

I.2. Classification des nanomatériaux

Parmi les nanomatériaux on peut citer : Les nanomatériaux à base de carbone, nanoparticules inorganiques et les nanoparticules organiques

I.2.1. Les nanomatériaux à base de carbone

Parmi les nanoparticules à base de carbone on peut citer : Les fullerènes, Les nanofeuillets de graphène, Les nanotubes de carbone, Les nanofibres de carbone, Le noir de carbone, Les nanomousses de carbone...etc [28].

I.2.2. Les nanoparticules inorganiques

✓ Les métaux

La majorité des métaux ont été ou peuvent être produits dans des dimensions nanométriques. Parmi ceux-ci, les nanoparticules (NP) d'or sont particulièrement étudiées. Leurs propriétés uniques permettent d'envisager une série d'applications, notamment comme marqueur optique pour le diagnostic médical ou comme agent de traitement contre le cancer [29- 34]. L'argent nanométrique est aussi produit en bonne quantité et est utilisé surtout pour ses propriétés antimicrobiennes [35, 36].

✓ Les oxydes métalliques

Plusieurs oxydes métalliques de dimensions nanométriques ont été créés mais les plus courants, car produits à grande échelle, sont probablement la silice, l'oxyde de titane et l'oxyde de zinc. Ils sont utilisés tels quels ou enrobés, principalement dans le domaine de la rhéologie, des plastiques et du caoutchouc en tant qu'agents actifs et d'additifs (SiO_2), des crèmes solaires (TiO_2 , ZnO) et de pigments pour la peinture (TiO_2) [37, 38].

✓ Les points quantiques

Important domaine de recherche depuis une quinzaine d'années, les points quantiques ont été élaborés sous forme de semi-conducteurs, d'isolants, de métaux, de matériaux magnétiques ou d'oxydes métalliques [39]. Avec des dimensions plus petites que le rayon d'exciton de Bohr, ils démontrent des propriétés optiques et électroniques uniques à des dimensions d'environ un à dix nm de diamètre. [40]. Plusieurs points quantiques sont modifiés afin d'en produire des vecteurs de médicaments, des outils diagnostics ou des piles solaires non-organiques [41- 43].

I.2.3. Les nanoparticules organiques

✓ Les polymères organiques

De nombreux polymères organiques courants peuvent être produits dans des dimensions nanométriques comme le chlorure de polyvinyle et le latex. Plusieurs de ces polymères organiques sont à même d'être préparés sous forme de nanofils, donnant lieu à leur utilisation dans l'élaboration de systèmes d'ultrafiltration en phase liquide ou gazeuse, ou notamment comme senseurs [44]. Certaines nanofibres organiques biodégradables pourraient être utilisées en médecine pour la réingénierie tissulaire, la régénération osseuse ou encore pour contrôler le relargage de médicaments [45-47].

✓ Les nanoparticules d'inspiration biologique

Les nanoparticules NP d'inspiration biologique sont très diversifiées mais regroupent normalement des structures dans lesquelles une substance biologique est encapsulée, emprisonnée ou absorbée à la surface. Y sont notamment observés les lipides, les peptides et les polysaccharides utilisés comme vecteurs pour le transport ciblé de médicaments, récepteurs, agents chimiques en imagerie médicale [48].

I.3. Propriétés des nanomatériaux

Deux facteurs principaux font que les propriétés [49] des nanomatériaux diffèrent significativement des autres matériaux: augmentation de la surface spécifique et une prédominance des effets quantiques. Le premier facteur est responsable des changements de réactivité qui peut s'accroître considérablement avec une diminution de la taille des nanomatériaux. Le second facteur, observé pour certaines particules de quelques nm ou dizaines de nm, induit des changements de propriétés aux plans : optique (photonique), électrique, électronique, mécanique, chimique, biologique, rhéologique, mécanique, structural ou magnétique. Le tableau I.1 présente des exemples d'évolution de propriétés des particules à l'échelle nanométrique.

Tableau I.1. Évolution des propriétés des particules à l'échelle nanométrique [49].

Propriétés	Exemples
Catalytiques	Efficacité catalytique élevée due au rapport surface / volume élevé
Electrique	Augmentation de la conductivité électrique des céramiques et des nano-composites magnétiques Augmentation de la résistance électrique des métaux
Magnétique	Augmentation de la coercivité magnétique, comportement super-paramagnétique
Mécanique	Augmentation de la dureté et la solidité des Métaux et des alliages, de la ductilité et de la superplasticité des céramiques
Optique	Changement spectral de l'absorption optique et des propriétés fluorescentes, augmentation de l'efficacité quantique des cristaux semi-conducteurs
Stérique	Augmentation de la sélectivité Sphères creuses pour un transport spécifiques de médicaments et une distribution contrôlée
Biologique	Augmentation de la perméabilité vis-à-vis des barrières biologiques (membrane, barrière épithéliale,...) augmentation de la biocompatibilité

I.4. Applications des nanomatériaux

La plupart des applications actuelles des nanomatériaux représentent les développements évolutifs des technologies existantes: par exemple, la réduction de la taille des appareils électroniques.

I.4.1. Les écrans solaires et les cosmétiques

L'approche traditionnelle de protection contre les ultra-violets (UV) chimiques souffre de sa faible stabilité à long terme. Un écran solaire à base de nanoparticules minérales comme le dioxyde de titane offre plusieurs avantages. Les nanoparticules d'oxyde de titane ont une propriété comparable de protection contre les ultra-violets (UV). Le dioxyde de titane et l'oxyde de zinc sont actuellement utilisés dans certains écrans solaires, car ils absorbent et réfléchissent les rayons ultra-violets (UV) tout en étant transparents à la lumière visible et donc plus attrayants pour le consommateur [50]. Les nanoparticules d'oxyde de fer sont

présentes dans certains rouges à lèvres en tant que pigment. L'utilisation de nanoparticules dans les cosmétiques a soulevé un certain nombre de préoccupations concernant la sécurité des consommateurs [51].

I.4.2. Peintures

L'incorporation de nanoparticules dans les peintures a permis d'améliorer leurs performances, en les rendant plus légères et en leur conférant des propriétés différentes [52]. Des revêtements de peinture plus fins (légers) utilisés par exemple sur les avions, réduisent leur poids, ce qui est bénéfique pour l'environnement.

I.4.3. Ecrans plats

L'énorme marché des écrans plats à grande surface et haute luminosité, utilisés dans les écrans de télévision et les écrans d'ordinateur, est le moteur du développement de certains nanomatériaux. Le sélénure de zinc nanocristallin, le sulfure de zinc, le sulfure de cadmium et le tellure de plomb synthétisés par des techniques sol-gel sont des candidats pour la prochaine génération de luminophores émetteurs de lumière [53, 54].

I.4.4. Piles

Avec la croissance des équipements électroniques portables (téléphones mobiles, ordinateurs portables, capteurs à distance), il existe une forte demande pour des batteries légères à haute densité énergétique. Les matériaux nanocristallins synthétisés par des techniques sol-gel sont des candidats pour les plaques séparatrices dans les batteries en raison de leur structure en mousse (aérogel), qui peut contenir considérablement plus d'énergie que les classiques. Les batteries au nickel-métal-hydrure faites de nickel nanocristallin et d'hydrures métalliques devraient nécessiter une recharge moins fréquente et durer plus longtemps en raison de leur grande surface [55].

I.4.5. Catalyse

En général, les nanoparticules ont une surface spécifique élevée et donc une activité catalytique plus élevée. La catalyse est importante pour la production de produits chimiques. Les nanoparticules servent de catalyseur efficace pour certaines réactions chimiques, en raison du très grand rapport surface / volume [56]. Les nanoparticules de platine sont maintenant considérées dans la prochaine génération de convertisseurs catalytiques automobiles car la très grande surface des nanoparticules pourrait réduire la quantité de platine nécessaire [57].

I.4.6. Énergie

Les projets de nanotechnologie les plus avancés liés à l'énergie sont: le stockage, la conversion, les améliorations de la fabrication en réduisant les taux de matériaux et de procédés, les économies d'énergie et les sources d'énergie renouvelable améliorées. Les meilleures cellules solaires d'aujourd'hui ont des couches de plusieurs semi-conducteurs différents empilés ensemble pour absorber la lumière à différentes énergies, mais ils ne parviennent toujours qu'à utiliser 40% de l'énergie solaire [58].

I.4.7. Capteurs de gaz

Les gaz comme NO_2 et NH_3 peuvent être détectés sur la base de l'augmentation de la conductivité électrique des nanomatériaux. Ceci est attribué à l'augmentation de la concentration des trous dans les nanomatériaux due au transfert de charge des nanomatériaux au NO_2 , car les molécules de gaz lient les nanomatériaux [58].

I.4.8. Nourriture

La nanotechnologie est appliquée dans la production, le traitement, la sécurité et l'emballage des aliments [59]. Des procédés de revêtement nanocomposite servent à améliorer l'emballage des aliments en plaçant des agents antimicrobiens directement sur la surface du film enduit [60]. Les nouveaux aliments font partie des produits de consommation créés par nanotechnologie qui arrivent sur le marché au rythme de 3 à 4 par semaine [48].

I.4.9. Agriculture

Les applications de la nanotechnologie ont le potentiel de transformer l'ensemble du secteur agricole et de l'industrie alimentaire, de la production à la conservation, la transformation, l'emballage, le transport et même le traitement des déchets [48].

I.4.10. Médecine

La nanotechnologie a été une aubaine dans le domaine médical en livrant des médicaments à des cellules spécifiques en utilisant des nanoparticules [61]. La consommation globale de médicaments et les effets secondaires peuvent être abaissés de manière significative en déposant l'agent actif dans la région morbide uniquement et sans dose plus élevée que nécessaire. Cette approche hautement sélective réduit les coûts et la souffrance humaine. La nanotechnologie peut également aider à reproduire ou à réparer les tissus endommagés. "L'ingénierie tissulaire" pourrait remplacer les traitements conventionnels d'aujourd'hui comme les greffes d'organes ou les implants artificiels. Par exemple, les os peuvent être repoussés sur des échafaudages de nanotubes de carbone [62].

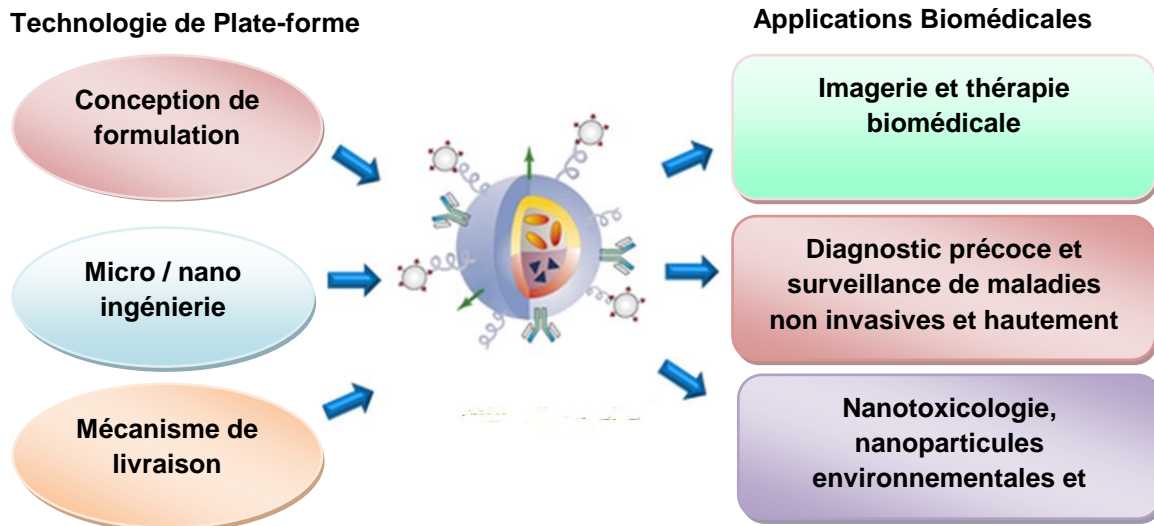


Figure I.1. Thérapeutiques et diagnostics à base de nanoparticules multifonctionnelles [63].

Des systèmes de nanoparticules multifonctionnelles peuvent être conçus avec un choix de véhicule de délivrance de médicament, de ligands ciblant la tumeur, d'agents d'imagerie moléculaire et de thérapeutiques biologiques et synthétiques et revêtus de propriétés furtives. Le schéma liste un menu abrégé des options précliniques actuellement disponibles pour composer de nouveaux systèmes de nanoparticules.

I.4.11. Autres applications

Certains produits commercialisés actuellement sur le marché utilisant des nanomatériaux comprennent des textiles résistants aux taches et des raquettes de tennis renforcées. Des entreprises (comme les aliments Kraft) financent fortement les emballages en plastique à base de nanomatériaux. Les aliments resteront frais plus longtemps si l'emballage est moins perméable à l'atmosphère [48].

I.5. Nanomatériaux. Cas d'étude « la famille du graphène »

Théoriquement, le graphène n'est pas un nouvel objet, Cependant, avant la découverte du graphène, il était toujours question de savoir si le carbone pouvait exister sous une forme bidimensionnelle (2D). En fait, il était communément admis qu'aucun cristal 2D autonome n'est stable à certaines températures, dans lesquelles les couches ou les macromolécules d'un tel matériau ne pourraient pas croître dans la structure cristalline selon les prédictions théoriques. Par conséquent, il est assez étrange que le graphène apparaisse fréquemment dans notre vie quotidienne mais personne ne l'a jamais trouvé avant 2004. Plus intéressant,

contrairement à beaucoup d'autres découvertes scientifiques, la première observation du graphène est très spectaculaire [64- 66].

I.5.1. Allotropes de carbone et matériaux connexes

Le carbone était l'un des premiers éléments connus de l'homme et l'un des éléments chimiques les plus remarquables. L'utilisation de matériaux carbonés pour une multitude d'applications dérive de la diversité unique des structures et des propriétés des matériaux qui s'étendent de la liaison chimique entre les atomes de carbone aux nanostructures, l'alignement des cristallites et les microstructures [64].

Le diamant et le graphite sont deux formes cristallines tridimensionnelles (3D) de l'élément carbone. Le graphite est constitué uniquement de liaisons hybridées sp^2 , tandis que le diamant est constitué uniquement de liaisons hybridées sp^3 . Les atomes de carbone dans le diamant sont disposés dans un réseau, qui est une variation de la structure cristalline cubique à face centrée (cfc) [66]. Le diamant a des qualités physiques superlatives, dont la plupart proviennent de la forte liaison covalente entre ses atomes (hybridation sp^3). Contrairement au diamant, le graphite en particulier est décrit comme étant constitué d'une structure lamellaire (stratifiée, plane) [67]. Dans chaque couche, les atomes de carbone sont disposés dans un réseau hexagonal avec une séparation de 0,142 nm (hybridation sp^2), et la distance entre les plans (couches) est de 0,335 nm. Les deux formes connues de graphite, α (hexagonale) et β (rhomboédrique), ont des propriétés physiques très similaires. Les structures lamellaires ont des forces beaucoup plus fortes dans les plans latéraux qu'entre les plans.

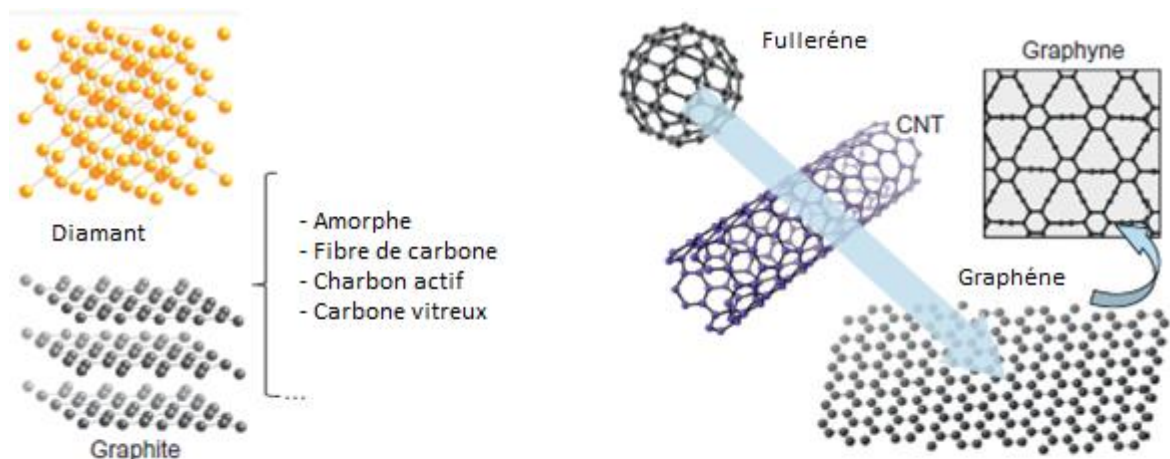


Figure I.2. Allotropes de carbone [68].

Les nanomatériaux de carbone graphitiques peuvent être considérés comme membres du même groupe car ils sont constitués principalement d'atomes de carbone sp^2 disposés en réseau hexagonal. Cette structure commune signifie qu'ils ont tous des propriétés communes, bien qu'ils présentent également des différences significatives en raison de leurs tailles et formes différentes. Le graphène [69] est l'élément structurel de base des autres allotropes [70], dont le graphite, le fullerène (C₆₀) [71], le nanotube de carbone (CNT) [72], le graphyne [73] et d'autres matériaux apparentés tels que le carbone vitreux, la fibre de carbone (CF), le carbone amorphe (AC), le charbon de bois [68] (Figure I.2).

✓ Carbone vitreux

Le carbone vitreux est une classe de carbone largement utilisé comme matériau d'électrode en électrochimie ainsi que dans les dispositifs prothétiques et de haute température (ex : un creuset); le carbone atomique et diatomique pur; et le carbone acétylénique linéaire, un polymère de carbone unidimensionnel avec la structure $-(C=C)_n$ [68].

Cette forme de carbone appelée "carbone vitreux" a les caractéristiques du verre, c'est-à-dire qu'elle est fragile, elle a une microporosité fermée, et elle est imperméable aux gaz. Ces caractéristiques se traduisent par une résistance exceptionnelle à la corrosion des agents chimiques en général. Seul l'oxygène au-dessus de 600 ° C et les oxydants attaquent le carbone vitreux. Sa résistance au choc thermique est bonne. Les formes réalisables sont limitées en épaisseur: 2 à 3 mm maximums [70].

I.5.2. Cas d'étude : Les nanomatériaux de la famille du graphène (NFG)

Les nanomatériaux de la famille du graphène (NFG) sont classés en fonction du nombre de couches dans la feuille ou de leur modification chimique. Certains des NFG les plus utilisés comprennent le graphène monocouche, le graphène bi-couche, le graphène multicouche, l'oxyde de graphène (GO), l'oxyde de graphène réduit (rGO) et l'oxyde de graphène réduit poreux (prGO) [74]. Le graphène et l'oxyde de graphène (GO) ont récemment fait l'objet de beaucoup d'attention et sont des matériaux prometteurs pour diverses applications [75]. Pour une utilisation dans des matériaux nanocomposites, l'oxyde de graphène est intéressant car il a des groupes réactifs intégrés et est relativement facile à fabriquer en grandes quantités. Cependant, une forte oxydation affaiblit la structure du graphène, de sorte que GO peut avoir à la fois des avantages et des inconvénients [76]. L'oxyde de graphène réduit (rGO) est donc une option, car une partie de la structure du graphite sera conservée, mais rGO peut encore avoir des groupes fonctionnels. L'oxyde de graphène est fabriqué par oxydation chimique de poudre de graphite dispersée dans des acides

forts et du permanganate (MnO_4^-). Le rGO est également obtenu par réduction thermique sous vide [77, 78].

I.5.2.1. Le graphène

Le graphène est un allotrope du carbone et est souvent appelé «la mère de toutes les formes graphitiques» (Figure I.3), car il est considéré comme l'élément constitutif d'autres allotropes de carbone sp^2 (nanotubes, graphite et fullerènes). Le graphène peut être enveloppé dans des boules de Bucky, roulé en nanotubes ou empilé en graphite [79-81]

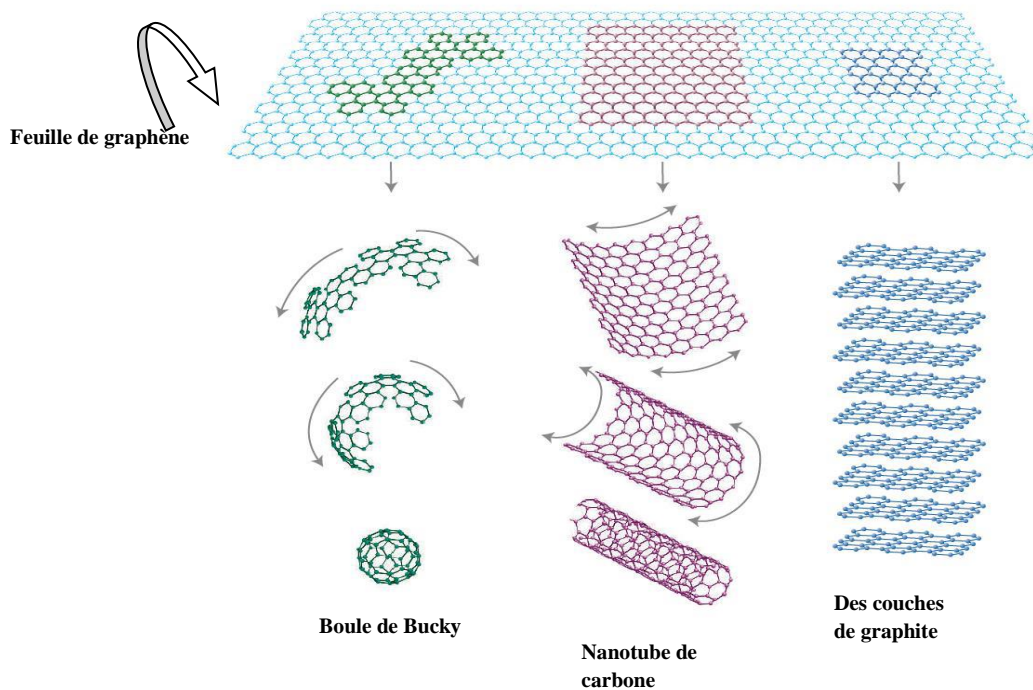


Figure I.3. Les formes graphitiques [81].

Le graphène est constitué d'une feuille de carbone monocouche disposée dans un treillis en fil de fer (hexagonal) de carbone sp^2 . À ce jour, le graphène est considéré comme le matériau le plus fort sur terre [82]. Le graphène a un rapport surface-volume élevé, ce qui est très avantageux pour une liaison facile à différentes matrices [83]. On dit que le graphène sans défaut à couche unique a une résistance à la traction intrinsèque plus élevée que tout autre matériau [84]. La figure I.4. montre la structure du graphène.

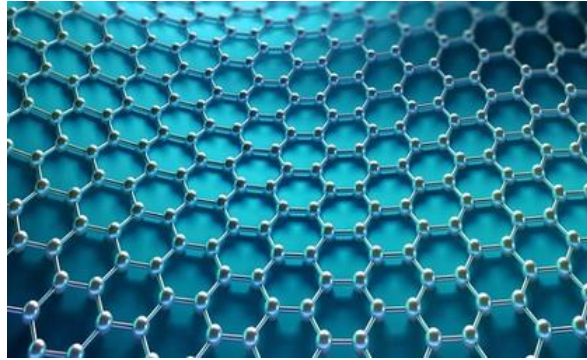


Figure I.4. Structure du graphène [85].

I.5.2.2. Propriétés du graphène

Depuis 2004, de nombreuses propriétés intéressantes du graphène ont été découvertes, notamment une conductivité thermique élevée, une mobilité élevée des porteurs de charge (conductivité électrique), une transparence optique, une grande surface spécifique théorique et d'excellentes propriétés mécaniques (résistance mécanique).

➤ Propriétés physico-chimiques

Les propriétés physicochimiques telles que la structure 2D plane unique, la surface spécifique élevée et la disponibilité des graphons π libres d'électrons font un bon candidat pour l'interaction avec les molécules organiques et ont été largement explorées dans la livraison de médicaments et les biocapteurs [86].

➤ Propriétés thermiques et électriques

La conductivité électrique et les propriétés thermiques exceptionnelles du graphène peuvent être utiles non seulement dans les dispositifs électroniques, mais aussi dans les dispositifs biomédicaux pour mesurer le potentiel des cellules et comme substrat pour les dispositifs de culture cellulaire conducteurs et les biocapteurs [87-90].

La conductivité thermique du graphène à température ambiante est d'environ 53103 W / mK [91], ce qui est 10 fois plus élevé que la conductivité thermique du cuivre (401 W / mK).

La surface spécifique du graphène atteint 2630 m² / g [92]. Cette propriété peut être utilisée dans les microdétecteurs de molécules de gaz, en surveillant les changements spectaculaires de résistance induits par l'adsorption et la désorption des molécules de gaz [93]. De plus, supporté par des simulations, le composite de graphène et de lithium à structure poreuse a la forte capacité de stocker de l'hydrogène [94].

➤ **Propriétés optiques**

Les résultats théoriques et expérimentaux suggèrent tous deux une excellente propriété optique qui peut être manipulée par l'épaisseur du graphène. Combiné avec sa haute conductivité, le graphène devient une membrane conductrice transparente très compétitive qui pourrait potentiellement remplacer de nombreuses membranes traditionnelles, telles que l'oxyde d'indium-étain (ou oxyde d'indium dopé à l'étain) (ITO), l'oxyde d'étain dopé au fluor (FTO). L'utilisation du graphène dans ce domaine pourrait résoudre le problème de la fragilité, de la pollution de l'environnement et des ressources limitées en indium. Une membrane à base de graphène pourrait être appliquée dans des cellules solaires à colorant et des Diode électroluminescente (LED) comme barrières de fenêtres.

De plus, après certaines modifications telles que le dopage, le graphène est non seulement capable d'être un accepteur dans les dispositifs optoélectroniques mais pourrait également être utilisé comme électrode dans les supercondensateurs. De plus, l'adsorption de la lumière du graphène atteindrait la saturation si l'intensité de la lumière dépasse une certaine valeur critique. Ce type d'absorption saturée dans le graphène se produit dans la région du proche infrarouge en raison d'une large gamme d'adsorption et de bande interdite nulle de graphène. Cette caractéristique pourrait être utilisée dans la photonique ultrarapide comme les lasers à fibre [88].

➤ **Propriétés mécaniques**

Le mécanisme exact derrière le comportement observé n'est toujours pas compris. La haute résistance et la capacité à accorder les propriétés mécaniques en utilisant diverses formes / stratégies de fonctionnalisation impliquent des applications potentielles du graphène comme charges ou renforcements dans les implants médicaux, les hydrogels et les échafaudages utilisés dans l'ingénierie tissulaire. [95, 96] La conductivité thermique et la résistance mécanique du graphène sont également très élevées. Le graphène a la structure de cristal la plus dure et dure parmi tous les matériaux connus. La résistance à la traction et le module d'élasticité du graphène sont respectivement de 125 GPa et de 1,1 TPa [97], tandis que sa limite de résistance atteint 42 N / m. Avec la même épaisseur, la résistance du graphène est d'environ 100 fois la résistance de l'acier, un 1 m² de graphène pouvant supporter 4 kg de poids. Cela peut être considéré comme une amélioration 2D typique pour des applications potentielles dans les matériaux composites [98].

➤ Propriétés biologiques

Étant donné l'existence de nanomatériaux de la famille du graphène ayant différentes propriétés physicochimiques, on s'attend à ce qu'ils présentent un modes d'interaction avec les biomolécules, cellules et tissus en fonction du nombre de couches, des dimensions, de la fonctionnalisation chimique, de l'hydrophilicité etc. Il est important de comprendre ces interactions de deux points de vue, l'un pour les applications biomédicales et l'autre pour leur toxicité et leur biocompatibilité. Une discussion détaillée sur les propriétés biologiquement pertinentes des nanomatériaux de graphène et leur toxicité a été fournie par Sanchez et al. [99] et plus récemment par Bianco [100]. Nous nous concentrons donc sur le bref aperçu des études récentes sur les interactions biomolécule-graphène et cellule-graphène. Les matériaux à base de graphène montrent des interactions uniques avec l'ADN et l'ARN, ce qui les rend attrayants dans la détection et la livraison de l'ADN ou de l'ARN [101-104]. En raison des interactions des charges négatives sur l'ADN avec GO, l'adsorption de petits oligomères a été améliorée dans une solution à force ionique élevée et à pH faible [105].

I.5.2.3. Diverces applications des nanomatériaux à base de graphène

Chaque membre des nanomatériaux de la famille du graphène (GFN) diffère de l'autre en termes de nombre de couches, de chimie de surface, de pureté, de dimensions latérales, de densité de défauts et de composition. Comme son nom l'indique, le graphène monocouche est une couche unique isolée d'atomes de carbone liés ensemble dans une structure 2D planaire. Il est synthétisé par exfoliation mécanique répétée [106, 107] ou croissance extrêmement contrôlée sur des substrats comme le carbure de silicium [108] par dépôt chimique en phase vapeur (CVD). Le graphène sans défaut à une seule couche est difficile à synthétiser en masse. Il est également difficile de suspendre dans des solutions et d'isoler en phase gazeuse en raison de la surface hautement réactive. Par conséquent, le graphène multicouche ou les oxydes de graphène sont largement utilisés pour des applications biomédicales.

L'oxyde de graphène (GO) est une forme fortement oxydée de graphène modifié chimiquement qui consiste en une couche épaisse d'atome unique de feuilles de graphène avec des groupes acide carboxylique, époxyde et hydroxyle dans le plan. Le groupe carboxylate périphérique fournit une stabilité colloïdale et une charge de surface négative dépendante du pH [109]. Les groupes époxyde et hydroxyle présents sur le plan de base sont non chargés mais polaires, ce qui permet des interactions faibles, des liaisons hydrogène et d'autres réactions de surface [110]. Le plan de base contient également des électrons π à surface libre provenant de zones non modifiées de graphène, qui sont hydrophobes et capables

d'interactions π - π pour le chargement de médicaments et la fonctionnalisation non-covalente. Ainsi, GO est une molécule analogue à une feuille amphiphile, qui peut être utilisée comme tensioactif pour stabiliser les molécules hydrophobes dans une solution [111,112]. Le GO multicouche est produit par une oxydation grossière du graphite cristallin suivie d'une dispersion dans un milieu aqueux par sonication ou d'autres procédés. Cependant, un traitement répété, une centrifugation et un environnement difficile conduisent à la production de graphène oxydé monocouche. La présence de groupes fonctionnels crée une haute densité de défauts dans GO, réduisant ainsi ses propriétés mécaniques, électriques et thermiques [113].

L'oxyde de graphène réduit (rGO) peut être obtenu par traitement thermique, chimique et UV de GO dans des conditions réductrices avec de l'hydrazine ou d'autres agents réducteurs [109]. rGO est principalement produit pour restaurer la conductivité électrique, l'absorbance optique dans GO tout en réduisant la teneur en oxygène, la charge de surface et l'hydrophilie [114]. Le graphène fonctionnalisé est la modification de n'importe quel membre de la famille du graphène par des polymères, de petites molécules, des nanoparticules, etc. pour améliorer ou altérer les propriétés requises pour une application spécifique. Figure .I.5. Vue d'ensemble schématique de diverses applications du graphène. Des nanomatériaux à base de graphène ont été explorés pour diverses applications non médicales et biomédicales en raison de leurs excellentes propriétés mécaniques, électriques et optiques [114].

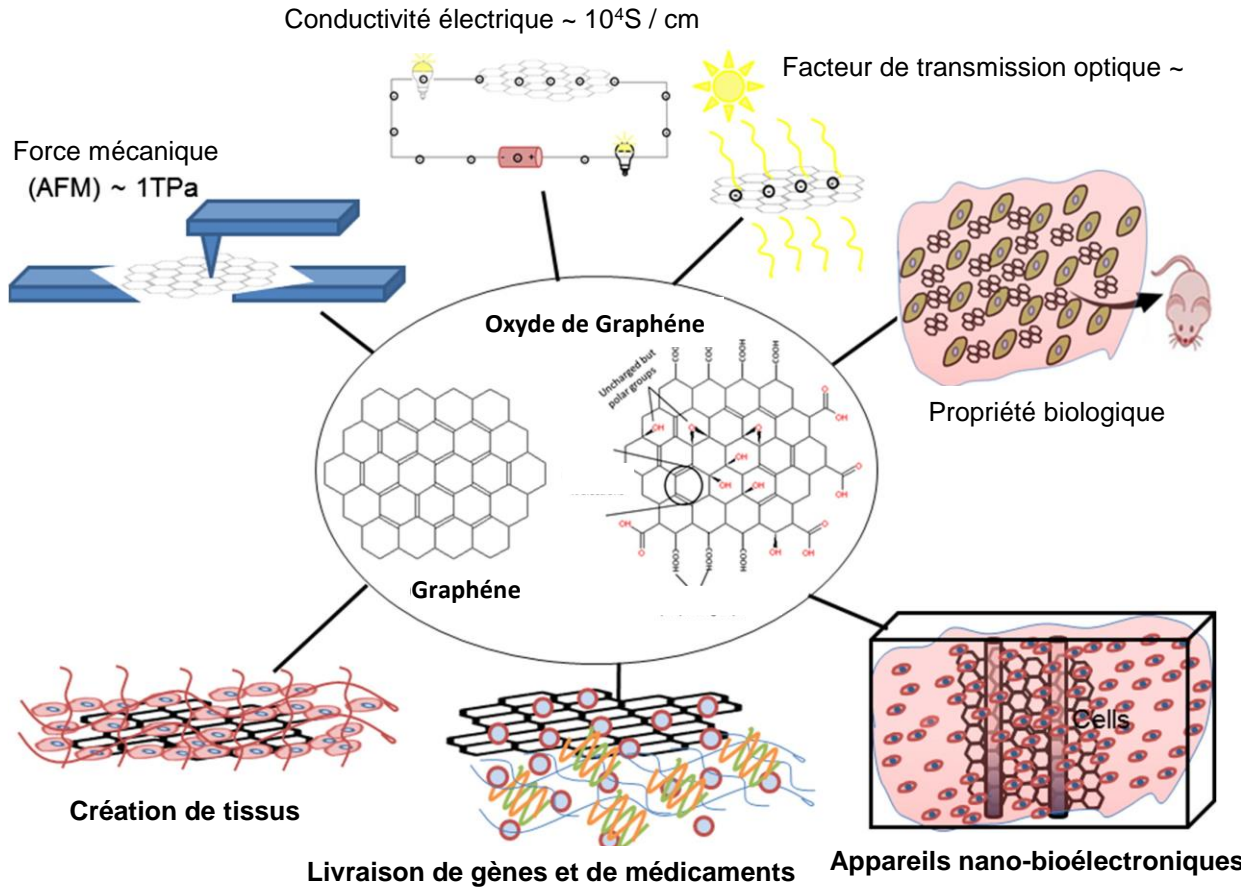


Figure .I.5. Diverses applications du graphène. [114].

I.5.2.4. Application de graphène

➤ Développement d'électrodes transparentes (TE)

Il est devenu nécessaire de trouver des matériaux qui peuvent remplacer l'oxyde de titane et d'indium (ITO) en tant que TE en raison du coût élevé et des ressources limitées d'ITO. Le graphène possède une grande mobilité électronique, une grande flexibilité et des propriétés mécaniques uniques qui en font un candidat prometteur pour ITO [115]. Il est possible de produire un film GO par un processus de solution simple à faible coût. Le film GO peut être fabriqué par centrifugation ou par filtration sous vide suivie d'une méthode de réduction [116]. La fabrication d'oxyde de graphène réduit (rGO) se produit par réduction chimique ou recuit, ce qui améliore la transparence du film et la performance de la résistivité de la feuille. ITO offre une haute transparence de 90% avec une faible résistivité de $10\text{-}30 \Omega / \text{sq}$ [117]. La transparence optique des films rGO peut être augmentée jusqu'à 96% en dopant le chlorure d'or [118].

➤ Applications biomédicales

Le graphène est considéré comme la monocouche la plus fine et la plus durable capable d'existence libre. La structure 2D et la présence d'électrons π de surface délocalisés dans le graphène peuvent être utilisés pour un chargement de médicament efficace via des interactions hydrophobes et un empilement π - π . De plus, une grande surface de graphène permet une bio-fonctionnalisation à haute densité par modification de surface covalente et non-covalente. Diverses études sur le comportement in vivo et la bioactivité du graphène [119,120,1121,1123-125] ont prouvé qu'il s'agissait d'un matériau prometteur qui pourrait remplacer les matériaux et dispositifs existants utilisés comme véhicules de délivrance de médicaments, échafaudages tissulaires et greffes, biocapteurs. , etc. D'autres sections mettent en lumière certaines des études récentes portant sur des matériaux à base de graphène, principalement dans le domaine de la livraison de médicaments et de l'ingénierie tissulaire.

I.5.3. Oxyde de graphène (GO)

L'oxyde de graphène (GO) est le dérivé fortement oxydé du graphène possédant divers groupes fonctionnels contenant de l'oxygène tel que carbonyle, hydroxyle, époxy et carboxyle. Ces groupes, trouvés à la fois sur le bord et le plan de base des nanofeuillets, convertissent le réseau de graphène lié à sp^2 en une combinaison de carbone hybride sp^2 et sp^3 . Ces sites de défauts sp^3 introduits déforment le système π conjugué intrinsèque et réduisent la résistance et la conductivité globales. Néanmoins, ces groupes rendent l'oxyde de graphène très attrayant en tant que matériau multifonctionnel pour une large gamme d'applications, car il peut être facilement modifié avec plusieurs groupes fonctionnels. Une structure possible de GO est représentée sur la figure I.6. [126].

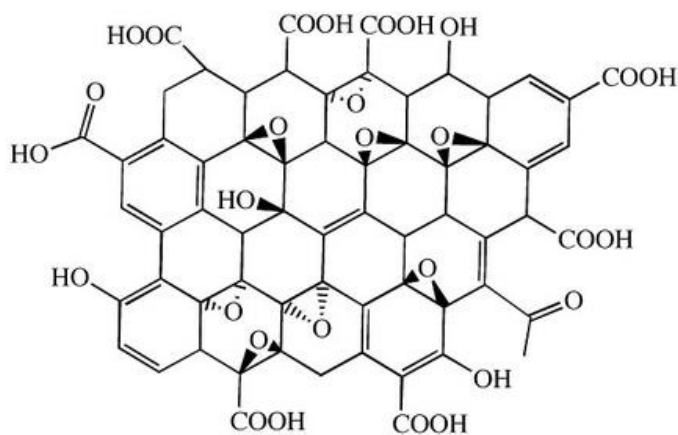


Figure I.6. Structure de l'oxyde de graphène [127].

I.5.3.1. Synthèse Oxyde de graphène (GO)

Le graphène peut être préparé par de nombreuses méthodes différentes, y compris des méthodes descendantes comme l'exfoliation en phase liquide, ou des méthodes ascendantes comme le dépôt chimique en phase vapeur (DCV) [128]. La production à grande échelle de graphène est un problème, cependant, des recherches récentes ont montré des résultats prometteurs en utilisant l'oxyde de graphène (GO) comme un précurseur pour la production de graphène [129]. Lorsque GO est utilisé comme précurseur pour la production de graphène, le graphite est oxydé en oxyde de graphite. L'exfoliation mécanique ou chimique de l'oxyde de graphite produit des feuilles d'oxyde de graphène monocouche. Une illustration des différentes étapes de la préparation de l'oxyde de graphène est présentée à la figure I.7. [130].

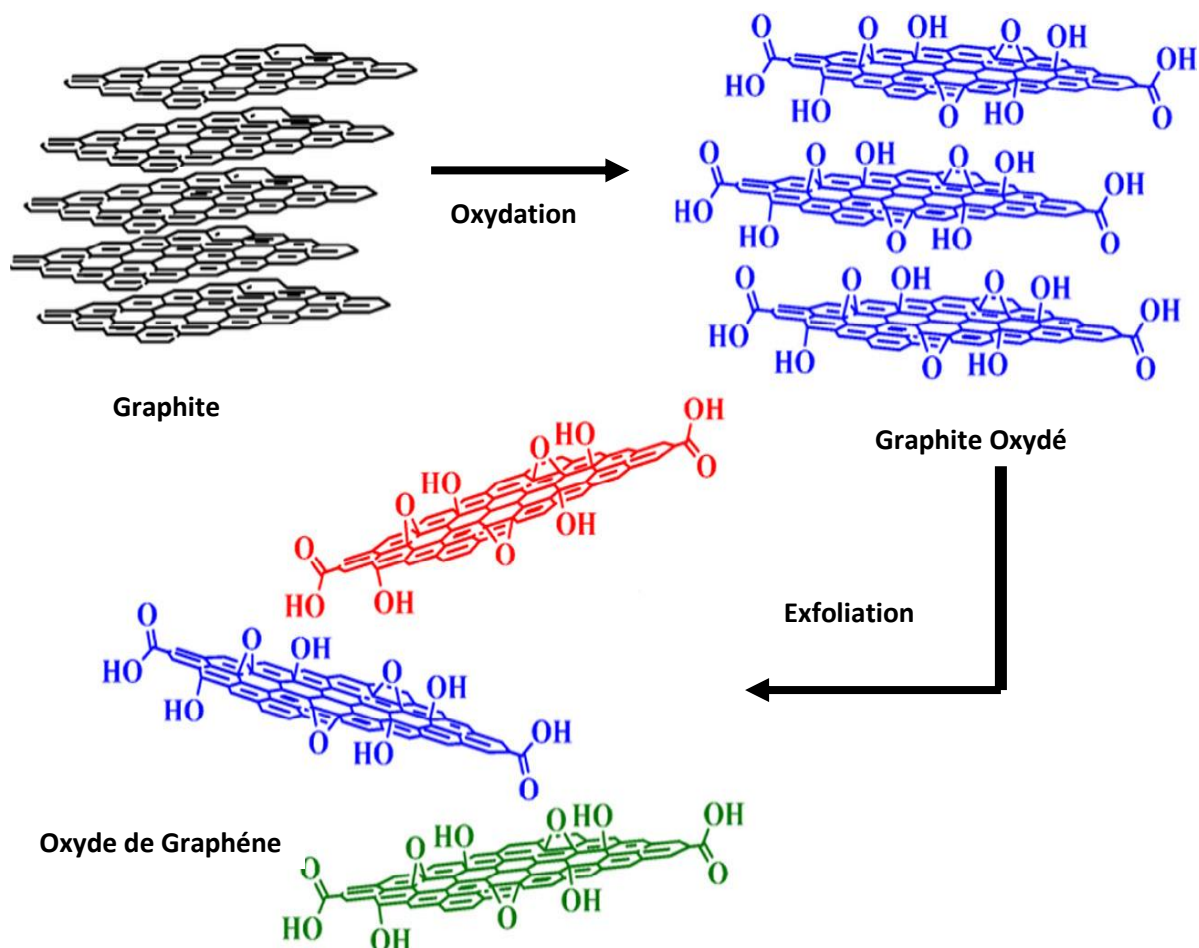


Figure I.7. Préparation de l'oxyde de graphène [130].

L'oxyde de graphène GO est plus facile à préparer que le graphène et peut être produit à partir de la poudre de graphite qui est disponible et à faible coût. En plus d'être une voie de production de graphène, l'oxyde de graphène a de nombreuses propriétés

intéressantes, telles que son haut niveau de dispersion dans les solvants polaires, sa dispersibilité dans diverses matrices et une meilleure compatibilité avec les polymères par rapport au graphène [131].

Le GO a presque la même structure que le graphène mais il est constitué d'une seule couche de carbone hybride sp^2 qui est enrichie en groupes oxygénés tels que l'époxy et le carboxyle [127]. Bien qu'il existe une théorie commune selon laquelle les groupes carboxyliques sont situés sur les bords de la plaquette GO, l'hydroxyle, l'époxyde et d'autres groupes fonctionnels sont situés sur le plan de base, la structure exacte de l'oxyde de graphène est inconnue [132]. Comme les chercheurs de différents laboratoires utilisent différentes méthodes de préparation, et aucune technique de caractérisation définitive unique n'est disponible, différentes structures sont possibles et ont été proposées au cours des années de recherche, le tableau I.2 donne quelques méthodes de synthèse de l'oxyde de graphène GO.

Tableau .I.2.Synthèse de l'oxyde de graphène GO [126].

Méthode	figure	Image
L'exfoliation mécanique		
Exfoliation en solution	 	
L'oxyde de graphène réduit rGO		

I.5.3.2. Méthodes de synthèse chimique de l'oxyde de graphène

➤ Méthode de Brodie

La méthode la plus courante pour la production de GO est l'oxydation chimique du graphite. Brodie est considéré comme la première personne à produire GO, et sa méthode de production a été utilisée pendant de nombreuses années. La méthode de Brodie implique la

synthèse de l'oxyde graphitique (oxyde de graphène) en utilisant du chlorate de potassium et de l'acide nitrique fumant [133].

➤ Méthode de Hummers

En 1957, Hummers et Offerman proposèrent une nouvelle méthode de préparation pour GO, et la «méthode Hummers» devint la méthode de préparation la plus courante [133]. Dans "la méthode de Hummers", le graphite est oxydé à travers différentes étapes avec un mélange sans eau d'acide sulfurique concentré, de nitrate de sodium et de permanganate de potassium. Les différentes étapes des "méthodes de Hummers" sont illustrées à la figure I.8.

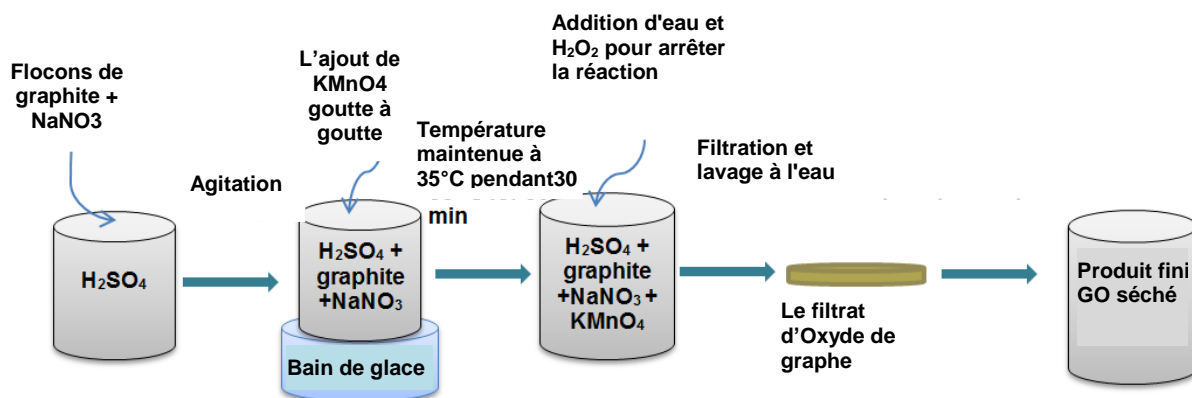


Figure I.8. Illustration des différentes étapes de la méthode de Hummers [134].

➤ Méthode améliorée de Hummers (Marcano)

En 2010, Marcano et al. ont proposé une méthode améliorée de Hummers où un mélange d'acide phosphorique et d'acide sulfurique a été utilisé. Marcano et al. ont déclaré que leur méthode était plus facile et plus sûre que la méthode Hummers, tout en étant capable de produire des GO de meilleure qualité et avec un rendement plus élevé [135]. La méthode améliorée de Hummers utilise une combinaison d'acide sulfurique et d'acide phosphorique, avec une quantité de $KMnO_4$ pour améliorer l'efficacité du processus d'oxydation [135]. La réaction du permanganate de potassium avec l'acide sulfurique peut provoquer une détonation lorsqu'il est chauffé à des températures supérieures à $55^\circ C$ ou s'il est en contact avec des composés organiques [136]. Cette réaction se produit dans la méthode de Hummers et beaucoup de soin doit être pris pour empêcher la détonation, cependant, la température ne dépasse pas $50^\circ C$ et le risque de détonation est éliminé [135]. La structure du GO préparé à l'aide de la méthode Hummers améliorée est présentée à la figure I.9. [137].

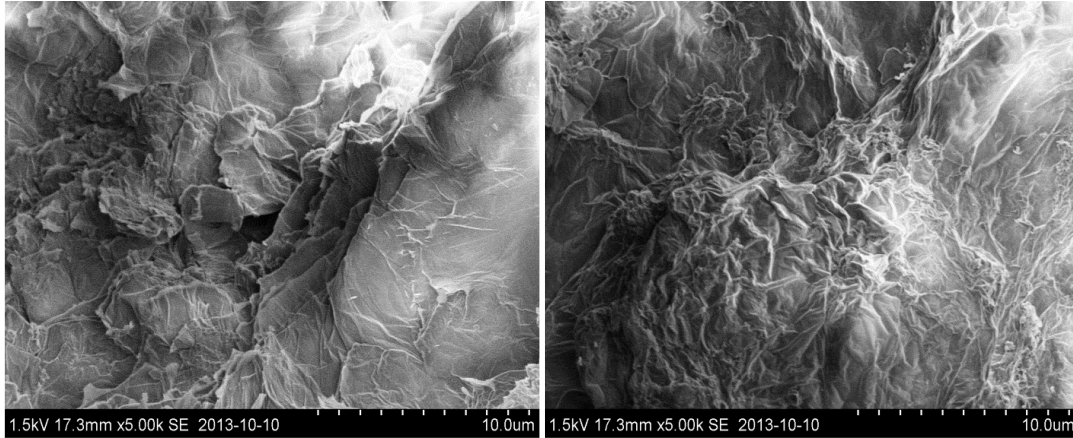


Figure I.9. Images MEB de GO préparé par la version de Marcano et al. [137].

La recherche de nouvelles méthodes pour la production de GO et de graphène est toujours en cours, et les chercheurs tentent de trouver une méthode de préparation optimale qui ne demande pas trop de temps, produit un oxyde de graphène à haut rendement et de bonne qualité, sans étapes dangereuses [129].

I.5.3.3. Exfoliation et réduction de GO

Alors que l'exfoliation de GO peut être réalisée avec différentes méthodes, les techniques d'exfoliation à base de solvant ou thermique sont les plus courantes [138, 139]. L'exfoliation à base de solvant est souvent réalisée par ultrason ou agitation mécanique qui augmente l'espacement inter-couche de GO, ce qui entraîne des suspensions colloïdales de GO [138]. Les groupes oxygénés de GO élargissent la distance inter-couche et rendent les couches hydrophiles, et les couches oxydées peuvent donc être exfoliées dans l'eau [129].

Il a été trouvé que la sonochimie produit des suspensions constituées principalement de plaquettes GO monocouche, cependant, ce processus fragmente les plaquettes GO en réduisant leurs dimensions latérales. L'agitation mécanique est une méthode plus douce et entraîne des plaquettes de GO avec des dimensions plus grandes par rapport aux ultrasons, mais l'exfoliation est très lente et produit un faible rendement [138].

GO a différentes propriétés physiques par rapport au graphène. Par exemple, GO est électriquement isolant, mais il est possible de réduire les feuilles d'oxyde de graphène en éliminant les groupes contenant de l'oxygène pour obtenir une structure similaire au graphène vierge et restaurer ainsi la conductivité [140]. La réduction chimique ou thermique des feuilles GO peut être réalisée pour générer des quantités massives de plaquettes de graphène. La réduction chimique est réalisée en utilisant des agents réducteurs tels que le borohydrure de sodium ou l'hydrazine monohydratée [138].

L'exfoliation de GO peut être réalisée par recuit thermique (141). Certains chercheurs ont essayé d'exfolier GO par chauffage rapide à haute température ($\sim 1050^{\circ}\text{C}$) dans une atmosphère inerte [142], tandis que d'autres ont essayé des températures plus basses ($\sim 200\text{-}400^{\circ}\text{C}$) et un vide poussé pendant une période plus longue [141]. La figure I.10. est une illustration d'une procédure d'exfoliation à haute température et à basse température.

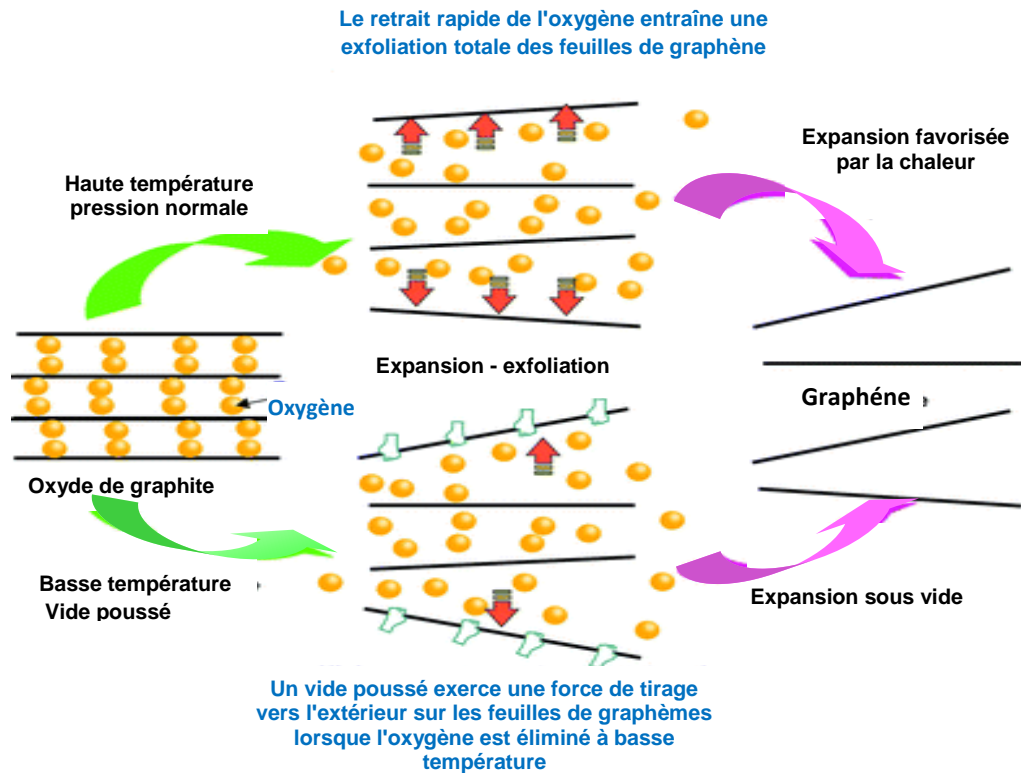


Figure I.10. Présentation schématique de l'exfoliation thermique de GO [141].

- La séquence en haut montre une exfoliation de GO à haute température sous pression atmosphérique
- La séquence en bas montre une exfoliation de GO à basse température (jusqu'à 200°C) sous vide poussé.

Les groupes oxygénés sur GO sont décomposés en gaz par l'augmentation rapide de la température. Les gaz produits provoquent une augmentation de pression entre les couches de GO, ce qui provoque à son tour une séparation des couches. En plus d'être exfolié à haute température, GO est également réduit en une structure de type graphène par le traitement thermique et est appelé oxyde de graphène réduit (rGO) [129].

La figure I.11. montre des images MEB de rGO thermiquement exfoliées [129].

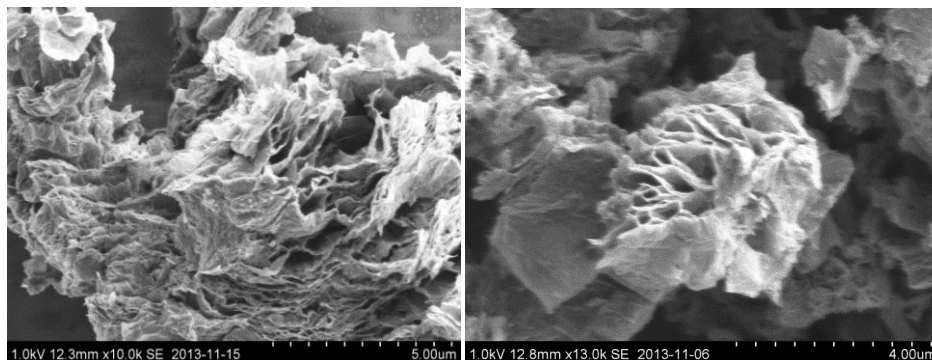


Figure I.11. Images MEB de rGO exfolié thermiquement [137].

Cependant, la température élevée peut conduire à la production de feuilles de graphène petites et froissées, car du carbone est toujours éliminé pendant le processus de décomposition. La libération de dioxyde de carbone entraîne donc des dommages structuraux des feuilles de graphène, ce qui affecte leurs propriétés, en particulier les propriétés électriques [129].

I.5.3.4. Fonctionnalisation de l'Oxyde de graphène (FGO)

Il a été proposé que la surface du graphène hautement cristallin soit chimiquement inerte. La surface inerte peut potentiellement réagir avec d'autres molécules par la physisorption, qui est l'adsorption provoquée par des forces d'interactions attractives moléculaires faibles provenant de dipôles permanents ou induits (forces de dispersion / forces de van der Waals) [143]. Différents groupes chimiques (carboxyle, carbonyle, amines et hydrogénés (CH)) pourraient réagir avec les bords chimiquement réactifs du graphène [143].

Une variété de transformations de GO est possible en raison de ses groupes fonctionnels à base d'oxygène. Des ajouts d'autres fonctionnalités chimiques à GO en utilisant diverses réactions chimiques sont possibles, et ceci est connu comme GO fonctionnalisé (FGO). GO peut être fonctionnalisé de manière covalente et non-covalente [136]. Les autres groupes fonctionnels peuvent réagir à travers diverses réactions avec les différents groupes contenant de l'oxygène sur GO. La fonctionnalisation de GO peut améliorer la compatibilité avec différentes matrices polymères et rendre les dispersions GO plus stables. Les réactions où les amines ou les isocyanates sont utilisés pour la fonctionnalisation de GO sont les plus commun [138].

Conclusion

La nanotechnologie exploite les propriétés de la matière à l'échelle nanométrique et peut offrir de nouvelles solutions à des millions de personnes qui n'ont pas accès aux services de base tels que l'eau potable, les énergies renouvelables, la santé et l'éducation. Le graphène est le matériau le plus prometteur dans le domaine des nanomatériaux en raison de ses propriétés uniques. Depuis sa découverte, la recherche sur le graphène a augmenté de façon exponentielle, en explorant ces différentes propriétés et applications, il a été utilisé pour diverses applications en électronique, optique, optoélectronique, ingénierie biomédicale, ingénierie tissulaire, implants médicaux, dispositifs médicaux et capteurs. Le chapitre II développe un domaine d'applications très important du graphène (dispositifs médicaux et capteurs).

Références bibliographiques

1. H.Sundeeep, Hwei-Jang Yo, Jow-Lay Huang, *Int. J. Nanoscience*, 9(3), 225p (2010).
2. A.Ravikrishna, *Engineering Chemistry*, Sri Krishna Hi-Tech Publishing Company, 10th Edition, Chennai, July 2009.
3. K.Arivalagan, R. Karthikeyan, *Engineering Chemistry*, Shiv Publications, Chennai, July 2007.
4. R. S. Varma, R. K. Saini, R. Dahiya. *Tetrahedron Lett*, 38, 7823p (1997).
5. M. Kidwai, P. Sapra. *Org. Prep. Proced. Int*, 33, 381p (2001).
6. R. Gedye, F. Smith, K. Westaway, H. Ali, *Tetrahedron Lett*, 27, 279p (1986).
7. N.Rajkumar, D.Umamaheswari, K.Ramachandran, *Int. J. Nanoscience*, 9(3), 243p (2010).
8. R.S. Varma, *Tetrahedron*, 58, 1235p (2002).
9. D.D. Artman, R.M. Williams, *J.Amer. Chem. Soc.*, 129, 6336p (2007) .
10. A.E.Mohamed, R.M.Rashad, M.K.Bedway, *Int. J. Nanoscience*, 8(3), 237p (2008).
11. S. J .Tans, A. R. M. Verschueren, C. Dekker, *Nature*, 393, 49p (1998).
12. A. Bachtold, P. Hadley, T. Nakanishi, C .Dekker, *Science*, 294, 1317p (2001).
13. B.P.Singh, Amit Varma, *Int. J. Nanoscience*, 7(6), 305(2009).
14. P. G. Collins, M. S. Arnold, P. Avouris , *Science*, 292 ,706p (2001).
15. R. A. Andrievski, *Journal of Nanoparticle Research*, 5, 415p (2003).
16. C. N. R. Rao , A .K. Cheetham, *Journal of Materials Chemistry*, 11, 2887(2001).

17. G. Cao, Nanostructures & Nanomaterials: Synthesis, Properties & Applications, Imperial College Press, 2004.
18. P. Knauth, J. Schoonman, Nanostructured Materials: Selected Synthesis Methods, Properties and Applications Springer, 2002.
19. C. N .R. Rao, A .Müller, A. K .Cheetham, The Chemistry of Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications , John Wiley & Sons, (2004).
20. C. Herring, J .K. Galt, Physical Review, 85, 1060p (1952).
21. S .Veprek, A. S. Argon, Surface and Coatings Technology , 146 , 175p (2001).
22. S. Iijima, T . Ichihashi, Nature, 363, 603p (1993).
23. Ebbesen, T. W. and Ajayan, P. M., Nature (London) 358, 220p (1992).
24. J. Liu, A. Rinzler, H. Dai, J. Hafner, R. Bradley, P. Boul, A. Lu, T. Iverson, K. Shelimov, C. Huffman, F. Rodriguez-Macias, Y.-S. Shon, T. Lee, D. Colbert et R. Smalley : Science, 280, 1253- 1256p (1998).
25. Boul, P. J.; Liu, J.; Mickelson, E. T.; Huffman, C. B.; Ericson, L. M.; Chiang, I. W.; Smith, K. A.; Colbert, D. T.; Hauge, R. H.; Margrave, J. L.; Smalley, R. E. Chem. Phys. Lett, 310, 367p (1999).
26. Zimmerman, J.; Bradley, R.; Huffman, C.; Hauge, R. H.; Margrave, J. L. Chem. Mater, 12, 1361p(2000).
27. Rinzler, A.; Liu, J.; Dai, H.; Nikolaev, P.; Huffman, C.; Rodriguez- Macias, F.; Boul, P.; Lu, A.; Heymann, D.; Colbert, D. T.; Lee, R.; Fischer, J.; Rao, A.; Eklund, P.; Smalley, R. E. Appl. Phys. A, 67, 29p (1998).
28. Sano N, Wang H, Alexandrou I, Chhowalla M, Teo KBK, Amaratunga GAJ, Iimura K,. Applied Physics, (5), 2783-2788p (2002).
29. Ca i W, Gao T, Hong H, Sun J. Nanotechnol Sci Appl, 1: 17–32P (2008).
30. Akhter S, Ahmad MZ, Ahmad FJ, Storm G, Kok RJ. Expert Opin Drug Deliv, 9(10), 1225-43p (2012).
31. Lim Z Z, Li J.E.J, Ng C-T, Yung L-Y.L, and Bay B-H.,Lim, Z.Z., Acta Pharmacol Sin, 32(8): p. 983- 90 (2011).
32. Kim, C.K., P. Ghosh, and V.M. Rotello,. Nanoscale, 1(1),61-7p (2009).
33. Phillips, M.A., M.L. Gran, and N.A. Peppas, Nano Today, 5(2),143-159p (2010).
34. Jeremic, B., A.R. Aguerri, and N. Filipovic,. Clin Transl Oncol, 15(8): p. 593-601(2013).
35. Steffen Foss Hansen, Britt H. Larsen, Stig I. Olsen, Nanotoxicology ,1, 243-250p (2009).
36. Hansen SF, Regulation and Risk Assessment of Nanomaterials - Too Little, Too Late? Thèse de doctorat, Université technique du Danemark, 130 p (2009).

39. Claude Ostiguy, Brigitte Roberge, Catherine Woods, Brigitte Soucy «Les nanoparticules de synthèse, Connaissances actuelles sur les risques et les mesures de prévention en SST», Rapport - 646, Université de Montréal, (2010).
40. Aitken RJ, Creely KS, Tran CL, Nanoparticles: An Occupational Hygiene Review, Institute of Occupational Medicine, Health and Safety Executive (HSE), UK, Research Report 274, 113 p (2004).
41. Akerman, M. E.; Chan, W. C.; Laakkonen, P.; Bhatia, S. N.; Ruoslahti, E. Proc. Natl. Acad. Sci, 99, 12617-12621p (2004).
42. Michalet, X.; Pinaud, F. F.; Bentolila, L. A.; Tsay, J. M.; Doose, S.; Li, J. J.; Sundaresan, G.; Wu, A. M.; Gambhir, S. S.; Weiss, S. Science, 307, 538-544p (2005).
43. Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA, Tsay JM, Doose S, Li JJ, Sundaresan G, Wu AM, Gambhir SS, Weiss S. Science, 307 (5709), 538- 544p (2005).
44. Health and safety research needs. “Towards predicting nano-biointeractions”, An international assessment of nanotechnology environment, International council on nanotechnology, Number 4, 1, (2008).
45. Reneker, D.H.; Yarin, A.L. Electrospinning jets and polymer nanofibers. Polymer, 49, 2387-2425p (2008).
46. Pham, Q.P.; Sharma, U.; Mikos, A.G. Biomacromolecules, 7, 2796-2805p (2006).
47. Abdullah M. Al-Enizi, Moustafa M. Zagho, and Ahmed A. Elzatahry, Nanomaterials, 8(4), 259p (2018).
48. K.S. Novoselov, A.K. Geim, S.V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S.V. Dubonos, IV. Grigorieva , AA. Firsov , Science 306 (5296), 666-669 p (2004).
49. Luther, W. Industrial application of nanomaterials-chances and risks. Technical report, Future Technologies Division of VDI Technologiezentrum , Technology analysis, (2004).
50. Companies deny consumers information on nano-ingredients in sunscreens, cosmetics, Les Amis de la Terre Australie, 2010.
51. Nanoparticules de dioxyde de titane et d’oxyde de zinc dans les produits cosmétiques : Etat des connaissances sur la pénétration cutanée, génotoxicité et cancérogenèse - Point d’information, AFSSAPS, rapport 28-29p (2011).
52. A. Jackson, Nanocoatings incognito, 2009: <http://www.soci.org/Chemistry-and-Industry/CnI-Data/2009/16/Nanocoatings-incognito>, (2009).
53. A. ARRAR , Synthèse et caractérisation des films de ZnO pur et dope par le processus de sol-gel spin coating, 2013.
54. Hellen Nalumaga, Kyung-Nam Kim , ol-gel synthesis of pure and cadmium-doped Zinc Oxide nanoparticles: Effect of Solvent on the microstructure of the Nanoparticles, Department of Advanced Materials Engineering, Kangwon National University, KOREA, 2017.

55. A Etiemble. Étude de matériaux hydrurables par émission acoustique : Application aux batteries Ni-MH. Matériaux. INSA de Lyon, (2013).
56. J Hainfeld et al. "The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice", Phys. Med. Biol. 49, 309 p (2004).
57. Soumare Y., Dakhlaoui-Omrani A., Schoenstein F., Mercone s., G. Viau b.G, Jouini N.,. Solid State Communications, 151, 4, 284-288 p (2011).
58. T. K. Manna and S. M. Mahajan, Nanotechnology in the Development of Photovoltaic Cells, International Conference on Clean Electrical Power, ICCEP '07, 379-386p (2007).
58. F. Schedin, A.K. Geim, S.V. Morozov, E. W. Hill, P. Blake, M. I. Katsnelson, K. S. Novoselov, Nat. Mater. 6 (9) 652-655p (2007).
59. Nick Fletcher et Andrew Bartholomaeus, Encadrement Réglementaire des Nanotechnologies dans le Secteur Alimentaire en Australie et en Nouvelle-Zélande, internationale d'analyse des risques alimentaires, Int. food risk anal., Vol. 1, No. 2, 37-46 p (2011).
60. Suresh Neethirajan, Digvir Jayas,. La nanotechnologie pour les industries alimentaires et bioprocédés. 5e Symposium international CIGR technique pour le traitement alimentaire, la technologie de surveillance en bioprocédés et gestion de la qualité alimentaire. Potsdam, Allemagne , 8 p (2009).
61. Wust, P.; Hildebrandt, B.; Sreenivasa, G.; Rau, B.; Gellermann, J.; Riess, H.; Felix, R.; Schlag, P. M.,. The Lancet Oncology, 3 (8), 487-497p (2002).
62. Sato, M.; Webster, T. J., Expert Rev. Medical Devices, 1 (1), 105-114p (2004).
63. Department of Biomedical Engineering, Univeristy at Buffalo, The State University of New York, www.acsu.buffalo.edu, August 2013.
64. C Lee , X Wei , JW Kysar , J Hone., Science, 321(5887): 385-388p (2008).
65. JH Chen ¹, C Jang, S Xiao , M Ishigami , MS Fuhrer., Nature Nanotechnology, 3(4): p. 206-209p (2008).
66. A. B. Kuzmenko, E. van Heumen, F. Carbone, and D. van der Marel., Universal optical conductance of graphite. Physical Review Letters, 100(11) (2008).
67. M.H. Nazaré, A.J. Neves (Eds.), Properties, Growth and Applications of Diamond, Institution of Engineering and Technology, 2000.
68. P. Delhaes, Graphite and Precursors, CRC Press, 2000.
69. R. Hoffmann, A.A. Kabanov, A.A. Golov, D.M. Proserpio, Angew. Chem. 55 (37), 10962-10976p (2016).
70. A. Hirsch, The era of carbon allotropes, Nat. Mater. 9 (11), 868-870p (2010).
71. H.W. Kroto, J.R. Health, S.C. O'Brien, R.F. Curl, R.E. Smalley, C60: buckminsterfullerene, Nature 318 (6042), 162-163p (1985).

72. S. Iijima, Helical microtubules of graphitic carbon, *Nature* 354 (6348), 56-58p (1991).
73. R.B. Heimann, S.E. Evsvukov, Y. Koga, Carbon allotropes: a suggested classification scheme based on valence orbital hybridization, *Carbon* 35 (10-11), 1654-1658p (1997).
74. K.S. Novoselov, A.K. Geim, S.V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S.V. Dubonos, I.V. Grigorieva, A.A. Firsov, Electric field in atomically thin carbon films, *Science* 306, 666-669p (2004).
75. Sumit Goenka, Vinayak Sant, Shilpa Sant.. *Journal of Controlled Release* 173, 75-88p (2014).
76. S. Stankovich, D.A. Dikin, R.D. Piner, K.A. Kohlhaas, A. Kleinhammes, Y. Jia Yuanyuan, Y. Wu Yue, S.T. Nguyen, R.S. Ruoff . *Carbon*; vol. 45, 1558p (2007).
77. G. Wang, J. Yang, J. Park et al. *J. Phys. Chem. C*; vol. 112, 8192 p (2008).
78. W. Gao, L.B. Alemany, L. Ci, M. Ajayan, *Nature Chemistry*; vol. 1, 1403 p (2009).
79. A. K. Geim and K. S. Novoselov, *Nature Materials*, vol. 6, no. 3, 183-191p (2007).
80. H. Kim, A. A. Abdala, and C. W. Macosko, *Macromolecules*, vol. 43, no. 16, 6515-6530p (2010).
81. M. Terrones, O. Martín, M. González, J. Pozuelo, B. Serrano, J. C. Cabanelas, S. M. Vega-Díaz, and J. Baselga, *Advanced Materials*, vol. 23, no. 44, 5302-5310p (2011).
82. P. Song, Z. Cao, Y. Cai, L. Zhao, Z. Fang, and S. Fu, *Polymer*, vol. 52, no. 18, 4001-4010p (2011).
83. J. Du and H.-M. Cheng, *Macromolecular Chemistry and Physics*, vol. 213, no. 10-11, 1060- 1077p (2012).
84. P. Mukhopadhyay and R. Gupta, *Plastics Engineering*, 32 -42p (2013).
85. O. C. Compton and S. T. Nguyen, *Small*, vol. 6, no. 6, 711-723p (2010).
86. L.J. Cote, F. Kim, J. Huang, *J. Am. Chem. Soc.* 131, 1043-1049p (2008).
87. M.S. Artiles, C.S. Rout, T.S. Fisher, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63, 1352-1360p (2011).
88. P. Nguyen, V. Berry, *J. Phys. Chem. Lett.* 3, 1024-1029p (2012).
89. T. Cohen-Karni, R. Langer, D.S. Kohane, *ACS Nano* 6, 6541-6545p (2012).
90. T. Cohen-Karni, Q. Qing, Q. Li, Y. Fang, C.M. Lieber, *Nano Lett.* 10, 1098-1102p (2010).
91. G. Van Lier, C. Van Alsenoy, V. Van Doren, P. Geerlings, *Chem. Phys. Lett.* 326, 181-185p (2000).
92. C.D. Reddy, S. Rajendran, K.M. Liew, *Nanotechnology* 17, 864-870p (2006).

93. K.N. Kudin, G.E. Scuseria, B.I. Yakobson, C2F, BN, and C nanoshell, *Phys. Rev. B* 64, (2001).
94. I.W. Frank, D.M. Tanenbaum, A.M. van der Zande, P.L. McEuen, *AVS*. 2558-2561p (2007).
95. K.E. Prasad, B. Das, U. Maitra, U. Ramamurty, C.N.R. Rao, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 13186-13189p (2009).
96. C.N.R. Rao, A.K. Sood, R. Voggu, K.S. Subrahmanyam, *J. Phys. Chem. Lett.* 1, 572-580p (2010).
97. X. Ma, H. Tao, K. Yang, L. Feng, L. Cheng, X. Shi, Y. Li, L. Guo, Z. Liu, *Nano Res.* 5, 199-212p (2012).
98. A.-J. Shen, D.-L. Li, X.-J. Cai, C.-Y. Dong, H.-Q. Dong, H.-Y. Wen, G.-H. Dai, P.-J. Wang, Y.-Y. Li, *J. Biomed. Mater. Res. A* 100A, 2499-2506p (2012).
99. V.C. Sanchez, A. Jachak, R.H. Hurt, A.B. Kane, *Chem. Res. Toxicol.* 25, 15-34p (2011).
100. A. Bianco, *Angew. Chem. Int. Ed.* 52, 4986-4997p (2013).
101. H. Ren, C. Wang, J. Zhang, X. Zhou, D. Xu, J. Zheng, S. Guo, J. Zhang, *ACS Nano* 4, 7169-7174p (2010).
102. C.-H. Lu, C.-L. Zhu, J. Li, J.-J. Liu, X. Chen, H.-H. Yang, *Chem. Commun.* 46, 3116-3118p (2010).
103. Y. Wang, Z. Li, D. Hu, C.-T. Lin, J. Li, Y. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* 132, 9274-9276p (2010).
104. Y. Xu, Q. Wu, Y. Sun, H. Bai, G. Shi, , *ACS Nano* 4, 7358-7362p(2010).
105. M. Wu, R. Kempaiah, P.-J.J. Huang, V. Maheshwari, J. Liu, *Langmuir* 27, 2731-2738p (2011).
106. K.S. Novoselov, A.K. Geim, S.V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S.V. Dubonos, I.V. Grigorieva, A.A. Firsov, *Science* 306, 666-669p (2004).
107. K.S. Novoselov, A.K. Geim, S.V. Morozov, D. Jiang, M.I. Katsnelson, I.V. Grigorieva, S.V. Dubonos, A.A. Firsov, *Nature* 438, 197-200p (2005).
108. M. Sprinkle, M. Ruan, Y. Hu, J. Hankinson, M. Rubio-Roy, B. Zhang, X. Wu, C. Berger, W.A. de Heer, *Nat. Nanotechnol.* 5, 727-731p (2010).
109. S. Park, J. An, I. Jung, R.D. Piner, S.J. An, X. Li, A. Velamakanni, R.S. Ruoff, *Nano Lett.* 9, 1593-1597p (2009).
110. J. Kim, L.J. Cote, F. Kim, W. Yuan, K.R. Shull, J. Huang, *J. Am. Chem. Soc.* 132, 8180-8186p (2010).
111. F. Guo, F. Kim, T.H. Han, V.B. Shenoy, J. Huang, R.H. Hurt, *ACS Nano* 5, 8019-8025p (2011).

112. F. Kim, L.J. Cote, J. Huang, *Adv. Mater.* 22, 1954-1958p (2010) .
113. F. Karlický, K.K.R. Datta, M. Otyepka, R. Zbořil, *ACS Nano* 7, 6434-6464p (2013).
114. A. Bagri, C. Mattevi, M. Acik, Y.J. Chabal, M. Chhowalla, V.B. Shenoy, *Nat. Chem.* 2, 581-587p (2010).
119. Z. Liu, J.T. Robinson, X. Sun, H. Dai, *J. Am. Chem. Soc.* 130, 10876-10877p(2008) .
120. K. Yang, J. Wan, S. Zhang, Y. Zhang, S.-T. Lee, Z. Liu, *ACS Nano* 5, 516-522p (2010).
121. S.K. Singh, M.K. Singh, P.P. Kulkarni, V.K. Sonkar, J.J.A. Grácio, D. Dash, *ACS Nano* 6, 2731-2740p (2012).
122. Y. Yang, Y.-M. Zhang, Y. Chen, D. Zhao, J.-T. Chen, Y. Liu, *Chem. Eur. J.* 18, 4208-4215p (2012).
123. K. Yang, S. Zhang, G. Zhang, X. Sun, S.-T. Lee, Z. Liu, *Nano Lett.* 10, 3318-3323p (2010).
124. H. Hong, K. Yang, Y. Zhang, J.W. Engle, L. Feng, Y. Yang, T.R. Nayak, S. Goel, J. ean, C.P. Theuer, T.E. Barnhart, Z. Liu, W. Cai, *ACS Nano* 6, 2361-2370p (2012).
125. A. Sahu, W.I. Choi, G. Tae, *Chem. Commun.* 48 (2012) 5820–5822.
126. Zheng, Q.; Li, Z.; Yang, J.; Kim, J.-K., *Progress in Materials Science*, 64, 200-247p (2014).
127. O. C. Compton and S. T. Nguyen, *Small*, vol. 6, no. 6, 711-723p (2010).
128. R. J. Young, I. A. Kinloch, L. Gong, and K. S. Novoselov, *Composites Science and Technology*, vol. 72, no. 12, 1459-1476p (2012).
129. Jonathan K.Wassei Richard B.Kaner *Graphene*, *Materialstoday*, Volume 13, Issue 3, 52-59p (2010).
130. H. Bai, C. Li, and G. Shi, *Advanced Materials*, vol. 23, no. 9, 1089-1115p (2011).
131. S. Pei and H. M. Cheng, *Carbon*, vol. 50, no. 9, 3210-3228p (2012).
132. H. J. Salavagione, G. Martínez, and G. Ellis, "Graphene-Based Polymer Nanocomposites" in *Physics and applications of Graphene- Experiments*, 1 ed. S. Mikhailov, Spain, Institute of Polymer Science and Technology, Spanish National Research Council, 169-192p (2011).
133. W. S. Hummers and R. E. Offeman, *Journal of the American Chemical Society*, vol. 80, no. 6, 1339p (1958).
134. Svendsen E. M., *Graphene Oxide as Reinforcement in Epoxy Based Nanocomposites*, *Chemical Engineering and Biotechnology*, Norwegian University of Science and Technology, 2014.

135. D. C. Marcano, D. V. Kosynkin, J. M. Berlin, A. Sinitskii, Z. Sun, A. Slesarev, L. B. Alemany, W. Lu, and J. M. Tour, *ACS Nano*, vol. 4, no. 8, 4806-4814 p(2010).
136. D. R. Dreyer, S. Park, C. W. Bielawski, and R. S. Ruoff, *Chemical Society Reviews*, vol. 39, no. 1, 228-240p (2010).
137. E. M. Svendsen, "Preparation and characterization of graphene oxide" Norwegian University of Science and Technology, Faculty of Natural Science and Technology, Department of Chemical Engineering, 2013.
138. J. R. Potts, D. R. Dreyer, C. W. Bielawski, and R. S. Ruoff, *Polymer*, vol. 52, no. 1, 5-25p (2011).
139. M. A. Rafiee, J. Rafiee, Z. Wang, H. Song, Z. Z. Yu, and N. Koratkar, *ACS Nano*, vol. 3, no. 12, 3884-3890p (2009).
140. R. Verdejo, M. M. Bernal, L. J. Romasanta, and M. A. Lopez-Manchado, *Journal of Materials Chemistry*, vol. 21, no. 10, 3301-3310p (2011).
141. O. Akhavan, *Carbon*, vol. 48, no. 2, 509-519p (2010).
142. C. Zhang, W. Lv, X. Xie, D. Tang, C. Liu, and Q. H. Yang, *Carbon*, vol. 62, 11-24p (2013).
143. M. Terrones, O. Martín, M. González, J. Pozuelo, B. Serrano, J. C. Cabanelas, S. M. Vega-Díaz, and J. Baselga, *Advanced Materials*, vol. 23, no. 44, 5302-5310p (2011).

Chapitre II :
Les voies d'administration des
médicaments

Introduction

Les médicaments sont l'arme principale que les médecins ont pour guérir ou soulager les malades. La "révolution pharmacologique" en est principalement responsable, directement ou indirectement (en permettant des progrès dans la chirurgie ou l'hygiène), de la baisse de la morbidité et de l'allongement de la durée de vie humaine au cours du XXe siècle. L'administration classique des médicaments peut entraîner des effets indésirables due à l'interaction, tels que des effets thérapeutiques accrus ou diminués. Tout au long de ce chapitre, les effets indésirables des voies d'administration de médicaments seront signalés ainsi que les Argentages de ces derniers.

II.1. Définition d'un médicament

Le Code de la Santé publique (1967), donne la définition suivante du médicament : « On entend par médicament toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que tout produit pouvant être administré à l'homme ou à l'animal en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions organiques. ». La médication (du latin *medicatio* : emploi d'un remède - en anglais *médication*) consiste à employer systématiquement des composants médicaux, appelés également agents médicaux, de façon à améliorer un état pathologique (maladie) [1,2].

La pharmacologie est une science qui traite de la pharmacie, de la chimie, de la biologie, de la génétique, de la pathologie, de la thérapeutique et de bien d'autres sciences. La pharmacologie comprend:

- Pharmacodynamique qui étudie les effets des médicaments sur l'organisme, qu'ils soient bénéfiques ou indésirables;
- La pharmacocinétique qui étudie le devenir des médicaments dans le corps, c'est-à-dire leur absorption, leur distribution, leur transformation et leur élimination [1, 2].

II.2. Historique des médicaments

Dans un passé lointain, les médicaments ont été préparés en utilisant des substances végétales provenant d'alcaloïdes (par exemple digitale ou morphine), animales (venin de serpent) ou minérales (arsenic). Actuellement, c'est l'industrie pharmaceutique qui soutient la fabrication de médicaments modernes, d'où une utilisation plus sûre. De plus en plus, la

science de la préparation des médicaments tente et réussit le plus souvent à copier la nature et plus spécifiquement les molécules, produisant ainsi des médicaments synthétiques. Parfois, les produits sont élaborés directement par les chercheurs, comme certains médicaments psychotropes (médicaments du système nerveux central) tels que les benzodiazépines connus sous le nom Valium. L'industrie pharmaceutique a été capable de fabriquer des substances par génie génétique, c'est-à-dire en manipulant les gènes de certaines bactéries afin de produire la substance désirée [3].

II.3. Voies d'administration des médicaments

Il existe plusieurs voies d'administration qui ont toutes des avantages et des inconvénients la figure II.1 présente les différentes voies d'administration des médicaments. Lors de la recherche d'un effet général, le médicament est administré par voie orale ou parentérale. Si nous voulons obtenir un effet local, nous utilisons des préparations spéciales telles que collyres, pommades ... L'absorption est le processus par lequel toute substance apportée de l'extérieur entre dans le sang ou la lymphe:

- Il est **direct** lorsque le médicament entre directement dans le corps (intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, etc.).
- Il est **indirect** lorsque le médicament doit franchir une barrière avant de passer dans la circulation générale (voie orale, application sur la peau) [4,6].

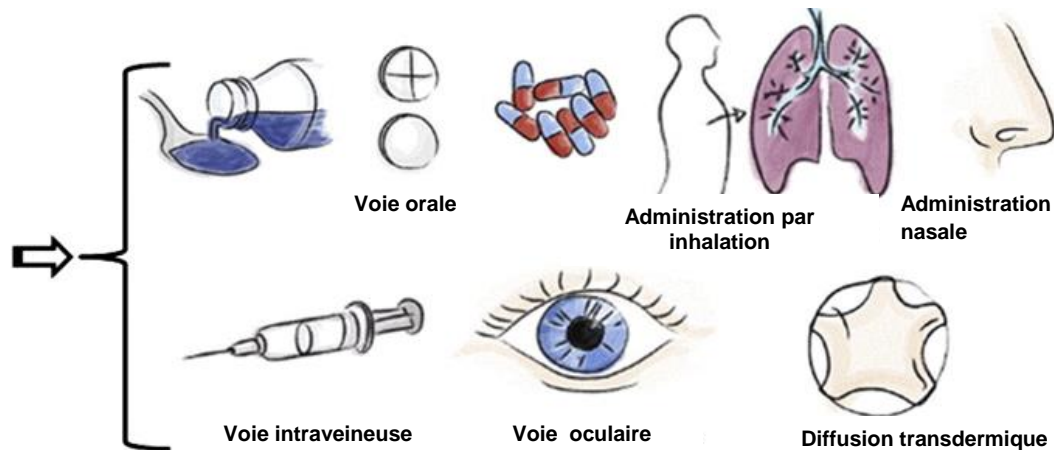


Figure II.1. Différentes voies d'administration des médicaments [4].

Le tableau II.1 présente les différentes voies d'administration des médicaments.

Tableau II.1. Voies et formes d'administration des médicaments [5].

Voie orale	Solides : – comprimés – gélules – granules – poudres
	Liquides : – sirops – ampoules – suspensions et solutions buvables – huiles
Voie parentérale (IV, IM, SC)	Solutions et suspensions injectables : – en ampoules Implants Préparations
Voie rectale	Suppositoires Capsules rectales Lavements
Voie vaginale	Ovules Capsules vaginales Comprimés vaginaux Solutés Crèmes et gelées vaginales
Voie ophtalmique	Collyres Pommades ophtalmiques Bains oculaires Solutés d'irrigation
Voie ORL (nasale, buccopharyngée, auriculaire)	Bains de bouche Collutoires Pommades Aérosols Gouttes nasales
Voie respiratoire	Inhalations Aérosols
Voie cutanée	Pommades Crèmes Lotions Liniments
Voie transdermique	Patchs transdermiques

II.3.1. La voie orale ou voie buccale

C'est la voie la plus utilisée (70 à 80 % des médicaments). Après administration orale, le médicament traverse la barrière intestinale puis le foie avant d'atteindre la circulation générale et de là les organes pour son action thérapeutique [7, 8].

➤ **Avantages**

- Des doses élevées peuvent être prises en une seule fois ;
- Elle est bien acceptée par le patient.

➤ **Désavantages**

- Les médicaments prennent la veine porte et traversent le foie où ils peuvent être dégradés par diverses enzymes ou être excrétés par les voies biliaires. Si le passage dans le foie est important, l'activité du médicament peut être considérablement réduite (l'aspirine, le propranolol, la trinitrine, par exemple);
- Il existe des risques de destruction par les sucs digestifs (pénicilline par exemple) ;
- l'irritation du tube digestif par certains médicaments (anti-inflammatoires, corticostéroïdes...);
- L'action n'apparaît qu'après un temps de latence correspondant au temps d'absorption (l'absorption est plus rapide à jeun).
- Parfois l'absorption est incomplète, voire nulle (certains sulfamides, sels métalliques).
- L'odeur et le goût des médicaments sont parfois désagréables (d'où l'utilisation d'aromatisants).
- La voie orale est difficile d'utiliser en cas de nausées et de vomissements.
- Elle ne peut pas être utilisée chez un patient inconscient.
- Il faut être attentif chez l'enfant en cas de fausse route [7, 8].

a) Les différentes formes de médicaments administrés par voie orale

La voie orale est la voie la plus largement répandue et la plus largement utilisée pour absorber un médicament. Celle-ci peut se faire soit sous forme liquide, soit sous forme d'absorption solide, soit sous forme de poudre [9].

- **Les médicaments liquides** : se présentent généralement sous forme de sirops ou d'ampoules. Les ampoules de solutés buvables contiennent généralement des fortifiants ou des antianémiques dont la conservation est difficile, d'où la nécessité de boire rapidement le contenu d'une ampoule dès que celle-ci est ouverte [9].

- **Les comprimés** : Les comprimés peuvent également comprendre plusieurs couches ayant chacune une propriété pharmacologique spécifique, c'est-à-dire contenant des principes actifs qui, sans ce procédé, pourraient être neutralisés l'un par rapport à l'autre. Les différentes couches des comprimés multicouches permettent également de libérer les substances actives à différentes vitesses et à des moments différents [9].

Les comprimés à libération prolongée : certains comprimés dits à libération modifiée sont fabriqués de façon à retarder ou prolonger la libération des substances médicamenteuses dans le tube digestif. Le terme *repetabs* désigne un comprimé de médicaments à double libération. Ce sont des médicaments appartenant à la famille des médicaments à libération lente qui permettent une plus longue période d'absorption et donc une plus longue durée d'action de l'ingrédient actif, permettant ainsi de réduire le nombre de doses. Les comprimés à libération prolongée ont une libération contrôlée de l'ingrédient actif au fil du temps. Il s'agit de comprimés avec une matrice ou une capsule contenant des micronodules par exemple. L'un des exemples les plus populaires de comprimés de *repetabs* est le *repetabs* polaramine [10].

- **comprimés sublinguaux** : Maintenus sous la langue, permettent de libérer le principe actif contenu dans le comprimé puis son absorption grâce à la vascularisation, c'est-à-dire à la présence sous la langue de nombreux petits vaisseaux contenus dans la muqueuse situés sous la langue, évitant ainsi l'action délétère (nuisible) des enzymes de l'estomac qui peuvent détruire la molécule, le principe actif du médicament [11].

- D'autres formes médicamenteuses orales existent mais sont moins utilisées que la forme comprimée, il s'agit de : L'élixir qui est une préparation liquidienne de substances médicamenteuses permettant de calmer la toux ou les douleurs de l'estomac, entre autres. Il s'agit le plus souvent de molécules dissoutes dans de l'alcool à 20 % contenant d'autre part 20 % de sucre et de glycérine [12].

- **Les huiles essentielles ou essences** : sont des produits très volatils extraits par distillations de végétaux. Leur administration se fait principalement par inhalation et parfois en solution d'alcool de façon à être bue, le plus souvent sur un sucre [12].

- **L'émulsion** : est un liquide qui contient en suspension de très petites gouttelettes. Les extraits sont obtenus en dissolvant une substance animale ou végétale puis en évaporant le solvant jusqu'à obtention d'une autre substance qui peut être un extrait fluide [12].

- **Les gélules et les capsules** : constituées de minuscules récipients de gélatine contenant un médicament sous forme liquide ou sous forme de poudre. Elles sont généralement utilisées pour masquer une odeur ou un goût désagréable. Certaines gélules sont résistantes aux sucs digestifs de l'estomac (gastro-résistantes) et leur produit est libéré uniquement dans l'intestin grêle [12].

- **Les poudres** : nécessitent le plus souvent avant absorption une dissolution dans de l'eau. Il s'agit le plus souvent de médicaments pour soulager des brûlures de l'estomac ou d'antibiotiques. Parfois, la poudre est inerte (lactose) [8].

-**La potion** : est un médicament à base d'eau et de sucre qui doit être consommé rapidement, de préférence le jour même où elle a été préparée par le pharmacien. Les solutés proviennent de végétaux dont on a extrait la substance active. Celle-ci est ensuite diluée, dans de l'alcool (alcoolat) entre autres, ou dissoute dans un solvant [3].

II.3.2. La voie injectable

C'est la voie la plus directe, car elle met directement en contact le médicament avec le sang ou les liquides interstitiels et évite le tube digestif. Les médicaments administrés par voie parentérale sont les préparations injectables liquides (solutions, émulsions, suspensions) ou solides (les implants) [13].

Avantages

- Effet rapide, surtout après administration intraveineuse.
- Passage immédiat dans l'organisme.
- Pas de destruction par les enzymes du tube digestif qu'elle permet d'éviter.
- Injection possible à l'endroit désiré (par exemple injection intracardiaque).
- Voie utile pour un patient inconscient ou incapable d'avaler.

Inconvénients

- L'injection est parfois douloureuse ;
- Elle peut comporter un risque d'infection ;
- L'anoxie suraiguë des tissus, source d'escarres ou de développement de germes anaérobies (gangrène, tétanos) due à l'utilisation de vasoconstricteurs puissants et à effet prolongé ;
- La piqûre d'un nerf (douleur) ou l'injection intra-nerveuse (risque de paralysie) [13].

Les médicaments injectables consistent en une solution ou une suspension liquide, ou une émulsion, qui peut être administrée sous la forme de piqûre (voie parentérale). Les solvants utilisés sont: Eau, Huiles végétales, Alcool, Lanoline. Contrairement aux molécules contenues dans les formes orales, le liquide injectable doit être non seulement stérile (exempt de microbes) mais en plus présenter un équilibre acido-basique convenable. Il doit d'autre part avoir une tension osmotique égale à celle du plasma sanguin : on parle d'isotonie. En effet, si

sa concentration est différente de celle du plasma sanguin, le liquide risque d'entraîner rapidement des lésions des tissus dans lesquels il est injecté. Les liquides destinés à être injectés sont conditionnés sous forme d'ampoule en verre ou en plastique (plus précisément en polychlorure de vinyle (PVC) [13].

L'administration d'une substance injectable est variable selon, premièrement, la substance injectée (une substance huileuse n'est pas injectée en intraveineuse) et selon l'effet thérapeutique souhaité. Ainsi, une injection intraveineuse a une action beaucoup plus rapide qu'une injection intramusculaire. La voie sous-cutanée (sous la peau dans le tissu conjonctif) est différente de la voie intramusculaire, plus lente. La voie intracardiaque est de moins en moins utilisée.

La voie intra-artérielle consiste à injecter directement un médicament dans une artère.

La voie intra-rachidienne permet l'injection d'un produit entre la moelle épinière et la colonne vertébrale : dans ce cas, le médicament se mélange au liquide céphalo-rachidien.

La voie épidurale permet l'injection dans le canal sacré [13].

II.4. L'administration transdermique de médicament

II.4.1. Généralités sur l'administration transdermique de médicament

L'administration transdermique de médicament a l'avantage de délivrer des médicaments à travers la peau à la circulation systémique à une vitesse prédéterminée et de maintenir la concentration thérapeutique pendant une période de temps prolongée. Un patch transdermique est un tampon adhésif médicamenteux qui est utilisé sur la peau pour délivrer le médicament à une dose spécifiée dans une région spécifique à travers la peau [14].

Le principal avantage du système transdermique d'administration de médicament par rapport à d'autres voies d'administrations comme orale, intraveineuse, sublinguale, intramusculaire est sa libération contrôlée du médicament à travers la peau habituellement par une membrane poreuse recouvrant le médicament ou par la température corporelle qui fond les couches minces de médicament incorporé dans l'adhésif [15,16]. Le seul inconvénient est que les médicaments dont les molécules sont de plus grande taille qu'elles ne peuvent traverser la peau. L'utilisation de patchs transdermiques a été restreinte en raison de son taux de pénétration.

Les médicaments administrés via les patchs cutanés comprennent la nicotine, l'œstrogène, le vasodilatateur et l'anesthésique topique [17,18]. Les marchés de patchs non médicamenteux

comprennent des patchs thermiques et froids, des patchs nutritifs, des patchs de soins cutanés (une classe composée de 2 sous-catégories majeures thérapeutiques et cosmétiques), des patchs d'arômes et des patchs de perte de poids. L'administration transdermique de médicaments présente de nombreux avantages par rapport à l'administration de médicaments conventionnels [19].

II.4.2. Les avantages de l'administration transdermique de médicament

En utilisant le système d'administration de médicament transdermique, il est possible d'obtenir les avantages suivants:

- Éviter l'«effet de premier passage» [20].
- Une concentration sanguine stable et contrôlée du médicament.
- Caractéristiques similaires à la perfusion intraveineuse.
- Peut arrêter l'administration ultérieure, si ce n'est pas nécessaire.
- Livraison de médicaments à long terme allant de quelques heures à une semaine.
- Aucune interférence avec les fluides gastriques et intestinaux, la nourriture, les boissons et autres médicaments oraux.
- Administration de médicaments avec une demi-vie très courte, une fenêtre thérapeutique étroite, une mauvaise absorption orale
- Amélioration de la conformité du patient et réduction de la variabilité intra-patiente.
- L'auto-administration est possible.
- Les systèmes sont non invasifs.
- Minimise les effets secondaires comme les vomissements et la diarrhée [21].

II.4.3. Les désavantages de l'administration transdermique de médicament

- Le médicament devrait avoir certaines propriétés physico-chimiques souhaitables comme la taille moléculaire inférieure, pour pénétrer à travers la couche cornée (stratum corneum.).
- Peut causer une irritation de la peau ou une dermatite due à une interaction médicamenteuse ou excipient.
- La fonction de barrière de la peau varie d'un site à l'autre sur la même personne, d'une personne à l'autre et avec l'âge.
- Il nécessite une concentration sanguine élevée [22].
- Il peut être non rentable [23].

II.4.4. Morphologie de la peau

La peau a trois grandes couches de tissu: l'épiderme, le derme et l'hypoderme [25]. L'épiderme avec son épithélium forme la couche superficielle du corps. C'est un épithélium pavimenteux kératinisé stratifié, présent dans la majorité des régions du corps. Les cellules se divisent constamment dans les couches cellulaires les plus basses [26-28]. Dans ce processus, une cellule fille migre vers la surface, et l'autre se divise à nouveau. Lorsque les cellules migrent vers la surface, elles deviennent cornées et forment des granules (stratum granulosum). La barrière principale dans la peau est la couche cornée et la couche supérieure de l'épiderme. La couche cornée est constituée de restes kératinisés et aplatis de cellules épidermiques autrefois en division active. Hygroscopique, mais imperméable à l'eau, elle se comporte comme une membrane souple et résistante. L'espace intercellulaire est riche en lipides. [29].

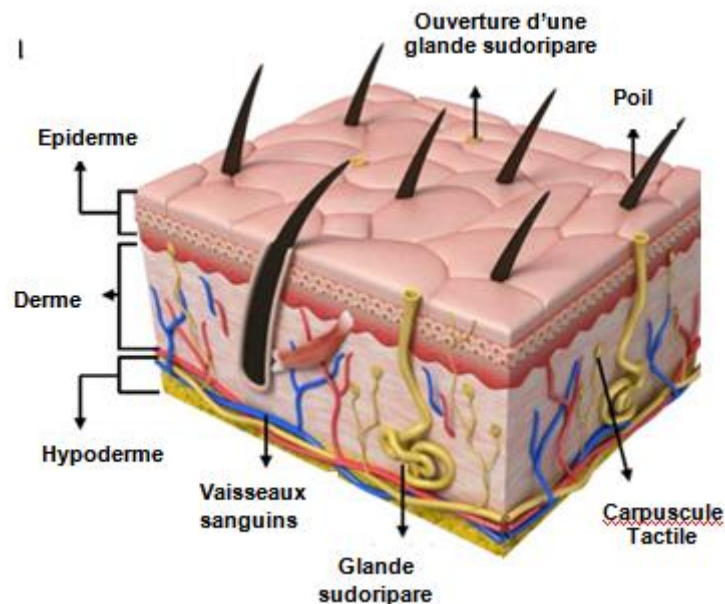


Figure II.2: Morphologie de la peau [24].

II.4.5. Classification des patchs transdermiques

Les patchs transdermiques sont classés en cinq types principaux en fonction de leur composition et de leur mécanisme [30-31].

- **Adhésif médicamenteux à couche unique:** L'adhésif utilisé dans ce type de patch retient non seulement toutes les couches ainsi que tout le système sur la peau, mais libère également le médicament. L'adhésif est entouré d'une couche de doublure et de support [32].

- **Médicament adhésif à plusieurs couches:** un adhésif à plusieurs couches est une collection d'un ou de plusieurs médicaments en une seule couche. Ces couches sont séparées par une membrane mais pas dans tous les cas. L'une des couches est destinée à la libération immédiate du médicament et le reste des couches est destiné à l'administration contrôlée de médicaments. Ce patch est également recouvert d'une couche de revêtement mince et un support permanent [33].
- **Réservoir:** Contrairement aux types cités ci-dessus, le type de patch de réservoir comporte une couche de médicament séparée qui contient le médicament à l'état liquide sous la forme d'une solution ou d'une suspension séparée par la couche adhésive. Le réservoir de médicament est complètement encapsulé dans un compartiment peu profond noyé dans un stratifié de plastique métallique imperméable aux médicaments, avec une membrane de contrôle de l'acétate de vinyle sur une surface. Le patch est entouré d'une couche de support [34].
- **Matrice:** Le patch de la matrice contient une solution médicamenteuse ou une suspension incorporée dans une matrice semi-solide qui agit comme une couche de médicament. La couche adhésive de ce type recouvre légèrement la couche de médicament et l'entoure. Ce type est également connu sous le nom de dispositif monolithique [35].
- **Patch de vapeur:** Dans le patch de vapeur, la couche adhésive colle non seulement toutes les couches et le système à la peau, mais libère également la vapeur du patch. L'activité du patch varie de 5 à 6 heures. Ce patch est utilisé dans le traitement de l'aide au sommeil et du sevrage tabagique [36].

II.4.6. Classification systèmes d'administration transdermiques de médicaments

Cependant, les systèmes d'administration de médicaments transdermiques sont le plus souvent classés en deux groupes:

- A. Patches matriciels:** Dans le système matriciel, la matrice semi-solide polymère inerte se lie au médicament et forme une couche de médicament qui contrôle sa libération du dispositif [37].
- B. Patches de réservoir de liquide:** Dans le système de réservoir, la matrice de polymère n'est pas responsable de la libération de médicament, une membrane contrôle la vitesse présente entre la matrice de médicament et la couche adhésive

agit en tant qu'une barrière limitant la vitesse de libération du médicament à partir du dispositif [38-40].

II.4.7. Composants du patch transdermique

Les patches de matrice et les patches de réservoir de liquide comprennent tous deux différents composants. Certains sont similaires dans les deux classes, tandis que d'autres sont spécifiques au type. Les composants communs incluent: [41-43]:

II.4.7.1. Films de soutien

Les films de soutien jouent un rôle essentiel dans le dispositif transdermique et également lors de l'utilisation du système. Le rôle du film est de protéger la couche active et de préserver la stabilité du système, et d'influer sur la perméabilité et la tolérance de la peau. Afin d'éviter tout type d'incompatibilité, le film antiadhésif doit être totalement inerte vis-à-vis des ingrédients. Il doit également être flexible, confortable et avoir une bonne affinité avec l'adhésif et une excellente imprimabilité. Les doublures antiadhésives les plus courantes sont le polypropylène, les polyesters, le PVC et le nylon [44].

II.4.7.2. Revêtements antiadhésifs

Un revêtement anti-adhérent recouvrira les doublures antiadhésives. Le rôle du protecteur antiadhésif est de protéger le système lorsqu'il est dans l'emballage, il sera retiré juste avant l'application de TDDS (*Système de d'administration transdermique*) sur la peau. Les doublures de libération jouent un rôle important dans la stabilité, la sécurité et l'affectivité du patch. Des précautions doivent être prises pour choisir les doublures antiadhésives. Une doublure antiadhésive incorrecte ne permet pas la libération facile du timbre et peut interférer avec le ou les composants actifs ou d'autres composants, réduisant ainsi sa durée de conservation. Les films les plus couramment utilisés comme films de protection sont des films à base de papier, des films plastiques et des films composites. Les deux principales classes de revêtements sont les silicones et les fluoropolymères [45-48].

II.4.7.3. Adhésifs sensibles à la pression

Pour les deux types de TDDS, les adhésifs sensibles à la pression (PSA) jouent un rôle important en servant de matrice qui porte les additifs actifs et les renforteurs de perméation et les moyens de rendre le patch collé à la peau. Il existe trois catégories de PSA: caoutchouc, acrylique sous forme de solutions acryliques, polymères en émulsion ou thermofusibles et

PSA au silicium. Pour chaque catégorie, il existe plusieurs sous-catégories qui donnent la flexibilité requise au patch [49-51].

II.4.7.4. Amplificateurs de pénétration

Ce sont les substances chimiques complètement différentes qui appartiennent à la même famille par des caractéristiques. Ils augmentent la vitesse de perméation, de plusieurs fois, de l'ingrédient actif à travers la peau. Cela améliore la faisabilité d'un système, car la plupart des actifs ne pénètrent pas dans la peau à la dose requise dans une zone relativement petite. Parfois, une combinaison de ces ingrédients est nécessaire pour créer l'effet d'amplification correcte [52-54].

II.4.7.5. Membranes microporeuses ou semi-perméables

La membrane poreuse est un type spécial de membranes principalement utilisé dans tous les timbres transdermiques liquides et certains des timbres de type matriciel. Son rôle est de réguler l'écoulement du contenu semi-solide du réservoir de liquide. La capacité de la membrane dépend de la conception du système, de la taille du composant actif et de la nécessité d'avoir un facteur limitant la vitesse afin de satisfaire aux caractéristiques de libération et d'absorption du système. Le taux de perméation dépend principalement de la composition chimique de la membrane [55-57].

Il existe deux types de membranes poreuses comme indiqué ci-dessous

- A. Membrane d'éthylène-acétate de vinyle
- B. Membrane de polyéthylène microporeuse [58-60].

II.4.7.6. Matériel de poche

La plupart des TDDS disponibles sur le marché sont conditionnés en doses unitaires dans des sachets scellés. Le matériau de la poche doit être inerte et doit maintenir la stabilité et l'intégrité du produit. Quand il y a deux films avec des caractéristiques désirées similaires, celui qui a le moins de coût, une meilleure fonction et une meilleure imprimabilité sera choisi [61-63].

Il y a trois couches principales dans les matériaux composites utilisés pour les poches:

- a. **Couche thermoscellable :**

Cette couche joue un rôle important dans la fonctionnalité, la stabilité et la protection du patch. Plusieurs films ou revêtements en plastique peuvent être utilisés pour sa formation, y compris le polyéthylène [64-66].

b. Couche de feuille d'aluminium :

Cette couche joue un rôle important dans la protection du produit contre la lumière et l'oxygène. Dans des conditions idéales, la feuille doit avoir une épaisseur de plus de 1 millième ou 25 micromètres pour constituer une véritable barrière. Si un niveau inférieur à ce niveau d'épaisseur est utilisé, il y aura toujours des piqûres réduisant les propriétés de barrière [67-69].

c. Couche externe :

La couche externe d'un film composite est responsable d'obtenir une meilleure qualité de finition et d'impression. Il agit en synergie avec la feuille d'aluminium. Le film de papier ou de polyester est utilisé comme couche externe, mais le film de polyester crée une meilleure pochette et une meilleure barrière [70-73].

II.4.8. Facteurs affectant la perméabilité transdermique

Les facteurs affectant la perméabilité transdermique du médicament sont classés en trois facteurs suivants [75- 78] :

II.4.8.1. Propriétés physicochimiques des pénétrants

a. Coefficient de partage: Les médicaments dont l'eau et les lipides sont solubles sont principalement absorbés par la peau. Le coefficient de perméabilité transdermique dépend directement du coefficient de partage. Un coefficient de partage lipide / eau de 1 ou plus est favorable à une perméabilité transdermique optimale [79].

b. Conditions de pH: l'état de pH de la peau et celui du patch affectent l'étendue de la dissociation des molécules de médicament ionique et de sa perméabilité [79].

c. Concentration pénétrante: La perméabilité transdermique à travers la peau suit le processus de diffusion passive. Par conséquent, le gradient de concentration des molécules pénétrantes sur les couches superficielles de la peau est nécessaire. [80-82].

II.4.8.2. Système de délivrance de médicament et ses propriétés physicochimiques

a. Caractéristiques de libération: En général, plus le médicament est libéré du système de distribution plus élevé sera le taux de perméation. Le mécanisme de libération du médicament dépend de la dissolution ou de la suspension des molécules médicamenteuses dans le système d'administration, du coefficient de partage interfacial entre le système médicamenteux et la

peau.

b. Composition des systèmes d'administration de médicaments: La composition du système d'administration de médicaments a une influence cruciale sur l'absorption percutanée de la molécule de médicament. Elle affecte le taux de libération du médicament et la perméabilité de la couche cornée au moyen de l'hydratation, du mélange avec les lipides cutanés, etc. [83].

c. Amélioration de la perméation transdermique: L'ajout d'un promoteur de sorption ou de perméation dans le système d'administration de médicament améliorera la perméation transdermique des médicaments [84-86].

- a. Solvants organiques comme promoteur de perméation: le diméthylsulfoxyde, l'éthanol, l'éthylène glycol, le polyéthylène glycol.
- b. Agent tensioactif comme promoteur de perméation - Les agents tensioactifs anioniques sont des promoteurs de perméation plus efficaces. Certains d'entre eux sont le laurylsulfate de sodium (SLS), le dioctylsulfosuccinate de sodium.

II.4.9. Les conditions d'utilisation d'un système d'administration de médicament

Le patient doit être informé des instructions suivantes :

1. Le dispositif transdermique doit être appliqué sur une peau propre et sèche, relativement exempte de poils, de sébacées ou de toute autre huile, et sur des lésions externes avec peau écorchée. La peau humide peut accélérer la perméation du médicament. Une peau grasse entravera l'adhérence du timbre sur la peau [87]. Si des poils sont présents à l'endroit désiré, ils doivent être coupés mais non rasés car ils peuvent enlever la couche cornée supérieure qui affecte la vitesse et l'étendue de la pénétration du médicament.
2. L'utilisation d'un hydratant pour la peau ou d'une lotion doit être évitée dans la zone d'application, car l'hydratation de la peau peut modifier le coefficient de partage du médicament [88-90].
3. Le support protecteur doit être retiré avec précaution sans toucher du bout des doigts. Le patch transdermique doit être pressé fermement contre le site de la peau avec le talon de la main pendant environ 10 secondes [91-93].

Conclusion

Le système d'administration transdermique de médicaments est une voie d'administration novatrice. Il est préconisé dans le cas des médicaments qui ont des incompatibilités ou une

réaction avec le contenu gastrique, les aliments ou des boissons, dans le cas de l'administration orale, les médicaments qui subissent une biodégradation ou un effet de premier passage, médicaments qui ont des interactions médicamenteuses. Ces médicaments peuvent être administrés comme timbre transdermique. Le patch est plus préféré en raison de son observance par le patient, de sa voie d'administration facile et de son effet thérapeutique souhaité. Cette administration de médicament transdermique est réalisable et disponible avec différentes techniques qui le rendent facile à appliquer à différentes molécules de médicament en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Le timbre transdermique présente divers avantages et inconvénients. Il varie dans son efficacité en fonction de diverses conditions. En général, le timbre transdermique peut être utilisé pour un large éventail d'applications comme les contraceptifs, le sevrage tabagique, le mal des transports, les thérapies hormonales, les somnifères, les analgésiques, les antihypertenseurs, le traitement de l'hyperphagie et bien d'autres. La technologie doit évoluer au-delà de ce niveau, la biotechnologie doit également être combinée pour inventer de nombreux autres médicaments innovants.

Références bibliographiques

1. <https://www.sciencedirect.com>, Voies d'administration des médicaments, Pharmacologie et thérapeutiques, Elsevier Masson SAS, 2013.
2. Y TOUITOU, Pharmacologie, Diplôme d'État d'infirmière, Professionnels, Professeur à la faculté de médecine Pierre et Marie Curie, Praticien hospitalier, 11^e édition, Elsevier Masson SAS, Copyright © 2007.
3. M Talbert, G Willoquet, guide de pharmaco, étudiants et professeurs paramédicaux, éditions Lamarre, 2004.
4. A. Faure, P. Jolliet, M. Fontaine, B. Herlin., Pharmacologie, Collection des Nouveaux Cahiers de l'Infirmière, n° 26. 3^e édition, 240 p, 2007.
5. L. Perlemuter, G. Perlemuter et al, Guide de thérapeutique, 2 : 016 p. 2006.
6. D. Rispaïl, A. Viaux., S'entraîner au calcul de doses et de débits médicamenteux, 2^e édition, 160 p, 2007.
7. M. Moulin, A. Coquerel. Pharmacologie, Collection Abrégés de Médecine, 2^e édition, 856 p, 2002.
8. E. Bergogne-Bérézin, P. Dellamonica. Préface de P. Godeau. Antibiothérapie en pratique clinique, d'Collection Abrégés de Médecine, 2^e édition, 520 p, 1999.
9. J.-M. Aiache, S. Aiache, R. Renoux. Initiation à la connaissance du médicament, Collection Abrégés de Pharmacie, 4^e édition, 352 p, 2001.
10. J. Quevauvilliers, L. Perlemuter, G. Perlemuter, Dictionnaire médical de l'infirmière, 7^e édition, 1176 p, 2005.

11. J. Quevauvilliers, Dictionnaire médical de poche, 544 p, 2005.
12. L. Perlemuter, G. Perlemuter, Guide pratique de l'infirmière, 1 536 p, 2006.
13. J DANGOUMAU, N MOORE et al, pharmacologie générale, Département de pharmacologie - Université Victor Segalen Bordeaux 2, édition 2006.
14. Gönül M, Çakmak SK, A, J Clin Exp Dermatol Res S6:008p (2013).
15. Jones N, Colver GB, J Clin Exp Dermatol Res 2:130p (2011).
16. Pruneddu S, Piras D, Wijesuriya N, Cerio R., J Clin Exp Dermatol Res S3:001 (2011).
17. Gomes CA, Nogueira CastanÃMn MCM, Gomes CC, Campanha PM, de Carvalho Vilela T, et al.. J Clin Exp Dermatol Res 2:137p (2011).
18. Eberting CL, J Clin Exp Dermatol Res 5:246p (2014).
19. Sheikh S, Ahmad A, Ali SM, Paithankar M, Raval RC, et al., J Clin Exp Dermatol Res 5:248p (2014).
20. Stoff BK, Payne LC, Shih J, Veledar E, J Clin Exp Dermatol Res 3:158p (2012).
21. Delicou S, Kourouni I, Samarkos M, Kouzis P, J Pain Relief 2:125p (2013).
22. Lin SL, Choy CS, Chan WP, Leung TK, Pharm Anal Acta 5: 281p (2014).
23. Lakshmi PK, Mounika K, Saroja CH., J Pharma Care Health Sys 1:103p (2014).
24. Dhanusha B, Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences RRJPPS, Vol 3: 3, 94-105p (2014).
25. Pandey A, Mittal A, Chauhan N, Alam S., J Mol Pharm Org Process Res 2:113p (2014).
26. Lauretti GR, Amaral M, Dias RD, Lanchote VL, Mattos AL., J Phys Chem Biophys 4:154p (2014).
27. Malika V, Kohli K, Chaudhary H, Kumar V., J Develop Drugs 3:121p (2014).
28. Branvold A, Carvalho M., J Gen Practice 2:188p (2014).
29. Szczygiel M, Boron B, Szczygiel D, Szafraniec M, Susz A, et al., J Anal Bioanal Tech 5:227p (2014).
30. A De, S Chakraborty, A Mukherjee, J Chattopadhyay and M Kumar., Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences RRJPPS RRJPPS, Vol 2, 3, 85-94p (2013).
31. <http://rroj.com/open-access/in-vitro-and-pharmacological-evaluation-of-a-formulated-101-110.pdf>
32. Lu Y, Tian L, He Y, Lu Y, Liang X, et al., Pharm Anal Acta 6:329p (2015).
33. Pandey A, Mittal A, Chauhan N, Alam S., J Mol Pharm Org Process Res 2:113p (2014).

34. Silva HR, Luz GM, Satake CY, Correa BC, Sarmiento VHV, et al., *J Nanomed Nanotechnol* 5:231p (2014).
35. Jampilek J, *J Bioequiv Availab* 5:233-235p (2013).
36. Kamimura M, Mouri A, Takayama K, Mizutani T, Hamamoto Y, et al., *J Allergy Ther* 4:152p (2013).
37. Lin SL, ChanW P, Choy CS, Leung TK., *Transl Med* 3:115p (2013).
38. Basu Sarkar A, Kandimalla A, Dudley R., *J Steroids Horm Sci* 4:114p (2013).
39. El-Khordagui LK., *J Bioequiv Availab* 4: xxxi-xxxiii (2012).
40. Meier-Davis SR, Murgasova R, Toole C, Arjmand FM, Diehl L, et al., *J Drug Metab Toxicol* 3:129p (2012).
41. Shakeel F, Mohammed SF, Shafiq S., *J Bioequiv Availab* 1: 013-017p (2009).
42. Elshafeey AH, Hamza YE, Amin SY, Akhlaghi F, Zia H., *J Bioequiv Availab* 3: 097-100p (2011).
43. Barakat N, Fouad E, Elmedany A., *Pharm Anal Acta* S2:002 (2011).
44. Shirai T, Kawayama T, Nagase H, Inoue H, Sato S, et al., *J Allergy Ther* 5:173p (2014).
45. Rudmik L., *Adv Pharmacoepidemiol Drug Saf* 3:148p (2014).
46. Shengqian Wu, Salar-Behzadi S, Fröhlich E., *J Mol Pharm Org Process Res* 1:106p (2013).
47. Asai N, Ohkuni Y, Kaneko N., *J Clin Case Rep* 3:296p (2013).
48. Chen YQ, Wang JD, Xiao J., *J Anesth Clin Res* 3:225p (2012).
49. Lapchak PA, Wu Q., *J Neurol Neurophysiol* S1(2011).
50. Khattak S, Malik F, Hameed A, Ahmad S, Rizwan M, et al., *J Bioequiv Availab* 2: 139-144p (2010).
51. Sozeri B, Yilmaz E, Dincel N, Gozuoglu G, Ozdemir K, et al., *J Nephrol Ther* 4:164p (2014).
52. Thompson JES, Webb R, Hewlett P, Llewellyn D, McDonnell BJ., *J Hypertens* 2:127p (2013).
53. Hiramoto K, Sato EF, Kobayashi H, Yokoyama S, Ooi K., *J Clin Exp Dermatol Res* 4:180p (2013).
54. DAI Yi., *J Trauma Treat* 2:171p (2013).
55. Wang H, Imamura Y, Matsumoto N, Yoshikawa N, Nakagawa J, et al., *Biochem Pharmacol* 2:108p (2013).
56. Komano Y, Yagi N, Nanki T., *Pharm Anal Acta* 6:352p (2015).

57. S Ravisankar, N Dey, AP Francis, K Pandian, T Devasena, International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology IJRSET, Vol 4, 1, 28-33p (2015).
58. Nikalje AP., Med chem 5:081-089p (2015).
59. Lee JH, Ivkov R, Blumenthal R., J Nanomedine Biotherapeutic Discov 4:130 p (2014).
60. Rasool Hassan BA., Pharmaceut Anal Acta 3:e137p (2012).
61. Hu D, Tang S, Peng H, Wang Q., Biochem Physiol 4: e133p (2015).
62. Agrawal P., J Pharmacovigil 3:e127p (2015).
63. Pawar HA, Bhangale BD., J Bioanal Biomed 7:006-012p (2015).
54. Jigar N Shah, Hiral J Shah, Anastasia Groshev, Anjali A Hirani, Yashwant V Pathak et al., J Biomol Res Ther 3:116p (2014).
65. <http://omicsonline.org/open-access/design-and-simulation-of-valve-less-pzt-micropump-for-drugdelivery-system-0976-4860-3-92-100.pdf?aid=35560>
66. P VV , A Lohumi, S Tribedi, Ru Mathappan, and S T Mathew., Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences RRJPPS RRJPPS, Vol 2, 3, 69-77p (2013).
67. S K Garg, A Dwivedi, P Saini, A Pareek, and S Trivedi., Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences RRJPPS RRJPPS, Vol 2, 3, 13-18p (2013).
68. Wen H, Li Y., Med chem 4:748-755p (2014).
69. Nagalaxmi Velpula, Sushma Reddy Sudini, Naga Jyothi Meka, Srikanth Kodangal, Swetha Palem, Lalitha Ch, Stuti Goyal., OHDM, Vol. 13, No. 4, 1034 - 1040p (2014).
70. Malika V, Kohli K, Chaudhary H, Kumar V., J Develop Drugs 3:121p (2014).
71. <http://rroj.com/open-access/a-review-on-pharmacosomes-7-12.pdf> drugs-23-30.pdf
72. UY Kandekar ,P D Chaudhary, and KB Chandrasekhar., Research and reviews: journal of pharmaceutics and nanotechnology RRJPNT, Vol, 2, Is 1, 31-36p (2014).
73. Gavasane AJ, Pawar HA Synthetic., Clin Pharmacol Biopharm 3:121p (2014).
74. Nagai N, Ito Y ., Anal Acta 5:305p (2014).
75. Kong KV, Goh D, Olivo M., J Nanomed Nanotechnol 5:212p (2014).
76. Xiang Q, Morais PC., J Nanomed Nanotechnol 5:209 p (2014).
77. Saktioto T, Irawan D, Thammawongsa N, Yupapin PP., J Biosens Bioelectron 5:159p (2014).
78. Punthawanunt S, Yupapin PP., J Biosens Bioelectron 5:158p (2014).
79. Nath D, Banerjee P, Das B., J Nanomedine Biotherapeutic Discov 4:125p (2014).

80. Pandey A, Mittal A, Chauhan N, Alam S., J Mol Pharm Org Process Res 2:113p (2014).
81. Domanska U, Halayqa M., J Phys Chem Biophys 4:143p (2014).
82. Sharif A, Akhtar N, Khan MS, Menaa B, Khan BA, et al., J Pharma Care Health Sys 1:107p (2014).
83. Zhang Y, Dusad A and Ren K., Orthopedic Muscul Sys S2:003 (2014).
84. Singh M, Kumar M, Manikandan S, Chandrasekaran N, Mukherjee A., J Nanomed Nanotechol S5:009 (2014).
85. Dutta AK, Ikiki E Nove I., J Bioequiv Availab 6:001-009p (2013).
86. Oliveira AM, Guimarães KL, Cerize NNP, Tunussi AS., J Nanomed Nanotechnol 4:186p (2013).
87. Tyrrell J, Tarran R., J Pharmacovigilance 2: 118p (2013).
88. Babar MM, Zaidi NSS, Kazi AG, Rehman A., J Antivir Antiretrovir 5:166-172p (2013).
89. Misra R, Upadhyay M, Mohanty S., Pharm Anal Acta 5:279p (2014).
90. Phan CM, Hui A, Subbaraman L, Jones L., Clin Exp Pharmacol 4:145p (2014).
91. Madhavi BR, Murthy VSN, Rani AP, Kumar GD., J Mol Pharm Org Process Res 1:107p (2013).
92. Koeck K, Grossauer S, Trummer M, Kleinert R., General Med 1:117p (2013).
93. Gou M., Promising Application of Nanotechnology in Anticancer Drug Delivery. Drug Des 2:e117p (2013).

Chapitre III :
Détermination de
l'Agrégation des protéines par
une électrode de GC/prGO

Introduction

L'instabilité des protéines, due au repli des protéines et à leur agrégation, est une grande préoccupation pour les thérapies basées sur ces protéines en raison de leur perte de biodisponibilité associée. Le développement de méthodes simples et rentables pour l'analyse de formulations pharmaceutiques, indiquant la présence et l'absence d'agrégats protéiques, devient d'une grande importance. Dans ce chapitre on propose une nouvelle interface électrochimique à base d'une électrode de carbone vitreux modifié par l'oxyde de graphène réduit poreux (GC / prGO), permettant d'identifier l'agrégation des protéines par simple variation du courant oxydant des parties électro-actives des protéines. Pour valider l'approche électrochimique, on étudie l'agrégation de trois protéines différentes, le lysozyme, l'insuline et la calcitonine, et par la suite de faire une comparaison entre les résultats obtenus avec les résultats d'analyse standard basée sur la fluorescence.

III.1. L'agrégation des protéines

L'agrégation des protéines est une question répandue et troublante car ces structures supramoléculaires sont capables d'induire des réponses biologiques significatives et de modifier les réactions moléculaires [1,2]. La pathogenèse de plusieurs maladies connues telles que la maladie de Parkinson, d'Alzheimer, la maladie de Huntington, Creutzfeld Jacob etc. ainsi que le vieillissement est connu pour être lié à l'agrégation des protéines [3]. Outre les implications de l'agrégation des protéines en tant que biomarqueur général pour la santé humaine, il existe un intérêt continu à détecter les agrégats solubles dans les produits biopharmaceutiques. Un obstacle majeur pour le développement de nombreuses thérapies à base de protéines est l'immunogénicité potentielle des agrégats de protéines chez les humains [4]. La détermination des niveaux acceptables d'agrégation des protéines dans les formulations de médicaments devient ainsi une grande importance avec le nombre croissant de produits biopharmaceutiques sur le marché. La figure III.1 représente les différentes étapes des phénomènes de l'agrégation des protéines.

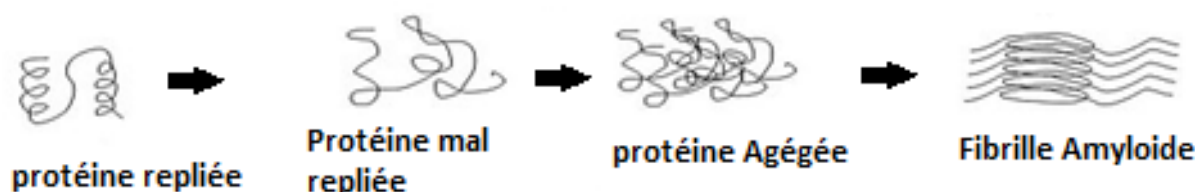


Figure III.1 : Agrégation des protéines.

III.2. Méthodes de détermination de l'agrégation des protéines

À côté des méthodes classiques utilisées pour déterminer les structures des agrégats de protéines tels que la spectroscopie de RMN ou la cristallographie aux rayons X [5], différentes techniques analytiques peuvent être utilisées pour la caractérisation de l'agrégation des protéines [2].

III.2.1. La Fluorescence ThT (Thioflavine T)

La Fluorescence ThT (Thioflavine T) est une méthode simple utilisée et commune, des essais turbidométriques basés sur la mesure de la densité optique de l'échantillon dans la région UV / Vis, où les protéines ont une absorption négligeable. Bien que cette méthode puisse détecter la formation précoce de l'agrégation, les résultats de cette méthode montrent des variations de 30% et ne sont pas adaptés à la quantification précise des agrégats de protéines. La détection basée sur la fluorescence reste parmi les méthodes les plus employées pour caractériser l'état global des protéines au stade tardif de l'agrégation [5, 6]. L'approche est basée sur l'utilisation de colorants fluorescents intercalants tels que la thioflavine T (ThT) ou le Rouge Congo, dont les caractéristiques spectroscopiques de fluorescence changent en liaison non covalente aux feuilles β dans les agrégats de protéines.

III.2.2. Les techniques électrochimiques

Les techniques électrochimiques ont en outre démontré qu'elles étaient très efficaces dans la surveillance de l'agrégation des protéines [7], notamment en surveillant les premiers stades de la formation d'amyloïdes [8-10]. Des études volta- métriques permettant l'oxydation directe de protéines et de peptides tels que l' α -synucléine [11], A β -40 et A β -42 peptides [9], polypeptide amyloïde d'îlot humain [12] ou lysozyme [10], fournissent un moyen simple et pratique de surveiller l'agrégation des protéines. L'oxydation électrochimique directe des résidus de tyrosine / tryptophane peut être observée pour des solutions anciennes de protéines de lysozyme et sera utilisée pour la détermination du début de l'agrégation [10].

D'autres approches électrochimiques pour étudier l'agrégation des protéines impliquent la détection de l'évolution de l'hydrogène catalysée par des protéines ou des changements dans les caractéristiques de transfert de charge lors de l'adsorption des protéines en utilisant une analyse de la spectroscopie d'impédance [13].

III.3. Etude de l'agrégation des protéines sur les électrodes modifiées à base d'oxyde de graphène réduit poreux

Dans ce chapitre, nous étudions le potentiel d'interfaces d'une électrode modifiée par d'oxyde de graphène réduit poreux (prGO) pour la détection précoce de l'agrégation des protéines. L'oxyde de graphène réduit poreux [14] possède tous les avantages des rGO nanosheets microprocesseurs rGO pour la détection électrochimique tel que la surface active accrue et le transfert massique facilité, tous deux avantageux pour la détection sensible [15, 16]. Les architectures prGO sont utilisées pour la fabrication de dispositifs de stockage d'énergie à haute performance [17 -19] et plus récemment pour certaines applications sensibles [20-23].

III.3.1. Les trois protéines utilisées dans les tests électrochimiques d'agrégation

Trois protéines différentes, le lysozyme, l'insuline et la calcitonine, sont étudiées car les protéines amyloïdes de différentes compositions d'acides aminés partagent la tendance à déplier et agréger, en suivant des étapes communes d'agrégation.

➤ *Le lysozyme*

Le lysozyme, une protéine de 14,3 kDa présente dans de nombreux organismes, considéré comme un bio-marqueur pour plusieurs maladies graves, il est choisi car il s'agit d'un modèle largement utilisé d'agrégation de protéines de type amyloïde [10, 23].

➤ *L'Insuline*

L'agrégation de l'insuline, un polypeptide de 5,8 kDa composé de 51 résidus d'acides aminés, sécrétés par le pancréas, largement utilisés comme médicaments antidiabétiques peuvent constituer un problème dans les formulations thérapeutiques [24, 25], où les changements physiques accompagnés de l'agrégation de l'insuline entraînent une diminution de son activité biologique [26]. Nous avons donc étudié une formulation injectable d'insuline humaine à action rapide, Humulin R produite par une stratégie d'ADNr (Acide désoxyribonucléique ribosomique) recombinée) et utilisée pour le traitement du diabète.

➤ *La calcitonine*

La troisième molécule étudiée est la calcitonine, une hormone polypeptidique linéaire à 32 acides aminés, produite principalement par des cellules C de la thyroïde, agissant pour réduire les taux sanguins de calcium. La calcitonine est un bon exemple pour un peptide bioactif avec un potentiel pharmaceutique limité en raison d'une forte tendance à l'agrégat [27-29]. La calcitonine de saumon, moins propice à l'agrégation que la calcitonine humaine a été incluse dans diverses préparations pharmaceutiques telles que des pulvérisations nasales pour le

traitement de l'ostéoporose. Il fait également actuellement partie des solutions injectables de calcitonine destinées à être utilisées dans le traitement des maladies de la thyroïde.

III.3.2. Matériaux utilisés

L'hexacyanoferrate de potassium (II) ($[K_4Fe(CN)_6]$), le thioflavine T (ThT), l'hydrate d'hydrazine et les comprimés de tampon phosphate (PBS, 0,1 M) sont de Sigma-Aldrich, France. L'insuline humaine provient de Roche Diagnostics, Allemagne. La poudre d'oxyde de graphène (GO) est de Graphenia, Espagne. La solution d'insuline injectable, Humulin R (100 UI ml^{-1}) provient du Laboratoire pharmaceutique Lilly, France. Des solutions de stock de thioflavine T (500 μM) est préparées quotidiennement dans du PBS (0,1M, pH 7,4) et stockées à température ambiante dans le noir pour éviter toute photodégradation possible.

III.3.3. Synthèses de rGO et prGO

➤ L'oxyde de graphène réduit (rGO)

L'oxyde de graphène réduit (rGO) est préparé à partir du précurseur de GO en utilisant la réduction de l'hydrazine. À 5 ml de suspension aqueuse (0,5 mg / ml), on a ajouté de l'hydrate d'hydrazine (0,50 ml, 32,1 mM) et on l'a chauffé dans un bain d'huile à 100 ° C pendant 24 heures, sur lequel le GO réduit a progressivement précipité la solution. Le produit est isolé par filtration sur une membrane PVDF (Polyfluorure de vinylidène) avec une taille de pores de 0,45 μm , lavé abondamment avec de l'eau (5 x 20 ml) et du éthanol (5 x 20 ml) et séché dans un four à 100 ° C pendant la nuit [30].

➤ L'oxyde de graphène réduite poreux (prGO)

La synthèse de prGO est basée sur la dispersion de la poudre de rGO (100 mg) dans H_2O_2 (100 ml, 30%), par ultrasons pendant 30 minutes, puis à reflux pendant 12 h à 60 ° C. La solution obtenue est filtrée et la poudre de prGO, récupérée, est dialysée pour éliminer H_2O_2 et séparer du graphène de petite taille [19]. Les étapes de synthèse de l'oxyde de graphène réduite poreux (prGO) sont illustrées dans la figure III.2.

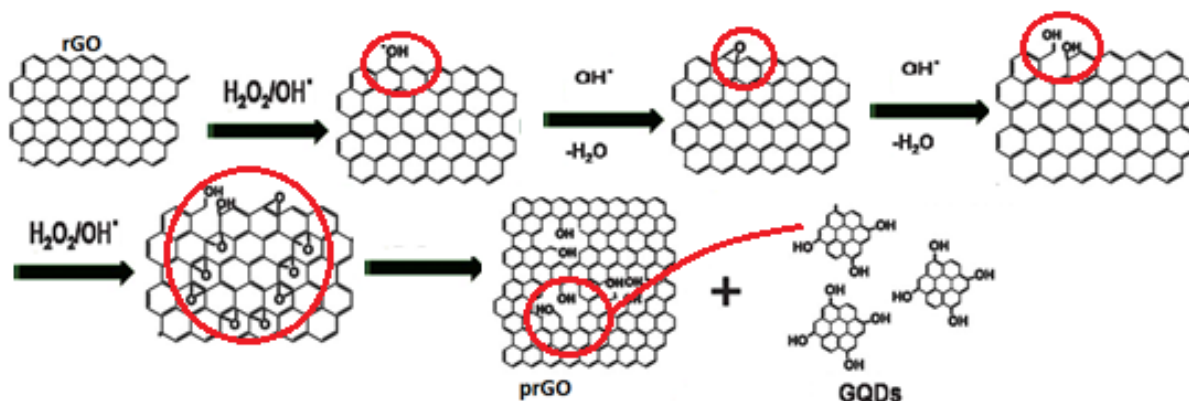


Figure III.2 : Etapes de synthèse de l'oxyde de graphène réduite poreux (prGO).

III.3.4. Préparation des électrodes de carbone vitreux modifiées par rGO et prGO (GC/rGO, GC/prGO)

Les électrodes en carbone vitreux (GC) polies avec la poudre d'alumine sont modifiées en déposant 5 μL d'une suspension de rGO ou de prGO (à une concentration de 1 mg/ml dans l'eau) et qu'on laisse sécher pendant 24 h dans un four à 60 ° C. Les électrodes GC / rGO ou GC / prGO formées sont immergées dans du PBS 0,1 M (pH 7,0) et cyclées 30 fois entre -1,5 V et +1,1 V à une vitesse de balayage de 0,1 V s^{-1} .

III.3.5. Agrégation des échantillons de protéines

➤ *Lysozyme*

Des solutions stockées de lysozyme (10 mg ml^{-1} ; 600 μM) dans du PBS (0,1 M, pH 7,4) sont préparées et stockées à -20 ° C pour empêcher l'agrégation. L'agrégation du lysozyme est effectuée en conservant le lysozyme (600 μM) dans du HCl (14 mM, pH 2 /NaCl (5 mg mL^{-1}) pendant 4 jours à 60 ° C au four (condition 1). En tant que témoin, l'agrégation dans les mêmes conditions, mais dans le PBS (0,1 M, pH 7,4) plutôt que au pH 2, est effectuée (condition 2) où aucune fibrillation amyloïde significative n'est attendue. Pour les mesures électrochimiques, la solution est diluée à 5 μM avec du PBS (0,1 M, pH 7,4) juste avant les mesures.

➤ *Insuline*

- L'insuline humaine (100 μM dans le tampon PBS pH 7,4) est agrégée en la gardant pendant 60 h à 60 ° C dans le four.
- La solution injectable d'insuline à l'humuline (3,4 mg mL^{-1} ; 0,586 mM) est maintenue jusqu'à 67 h à 60 ° C dans le four.

Pour les mesures électrochimiques, les solutions d'insuline et d'humuline sont diluées à 3 μM avec du PBS (0,1 M, pH 7,4) avant les mesures.

➤ *Calcitonine De Saumon*

La calcitonine de saumon (sCT, 0,59 mM) est maintenue, pendant 72 h à température ambiante, dans du tampon citrate (10 mM, pH 6). Avant les analyses, la solution est diluée à 15 μM avec PBS (0,1 M, pH 7,4) pour être dans la gamme linéaire de la courbe d'étalonnage du sCT.

III.3.6. Mesures de l'agrégation

➤ *Dosages à base de fluorescence*

Un volume de 380 μL de thioflavine T dans du PBS (10 mM, pH 7,4) est mélangé avec 20 μL de l'échantillon de protéines, est soumis à un vortex à court terme, puis la fluorescence est

mesurée avec un luminomètre Glomax 20/20 de Promega équipé d'un module bleu de fluorescence (Excitation 465 nm-485 nm, émission à 515-575 nm).

➤ ***Procédure de mesure électrochimique pour l'agrégation des protéines***

Pour les mesures électrochimiques de l'agrégation des protéines, les solutions de protéines différenciellement vieilles sont diluées jusqu'à la concentration finale avec du PBS (0,1 M, pH 7.4) juste avant les mesures, les électrodes sont adsorbées pendant 15 min dans ces solutions avant que la DPV ne soit mesurée. Les mesures électrochimiques sont effectuées avec un potentiostat / galvanostat (Autolab, Pays-Bas). Une configuration conventionnelle à trois électrodes est employée en utilisant un fil d'argent et une maille de platine comme électrodes de référence et auxiliaires, respectivement. Les voltamogrammes d'impulsion différentielle (DPV) sont enregistrés dans la plage de potentiel de -0,1 V à +1,5 V sous une amplitude de modulation de 5 mV avec un potentiel d'étape de 80 mV; Hauteur réglée 15 mV et temps de marche 250 ms.

III.4. Méthodes de Caractérisation

III.4.1. Microscopie électronique par transmission (TEM)

L'analyse par microscopie électronique par transmission (TEM) des échantillons est effectuée en dispersant 1 mg de matière dans 5 mL d'alcool isopropylique (IPA) et en déposant 5 μ L de la solution résultante sur une grille Cu de 200 mesh. La grille de Cu revêtue de matériaux est séchée dans des conditions ambiantes et imagée à l'aide d'un instrument FEI-TECNAI G2 F20 TEM fonctionnant à une tension accélérée de 200 kV ($C_s = 0,6$ mm, résolution 1,7 Å).

III.4.2. La Microscopie de Force Atomique (AFM)

La Microscopie de Force Atomique (AFM) est utilisée pour observer la nature filamenteuse ou amorphe des agrégats de protéines formés dans les expériences d'agrégation forcée. Et afin de réaliser les images AFM, des aliquotes de 20 μ L des solutions de protéines (diluées antérieurement à 50 μ g mL⁻¹) sont repérées sur des échantillons de mica fraîchement coupés. Les échantillons de mica sont ensuite séchés dans un dessiccateur aspiré, bien lavés avec de l'eau ultra pure et finalement séchés sous un courant d'azote. Un instrument NanoWizard II AFM (de JPK Instruments AG, Allemagne), des capteurs SPM parallèles Arrow (avec fréquence de résonance typique de 285 kHz et constante de force de 42 N / m, de Nano World AG, Suisse) et un mode de contact intermittent sont utilisés pour obtenir des

images AFM, des agrégats adsorbés, sur les échantillons de mica. Les données AFM obtenues sont nivelées par soustraction d'un niveau moyen et / ou corrigées par la médiane de hauteur correspondante.

III.5. Résultats et discussion

III.5.1. Développement d'interfaces de détection électrochimique pour l'agrégation des protéines

La figure III.3 affiche des images TEM d'oxyde de graphène réduit (rGO) avant et après le traitement avec du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à température de $60^\circ C$.

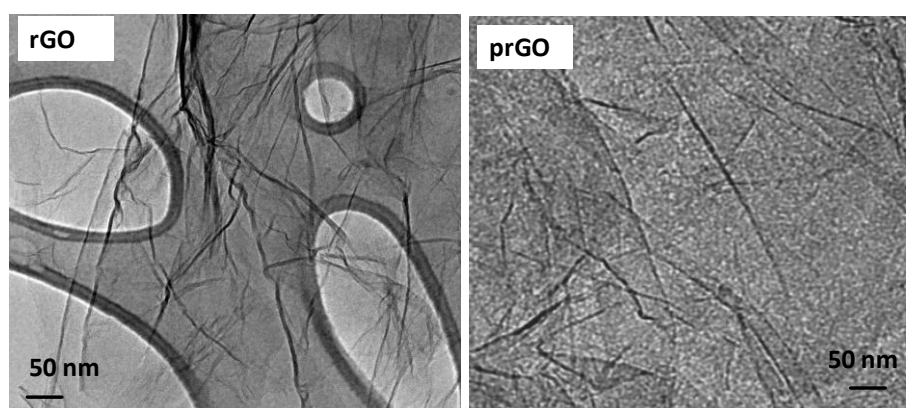


Figure III.3: Images de microscopie électronique par transmission (TEM) d'oxyde de graphène réduit (rGO) et d'oxyde de graphène réduit poreux (prGO).

La génération de radicaux libres oxydants conduit à la formation d'une quantité croissante de groupes époxy sur rGO, qui, lors de l'hydrolyse des groupes hydroxyle, entraîne une rupture ultérieure de C-C et la formation d'une matrice poreuse (prGO).

Le comportement électrochimique des électrodes GC modifiées avec les nanocomposites rGO ou prGO en utilisant $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ comme le couple redox, est illustré sur la Figure III.4.

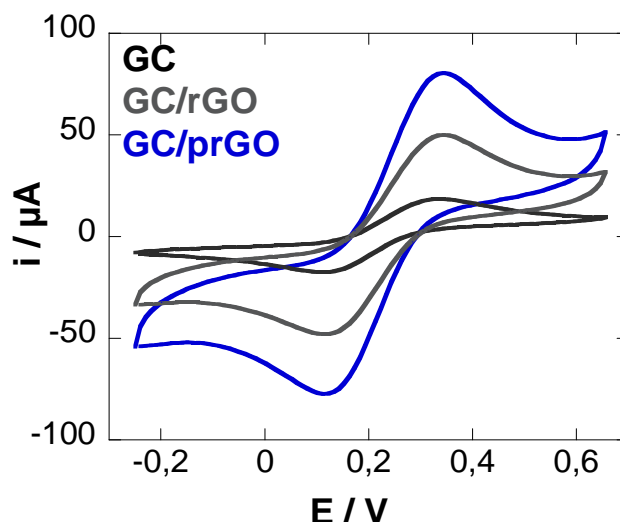


Figure III.4: Voltammogrammes cycliques enregistrés sur GC (noir), GC/rGO (gris) et GC/prGO (bleu) en utilisant $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (5 mM) / PBS (0,1 M), Vitesse de balayage = 50 mV s^{-1} .

L'électrode GC/prGO présente des intensités de courant accrues par rapport aux électrodes GC et GC/rGO. Les bonnes propriétés électroniques de l'électrode GC/prGO sont en corrélation avec les caractéristiques d'un matériau d'électrode supportant un transfert rapide d'électrons, avec une morphologie favorable (figure III.5).

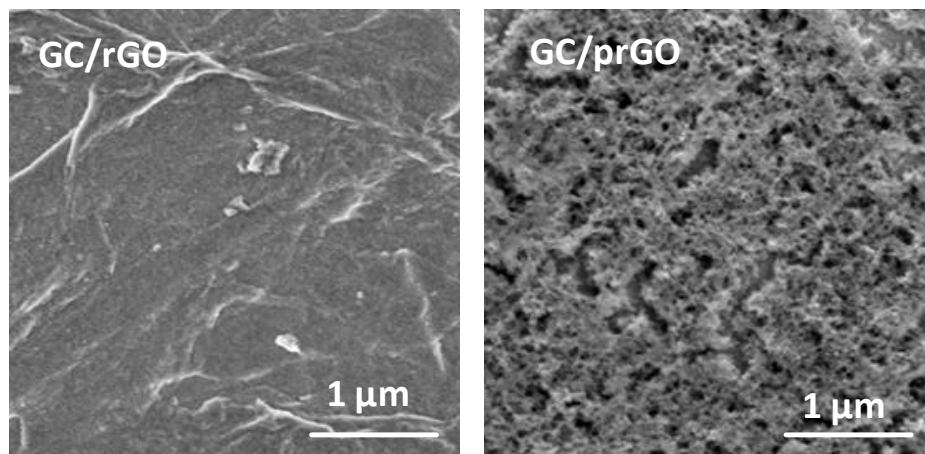


Figure III.5: Images SEM des électrodes GC / rGO et GC / prGO.

Alors que les électrodes revêtues de rGO présentent une morphologie bouclée avec des structures en forme de papier ridées fines, l'électrode de carbone vitreuse prGO modifiée présente une structure 3D poreuse conforme à l'image TEM (Figure III.3), ce qui entraîne une surface active globale plus élevée et par conséquent des courants redox plus élevés enregistrés.

III.5.2. Agrégation de lysozyme

Les différentes interfaces électriques (GC, GC / rGO et GC / prGO) sont comparées pour leur capacité à détecter les résidus de tyrosine et de tryptophane dans le lysozyme [10,31]. Le lysozyme contient 3 résidus tyrosine et 6 résidus tryptophane par molécule [32]. Cependant, l'oxydation de tyrosine et tryptophane est un processus de transfert à 2 électrons sur des électrodes graphitiques [33]. Comme on peut le voir sur la figure III.6, la nature poreuse, l'électroactivité élevée et la bonne conductivité de l'électrode GC / prGO sont corrélées à des densités de courant oxydatif plus grandes en comparaison des GC et GC / rGO.

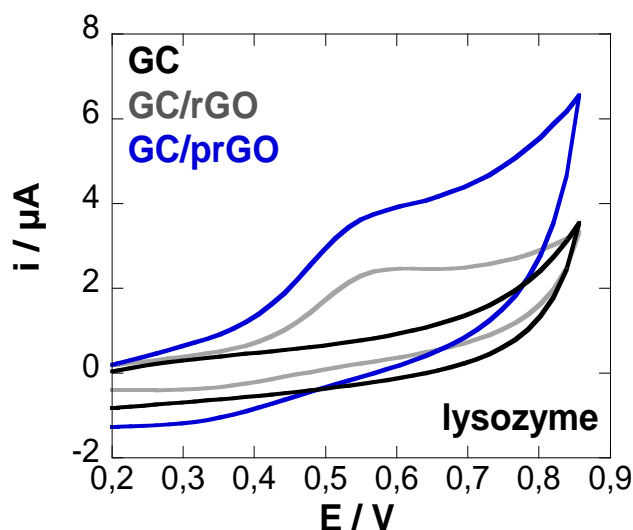


Figure III.6: Voltamogrammes cycliques enregistrés sur GC (noir), GC / rGO (gris) et GC / prGO (bleu) dans PBS (0,1 M, pH 7,4 en présence de lysozyme (5 µM), Vitesse de balayage = 50 mV s⁻¹.

L'oxydation de tyrosine ($E = 0,61$ V) et tryptophane ($E = 0,74$ V) sur les électrodes GC / prGO s'est révélée irréversible (pas de pic de réduction) comme sur d'autres interfaces à base de carbone [9] avec des potentiels de pic similaires (figure III.7). Une large bande redox des unités de tyrosine et tryptophane dans le lysozyme a été enregistrée sur des électrodes GC / prGO avec un courant maximal à $E = 0,64$ V (figure III.8).

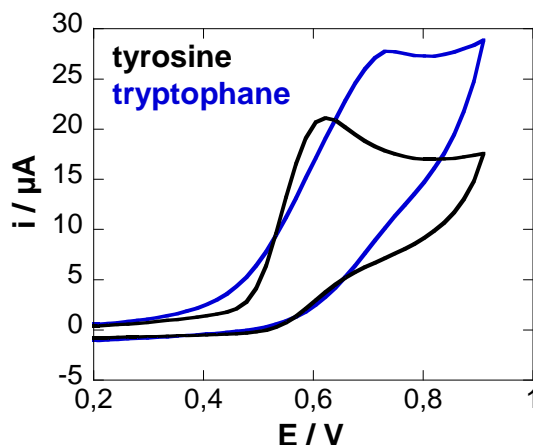


Figure III.7: Voltamogrammes cycliques de la tyrosine (1 mM, noir) et du tryptophane (1 mM, bleu) dans le PBS (0,1 M, pH = 7,4), vitesse de balayage = 50 mV s⁻¹, acquise avec l'électrode GC / prGO.

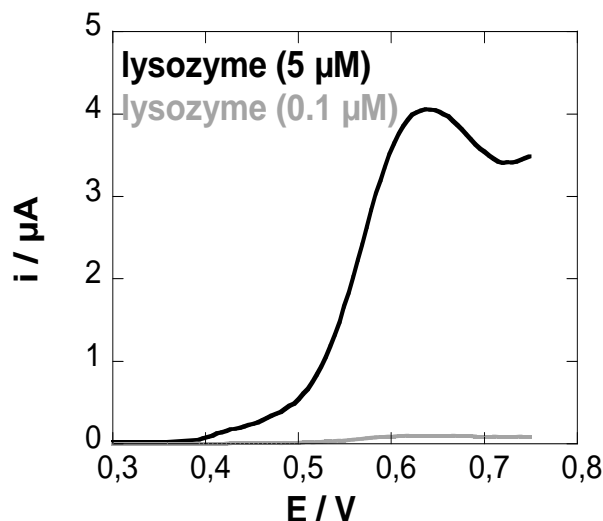


Figure III.8: Voltamogrammes d'impulsions différentielles de lysozyme (5 μM, 0,1 μM) dans du PBS (0,1M, pH 7,4) enregistrés avec des électrodes GC / prGO.

En utilisant la voltamétrie d'impulsion différentielle (DPV) sur les électrodes GC / prGO (Figure 8), une bande redox bien définie est observée linéairement sur une gamme entre 0.05 - 7.4 μM (correspondant à 0.7-107 μg mL⁻¹) concentration de lysozyme (Figure III. 9), avec un Coefficient de corrélation de 0,999 selon :

$$i (\mu A) = 0,0029 + 0,08 [\text{lysozyme}] (\mu M).$$

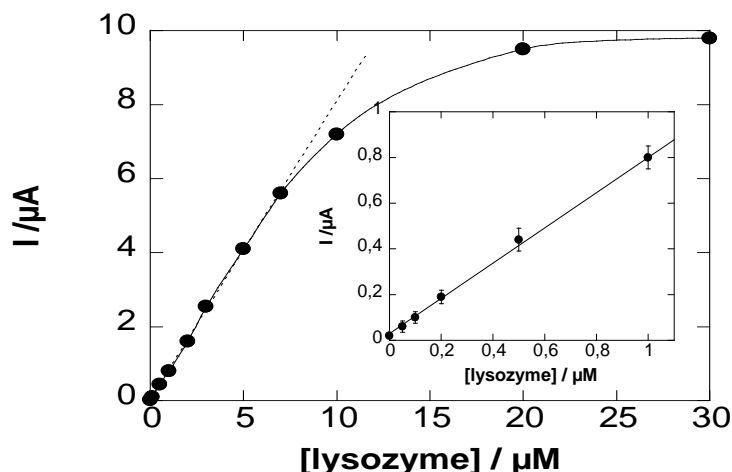


Figure III.9 : Changement de hauteur de crête en fonction des concentrations de lysozymes (insertion: zoom à des concentrations inférieures).

Une limite de détection de $0,05 \mu\text{M}$ est estimée à partir de cinq signaux de bruit de fond. La linéarité améliorée par rapport à la détection directe du lysozyme sur GCE, comme indiqué précédemment [10], montre l'intérêt de l'électrode GC / prGO d'étudier l'agrégation des protéines en suivant directement le signal électrochimique.

Sur la base des travaux précédents [10], l'agrégation de lysozymes à partir d'une solution acide (pH 2) contenant du lysozyme $50 \mu\text{M}$ ($723 \mu\text{g mL}^{-1}$) et une concentration en sel de NaCl 5 mg mL^{-1} peuvent être obtenues après chauffage à 60°C au four pendant 7 jours (condition 1). Nous avons également étudié l'agrégation dans les mêmes conditions, mais dans le PBS ($0,1 \text{ M}$, pH 7,4) (condition 2) plutôt qu'au pH 2. La figure III.10 montre l'évolution de la fluorescence de ThT, un colorant benzothiazole, sur l'état d'agrégation du lysozyme.

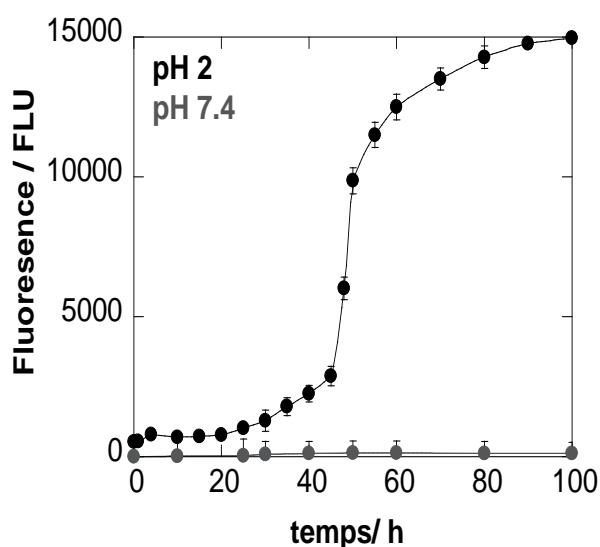


Figure III.10: Evolution de la fluorescence de la thioflavine T lors de l'incubation du lysozyme (10 mg mL^{-1}) à 60°C en présence de NaCl (5 mg mL^{-1}) à pH 2 (noir) et pH 7,4 (gris) ; Les barres d'erreur indiquent l'écart-type des mesures triplées ($n = 3$).

Il est bien établi que lorsque ThT se lie aux rainures de β -feuilles dans les fibrilles amyloïdes, son excitation maximale passe de 350 nm à 440 nm, une émission de fluorescence améliorée est observée à 490 nm.

- En utilisant la condition 1 pour l'agrégation du lysozyme, pendant les 25 premières heures, correspondant à la phase de retard dans la fluorescence ThT, aucune augmentation significative de la fluorescence n'est observée. Ensuite, la fluorescence augmente régulièrement en atteignant un plateau après environ 70 h.
- En revanche, à pH 7,4 (condition d'agrégation 2), aucune augmentation de la fluorescence n'est observée avec le temps, indiquant à priori l'absence d'agrégation de type amyloïde.

Visuellement, la décantation d'un agrégat amorphe blanc au fond du flacon a été observée simultanément avec une diminution de la concentration de protéine en solution telle que déterminée par des mesures d'absorbance à 280 nm (non représentées).

Les images de la Microscopie de Force Atomique (AFM) valident la formation d'agrégats amyloïdes lysozymes à pH 2 chauffés pendant 7 jours à 60 ° C (Figure III.11) par la présence de fibres longues.

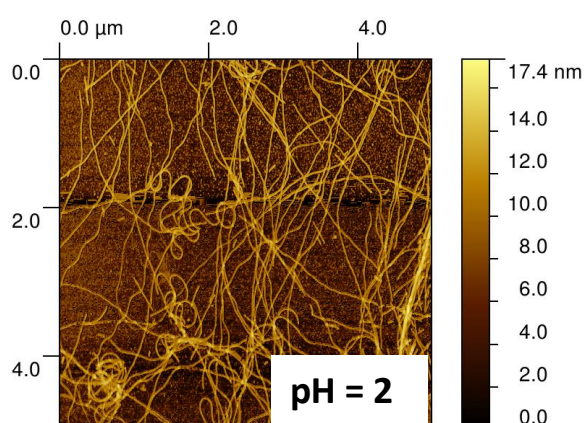


Figure III.11 : Les images AFM du mode contact des solutions de lysozyme sont conservées 3 jours à pH 2 et 60 ° C.

Par contre, à pH 7,4, aucune fibre n'est visualisée, conformément à une fluorescence ThT non modifiée au fil du temps (figure III.10).

Nos données confirment davantage la forte influence du pH sur l'agrégation du lysozyme, bien connu dans la littérature [34,35].

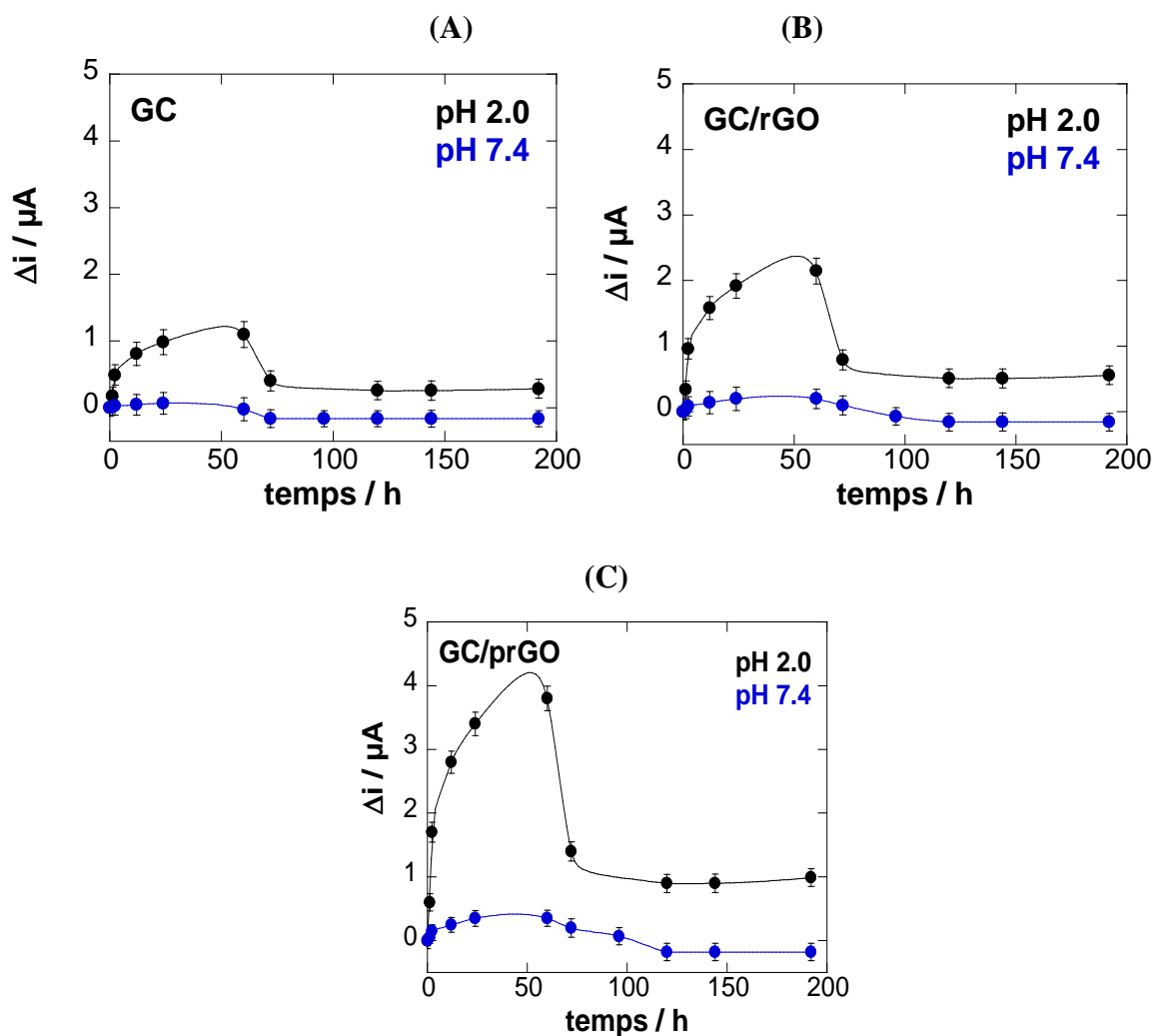


Figure 12: Evolution du courant d'oxydation avec différentes électrodes de lysozyme (10 mg mL^{-1}) dans 0,1 PBS (pH 7,4, bleu) et pH 2,0 (noir) lors de l'incubation à 60°C pendant plusieurs jours: (A) GC; (B) GC / rGO; (C) GC / prGO; Les barres d'erreur indiquent l'écart type des mesures triplées ($n = 3$). La solution a été diluée à $5 \mu\text{M}$ pour être dans la gamme linéaire de la courbe d'étalonnage (figure III.9).

La figure III.12 montre la variation du pic de courant sur les différentes électrodes (A) GC; (B) GC / rGO; (C) GC / prGO pour une solution concentrée de lysozyme (10 mg mL^{-1}) à pH 2 et 7,4 en présence de NaCl 5 mg mL^{-1} et après chauffage à 60°C pendant plusieurs jours.

On remarque que sur toutes les électrodes, pendant les 40 premières heures, le pic de courant a augmenté constamment, atteignant presque un plateau après 50 h. Cette augmentation est liée à l'exposition au solvant des résidus de tyrosine et de tryptophane intégrés au lysozyme natif lors des étapes initiales de l'agrégation du lysozyme, lorsque la protéine native se déploie. Par la suite, une baisse significative du courant maximal est enregistrée.

À mesure que les agrégats forment, les résidus électroactifs deviennent encore moins accessibles et le signal électrochimique diminue. Le GC / prGO a montré les signaux les plus prononcés et semble être le plus approprié pour une détection sensible de l'agrégation des protéines.

Dans une expérience de contrôle, les signaux électrochimiques lors de l'agrégation à pH 7,4 sont enregistrés. Après une petite augmentation du courant oxydatif, un plateau est atteint pendant les 60 premières minutes, puis le courant diminue. Cette condition n'incite pas à l'agrégation des protéines, validée par la différence dans la signature électrochimique, la décantation d'agrégats amorphes au bas du flacon entraîne des signaux de courant réduit.

III.5.3. Agrégation de l'insuline et des formulations pharmaceutiques d'insuline

III.5.3.1. Insuline humaine

Après le lysozyme, la possibilité d'utiliser GC / prGO pour la détection de l'agrégation des échantillons d'insuline humaine a été étudiée. L'insuline, un polypeptide de 5,8 kDa, il est composé de 51 résidus d'acides aminés et il est sécrétée par le pancréas, ce médicament est un antidiabétique largement utilisé. La formation de dépôts d'insuline amyloïde au site d'injection ou dans des formulations thérapeutiques entraîne une diminution de son activité biologique [26]. L'insuline humaine peut être directement oxydée sur l'électrode GC/prGO avec une bande d'oxydation se produisant à 0,65 V (Figure III.13) [36].

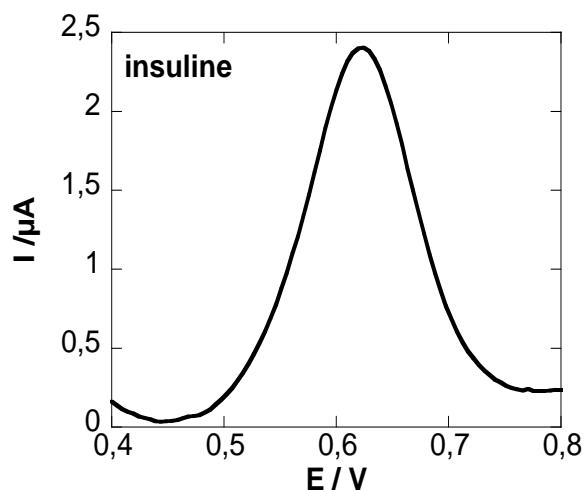


Figure III.13: Voltamogramme d'impulsion différentielle (DPV) de l'insuline (1 μ M dans PBS (0.1M, pH 7.4) sur GC / prGO.

La bande oxydante est censée être dû à l'oxydation des résidus de tyrosine dans l'insuline. L'électrode GC / prGO présente une corrélation linéaire entre le courant oxydant et la concentration d'insuline entre 0,1-8 μM (0,057-4,6 $\mu\text{g m}^{-1}$), avec un coefficient de corrélation de 0,999 selon :

$$i (\mu\text{A}) = 0,14 + 2,12 [\text{Insuline}] (\mu\text{M}) \quad [37]$$

Une limite de détection de 0,1 μM à partir de cinq signaux de bruit de fond (figures III.14).

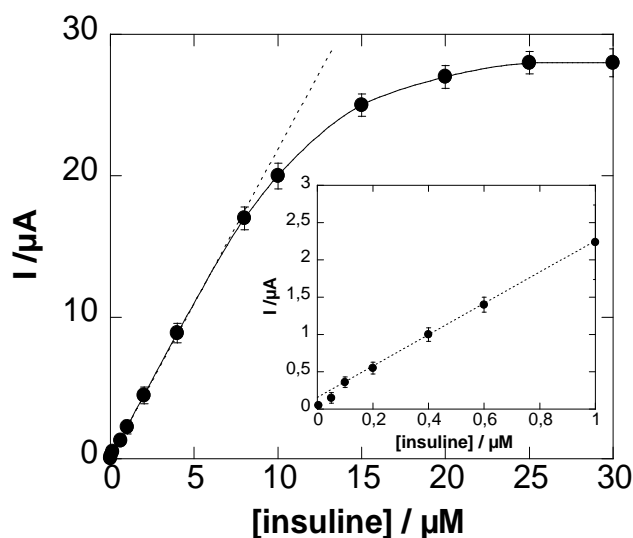


Figure III.14 : Courbe d'étalonnage pour l'insuline.

L'évolution de fluorescence de ThT sur l'insuline (100 μM dans PBS 0,1 M pH 7,4) vieillissant pendant 60 h à 60 ° C (Figure III.15(A)) et la variation du courant maximal électrochimique à 0,65 V (Figure III.15(B)) présentent des caractéristiques intéressantes.

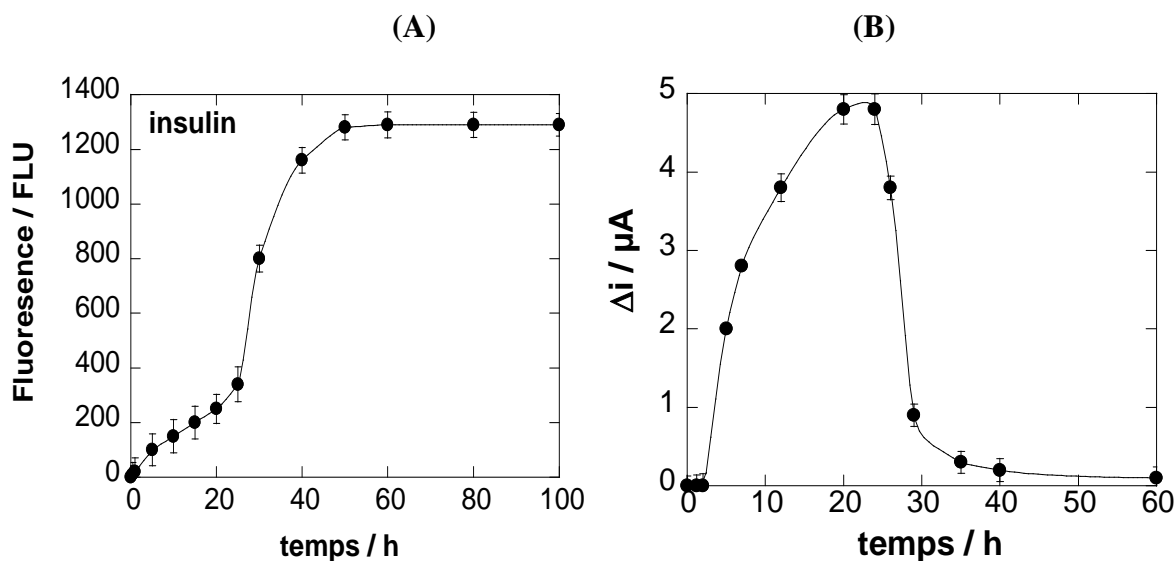


Figure III.15 : (A) Evolution de la fluorescence ThT et (B) évolution du courant maximal oxydatif à $E = 0,62 \text{ V}$, sur l'insuline (100 μM dans 0,1 PBS pH 7,4) incubation à 60 ° C. Les barres d'erreur indiquent l'écart type des mesures triplées ($n = 3$);

Dans le cas de la lecture électrochimique, après un temps de retard de 2 h, le courant d'oxydation a augmenté et a atteint un plateau dans les 20 h.

Le changement de courant reflète le modèle en deux étapes de l'agitation-induite par l'agrégation de l'insuline [26, 38].

Au début de l'agrégation, les interactions non-covalentes entre les molécules d'insuline monomères / dimères ont lieu. Cela se traduit par un changement négligeable dans les structures secondaires pendant les 2 premières heures et aucun changement significatif dans le signal électrochimique. Ensuite, les molécules d'insuline voisines commencent à interagir conduisant à un changement significatif dans le pli tertiaire, accompagné d'une augmentation du courant pour les 20 h suivantes, suivie d'une diminution abrupte du courant après 26 h. La formation d'un monomère partiellement plié en tant que précurseur pour les espèces agrégées menant, éventuellement, à la fibrillation de l'insuline [39].

Les monomères partiellement exposés auront plus de résidus hydrophobes exposés au solvant, par exemple Tyrosine électro-active; D'où l'augmentation du signal électrochimique dans les 20 premières heures. Au contraire, l'association des monomères en agrégats diminue l'exposition des résidus de tyrosine et leur accès à la surface de l'électrode. Dans le cas des mesures de fluorescence (Figure III.15(A)), le signal commence à augmenter significativement seulement après 20 h et atteint un plateau après environ 40 h. Les résultats sont cohérents avec la formation d'agrégats de protéines plus importants comme confirmé par les mesures AFM (Figure III.16).

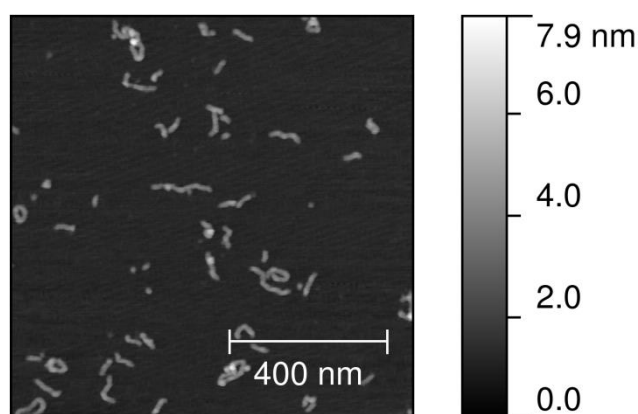


Figure III.16 : image AFM d'insuline agrégée (100 μM / 0,1 PBS pH 7,4) lors de l'incubation à 60 ° C pendant 60 h.

Des résultats similaires utilisant la fluorescence sont montrés par l'étude de Gong et al, l'agrégation de 100 μM d'insuline à 65 ° C [25], et Malik et al. , Utilisant une insuline à 86 μM exempte de Zn secouée dans un incubateur à 37 ° C à 300 tr / min [26].

6.3.2. L'insuline humaine: une formulation pharmaceutique

Pour voir si la méthode est applicable à des formulations pharmaceutiques réelles, la solution d'insuline injectable Humuline ($3,4 \text{ mg mL}^{-1}$; $0,586 \text{ mM}$) est vieillie de la même manière et la fluorescence (figure III.17) et les données électrochimiques (figure 18) ont été enregistrées. Le développement d'une insuline pharmaceutique stable est mis au point par la formation de produits de haut poids moléculaire, définis comme des impuretés supérieures au monomère d'insuline [37], soupçonnés de promouvoir des réponses immunogènes chez les patients.

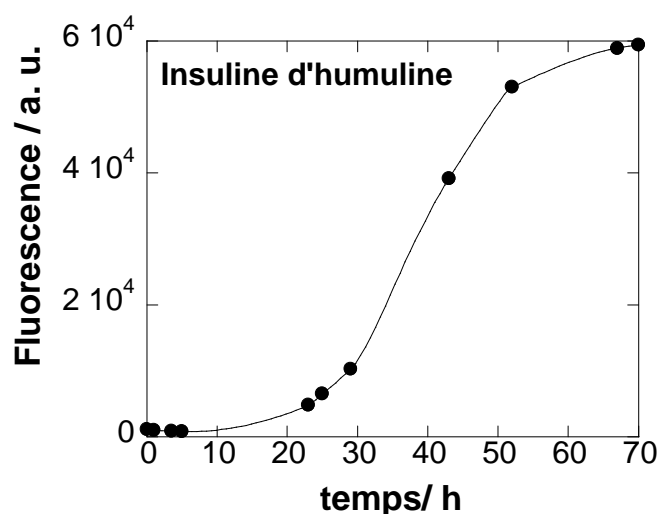


Figure III.17 : Evolution de la fluorescence de ThT lors de l'incubation de l'insuline d'humuline ($3,4 \text{ mg mL}^{-1}$) à 60°C pendant 60 h; Les barres d'erreur indiquent l'écart type des mesures en triplicat ($n = 3$),

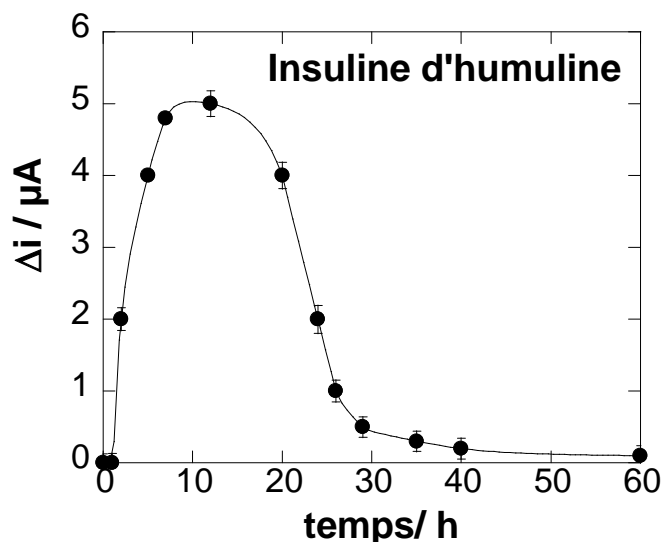


Figure III.18 : Evolution du courant maximal oxydatif déterminé à $E = 0,62 \text{ V}$ après le vieillissement de l'insuline Humuline.

Après un délai de 2h, le signal électrochimique de la formulation d'insuline Humuline vieillissante augmente et atteint un maximum après 15 h, puis diminue avec le temps (Figure III.18). Les mesures de fluorescence (figure II.17) montrent l'apparition d'une fluorescence accrue seulement à 15h, le point de temps qui correspond au signal électrochimique maximum. Dans le produit pharmaceutique, l'insuline existe sous la forme d'un hexamère stabilisé par des ions Zn^{2+} contenus dans la formulation [26]. La formation de monomère d'insuline à partir de l'hexamère et son déploiement partiel ultérieur explique le signal électrochimique augmenté, c'est-à-dire en raison d'un nombre accru de résidus de tyrosine exposés au solvant. L'association des unités d'insuline monomère conduit à une augmentation de la teneur en β -feuilles et des opportunités plus contraignantes pour ThT, expliquant l'augmentation de la fluorescence après 20 h. Le signal électrochimique a une tendance inverse, en diminuant après 20 h, car certains des résidus d'acides aminés électro-actifs sont "enterrés", et ne sont plus disponibles pour l'oxydation électrochimique en raison de l'association des monomères.

L'Humuline fraîche est une solution claire dont l'analyse par HPLC ne présente aucun complexe de dimère détectable ou de poids moléculaire élevé (Figure III.19), également validé par un signal de fluorescence faible de ThT.

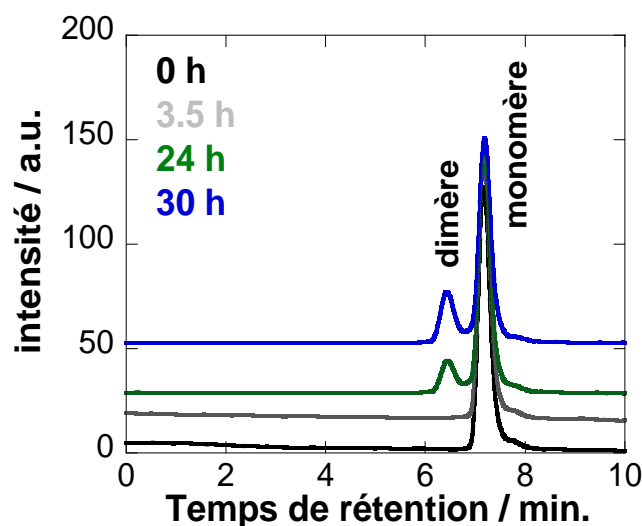


Figure III.19: mesures HPLC d'humuline fraîche (solution injectable à l'insuline, $3,4 \text{ mg ml}^{-1}$) ($t = 0\text{h}$) et après 3,5, 24 et 30 h à 60°C .

D'après les mesures par HPLC, la formation de dimères est clairement identifiée après 24 heures de vieillissement (Figure III.19) validant l'essai électrochimique développé durant cette expérience.

III.5.4. Agrégation de la calcitonine (*Calcitonine De Saumon*)

La calcitonine au saumon est un peptide bioactif prescrit dans diverses formulations pharmaceutiques (spray nasal, solutions injectables) pour le traitement de l'ostéoporose (jusqu'en 2014) et diverses affections thyroïdiennes. Bien que son agrégation soit beaucoup plus lente que la calcitonine humaine, le potentiel du sCT pour former des agrégats cytotoxiques et des fibrilles amyloïdes et pour susciter une réponse immunogène chez les patients demeure important [28,27].

L'analyse par DPV de la matière première du sCT montre un pic d'oxydation à 0,58 V attribué à l'oxydation du résidu de tyrosine dans la calcitonine et une onde non bien définie à 1,12 V (figure III.20).

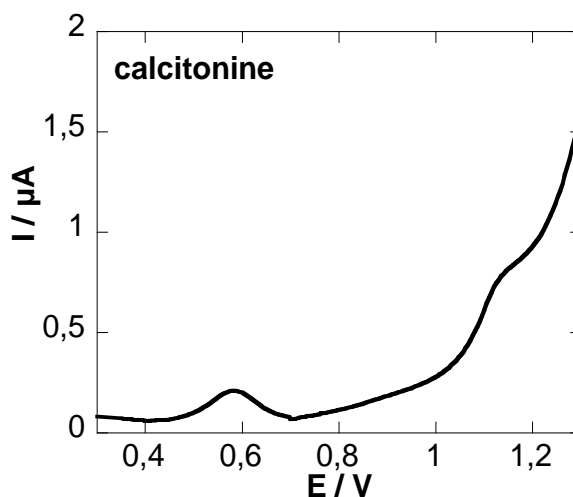


Figure III.20: Voltammogrammes d'impulsion différentielle de sCT ($40 \mu\text{g ml}^{-1}$) dans du PBS (0,1 M, pH 7,4).

La bande à 0,58 V évolue linéairement avec la concentration de sCT (Figure III.21) jusqu'à $33 \mu\text{M}$ avec un coefficient de corrélation de 0,999 selon

$$i (\mu\text{A}) = 0,10 + 0,02 \times [\text{calcitonine}] (\mu\text{M}),$$

Une limite de détection de $0,2 \mu\text{M}$ à partir de cinq signaux de bruit de fond.

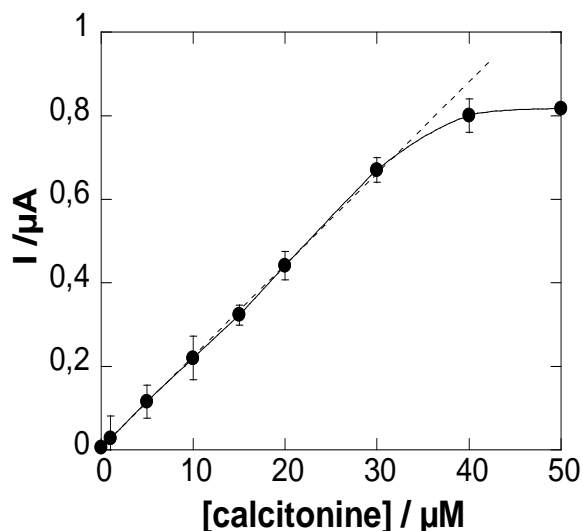


Figure III.21: Courbe d'étalonnage pour sCT (insertion: zoom à des concentrations inférieures);

Le processus de vieillissement du sCT (2 mg mL^{-1}) dans du tampon citrate 10 mM ($\text{pH } 7$) à température ambiante est suivi par la fluorescence ThT (Figure III.22(A)), l'électrochimie (figures III.22 (B)) et l'analyse AFM (figure III.23).

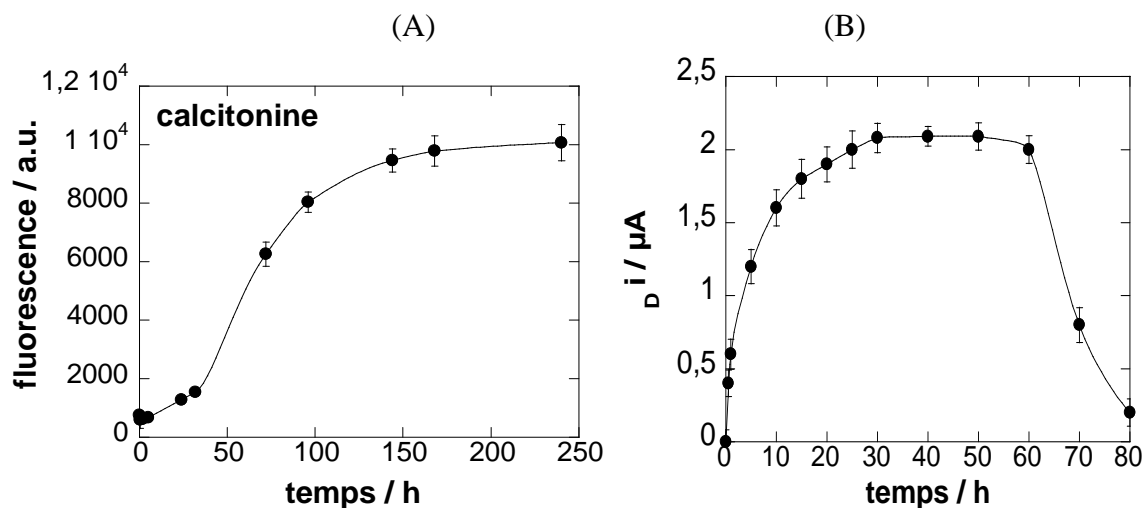


Figure III.22: (A) Variation de l'intensité de fluorescence de ThT et (B) évolution du courant de pic oxydatif ($E = 0,58 \text{ V}$) de calcitonine ($0,59 \text{ mM}$) dans un tampon citrate (10 mM , $\text{pH } 6$) maintenu à température ambiante. La solution a été diluée à $15 \text{ } \mu\text{M}$ avec PBS ($0,1 \text{ M}$, $\text{Ph } 7.4$) pour être dans la gamme linéaire de la courbe d'étalonnage.

La Microscopie de Force Atomique (AFM) montre une fibrillation (agrégation) amyloïde nettement significative après 72h (figure III.23). Nous avons analysé les diamètres

de ce qui semblait être des fibrilles / protofibrilles simples de calcitonine, de lysozyme et d'insuline provenant des différentes images AFM (plus de 40 fibrilles / protofibrilles provenant de 4 images AFM différentes pour chacune des protéines).

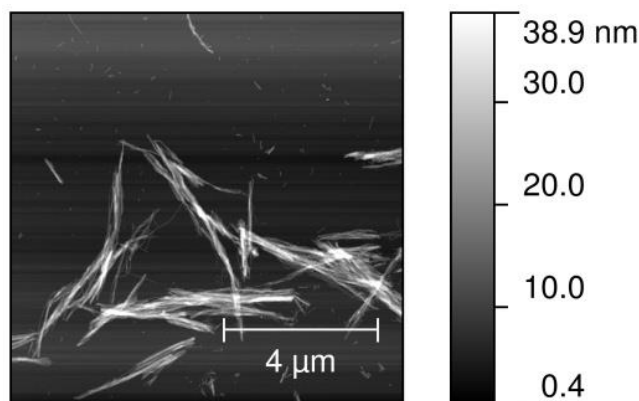


Figure III.23: Photos de la Microscopie de Force Atomique (AFM) des fibrilles amyloïdes sCT formées après 3 jours à température ambiante.

Les diamètres ont été estimés à partir de la hauteur de la fibrille (car les mesures AFM verticales sont exemptes des effets de convolution associés aux mesures AFM latérales). Le diamètre moyen d'une seule fibrille de calcitonine, de lysozyme et d'insuline est respectivement de $5,8 \pm 1,4$ nm, $2,2 \pm 0,8$ nm et $2,8 \pm 0,3$ nm (figure III.24).

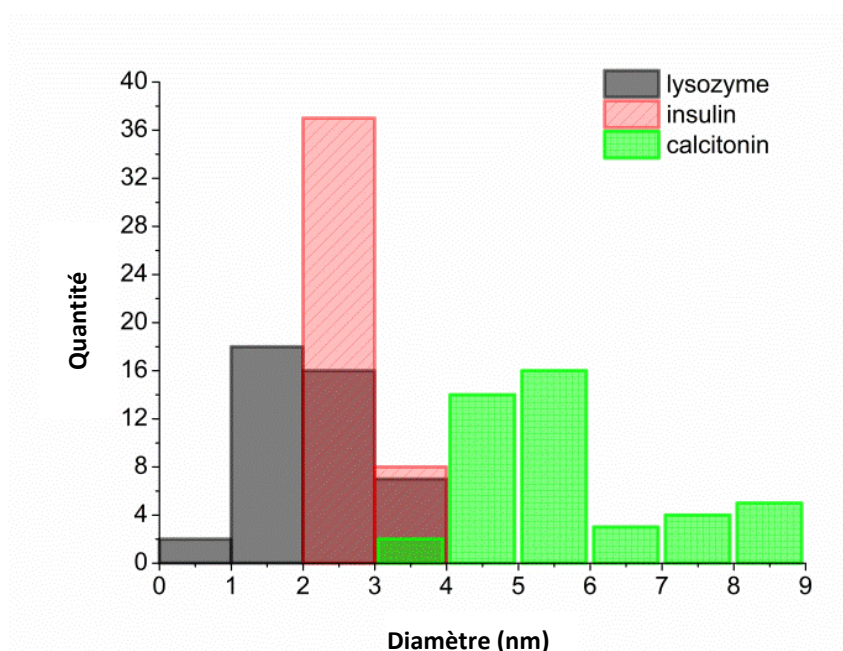


Figure III.24 : Diamètres des fibrilles de protéines de lysozyme, insuline et calcitonine mesurées par AFM. La large distribution des diamètres provient de l'hétérogénéité structurale dans les fibrilles.

Le plus grand diamètre des fibrilles de calcitonine présente une distribution plus large par rapport aux autres protéines, tandis que les fibrilles d'insuline sont caractérisées par une distribution très étroite. Le plus grand diamètre des fibrilles de calcitonine explique l'aspect plus rigide de ces fibrilles par rapport à celles produites par le lysozyme et l'insuline. En plus de cet aspect rigide, les fibrilles de calcitonine tendent également à s'associer latéralement les unes aux autres et à former des structures de type ruban (tandis que les fibrilles de lysozyme ont tendance à former des structures difformes).

Conclusions

Dans une tentative de développer une méthode alternative pour détecter l'apparition de l'agrégation des protéines dans les produits pharmaceutiques, nous avons utilisé des électrodes de carbone vitreuses modifiées avec de l'oxyde de graphène réduit poreux, permettant l'identification électrochimique de protéines et de peptides pharmaceutiques électroactifs tels que le lysozyme, l'insuline ainsi que la calcitonine. Nous avons pu démontrer que les électrodes GC / prGO présentent des signatures électrochimiques bien définies de ces protéines, attribuées à la tyrosine dans l'insuline / calcitonine et la tyrosine et le tryptophane dans le lysozyme, qui peut être utilisée pour l'identification des processus d'agrégation par simple suite à la modification du pic de courant oxydatif avec le temps. Par rapport aux mesures de fluorescence ThT, l'analyse électrochimique est particulièrement efficace pour identifier le stade précoce de l'agrégation des protéines, en raison de changements de conformation dans les protéines, ce qui permet d'exposer plus de leurs espèces électroactives (tyrosine, tryptophane, cystéine, etc.) en solution. Cette approche a été validée sur un produit pharmaceutique: solution d'insuline injectable Humulin. Alors qu'une solution fraîche ne contient pas d'agrégats de protéines, les formulations d'insuline soumises à une dégradation forcée par chauffage ont montré une formation de grands agrégats.

Références bibliographiques

1. K. Turoverov, I. M. Kuznetsova and V. N. Uversky, *Prog Biophys Mol Biol.* , 102, 73-84p (2010).
2. W. Wang, *Int. J. Pharmaceutics*, 289, 1-30p (2005).
3. Edward H. Koo, Peter T. Lansbury, Jr., and Jeffery W. Kelly, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 96, pp. 9989 -9990p (1999).
4. F. R. Brennan, L. Dill Morton, S. Spindeldreher, A. Kiessling, R. Allenspach, A. Hey, P. Y. Muller, W. Frings and J. Sims, *MAbs*, 2, 233-255p (2010).

5. D. Ami, A. Natalello, M. Lotti and S. M. Doglia, *Microbial Cell Factories*, 12, 12-17p (2013).
6. A. Espargaro, R. Sabate and S. Ventura, *Mol Biosyst.*, 8, 2839-2844p (2012).
7. E. Palecek, J. Tkac, M. Bartosik, T. Bertok, V. Ostatna and J. Palecek, *Chem Rev*, 115, 2045-2108p (2015).
8. A. J. Velosco, V. W. S. Hung, G. Sindhu, S. Costantinof and K. Kerman, *Anal. Chem.*, 81, 9410-9415p (2009).
9. M. Vestergaad, K. Kerman, M. Saito, N. Nagatani, Y. Takamura and E. Tamiya, *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 11892-11893p (2005).
10. A. Vasilescu, S. Gaspar, I. Mihai, A. Tache and S. C. Litescu, *Analyst*, 138, 3530-3537p (2013).
11. M. Masařík, A. Stobiecka, R. Kizek, F. Jelen, Z. Pechan, W. Hoyer, T. M. Jovin, V. Subramaniam and E. Paleček, *Electroanalysis*, 16, 1172-1181p (2004).
12. N. Zhou, Z. Chen, D. Zhang and G. Li, *Sensors*, 8, 5987-5995p (2008).
13. A. Veloso and K. Kerman, *Anal. Bioanal. Chem.*, 405, 5725-5741p (2013).
14. L. Jiang and Z. Fan, *Nanoscale*, 6, 1922-1945p (2014).
15. D. Chen, H. Feng and J. Li, *Chem. Rev.*, 112, 6027-6053p (2012).
16. S. Wu, Q. He, C. Tan, Y. Wang and H. Zhang, *Small*, 9, 1160-1172p (2013).
17. S. Han, D. Wu, S. Li, F. Zhang and X. Feng, *Adv. Mater.*, 26, 849-864p (2014).
18. L. Ren, K. N. Hui, K. S. Hui, Y. Liu, X. Qi, J. Zhong, Y. Du and J. Yang, *Sci. Rep.*, 5, 14229p (2015).
19. S. K. Singh, V. M. Dhavale, R. Boukherroub, S. Kurungot and S. Szunerits, *App. Mater. Today*, 8, 141-149p (2017).
20. G. Li, H. Huo and C. Xu, *J. Mater. Chem. A*, 2015, 3, 4922-4930.
21. T. H. Han, Y. K. Huang, A. T. Tan, V. P. Dravid and J. Huang, *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 15264-15267p (2011).
22. H. Maaoui, S. K. Singh, F. Teodoresu, Y. Coffinier, A. Barras, R. Chtourou, S. Kurungot, S. Szunerits and R. Boukherroub, *Electrochim. Acta*, 224, 346-354p (2017).
23. A. Vasilescu, Q. Wang, M. Li, R. Boukherroub and S. Szunerits, *Chemosensors*, 4(2), 10 (2016).
24. S. Okamura, Y. Hayashino, S. Kore-Eda and S. Tsujii, *Diabetes Care*, 36, E200-E200 (2013).

25. H. Gong, Z. He, A. Peng, X. Zhang, B. Cheng, Y. Sun, L. Zheng and K. Huang, *Sci. Rep.*, 4, 5648 (2014).
26. R. Malik and I. Roy, *Int. J. Pharmaceutics*, 413, 73-80p (2011).
27. M. Diociaiuti, M. C. Gaudiano and F. Malchiodi-Albedi, *Int. J. Mol. Sci.*, 12, 9277-9295 p (2011).
28. S. B. Fowler, S. Poon, R. Muff, F. Chiti, C. M. Dobson and J. Zurdo, *PNAS*, 102, 10105-10110p (2005).
29. C. Guo, L. Ma, Y. Zhao, A. Peng, B. Cheng, Q. Zhou, L. Zheng and K. Huan, *Sci. Rep.*, 5, 3556 (2015).
30. S. Stankovich, D.A. Dikin, R.D. Piner, K.A. Kohlhaas, A. Kleinhammes, Y. Jia, Y.Wu, S.T. Nguyen, R.S. Ruoff, *Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide*, *Carbon* 45, 1558p (2007).
31. V. Brabec, I. Schinlderova, E, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 8, 451(1981).
32. E.V. Suprun, M.S. Zharkova, G.E. Morozevich, A.V. Veselovsky, V.V. Shumyantseva, A.I. Archakov, , *Electroanalysis* 25, 2109-2116p (2013).
33. V. Barbec, V. Mornstein, , *Biophys. Chem.* 12, 159p (1980).
34. D. T. Tran, K. P. F. Janssen, J. Pollet, E. Lammertyn, J. Anne, A. Van Schepdael and J. Lammertyn, *Molecules.*,15, 1127p(2010) .
35. A. S. R. Potty, K. Kourentzi, H. Fang, P. Schuck and R. C. Willson, *Int. J. Biol. Macromol.* , 48 (3), 92p (2011).
36. W. Zong, R. Liu, F. sun, M. Wang, P. Zhang, Y. Liu and Y. Tian, *Prot. Sci.*, 19, 263-268p (2012).
37. Council, of, Europe., European, Directorate, for, the, Quality, of, Medicines and &HealthCare, *European Pharmacopoeia*. Strasbourg:, 5299 (2015).
38. C. F. Hjorth, M. Norrman, P.-O. Wahlund, A. J. Benie, B. O. Petersen, C. M. Jessen, T. A. Pedersen, K. Vestergaard, D. B. Steensgaard, J. S. Pedersen, H. Naver, F. Hubalek, C. Poulsen and D. Otzen, *J. Pharmaceutical Sci.*, 105, 1376-1386p (2016).
39. L. Nielsen, S. Frokjaer, J. Brange, V. N. Uversky and A. L. Fink, *Biochemistry*, 40, 8397-8409p (2011).

Chapitre IV :
Administration
photothermique de l'ODS

Introduction

Dans ce chapitre, nous étudions, la possibilité qu'un patch de peau transdermique, obtenu par imprégnation de rGO nano-feuilles avec l'ondansetron (ODS), en tant que médicament modèle, déposé sur une interface polyimide (PI) flexible, le Kapton, puisse fournir des produits thérapeutiques à travers la peau à la demande en utilisant la lumière proche infrarouge PIR.

IV.1. Historique de la délivrance photothermique des médicaments

Les réalisations récentes en matière de science des matériaux et de nanotechnologies ont conduit au développement de divers matériaux adaptés en tant que supports de médicaments et de thérapeutiques [1-9]. En particulier, les matériaux à base de graphène qui ont suscité beaucoup d'intérêt dans ce domaine en raison de leur capacité de chargement élevée [3,10-16]. Par exemple, le taux de charge (rapport pondéral du médicament chargé sur le support) d'oxyde de graphène (GO) par le chlorhydrate de doxorubicine, un médicament anticancéreux, pourrait atteindre jusqu'à 200%, beaucoup plus élevé que celui des autres nano-feuilles tels que les nanoparticules avec un taux de chargement Inférieur à 100% [13].

Divers stimuli externes ont été utilisés pour initier la libération de médicament à partir de matrices à base de graphène, notamment le pH [13, 14, 17], le contrôle électrique [18], le contrôle électrochimique [10,11,19] et la lumière [15,20]. Pour la libération, à la demande, de médicaments ayant une résolution spatiale et temporelle élevée, la stimulation de la lumière s'est révélée être une approche efficace. De tels systèmes de distribution de médicaments photo-contrôlés sont souvent basés sur des photoréactions induites par la lumière, qui déclenchent la libération de médicament des nano-feuilles [6, 21, 22]. Dans le cas des plateformes de livraison de médicaments à base de graphène, les effets photothermiques déclenchés par la lumière du PIR sont avant tout utilisés pour entraîner la libération des agents thérapeutiques [15, 20, 23]. L'efficacité du graphène en tant qu'agent photothermique absorbe le rayonnement du PIR par rapport à d'autres allotropes de carbone est renforcée par la conversion rapide de la lumière de l'oxyde de graphène réduit (rGO) sous irradiation PIR à faible puissance [24]. La fabrication aisée de dispositifs de pointe laser PIR et la transparence des tissus dans la région PIR rendent ces approches de livraison modifiables en fonction des paramètres cliniques [25].

En outre un rapport récent de Matteini et al., où les films photothermiques composés de dispersion de nano-feuilles rGO chargées de doxorubicine dans des plates-formes de chitosane ont été proposés comme systèmes de libération [20], la photoablation de tumeurs par absorption cellulaire de nanomatériaux à base de graphène est largement étudiée [16,26]. Cependant, les patches collés sur la peau, capables de la libération transcutanée contrôlée des principes actifs par activation thermique, pourraient constituer une solution unique pour la libération contrôlée de principes actifs sur des périodes à long terme. Cela pourrait représenter une technologie biomédicale prometteuse pour le traitement de certains types de maladies comme le cancer, le diabète et la douleur chronique.

IV.2. Les systèmes thérapeutiques transdermiques ou patches transdermiques

Le développement d'un patch cutané transdermique chargé de médicaments, où les produits thérapeutiques intégrés peuvent être libérés à la demande à l'aide d'un déclencheur photothermique, est présenté (Figure IV.1.). Les systèmes thérapeutiques transdermiques, connus sous le nom de patches transdermiques, sont des systèmes qui délivrent une quantité efficace de médicaments à la circulation systémique via la peau [27-30].

Par rapport aux systèmes oraux, ils ont l'avantage de surmonter le métabolisme du premier passage des médicaments dans l'intestin et le foie, l'amélioration de la conformité du patient et la réduction des effets secondaires. Les systèmes thérapeutiques transdermiques se sont révélés d'une grande utilité thérapeutique. Cependant, il existe plusieurs facteurs qui rendent la transmission transdermique de divers médicaments un problème difficile. Les caractéristiques structurelles uniques *du stratum corneum*, la couche la plus externe de la peau, ne permettent que des lipophiles à faible poids moléculaire (<500 Da) de pénétrer par diffusion passive [31]. Plusieurs méthodes ont été testées pour améliorer la perméabilité du *stratum-corneum*. La conception de formulations chimiques, avec des activateurs chimiques de la peau, tel que les solvants et les tensioactifs, ainsi que la synthèse de co-médicaments adaptés aux thérapies pour perturber la structure du *stratum-corneum* ont été proposées [32-34].

D'autre part, les techniques physiques, y compris les approches mécaniques et thermiques, ont été étudiées pour générer des perturbations micrométriques dans la structure du *stratum-corneum*. L'utilisation de *micro-aiguilles* remplies de médicaments est l'une des stratégies indolores pour percer le *stratum-corneum* et améliorer l'injection des médicaments [10, 29, 35]. La transmission de médicament transdermique par ablation améliorée au laser, utilisant des longueurs d'onde de CO₂ et des lasers Er: YAG à 10,600 nm et 2940 nm ont été étudiées pour chauffer la peau à des centaines de degrés pendant une très courte période afin de perturber la structure du *stratum-corneum* [36, 37].

D'autres études ont montré que la chaleur peut être utilisée comme un déclencheur externe pour augmenter la perméabilité de la peau et améliorer en plus la perméabilité des vaisseaux sanguins, facilitant ainsi la transmission de médicament transdermique [38, 39]. La libération de médicament dépendante de la température par un effet hyperthermique est également l'une des approches utilisées pour déclencher une libération efficace de médicament à partir de nanomatériaux de graphène [15, 20, 23].

IV.4. Critique de choix du médicament ODS dans les essais

Les étapes de la méthode de libération photothermique d'un médicament à partir du patch cutané sont expliquées dans la figure IV.1. La lumière PIR provoque une faible absorption tissulaire et un effet thermique minimal [40]. L'ODS, un antagoniste sélectif du récepteur 5-HT₃ utilisé dans le traitement des nausées et des vomissements liés à la chimiothérapie anticancéreuse [41], est choisi comme médicament modèle. L'ODS semble être un agent transdermique bien adapté [28,42].

Comme la distribution transdermique passive de l'ODS est très faible, les agents améliorant la peau sont normalement ajoutés aux formulations de l'ODS pharmaceutiques pour permettre la pénétration du médicament ODS à travers la peau [43-45]. Ce qui nous a motivés à utiliser ce médicament pour le chargement du patch cutané élaboré, puis à étudier l'efficacité de la délivrance d'ODS à travers la peau lors de l'irradiation du patch par des ondes PIR.

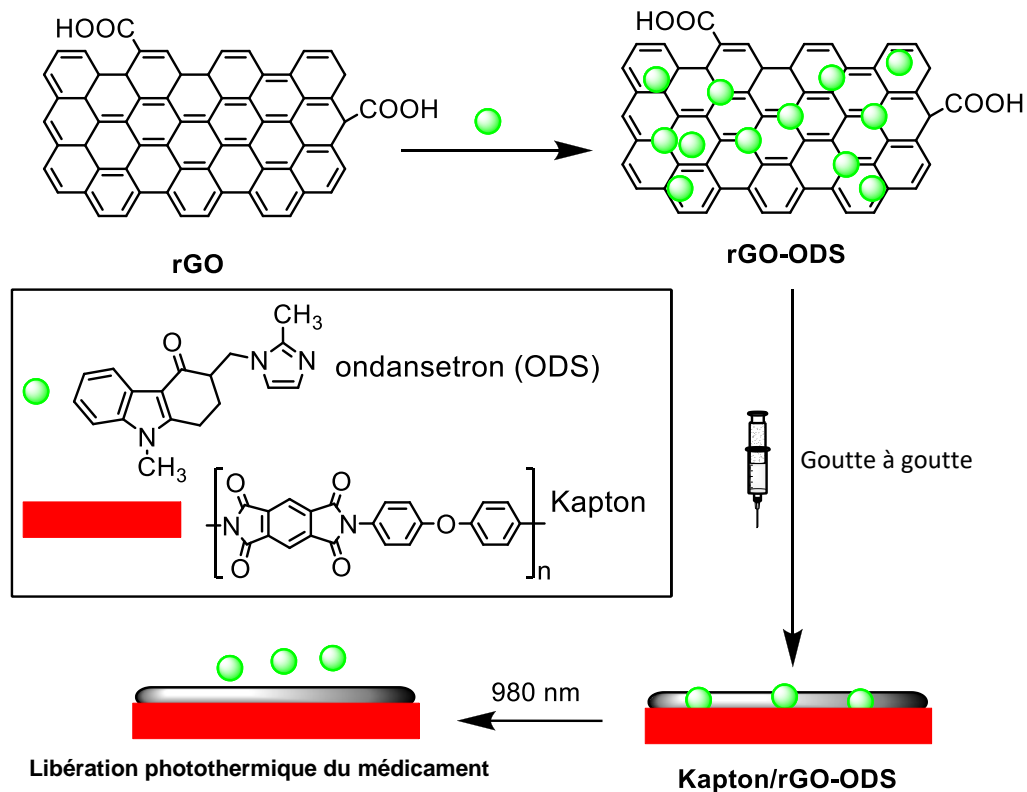


Figure IV.1. Illustration schématique de la fabrication d'un Patch cutané, un dispositif photoactif flexible basé sur le rGO chargé d'ODS déposé sur le Kapton.

IV.5. Section expérimentale

IV.5.1. Matériaux utilisés

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'acide sulfurique (H_2SO_4), l'hydroxyde de sodium (NaOH), le diméthylsulfoxyde (DMSO), l'hydrate d'hydrazine, l'acétonitrile (CH_3CN) et le Tween 20 sont prévenus de Sigma-Aldrich (Darmstadt, Allemagne) et utilisés comme reçus. Ondansetron (ODS) est de Biotrend (Zurich, Suisse) et Graphenea (Espagne), respectivement. Des feuilles de Polyimide Kapton HN ayant une épaisseur de 125 μm sont obtenues chez DuPont (Circleville, OH, USA).

IV.5.2. Synthèse de l'oxyde de graphène réduit (rGO)

L'oxyde de graphène (GO) est synthétisé à partir de la poudre de graphite par la méthode Hummers modifiée [46]. 5 mg de GO synthétisés sont dispersés dans 1 ml d'eau et exfoliés par ultrasons pendant 3 h. Cette suspension aqueuse de GO est utilisée comme suspension de stock dans des expériences ultérieures. La réduction de GO en oxyde de graphène réduit (rGO) est effectuée en suivant la méthode illustrée dans le chapitre III [47].

IV.5.3. Chargement de rGO avec Ondansetron (ODS)

Une solution de rGO (1-5mg mL⁻¹) est traité aux ultrasons avec de l'ondansétron (500 µg mL⁻¹) pendant 2 h sous agitation. Tous les échantillons sont centrifugés à 13 500 tr / min pendant 30 min. La concentration de l'ODS chargée sur la matrice rGO est déterminée en utilisant la spectrométrie UV / Vis (voir la figure IV.7). Une courbe d'étalonnage (figure IV.7) est établie à 310 nm, en utilisant une série de solutions d'ODS de différentes concentrations. La concentration d'ODS restant dans la solution surnageant est d'abord déterminée à l'aide de la courbe d'étalonnage, et la concentration dans le patch est calculée selon l'équation Eq 1:

$$[\text{ODS}]_{\text{rGO}} = [\text{ODS}]_{\text{initial}} - [\text{ODS}]_{\text{surnageant}} \quad \text{Eq 1}$$

Avec $[\text{ODS}]_{\text{rGO}}$ = concentration d'ODS sur la matrice rGO (µg mL⁻¹)

$[\text{ODS}]_{\text{initial}}$ = concentration initiale de ODS en solution (500 µg mL⁻¹)

$[\text{ODS}]_{\text{surnageant}}$ = concentration d'ODS sur le surnageant (µg mL⁻¹)

IV.5.4. Préparation du patch cutané flexible : Kapton / rGO-ODS

Les feuilles du Kapton (10 × 10 mm²) sont nettoyées avec de l'acétone dans un bain d'eau à ultrasons pendant 30 minutes, suivies de l'isopropanol pendant 10 min puis séchées sous un courant d'azote. Les feuilles de Kapton nettoyées sont ensuite modifiées avec de la rGO-ODS par la technique goutte à goutte (100 µL) trois fois de suite, puis séchées à température ambiante pendant plusieurs heures.

IV.5.5. Les méthodes de caractérisation de l'ondansetron chargé sur Kapton / rGO

IV.5.5.1. Microscopie électronique à balayage (MEB)

Les images MEB ont été obtenues à l'aide d'un microscope électronique ULTRA 55 (Zeiss, France) équipé d'un émetteur d'émission de champ thermique et de trois détecteurs différents (détecteur EsB avec grille filtrante, détecteur SE In-lens haute performance et détecteur d'électrons secondaire Everhart-Thornley).

IV.5.5.2. Mesures UV / Vis

Les spectres d'absorption sont enregistrés en utilisant un spectrophotomètre Perkin Elmer Lambda UV / Vis 950 dans une cuvette à quartz de 1 cm. La plage de longueur d'onde étant de 200-1100 nm.

IV.5.5.3. Mesures du potentiel Zeta

Le potentiel zêta est déterminé en utilisant le principe dynamique de diffusion de la lumière (Malvern Zetasizer, NanoZS). Les valeurs du potentiel zêta de rGO ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) et de son mélange avec l'ODS dans de l'eau à différents pH (4, 6, 7 et 9) sont enregistrées.

IV.5.5.4. Méthode HPLC / UV pour la quantification de la perméation d'ondansetron à travers la peau

Les analyses chromatographiques sont effectuées à l'aide d'un système d'eaux (Milfors, MA, USA) équipé d'une pompe doseuse 600E de gradient, d'un appareil de dégazage en ligne, d'un échantillonneur automatique 717 plus et d'un détecteur de photodiodes 996. Les séparations sont opérées sur un Kinetex C18 en phase inversée ($100 \times 4,60 \text{ mm i.d.}, 2,6 \mu\text{m}$) (Phenomenex, Le Pecq, France) précédée d'une colonne C18 de garde ($1 \times 4,60 \text{ mm}$). L'éluion isocratique est réalisée à 1 mL min^{-1} avec une phase mobile constituée d'un mélange H_2O / acétonitrile (80/20 - v / v) contenant 0,1% d'acide formique. La colonne est thermostatée à 25°C . Les échantillons sont filtrés à travers une membrane de cellulose régénérée de $0,45 \mu\text{m}$ avant le chargement de la colonne (volume d'injection: $20 \mu\text{L}$). La détection est effectuée à 310 nm . Cette méthode permet l'analyse de l'ODS en moins de 6 min avec une plage linéaire comprise entre 0,1 et $100 \mu\text{g L}^{-1}$, selon une régression linéaire ($R^2 > 0,999$).

IV.5.6. Libération photothermique d'ODS en solution

Des expériences de libération sont effectuées dans 1 ml d'eau désionisée. Le patch cutané est irradié avec un laser en mode continu (modèle Gbox, Fournier Medical Solution) avec une lumière de sortie à 980 nm à différentes densités de puissance ($1\text{-}10 \text{ W cm}^{-2}$) pour différents intervalles de temps (1- 60 min). Les images thermiques sont capturées par une caméra infrarouge (Thermovision A40) et sont traitées à l'aide du logiciel ThermaCam Researcher Pro 2.9. La quantité de médicament libérée est déterminée par l'évaluation de la concentration d'ondansetron dans le surnageant après irradiation, par la méthode de spectrométrie UV, à 310 nm , en utilisant une courbe d'étalonnage avec une plage de concentration de ODS comprise entre 1 et $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

IV.5.7. Expériences de perméabilité de la peau

Les études sur la perméabilité cutanée sont effectuées à l'aide d'une peau d'oreille de porc fraîche. Après un rinçage complet de l'oreille de porc avec de l'eau distillée, le cartilage et la couche épaisse du tissu sont enlevés à l'aide d'un scalpel chirurgical. La peau est doucement rasée et coupée en morceaux circulaires de $1,8 \text{ cm}^2$.

Après la mesure de son épaisseur à l'aide d'un micromètre digimatique (Mitutoyo, France), la peau est utilisée immédiatement après, pour des expériences de diffusion. Des expériences de diffusion cutanée de l'ODS sont réalisées à l'aide de cellules statiques de diffusion Franz (SES GmbH, Analyse System, Bechenheim, Allemagne) (Figure IV.2.) présentant une surface efficace de $0,64 \text{ cm}^2$.

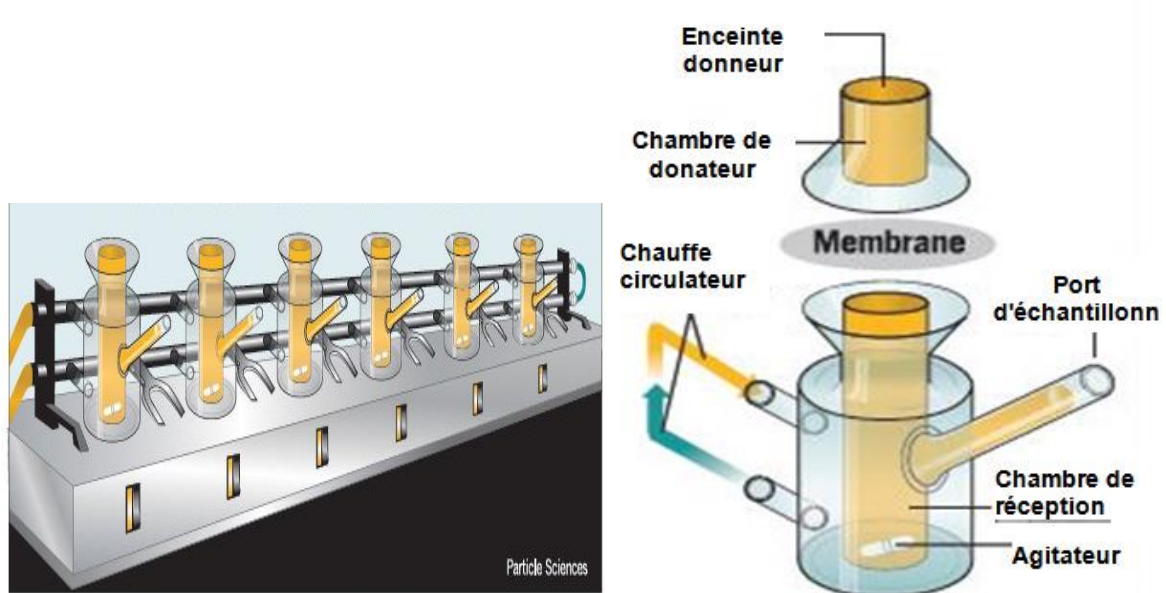


Figure IV.2. Cellules statiques de diffusion Franz (SES GmbH, Analyse System, Bechenheim, Allemagne) [48].

Après avoir rempli le compartiment récepteur avec du PBS dégazé (1 x, pH 7,4), la solution est maintenue à $32 \text{ }^\circ\text{C}$ et agitée avec une barre d'agitation magnétique à environ 500 tr / min. La peau de porc est soigneusement serrée entre le donneur et le compartiment récepteur (3,1 mL).

La pré-incubation dans le milieu du compartiment du récepteur pendant 1 h est effectuée avant que le patch cutané chargé par l'ODS ne soit appliqué sur la peau préalablement mouillée avec $100 \text{ }\mu\text{L}$ d'eau pour assurer le contact entre le patch et la peau. L'expérience de diffusion est lancée et suivie pendant 6 h. Juste après son application (Figure IV.3.), le patch cutané chargé par l'ODS est irradié avec un laser à onde continue à 980 nm

pendant 10 minutes, en utilisant différentes densités de puissance ($0-10\text{Wcm}^{-2}$). À des intervalles de temps déterminés (1 h), des aliquotes de $250\ \mu\text{L}$ de solution diffuse ont été retirées du compartiment récepteur et analysées par HPLC. Après chaque échantillonnage, un volume égal de fluide de diffusion frais est ajouté au compartiment récepteur pour maintenir un volume constant. Toutes les expériences sont réalisées trois fois.

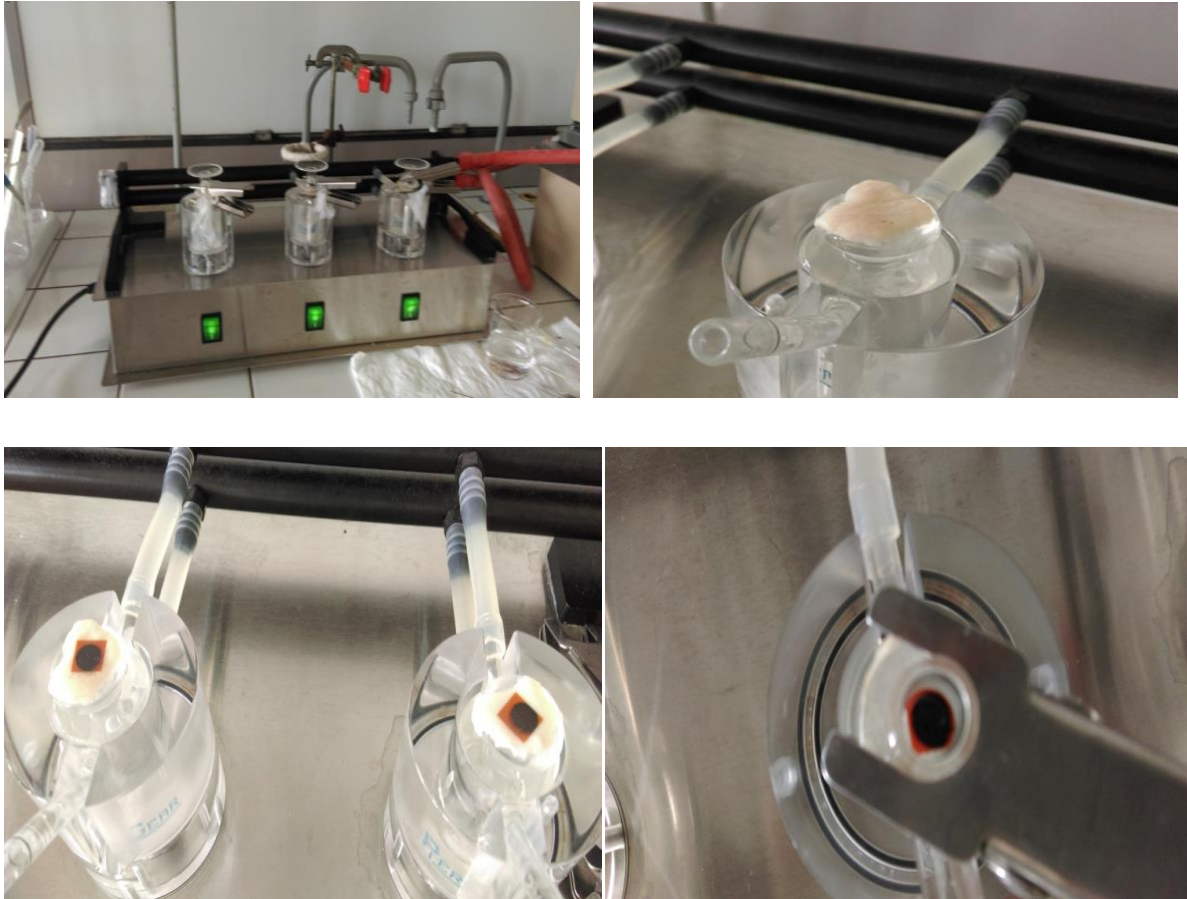


Figure IV.3. A. Les étapes de l'expérience de libération photothermique de l'ODS à partir d'un patch Kp / rGO / ODS.

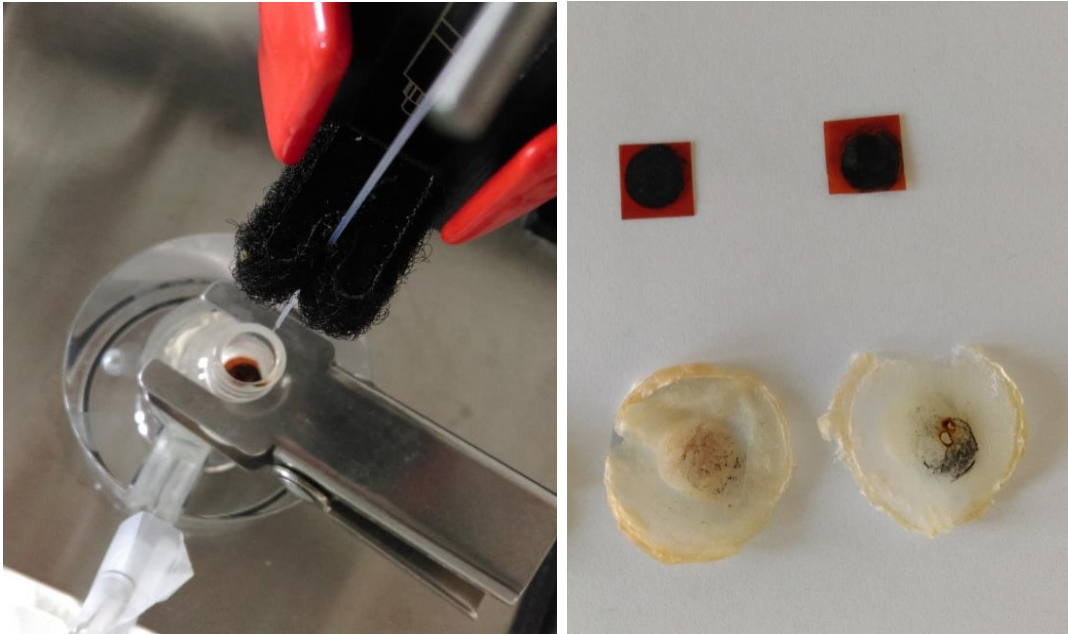


Figure IV.3. B. Les étapes de irradiation des patches Kp / rGO / ODS pour administration photothermique de l'ODS.

IV.5.8. Calculs de la quantité cumulée d'ODS et le flux ODS

Les profils de libération et de diffusion sont déterminés en traçant la quantité cumulée de l'ODS dans le compartiment récepteur (Q_{exp}) (équation 2) par rapport au temps.

$$Q_{exp} = c_n \times V + \sum_{i=1}^{n-1} V_s \times c_i \quad (\text{Eq 2})$$

Avec :

Q_{exp} = quantité cumulée d'ODS diffusée à travers la peau (μg) ;

C_n = concentration d'ODS ($\mu\text{g mL}^{-1}$) déterminée au $n^{\text{ième}}$ intervalle d'échantillonnage ;

V = volume de la phase accepteur (compartiment récepteur) (ml).

Le flux ODS (J) est déterminé selon l'équation (3):

$$J = A / S \quad (\text{Eq3})$$

Avec :

J = flux d'ODS à travers la peau ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$) ;

A = pente linéaire des courbes de la quantité cumulée en fonction de temps, dans les conditions d'équilibre ($\mu\text{g h}^{-1}$) ;

S = surface de la membrane de la cellule Franz ($0,64 \text{ cm}^2$).

IV.5.9. Effet du tensioactif Tween 20 sur la diffusion cutanée de l'ODS

L'effet de Tween 20 sur l'efficacité de diffusion de l'ODS à travers la peau de porc est évalué de deux façons. Dans la première approche, le Tween 20 est intégré dans le mélange rGO / ODS en sondant le rGO (1 mg mL^{-1}) avec de l'ondansétron ($500 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) et le Tween 20 ($500 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) pendant 2 h sous agitation. Les échantillons sont centrifugés à 13.500 tr/min pendant 30 minutes, lavés avec de l'eau et déposés ($100 \text{ } \mu\text{L}$, trois fois) sur des feuilles de Kapton nettoyées, suivi d'un séchage à température ambiante pendant plusieurs heures. L'autre méthode expérimentale consistait à appliquer le patch cutané chargé d'ODS à la peau préalablement mouillée avec $200 \text{ } \mu\text{L}$ d'un mélange d'eau/tween 20 (85/15 w: w%). Les expériences de diffusion sont réalisées comme expliqué au paragraphe IV.5.7.

IV.5.10. Evaluation de l'ODS piégé dans la peau

Pour estimer la quantité d'ODS piégée dans la peau, cette dernière est ajoutée dans le mélange eau / glace pendant 10 min et est traitée par ultrasons, en présence de perles ZnO_2 (diamètre de 4mm), avant d'être centrifugée pendant 30 minutes à 13500 tr/min , en utilisant une ultracentrifugeuse (Mini Scan Fuge ORIGIO). La phase liquide est recueillie et filtrée dans un filtre en Nylon de $0,1 \text{ } \mu\text{m}$ (Whatman Puradisc 13 mm) et la quantité d'ODS déterminée par HPLC / UV.

IV.5.11. Coloration de la peau et histologie

Immédiatement après les études de libération au laser, la peau porcine est nettoyée dans de l'eau, disséquée et placée dans du paraformaldéhyde (4% v / v) pendant 24 h, afin de fixer le tissu. Les échantillons sont paraffinés, sectionnés et colorés avec le colorant trichrome de Masson.

IV.6. Résultats et discussion

IV.6.1. Conception et caractéristiques des patches cutanés flexibles et photo-actifs Kapton / rGO

La fabrication d'un patch cutané flexible et photoactif est basée sur la technique goutte à goutte d'une suspension de rGO chargée de médicaments, sur des films de 1 cm^2 de poly (4,4'-oxydiphénylène-pyromellitimide), appelés Kapton (figure IV.1).

Le choix du Kapton en tant que matériau de patch est basé sur certaines de ses propriétés physico-chimiques intéressantes. Les résines polyimides hautement aromatiques telles que le Kapton ont une stabilité thermique élevée ($N 300 \text{ } ^\circ\text{C}$), une température de

transition vitreuse élevée (T_v 200 °C), une résistance chimique éprouvée ainsi qu'une excellente souplesse et des propriétés adhésives [49-50]. L'absorption optique de GO, rGO, rGO / Kapton est représentée sur la Figure IV.4.

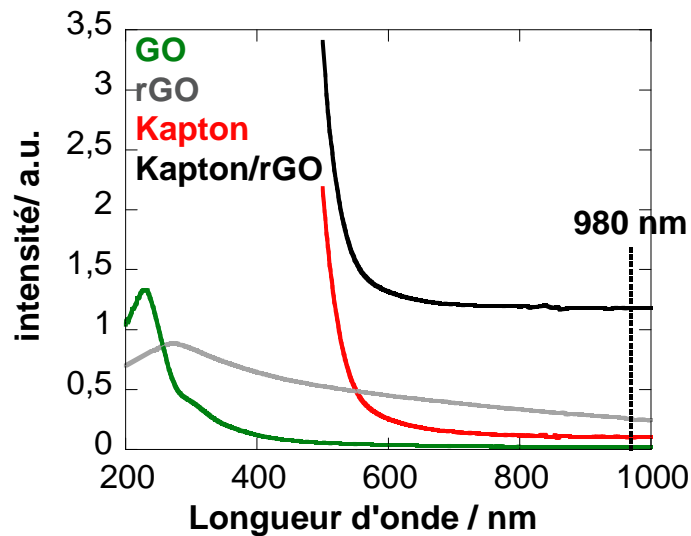


Figure IV.4. Spectres d'absorption UV / Vis : - solution aqueuse de GO (2 mg mL⁻¹, vert), interfaces quartz recouvertes de films minces rGO déposés goutte à goutte (2 mg mL⁻¹, x 3, gris), - film Kapton (Rouge) - et Kapton revêtu par le dépôt à la goutte avec du rGO (2mg mL⁻¹, x 3, noir).

L'intensité d'absorbance à 980 nm s'est révélée être amplifiée dans le film du Kapton. L'image MEB d'un dépôt de rGO / Kapton (figure IV.5) montre que l'interface entière est revêtue d'un film mince de structures en forme de papier froissé comme attendu pour le rGO. Les patchs rGO / Kapton sont stables dans l'air pendant plusieurs mois.

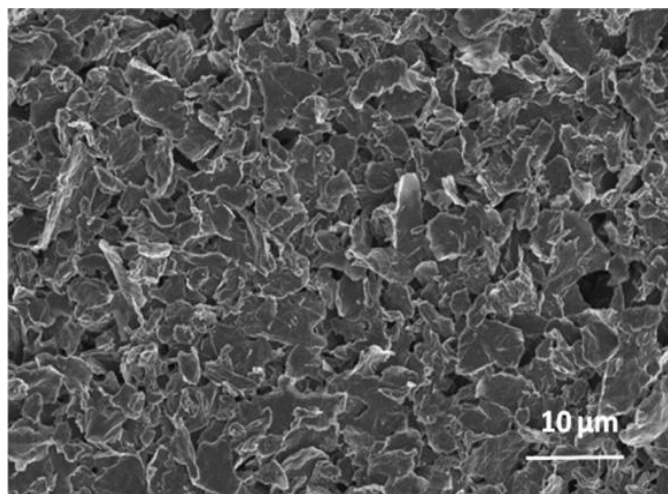


Figure IV.5. Image MEB du patch Kapton chargé de rGO.

IV.6.2. Propriétés photothermiques du patch cutané

L'objectif du travail étant le développement d'un patch cutané, pouvant être activé par des ondes PIR continues, afin de fournir des médicaments à la demande sur une longue période de temps, en raison d'un changement de température induit, nous avons déterminé la capacité de chauffage photothermique du patch.

L'utilisation de la lumière PIR dans la gamme de 700-1100 nm est nécessaire car l'absorption des photons PIR de la peau est minimale dans cette région spectrale. La longueur d'onde de 980nm est largement utilisée dans la construction de lasers biomédicaux et a donc été utilisée tout au long de ce travail. Alors que cette longueur d'onde relève du début de vibration des molécules d'eau, avec par conséquent une section transversale d'absorption plus élevée, l'absorption par des molécules d'eau à 980 nm ne cause pas de problèmes dans la plupart des cas [51, 52] et pourrait être bénéfique pour la transmission photothermique à travers la peau. L'un des principaux avantages de l'utilisation d'une excitation de 980 nm plutôt que 810 nm est associé à une pénétration plus profonde des tissus et à une faible dégradation des biomolécules et des photos-dommages cellulaires.

La capacité de chauffage photothermique de Kapton et de rGO / Kapton est déterminée sous irradiation PIR (figure IV.6 (A)). Bien que le Kapton ait une forte absorption à 980 nm, il ne présente aucune capacité de chauffage photothermique même sous une forte irradiation par laser de 4 W cm^{-2} . Lors du revêtement avec rGO, des températures allant jusqu'à 88°C sont atteintes en 10 min. Pour évaluer si le Kapton a un effet synergique sur la température finale, on enregistre les courbes de chauffage photothermique du verre seul et du verre chargé goutte à goutte avec rGO (figure IV.6 (B)). Le verre seul ne chauffe pas comme prévu. L'interface verre / rGO présente une température de solution finale légèrement plus petite de 81°C par rapport aux 88°C obtenus avec rGO / Kapton, ce qui indique un impact assez petit de Kapton sur les propriétés photothermiques du patch.

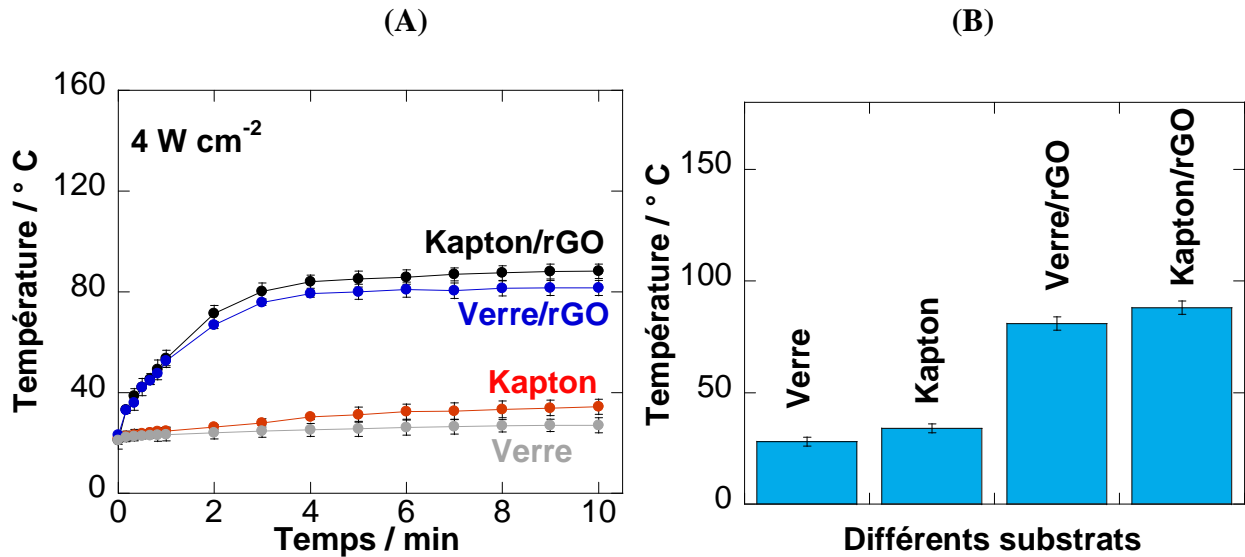


Figure IV.6. Comparaison de la capacité de chauffage photothermique du verre (gris), du Kapton (rouge), du verre / rGO (bleu) et du Kapton / rGO (noir) dans l'eau, sous la lumière PIR (980 nm), pendant 10 min à 4 W cm^{-2} (A), avec la Température finale, sous la forme d'un diagramme à barres (B).

IV.6.3. Chargement du patch cutané avec ODS

L'ODS intégré dans rGO en irradiant sous ultrasons une suspension de rGO ($1-5 \text{ mg mL}^{-1}$) dans l'eau (pH 7) avec $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ d'ODS pendant 4 h. On pense que le mécanisme de chargement se produit par l'empilement π - π et / ou des interactions de charge entre rGO et le réseau de pyridine à charge positive d'ODS, bien que d'autres contributions telles que les interactions de liaison hydrogène et / ou van der Waals ne puissent être exclues. La capacité de chargement du rGO pour l'ODS a été évaluée en mesurant la concentration de l'ODS en solution avant et après le chargement à l'aide de mesures spectrométriques UV/ Vis à 310 nm. À cette longueur d'onde, l'ODS affiche une bande d'absorption bien définie qui évolue linéairement avec sa concentration en solution (figure IV.7).

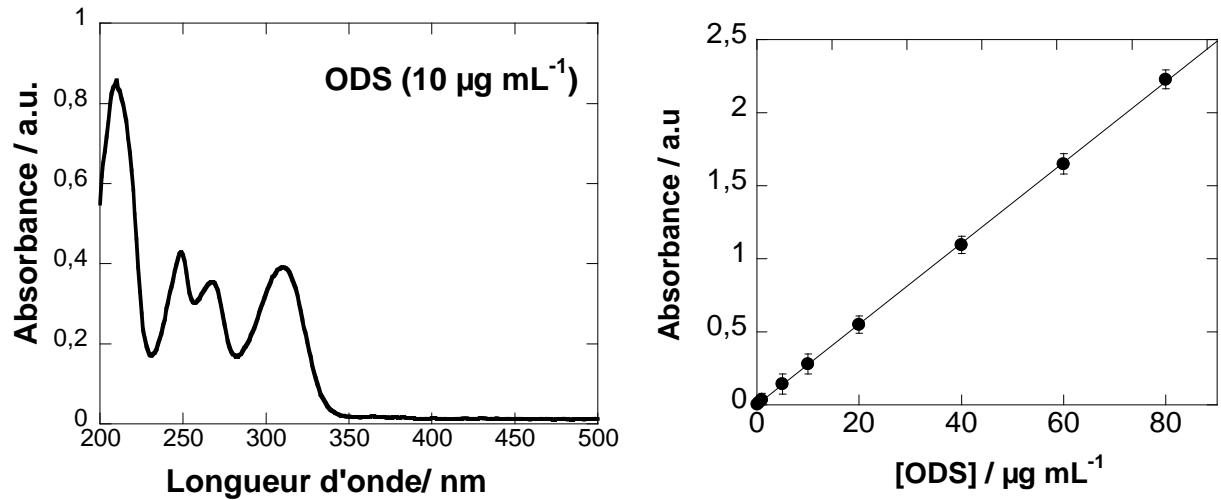


Figure IV.7: Spectre UV / Vis de la solution de l'ODS, courbe d'étalonnage de l'ODS.

La figure IV.7 donne le spectre UV/Vis de la solution de l'ODS dans l'eau, qui montre sa longueur d'onde d'absorbance à 310 nm. La courbe d'étalonnage trace l'évolution linéairement de l'absorption en fonction de la concentration le l'ODS.

IV.6.4. Le rapport [rGO] / [ODS]

Comme le montre la figure IV.8, le chargement de l'ODS a augmenté avec le rapport de [rGO] / [ODS].

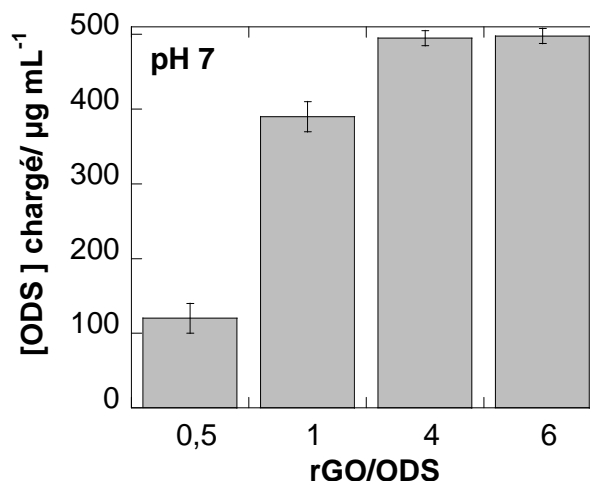


Figure IV.8: Capacité de chargement d'ODS (500 µg mL⁻¹) sur rGO en fonction de la teneur en rGO à pH 7.

Une efficacité de chargement de 98% a été atteinte pour un rapport rGO / ODS égal à 4 (figure IV.9).

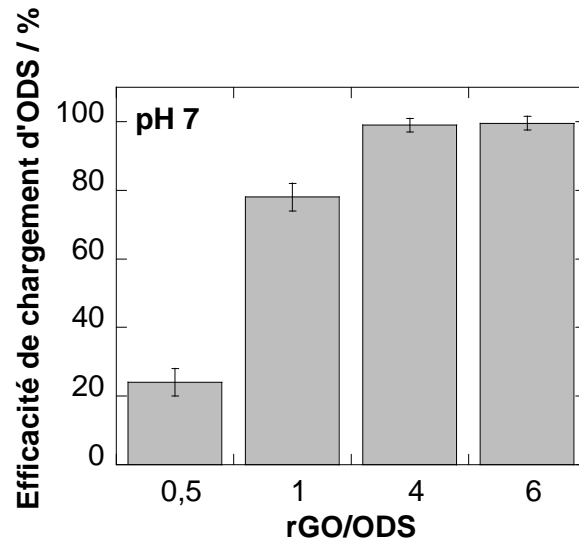


Figure IV.9: Efficacité de chargement de l'ODS,

Une augmentation supplémentaire du rapport $[rGO] / [ODS]$ à 6 n'a entraîné aucune élévation de chargement de l'ODS au pH 7. La capacité de chargement du rGO s'est révélée dépendante du pH, avec un chargement d'ODS plus élevé au $pH \geq 7$ (Figure IV.10).

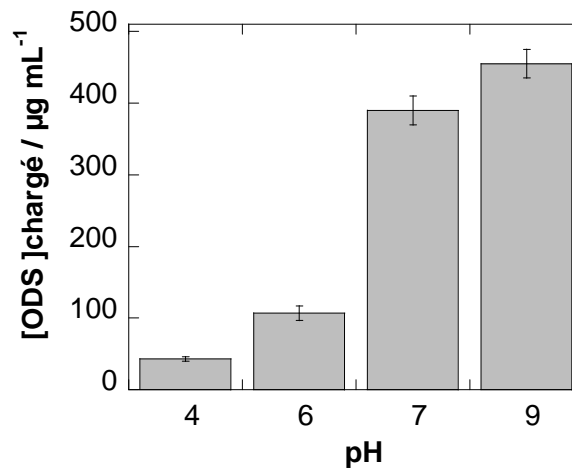


Figure IV.10: Influence du pH sur le chargement des ODS ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) sur le rGO (2 mg mL^{-1});

Avec un pKa de 7,6, sous pH 7,6, l'ODS est principalement sous forme cationique (99,97%, 97,5% et 80% à pH 4, 6 et 7, respectivement) alors qu'à pH 9, elle est principalement neutre (96,2%). Comme les interactions d'empilement π - π sont indépendantes du pH, le chargement de l'ODS plus élevé dans des conditions basiques peut être dû à une meilleure solubilité de l'ODS.

IV.6.5. Etude de chauffage photothermique d'un patch Kapton /rGO/ODS

Les courbes de chauffage photothermique d'un patch, formé par dépôt à la goutte d'une solution rGO/ODS (rapport de 4) sur Kapton, en fonction de la puissance laser, sont représentées sur les Figures IV.11, IV.12.

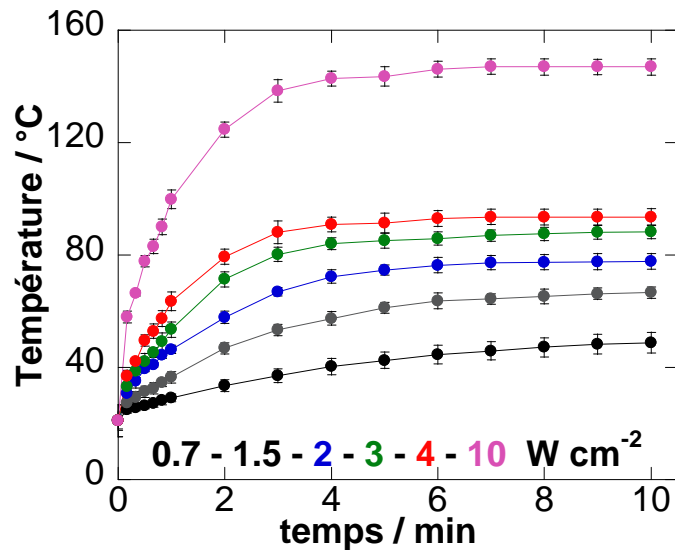


Figure IV.11. Courbes de chauffage photothermique de l'eau à l'aide d'un patch Kapton / rGO sous la lumière PIR (980 nm) à différentes densités de puissance laser à ondes continues;

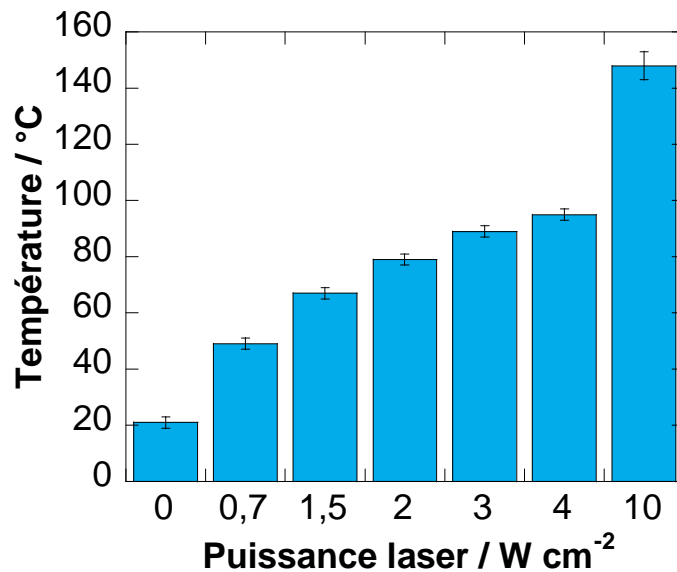


Figure IV.12. Changement de la température de la solution aqueuse (1 mL) lors de l'illumination du patch Kapton/rGO à 980 nm pendant 10 minutes, en fonction de la densité de puissance du laser.

La présence de l'ODS n'a pas d'impact sur la température de la solution étant donné que les mêmes températures sont atteintes à 4 W cm⁻² pour Kapton / rGO/ODS (figure IV.11) et Kapton/rGO (figure IV.13).

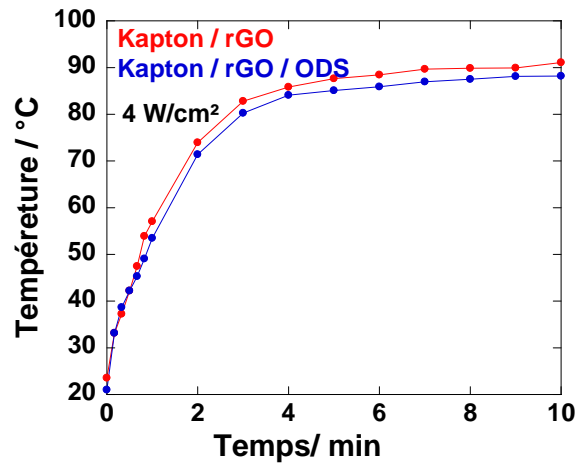


Figure IV.13 : températures atteintes à 4 W cm^{-2} pour Kapton / rGO/ODS et Kapton/rGO.

En fonction de la densité de puissance laser utilisée, la température de la solution peut être réglée entre 20 et 155 ° C. Cette large gamme de température permet d'étudier l'effet de la température sur les interférences de la peau et la transmission de médicaments. Dans le cas d'une transmission de médicaments transdermique par ablation améliorée au laser, la peau est chauffée à des centaines de degrés, en un laps de temps très courts (μs - ms), ce qui perforé ou élimine le *stratum-corneum* (SC):

- Des températures entre 100 et 150 ° C entraînent un désordre des structures lipidiques SC;
- Des températures entre 150 et 200 ° C perturbent les structures du réseau de kératine SC,
- Tandis que des températures supérieures à 300 ° C entraînent une décomposition et une vaporisation de la kératine pour créer des micropores dans le SC, ce qui entraîne une perméabilité cutanée accrue [53].

Les lasers pulsés CO₂ et Er: YAG sont nécessaires, car leur longueur d'onde médiane infrarouge émettrice correspond à la longueur d'onde d'absorption des molécules d'eau, ce qui entraîne une forte absorption de la lumière et un chauffage de la peau [36, 54]. La lumière PIR seule, telle qu'on l'a utilisée, n'est cependant pas suffisante pour éliminer le *stratum-corneum*.

IV.6.6. Délivrance d'ondansetron (ODS) à partir des patchs de Kapton / rGO-ODS

IV.6.6.1. La stabilité du patch Kapton / rGO chargé d'ODS

Avant de déterminer la quantité de l'ODS libérée pendant l'activation photothermale, la stabilité à long terme du patch Kapton / rGO chargé d'ODS (formé en mélangeant 1 mg ml⁻¹ rGO avec 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ODS) est établie. Environ $5 \pm 2\%$ d'ODS désorbe du patch après 1

jour d'immersion dans une solution à pH 7, ce qui indique une interface stable dans le temps. La figure IV.14. montre la quantité d'ODS libérée par voie photochimique lors de l'irradiation du patch à 980 nm pendant 10 minutes avec un laser continu à différentes puissances.

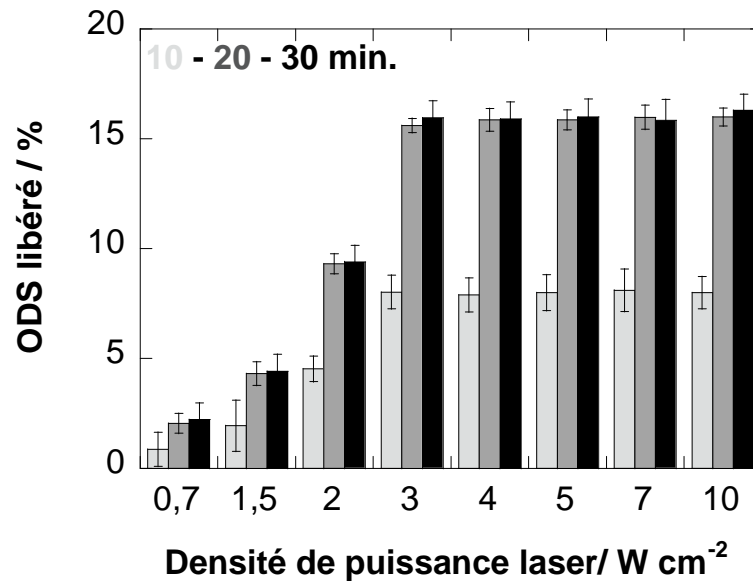


Figure IV.14. Concentration d'ODS libérée par voie photothermique dans l'eau (pH 7) à partir du patch Kapton / rGO / ODS à l'aide d'un laser à onde continue à 980 nm, 0,7-10 $W\ cm^{-2}$ avec un temps d'irradiation de 10 min.

La proportion de l'ODS libérée augmente avec l'évolution de la densité de puissance du laser. À $0,7\ W\ cm^{-2}$, seule une petite fraction de l'ODS est relâchée. Une température de $50^{\circ}C$ (Figure 11) semble insuffisante pour modifier l'affinité entre l'ODS et rGO. À une puissance laser de $3\ W\ cm^{-2}$, correspondant à $89^{\circ}C$, la proportion de l'ODS libérée après 10 min atteint une valeur maximale. Malgré l'augmentation de la densité de puissance du laser à $10\ W\ cm^{-2}$, aucune libération supplémentaire n'est observée (figure IV.14).

IV.6.5.2. Etude de la réutilisation du patch

Une caractéristique importante du patch est sa réutilisabilité. Le rechargement d'ODS sur le patch après la libération photothermique pourrait être effectué avec la même efficacité pendant au moins 6 cycles (figure IV.15), ce qui représente un motif d'intérêt particulier pour le développement de plates-formes de transmission à la demande.

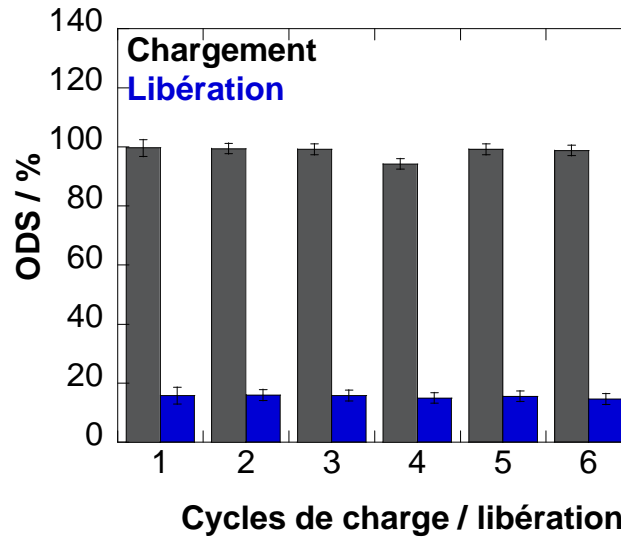


Figure IV.15. Rechargement (à pH 7 avec $500 \mu\text{g mL}^{-1}$) et libération d'ODS (980 nm, 10 min, 3 W cm^{-2}) du patch pendant 6 cycles.

Le patch chargé ODS fournit également une libération prolongée de médicament lors du déclenchement de l'irradiation PIR. La Figure IV.16. Présente la quantité totale de l'ODS libérée par le patch pendant 9 jours lorsqu'il est activé une fois par jour pendant 10 min par éclairage laser à 980 nm (3 W cm^{-2}). Pendant le premier jour, 15% sont libérées ($75 \mu\text{g mL}^{-1}$), le deuxième jour, 14% ($70 \mu\text{g mL}^{-1}$) et le troisième jour, 10% ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) d'ODS sont libérés de la matrice, ensuite la quantité libérée est maintenue constante à 8,8 % ($44 \mu\text{g mL}^{-1}$). Cette expérience démontre que l'interface Kapton / rGO photoactivée facilite la libération des doses multiples de médicaments à la demande en utilisant le même patch, sans être rechargé. Dans les conditions choisies, le patch peut être utilisé pendant au moins une semaine en toute sécurité.

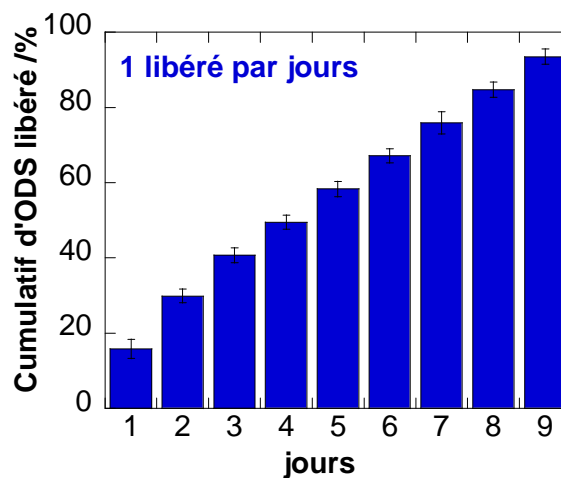


Figure IV.16. Décharge fractionnaire cumulative de ODS pendant 9 jours après activation une fois par jour pendant 10 min (980 nm, 3 W cm^{-2}).

On a déjà démontré que l'ablation photo-thermique utilisant une lumière laser pulsée plutôt qu'une lumière continue, produit un chauffage instantané, qui cesse à la fin de chaque impulsion lumineuse, ce qui entraîne une augmentation beaucoup moins importante de la température de la peau et une libération favorable [55]. En outre, le profil de libération de l'ODS sous impulsions laser de 100 ms, avec un temps mort de 500 ms, est examiné (figure IV.17).

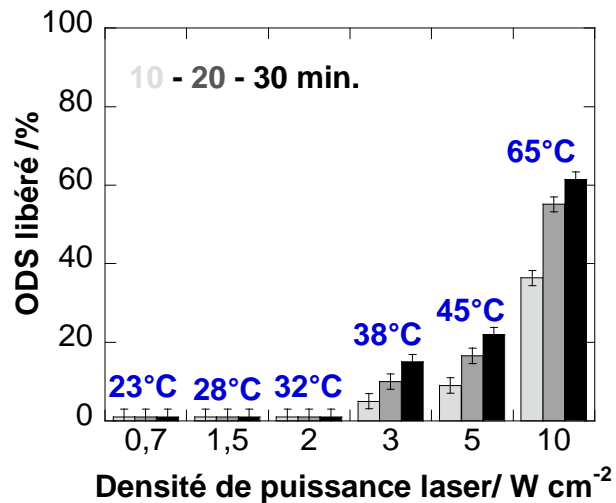


Figure IV.17. Concentration de l'ODS libérée par voie photothermique dans l'eau (pH 7) à partir du patch Kapton / rGO lors d'une irradiation à la lumière pulsée à 980 nm et $3Wcm^{-2}$.

Sous l'activation des impulsions lumineuses laser, seule une fraction de l'ODS est relâchée par rapport à celle sous éclairage continu (figure IV.14). Étant donné que les températures obtenues à l'aide d'un éclairage pulsé sont beaucoup plus faibles que celles obtenues à l'aide d'un éclairage continu, il semble que la température joue un rôle majeur dans la libération de l'ODS.

IV.6.7. Délivrance transdermique de l'ODS à travers la peau du porc

Pour déterminer l'impact de l'irradiation laser PIR sur la capacité de pénétration de la peau et le profil de l'ODS du réservoir du patch Kapton / rGO-ODS, le flux transdermique d'ODS à travers la peau est étudié à l'aide d'une installation de cellules de diffusion Franz. Des études de pénétration de la peau sont effectuées à l'aide de la peau d'oreille de porc, car son *stratum-corneum* est très similaire à celui du *stratum-corneum* humain [56]. L'épaisseur de la peau est déterminée comme étant de $1,6 \pm 0,4$ mm. Comme la peau sèche constitue un obstacle important à la diffusion du médicament, la peau de cochon est mouillée avant de placer le patch Kapton / rGO-ODS sur la peau.

IV.6.7.1. Le choix de la densité de puissance laser

Le patch Kapton / rGO-ODS (formées en mélangeant $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ODS avec 1 mg mL^{-1} rGO) est irradié pendant 10 min à 980 nm à différentes densités de puissance laser entre 0 et 10 W cm^{-2} et le passage de l'ODS à travers la peau est suivi pendant 6 h et quantifié par HPLC / UV (figure 16), aucune diffusion transdermique passive (sans irradiation laser) de l'ODS n'est observée. Cela est validé à la fois en déposant :

- (1) des patches Kapton / rGO chargés d'ODS sur la peau de porc sans stimulation laser
 - (2) Ou lorsque $200 \mu\text{L}$ d'une solution ODS ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) sont déposés sur la peau.
- Ceci est en accord avec les données rapportées par d'autres chercheurs [43,44].

Les profils de libération in vitro de l'ODS lors de l'irradiation au laser indiquent une densité de puissance du laser corrélée avec l'augmentation de la quantité d'ODS traversant la peau (figure IV.18).

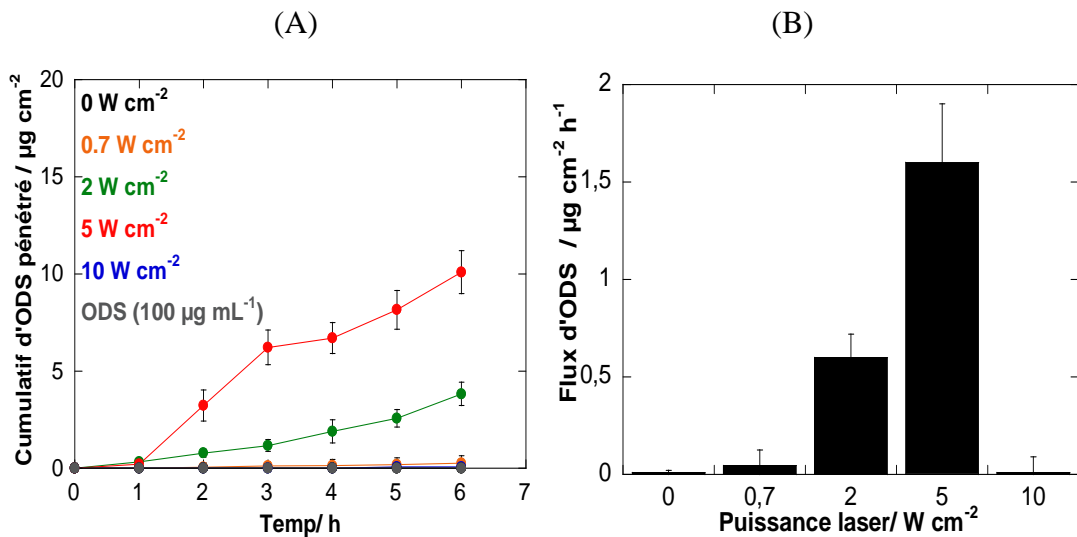


Figure IV.18: (A) Profils de pénétration in vitro d'ODS (quantité cumulée perméable en fonction du temps) à travers la peau porcine à partir des patches Kapton / rGO-ODS. (B) Flux de l'ODS.

Après un intervalle de temps, d'environ 1 h, de l'irradiation laser, la délivrance d'ODS transdermique est observée pour les densités de puissance laser de 2 et 5 W cm^{-2} , avec une pénétration plus efficace pour la densité de puissance de 5 W cm^{-2} .

Bien qu'une augmentation constante de la pénétration de l'ODS soit observée dans le cas de 2 et 5 W cm^{-2} , la pénétration est plus efficace dans les 3 premières heures, puis stagne avec un recaptage à des temps de pénétration plus longs. Cette amélioration est corrélée avec l'augmentation de la température au voisinage de la peau de 34°C (0.7 W cm^{-2}) à 41°C

(2Wcm^{-2}) et enfin à $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (5Wcm^{-2}). En effet, l'application de chaleur contrôlée peut améliorer de manière significative la perfusion cutanée locale et l'absorption de médicaments à partir de patches, en corrélation avec l'augmentation de l'administration transdermique d'ODS [57]. De manière surprenante, l'application d'une densité de puissance laser de 10Wcm^{-2} , qui conduit à une température locale encore plus élevée de $\approx 89\text{ }^{\circ}\text{C}$, ne montre aucun passage d'ODS au fil du temps. De telles températures devraient aboutir à un désordre des structures lipidiques du *stratum-corneum* et probablement à la rupture des structures du réseau de kératine de *stratum-corneum*, favorisant la pénétration du médicament à travers la peau [36]. Différent de l'ablation par laser, la pulsation de chaleur est plus longue et sa propagation dans le tissu est plus profonde, ce qui pourrait l'endommager et empêcher la pénétration d'ODS. La figue. IV.19. montre des images photographiques de la peau de porc avant et après irradiation laser à 5 et 10 W cm^{-2} . On peut remarquer que, bien qu'aucune brûlure significative ne soit observée jusqu'à une densité de puissance laser de 5 W cm^{-2} , la peau de porc est fortement brûlée à 10Wcm^{-2} .

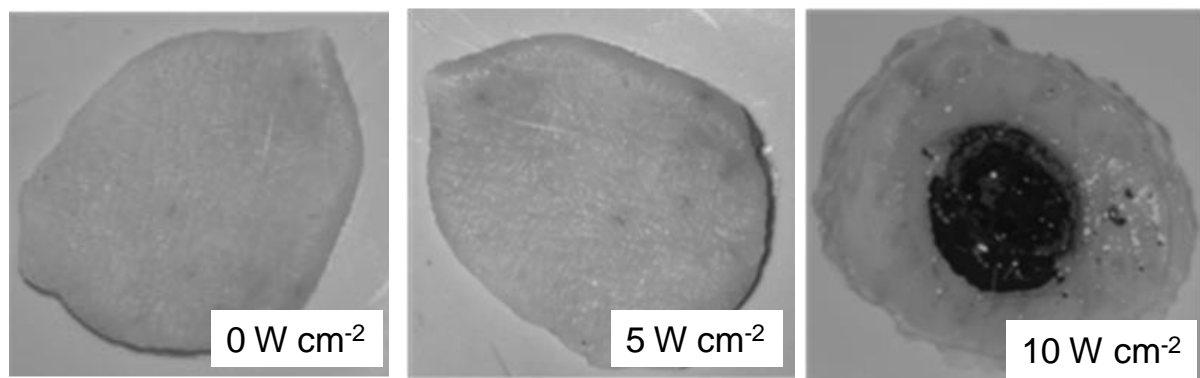


Figure IV.19. Photographies de peau de porc avant et après irradiation au laser à 5 et 10Wcm^{-2} pendant 10 min.

IV.6.7.2. La quantité de l'ODS retenue dans la peau

Une étude plus détaillée de l'irradiation au laser des patches Kapton / rGO-ODS utilisant des densités de puissance de 5Wcm^{-2} est menée. Nous avons déterminé la quantité de l'ODS qui n'a pas traversé la peau, mais qui est plutôt retenue par cette dernière. En effet, à partir des $495\text{ }\mu\text{g}$ d'ODS initialement chargés sur le patch de Kapton / rGO-ODS, après 6 h, $70 \pm 10\text{ }\mu\text{g}$ sont retrouvés dans la peau, sachant que $79,6\text{ }\mu\text{g}$ ODS (16%) sont libéré du patch de la peau lors de l'irradiation à 5Wcm^{-2} (figure IV.16).

IV.6.7.3. Le flux de l'ODS (J) à travers la peau de porc sous irradiation laser de 5Wcm^{-2}

De la Figure. 18. A, le flux de l'ODS (J) est déterminé comme $J = 3,1 \mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$ pendant les 3 premières heures, puis ce dernier a diminué à $J = 1,6 \mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$ (figure 18.B). Ces valeurs sont comparables à celles rapportées par Mashru et al., à pH 7,4 avec un flux ODS de $J = 2,52 \mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$ [58]. Les résultats sont également similaires aux paramètres de pénétration de l'ODS à travers une peau de souris sans poils, exercée avec un flux de $J = 4,04 \mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$ [45].

Étant donné que la dose orale habituelle d'ODS est comprise entre 16 et 32 mg par jour et que la biodisponibilité orale de l'ODS est de 60%, pour un système efficace de délivrance transdermique, environ 10-20 mg par jour devraient être transmis par la peau dans la circulation sanguine, soit 2,5 - 5 mg tous les 6 h [45]. Étant donné qu'un patch de 25cm^2 pourrait être utilisé, une livraison ODS d'environ de $480 \mu\text{g}$ toutes les 6 h peut être atteinte, ce qui nécessiterait actuellement l'utilisation de plusieurs patches.

IV.7.8. Analyse histologique de la peau de porc irradiée au laser

L'impact de l'irradiation laser sur la structure de la peau est en outre pris en compte en effectuant des recherches histologiques immédiatement après les expériences d'activation au laser. Le colorant trichrome de Masson est utilisé pour distinguer les cellules d'un tissu spécifique des cellules d'autres tissus conjonctifs par des colorations distinguables de chaque tissu. À l'aide de ce colorant, les fibres de kératine et de muscle sont colorées en rouge, le collagène et les os en bleu ou en vert, le cytoplasme en rouge ou en rose, et les noyaux cellulaires sont de couleur marron-noir. Comme on peut le voir sur la Figure 20, aucun changement histologique significatif n'est observé jusqu'à une densité de puissance laser de 2W cm^{-2} . Dans le cas de 5W cm^{-2} , qui a entraîné une grande amélioration de la perméabilité ODS, la modification de la structure de l'épiderme de la peau est remarquée. On observe une perturbation totale du *stratum-corneum*, correspondant à la possibilité d'une délivrance transdermique de l'ODS.

La structure de la cellule de collagène se transforme en une kératine (tissu cicatriciel).

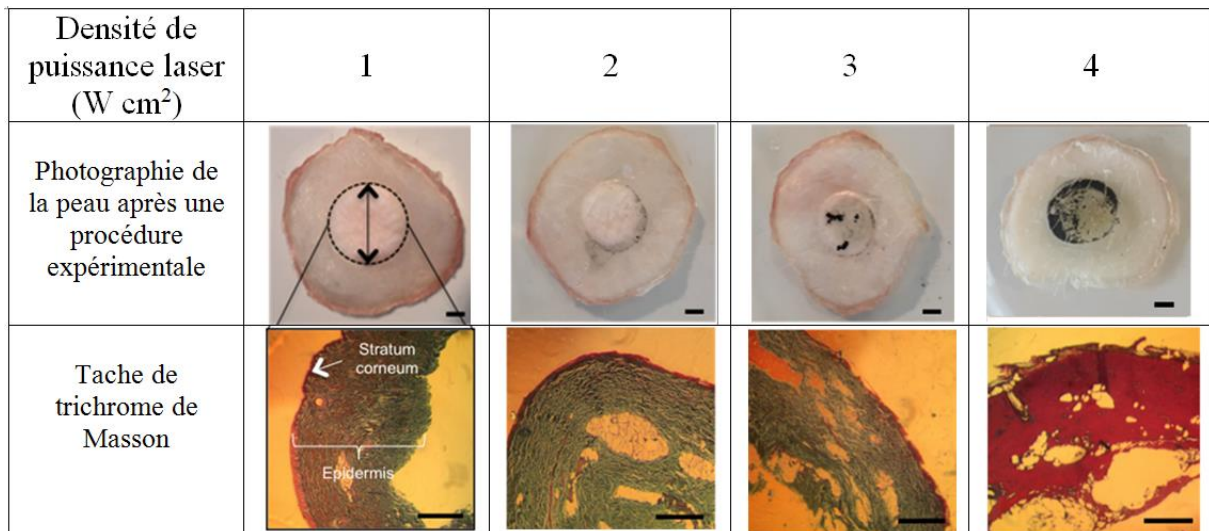


Figure IV.20. Des photographies représentatives et l'histologie de la peau de l'oreille du cochon après un traitement avec différentes densités de puissance laser à 980 nm pendant 10 min. Barre d'échelle = 0,5 mm; Les taches noires sur la peau sont dues à rGO.

IV.7.9. Effet de l'ajout d'un amplificateur de pénétration sur le flux ODS

L'ajout d'amplificateurs de pénétration aux systèmes de délivrance transdermique est connu pour améliorer la pénétration du médicament à travers la peau soit en modifiant la barrière cutanée, soit en modifiant l'activité thermodynamique de pénétration [32]. Nous avons opté pour l'utilisation du tensioactif Tween 20, un amplificateur de peau efficace connu, utilisé pour la distribution transdermique de l'ODS [44].

La figure IV.21 montre les profils de pénétration in vitro de l'ODS à travers la peau de porc en utilisant soit :

- un patch où le Tween 20 a été intégré dans la formulation de rGO / ODS
- et lorsque la peau de porc est simplement mouillée avec 200 µl d'une solution de Tween 20 (15% dans l'eau) avant que le patch Kapton / rGO-ODS ne soit placé sur la peau.

L'intégration de Tween 20 dans le patch cutané (Kapton / rGO-ODS-tween 20) entraîne une pénétration d'ODS de 2,8 fois plus élevée, avec un flux de l'ODS de 4,49 µg cm⁻² h⁻¹. Cependant, le flux de l'ODS est significativement amélioré à 13,2 ± 1,5 µg cm⁻² h⁻¹ lorsque le Tween 20 est déposé directement sur la peau de porc et non intégré dans la formulation du patch. Avec un patch cutané de 25 cm², environ 2 ± 0,2 mg d'ODS sont libérés toutes les 6 h, ce qui indique une dose thérapeutiquement suffisante.

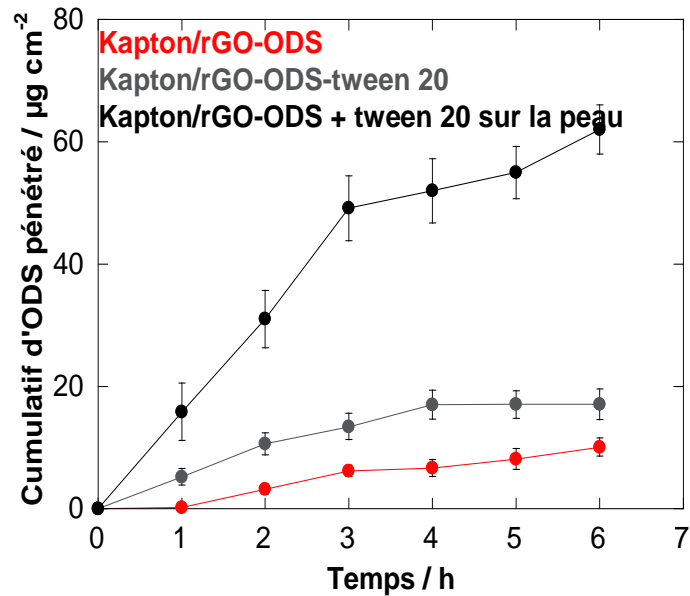


Figure IV.21. Profils de perméation in vitro des ODS imprégnés, cumulés par la peau porcine lors d'une irradiation lumineuse pendant 10 minutes à l'aide d'un laser continu à 980nm à 5Wcm⁻².

- Kapton / rGO-ODS (rouge, formé en mélangeant 500 µg mL⁻¹ d'ODS avec 1 mg mL⁻¹ de rGO),
- Kapton / rGO-ODS -tween 20 paches imprégnés (gris, formées en mélangeant 500 µg mL⁻¹ ODS avec 500 µg mL⁻¹ tween 20 et 1 mg mL⁻¹ rGO)
- Kapton / rGO-ODS par mouillage de la peau avec tween 20 (200 µL, 15% en poids dans l'eau);

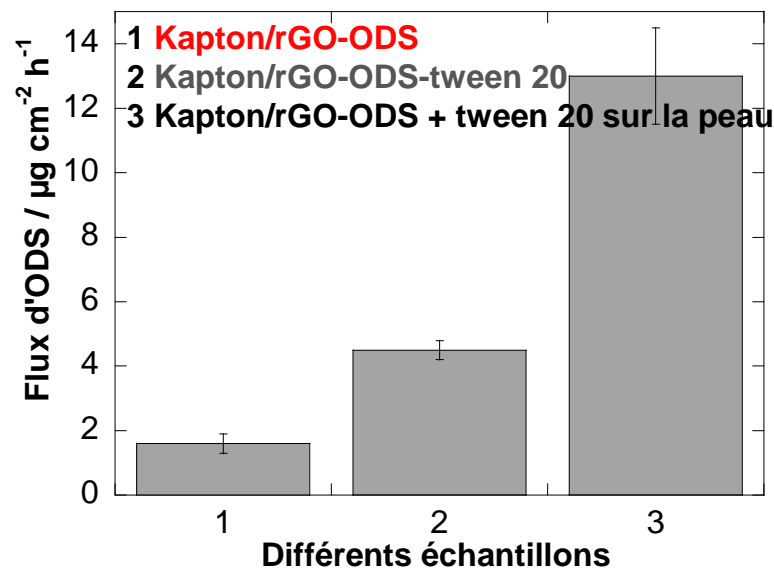


Figure IV.22. Flux d'ODS.

Conclusion

En résumé, nous avons développé une nouvelle stratégie pour l'administration transdermique de médicaments en utilisant un patch composite basé sur le Kapton modifié avec de l'oxyde de graphène réduit (rGO). L'Ondansetron (ODS), un médicament commun pour limiter la nausée et les vomissements provoqués par la chimiothérapie est utilisé comme médicament modèle pour valider le concept. Bien que l'ODS ait une très bonne biodisponibilité orale, une bonne solubilité dans l'eau et un faible poids moléculaire, sa faible perméabilité ne permet pas une délivrance transdermique passive. Nous avons montré que l'utilisation de patch Kapton / rGO chargé de l'ODS lors d'une irradiation laser continue à 980 nm pendant 10 minutes entraîne une pénétration accrue de la peau sans l'utilisation d'amplificateurs de pénétration. La stratégie de notre travail est basée sur une augmentation de la température induite par la photothermie, qui module l'affinité de l'ODS à le rGO et entraîne une libération contrôlée d'ODS du patch élaboré. En utilisant la peau d'oreille de porc en tant qu'un étalon, la quantité cumulée d'ODS passant à travers la peau et le flux de l'ODS dépendent fortement de la densité de puissance laser utilisée. À l'irradiation de 5Wcm^{-2} , le flux de l'ODS à travers la peau de porc était de $1,6\ \mu\text{g cm}^{-2}\ \text{h}^{-1}$. La dose transdermique de l'ODS libérée est plus petite que la dose attendue, nécessaire pour un effet thérapeutique. Cependant, le flux d'ODS pourrait être augmenté à $13,2\ \mu\text{g cm}^{-2}\ \text{h}^{-1}$ lorsqu'on utilise le Tween 20 pour le mouillage de la peau. Avec un patch cutané de $25\ \text{cm}^2$, une livraison d'environ 2 mg toutes les 6 h [45] peut ainsi être atteinte.

Ces résultats, montrant le potentiel de l'administration transdermique photothermique, à l'aide de patches appropriés pour la peau, sont encourageants et pourraient ouvrir de nouvelles voies pour le développement de l'administration transdermique, assistée par l'irradiation PIR, de différents médicaments utilisant des nanostructures photothermiques. Un avantage intrinsèque pour l'approche proposée est que le rGO n'est pas livré avec le médicament à l'étude, minimisant les problèmes réglementaires ainsi que les problèmes de sécurité et de toxicité. Les coûts de fabrication de ces patches cutanés sont faibles, car le rGO peut être produit sur une base industrielle à grande échelle, et seules de petites quantités de rGO (1 mg / mL) sont nécessaires pour la fabrication d'un patch. En outre, ces patches peuvent être facilement rechargés avec l'ODS ou tout autre médicament d'intérêt, en imitant Kapton / rGO dans la solution respective. Nous croyons que tous ces critères rendent ce patch photoactivable, à la demande, une alternative intéressante à d'autres formulations d'ODS.

Références bibliographiques

1. M. Bikram, J.L. West, Thermo-responsive systems for controlled drug delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.* 10 (2008) 1077–1091.
2. L. Deng, J. Ren, J. Li, J. Leng, Y. Qu, C. Lin, D. Shi, Magnetothermally responsive starblock copolymeric micelles for controlled drug delivery and enhanced thermo-chemotherapy, *Nanoscale* 7 ,9655–9663p (2015).
3. S. Goenka, V. Sant, S. Sant, Graphene-based nanomaterial for drug delivery and tissue engineering, *J. Control. Release* 173, 75–88p (2014).
4. J.S. Im, B.C. Bai, Y.-S. Lee, The effect of carbon nanotubes on drug delivery in an electro-sensitive transdermal drug delivery system, *Biomaterials* 31, 1414–1419p (2010).
5. D.A. La Van, T. McGuire, R. Langer, Small-scale systems for in vivo drug delivery, *Nat. Biotechnol.* 21, 1184p (2003).
6. S. Mura, J. Nicolas, P. Couvreur, Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery, *Nat. Mater.* 12, 991–1003p (2013).
7. D. Peer, J.M. Karp, S. Hong, O.C. Farokhzad, R. Margalit, R. Langer, Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy, *Nat. Nanotechnol.* 2, 751p (2007).
8. C.L. Stevenson, J.T. Santini, R. Langer, Reservoir-based drug delivery systems using microtechnology, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012).
9. W. He, X. Guo, M. Zhang, Transdermal permeation enhancement of N-trimethyl chitosan for testosterone, *Int. J. Pharm.* 356, 82–87p (2008).
10. H. Lee, T.K. Choi, Y.B. Lee, H.R. Cho, R. Ghaffari, L. Wang, H.J. Choi, T.D. Chung, N. Lu, T. Hyeon, S.H. Choi, D.-H. Kim, A graphene-base electrochemical device with thermoresponsive microneedles for diabetes monitoring and therapy, *Nat. Nanotechnol.* (2016).
11. F. Teodorescu, L. Rolland, V. Ramarao, A. Abderrahmani, D. Mandler, R. Boukherroub, S. Szunerits, Electrochemically triggered release of human insulin from an insulin impregnated reduced graphene oxide modified electrode, *Chem. Commun.* 51, 14167–14170p (2015).
12. J. Hong, N.J. Shah, A.C. Drake, P.C. DeMurth, J.B. Lee, J. Chen, P.T. Hammond, Graphene multilayers as gates for multi-week sequential release of proteins from surfaces, *ACS Nano* 6, 81–88p (2012).
13. X. Yang, X. Zhang, Z. Liu, Y. Ma, Y. Huang, Y. Chen, High-efficiency loading and controlled release of doxorubicin hydrochloride on graphene oxide, *J. Phys. Chem. C* 112, 17554–17558p (2008).
14. K. Turcheniuk, A. Mororina, P. Subramanian, A. Barras, V. Zaitsev, V. Kuncser, A. Leca, A. Martoriati, K. Cailliau, J.-F. Bodart, R. Boukherroub, S. Szunerits, Insulin loaded iron magnetic nanoparticles-graphene oxide composites: synthesis, characterization and application for diabetes treatment, *RSC Adv.* 4, 865–875(2014).

15. H. Kim, W.J. Kim, Photothermally controlled gene delivery by reduced graphene oxide-polyethylenimine nanocomposite, *Small* 10, 117–126p (2014).
16. Z. Liu, J.T. Robinson, X. Sun, H. Dai, PEGylated nanographene oxide for delivery of water-insoluble cancer drugs, *J. Am. Chem. Soc.* 130, 10876–10877p (2008).
17. L. Zhang, J. Xia, Q. Zhao, L. Liu, Z. Zhang, Functional graphene oxide as a nanocarrier for controlled loading and targeted delivery of mixed anticancer drugs, *Small* 6, 537–544p (2010).
18. C.L. Weaver, J.M. LaRosa, X. Luo, X.T. Cui, Electrically controlled drug delivery form graphene oxide nanocomposite films, *ACS Nano* 8, 1834–1843p (2014).
19. N.M. Kenna, P. Calvert, A. Morrin, G.G. Wallace, S.E. Moulton, Electro-stimulated release from a reduced graphene oxide composite hydrogel, *J. Mater. Chem. B* 3, 2530p (2015).
20. P. Matteini, F. Tatini, L. Cavigili, S. Ottaviano, G. Ghini, R. Pini, Graphene as a photothermal switch for controlled drug release, *Nanoscale* 6, 7947p (2014).
21. Z. Yan, D. zhao, X. Yi, R. Zhuo, F. Li, Steric protected and illumination-activated tumor targeting accessory for endowing drug-delivery system with tumor selectivity, *Adv. Funct. Mater.* 24, 1799–1807p (2014).
22. D. Wang, S. Wu, Red-light responsive supramolecular valves for photocontrolled drug release from mesoporous nanoparticle, *Langmuir* 32 (2016) 632–636.
23. Y.-W. Wang, Y.-Y. Fu, Q. Peng, S.-S. Guo, G. Liu, J. Li, H.-H. Yang, G.-N. Chen, Dye-enhanced graphene oxide for photothermal therapy and photoacoustic imaging, *J. Mater. Chem. B* 1, 5762–5767p (2013).
24. Z.M. Markovic, L.M. Harhaji-Trajkovic, B.M. Todorovic-Markovic, D.P. Kepoc, K.M. Arsinin, S.P. Jovanovic, A.C. Pantovic, M.D. Dramicanina, V.S. Trajkovic, *Biomaterials* 32, 1121p (2011).
25. B.P. Timko, M. Arruebo, S.A. Shankrappa, J.B. McAlvin, O.S. Okonkwo, B. Mizrahi, C.F. Stefanescu, L. Gomez, J. Zhu, A. Zhu, J. Santamaria, R. Langer, D.S. Kohane, Near- infrared(actuated devices for remotely controlled drug delivery), *PNAS* 111, 1349–1354p (2014).
26. E. Akhavan, E. Ghaderi, Graphene nanomesh promises extremely efficient in vivo photothermal therapy, *Small* 9, 3593p (2013).
27. T. Taqner, R. Marks, Delivering drugs by the transdermal route: review and comments, *Skin Res. Technol.* 14, 249–260p (2008).
28. G. Cevc, G. Blume, A. Schatzlein, D. Gebauer, The skin: a pathway for systematic treatment with patches and lipid-based carriers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 18, 349–378p (1996).
29. D.P. Wermeling, S.L. Banks, D.A. Hudson, H.S. Gill, J. Gupta, M.R. Prausnitz, A.L. Stinchcomb, Microneedles permit transdermal delivery of a skin-impermeant medication to humans, *PNAS* 105, 2058–2063p (2008).

30. M.R. Prausnitz, S. Mittagotri, R. Langer, *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 115–124p (2004).
31. T. Hampton, Breaking barriers in transdermal drug delivery, *J. Am. Med. Assoc.* 293, 2083p (2005).
32. A.C. Williams, B.W. Barry, Penetration enhancers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 603–618p (2004).
33. H.K. Vaddi, et al., Human skin penetration of branched chain 3-O-alkyl ester and carbonate prodrugs of naltrexone, *Pharm. Res.* 22, 758–765p (2005).
34. Y. Chen, Y. Shen, X. Gui, C. Zhang, W. Yang, M. Ma, S. Liu, M. Zhang, L.P. Wen, Transdermal protein delivery by coadministered peptides identified via phage display, *Nat. Biotechnol.* 24, 455–460p (2006).
35. S. Yang, F. Wu, J. Liu, G. Fan, W. Welsh, H. Zhu, T. Jin, Phase-transition microneedle patches for efficient and accurate transdermal delivery of insulin, *Adv. Mater.* 25, 4633–4641p (2015).
36. Y. Li, L. Guo, W. Lu, Laser ablation-enhanced transdermal drug delivery, *Photon Lasers Med.* 2, 315–322p (2013).
37. M.R. Prausnitz, R. Langer, Transdermal drug delivery, *Nat. Biotechnol.* 26, 1261–1268p (2008).
38. J. Vanakoski, T. Seppala, Heat exposure and drugs. A review of the effects of hyperthermia and pharmacokinetics, *Clin. Pharmacokinet.* 34 (1998) 311–322.
39. K.K. Peersen, M.L. Rousing, C. Jensen, L. Arendt-Nielsen, P. Gazerani, Effect of local controlled heat on transdermal delivery of nicotine, *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* 3, 236–242p (2011).
40. B.P. Timko, D.S. Kohane, Prospects for near-infrared technology in remotely triggered drug delivery, *Expert Opin.* 11, 1681–1685p (2014).
41. R. Patel, S. Naik, J. Patel, A. Baria, *Arch. Pharm. Sci. Res.* 1, 212p (2009).
42. B. Godin, E. Touitou, Transdermal skin delivery: predictions for human from in vivo, ex vivo and animal models, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 1152–1161p (2007).
43. A.S. Can, M.S. Erdal, S. Gungor, Y. Ozsoy, Optimization and characterisation of chitosan films for transdermal delivery of ondansetron, *Molecules* 18, 5455–5471p (2013).
44. R.M. Al Abood, S. Talegaonkar, M. Tariq, F.J. Ahmad, Microemulsion as a tool for the transdermal delivery of ondansetron for the treatment of chemotherapy induced nausea and vomiting, *Colloids Surf. B* 101, 143–151p (2013).
45. H.S. Gwak, I.S. Oh, I.K. Chun, Transdermal delivery of ondansetron hydrochloride: effects of vehicles and penetration enhancers, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 30, 187–194p (2004).

46. O. Fellahi, M.R. Das, Y. Coffinier, S. Szunerits, T. Hadjersi, M. Maamache, R. Boukherroub, Silicon nanowire arrays-induced graphene oxide reduction under UV irradiation, *Nanoscale* 3, 4662–4669p (2011).
47. S. Stankovich, D.A. Dikin, R.D. Piner, K.A. Kohlhaas, A. Kleinhammes, Y. Jia, Y.Wu, S.T. Nguyen, R.S. Ruoff, Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide, *Carbon* 45, 1558p (2007).
48. In Vitro Release Testing Methods for Semisolid Formulations. Particle Sciences - Technical Brief , practical science, drug development service, Volume 10,2009, P. A, Sensor Applications of Polyimides, InTech, 199–214p (Chapter 10) 2012.
49. D. Wilson, H.D. Stenzenberger, P.M. Hergenrother, Polyimides, Chapman & Hall, London, 1990.
50. D. Sui, Y. Huang, L. Hung, J. Liang, Y. Ma, Y. Chen, Flexible and transparent electrothermal film heaters based on graphene materials, *Small* 7, 3186–3192p (2011).
51. Y.M. Bae, Y.I. Park, S.H. Nam, J.H. Kim, K. Lee, H.M. Kim, B. Yoo, J.S. Choi, K.T. Lee, T. Hyeon, Y.D. Suh, Endocytosis, intracellular transport, and exocytosis of lanthanidedoped upconverting nanoparticles in single living cells, *Biomaterials* 33, 9080–9086p (2012).
52. S.H. Nam, Y.M. Bae, B.J. Park, J.H. kim, H.M. Kim, J.S. Choi, K.T. Lee, T. Hyeon, Y.D. Suh, Long-term real-time tracking of lanthanide ion doped upconverting nanoparticles in living cells, *Angew. Chem. Int. Ed.* 50, 6093–6097p (2011).
53. W.R. Lee, S.C. Shen, K.H. Wang, C.H. Hu, J.Y. Fang, The effect of laser treatment on skin to enhance an control transdermal delivery of 5-fluorouracil, *J. Pharm. Sci.* 91, 1613–1626p (2002).
54. R. Kaufmann, C. Beier, Laser skin ablation: an update on aesthetic and medical indications, *Med. Laser Appl* 19, 212–222p (2004).
55. S. Ramadan, L. Guo, Y. Li, B. Yan, W. Lu, Hollow copper sulfide nanoparticle-mediated transdermal drug delivery, *Small* 8, 3143–3150p (2012).
56. K. Guth, M. Schäfer-Korting, E. Fabian, R. Landsiedel, B. van Ravenzwaay, Suitability of skin integrity tests for dermal absorption studies in vitro, *Toxicology* 29, 113–123p (2015).
57. K.K. Petersen, M.L. Rousing, C. Jensen, L. Arendt-Nielsen, P. Gazerani, Effect of local controlled heat on transdermal delivery of nicotin, *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* 3, 236–242p (2011).
58. R.C. Mashru, V.B. Sutariya, M.G. Sankalia, J.M. Sankalia, Effect on pH on in vitro permeation of ondansetron hydrochloride across porcine buccal mucosa, *Pharm. Dev. Technol.* 10, 241–247p (2005).

Chapitre V :
Libération contrôlée des
médicaments (ODS - AM)
par voie électrochimique

Introduction

Malgré les avantages d'un contrôle électrochimique de la libération du médicament, les systèmes de libération électrochimique à intérêt thérapeutique qui ont été développés jusqu'à présent ne sont pas nombreux. Nous présentons dans ce chapitre le développement d'une plate-forme électrochimiquement activable pour l'administration de médicaments à la demande. Il est basé sur des électrodes souples en un film mince d'or, revêtues d'oxyde de graphène réduit poreux (prGO), sur lesquels le médicament d'intérêt est préalablement intégré. Deux médicaments différents sont étudiés ici: le chlorhydrate d'ondansétron (ODS), utilisé pour prévenir les nausées et les vomissements, causés par la chimiothérapie et la radiothérapie, et l'ampicilline (AM) un antibiotique utilisé pour prévenir et traiter un certain nombre d'infections bactériennes, comme celles des infections des voies respiratoires, des infections des voies urinaires et de la méningite.

V.1. Le contrôle électrochimique de la libération des médicaments

Le développement d'une plate-forme pour une distribution efficace et à la demande de divers médicaments reste une tâche inachevée. Alors qu'une grande variété de véhicules sensibles aux stimuli pour l'administration des médicaments à l'échelle nanométrique et microscopique a été conçue et testée. Pour chaque médicament, des formulations spéciales doivent être conçues avec précautions en tenant compte des propriétés physicochimiques de la thérapeutique. Des efforts considérables sont consacrés ces dernières années dans le domaine de l'administration des médicaments utilisant des structures poreuses comme matrices de chargement de médicaments, en raison de leur grande surface, de leurs pores ajustables et de leurs architectures de surface bien définies [1-5].

V.1.1. L'utilisation de l'oxyde de graphène réduit poreux (prGO) pour délivrance des médicaments

Les nanostructures poreuses à base de graphène telles que l'oxyde de graphène réduit poreux (prGO) fournissent des propriétés électrochimiques supérieures par rapport à rGO en plus de leur haute résistance mécanique [6, 7]. Alors que l'architecture de prGO est utilisée pour la réalisation de dispositifs de stockage d'énergie à haute performance [8-11] et pour la détection [7-12], leur avantage pour le chargement et la libération de médicaments n'a pas encore été découvert. Au fur et à mesure que la porosité résidente augmente la surface

spécifique, on s'attend à ce que le chargement des médicaments sur ces matériaux nanostructurés soit plus élevé.

V.1.2. Le chargement et la libération électrochimique des médicaments sur prGO

Dans ce travail, nous démontrons l'intérêt de l'oxyde de graphène réduit poreux (prGO) pour le chargement de médicaments. La simulation électrochimique est devenue une méthode particulièrement intéressante pour l'administration à la demande de produits thérapeutiques [13-18] et sera utilisée ici comme stratégie de libération. Sans doute, les nanostructures de prGO sont des plateformes idéales pour le chargement et la libération électrochimique de médicaments.

Leur surface spécifique élevée ainsi que l'abondance des π -électrons localisés à la surface des nanofeuillets, permettent une interaction avec la partie aromatique du médicament, ce qui permet d'obtenir une capacité de charge élevée, et leurs propriétés conductrices les rendent idéales pour les applications électrochimiques.

Le dépôt d'une matrice prGO chargée de médicament sur des électrodes en Kapton revêtu d'or (K / Au) (Figure V.1) donne des interfaces flexibles, qui peuvent être testées électrochimiquement. En effet, malgré tous les avantages offerts par l'électrochimie, tels qu'un faible coût, un excellent contrôle du potentiel ou du courant appliqué, etc., seule quelques poignées de systèmes de libération électrochimiques des médicaments ont des concentrations thérapeutiques pertinentes.

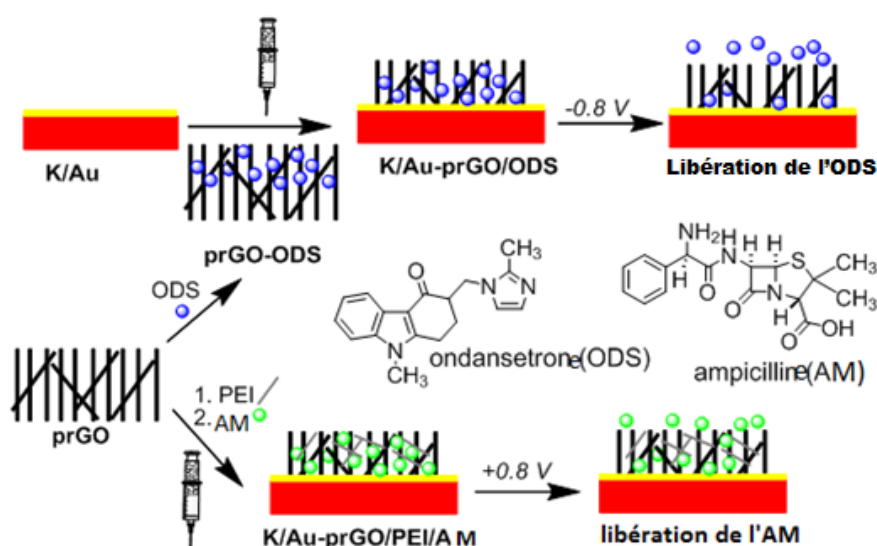


Figure V.1. Illustration schématique de la préparation d'interfaces flexibles à base de Kapton / Au modifiées avec de l'oxyde de graphène réduit poreux (prGO) chargé d'ondanestron (ODS) et de prGO modifié avec polyéthylèneimine (PEI) chargé d'ampicilline (AM) pour une libération électrochimique déclenchée à la demande.

V.1.3. Le choix des médicaments utilisés pour la délivrance

Deux médicaments différents ont été testés pour le chargement sur prGO et la libération électrochimique: ondanestron (ODS) et ampicilline (AM).

L'ondansétron (ODS), voire le chapitre IV [19-24]

Ampicilline (AP)

L'autre médicament à étudier est l'antibiotique l'ampicilline (AM) car le traitement des infections bactériennes reste toujours une des tâches les plus stimulantes dans le champ biomédical. Avec l'utilisation excessive d'antibiotiques et le nombre croissant de bactéries multirésistantes, le développement de systèmes d'administration d'antibiotiques à la demande est une stratégie pratique pour réduire la génération de résistance aux antibiotiques, et augmenter la durée de vie des nouveaux antibiotiques [26-28]. Les polymères biodégradables ont été considérées et étudiées depuis une décennie comme vecteurs de livraison d'antibiotiques pour le traitement local des infections [26, 29-31]. Dans ces systèmes, la dégradation et l'érosion de la matrice entraînent la libération d'antibiotiques encastrés avec des taux de libération d'antibiotiques souvent faibles.

V.2. Protocole expérimental

V.2.1. Matériaux utilisés

Le chlorhydrate d'Ondansetron (ODS), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'hydroxyde de sodium (NaOH), l'hydrazine monohydraté, l'hexacyanoferrate de potassium (II) ($[K_4Fe(CN)_6]$), la polyéthylèneimine ramifiée (Mw B 25 000) ont été achetés au près de Sigma - Aldrich (Darmstadt, Allemagne) .

La poudre d'oxyde de graphène (GO) a été achetée chez Graphenea, en Espagne et l'ampicilline (AM) chez Fisher Scientific. Des feuilles de Polyimide Kapton HN ayant une épaisseur de 125 μm ont été obtenues chez DuPont (Circleville, OH, USA).

V.2.2. Synthèse des matériaux (rGO, prGO)

La méthode de synthèse de (rGO, prGO) a été déjà présentée dans le chapitre III [32].

V.2.3. Chargement de rGO ou de prGO avec des médicaments

V.2.3.1. Ondansétron (ODS)

rGO ou prGO ($0,5-1 \text{ mg mL}^{-1}$) ont été traités aux ultrasons avec de l'ondansétron ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) pendant 2 h sous agitation. Tous les échantillons ont été centrifugés à $13\,500 \text{ tr / min}$ pendant 30 minutes. La concentration d'ODS chargée sur la matrice de rGO ou prGO a été déterminée en utilisant la spectroscopie UV / vis à 312 nm .

V.2.3.2. Ampicilline (AM)

Une matrice prGO et prGO / PEI a été chargée par l'ampicilline (AM) en mélangeant avec $10 \mu\text{l}$ de solution AM (10 mg mL^{-1}) avec prGO / PEI ($0,1-1 \text{ mg mL}^{-1}$, à un rapport en volume de 1/1) et en agitant les suspensions pendant 2 h à température ambiante. La matrice prGO / PEI a été obtenue par mélange de deux substances à un rapport en volume de 1/1 ($1 - 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$) et agitation pendant 30 minutes à température ambiante. Tous les échantillons ont été centrifugés à $13\,500 \text{ tr / min}$ pendant 30 min. La concentration de AM chargée sur la matrice prGO / PEI a été déterminée en utilisant une analyse HPLC.

Le PEI polyéthylèneimine a été utilisé avec l'AP pour charger la surface du prGO positivement et faciliter au AP de s'y attacher et former la matrice.

V.2.4. Modification des feuilles de Kapton revêtues d'or avec rGO / ODS, prGO / ODS, prGO / AM ou prGO / PEI / AM

Les feuilles de Kapton ($10 \times 10 \text{ mm}^2$) ont d'abord été nettoyées avec de l'acétone dans un bain d'eau à ultrasons pendant 30 minutes, ensuite dans de l'isopropanol pendant 10 minutes puis séchées sous un courant d'azote. Les films Kapton dorés ont été préparés par évaporation thermique de 5 nm de titane et 50 nm d'or sur des interfaces Kapton nettoyées. Le titane est utilisé comme une couche d'adhérence entre la surface d'or et Kapton. La distribution (par goutte à goutte) de rGO / ODS ou prGO / ODS ou prGO / AM ou prGO / PEI / AM sur Kapton / Au (trois fois) a abouti à K / Au-rGO / ODS ou K / Au-prGO / ODS ou K / Au - prGO / AM ou K / Au-prGO / PEI / AM électrodes flexibles utilisées dans ce travail.

V.2.5. Instrumentation

La Microscopie Electronique à Balayage (MEB), la Microscopie Electronique à Transmission (MET), les Mesures UV / Vis, les Mesures du potentiel Zeta, les Mesures Electrochimiques et la Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) : leurs techniques ont été décrites dans les chapitres III et IV.

V.2.6. Quantification des doses des médicaments

V.2.6.1. Quantification d'ODS par UV-Vis

La concentration d'ODS chargée sur des films rGO ou prGO et libérée des électrodes K / Au-rGO / ODS ou K / Au-prGO / ODS a été déterminée à l'aide d'une spectroscopie UV-vis. D'abord, une courbe d'étalonnage d'une série de solutions ODS de différentes concentrations a été établie. Dans le cas de la détermination de l'ODS chargée sur rGO ou prGO, à l'aide de la concentration de ODS du surnageant de la matrice on peut déterminer la concentration de l'ODS capté par le graphène, dans le film rGO ou prGO selon:

$$[\text{ODS}]_G = [\text{ODS}]_{\text{initial}} - [\text{ODS}]_{\text{surnageant}}$$

Avec $[\text{ODS}]_G$ = concentration d'ODS sur la matrice rGO ou prGO ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

Avec $[\text{ODS}]_{\text{initial}}$ = concentration initiale de ODS en solution ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$)

Avec un $[\text{ODS}]_{\text{surnageant}}$ = concentration d'ODS sur le surnageant ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

Dans le cas de la libération, la concentration l'ODS dans la solution d'électrolyte a été déterminée directement.

V.2.6.2. Quantification de l'ampicilline (AM) par HPLC

La concentration d'AM chargée sur prGO / PEI a été déterminée par un système HPLC (Shimadzu, Tokyo, Japon), les échantillons sont injectés à un volume de 40 mL et la longueur d'onde de détection était de 227 nm. D'abord, une courbe d'étalonnage d'une série de solutions AM de différentes concentrations est réalisée. La concentration de l'AM restant dans la solution surnageante utilisée pour le chargement est mesurée, ce qui permet de déterminer la concentration d'AM dans le film prGO / PEI. C'est comme décrit pour l'ODS.

V.2.7. La libération électrochimique des médicaments

V.2.7.1. Ondansetron (ODS)

Des expériences de libération ont été réalisées dans 1 mL de PBS (0,1 M, pH 7,4). La quantité d'ODS libérée dans la solution d'électrolyte est déterminée par spectroscopie UV-vis à 312 nm, en utilisant une courbe d'étalonnage avec une des concentration (s) d'ODS comprise entre 1 et $60 \mu\text{g mL}^{-1}$.

V.2.7. 2. Ampicilline (AM)

Des expériences d'administration ont été réalisées dans 1 mL de PBS (0,1 M, pH 7,4). La quantité d'AM libérée dans la solution d'électrolyte est déterminée par analyse (HPLC) (figure V.12), en utilisant une courbe d'étalonnage avec une concentration AP comprise entre 5 et 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (figure V.12 , y (zone) = $1,11 + 0,589 \times [\text{AM}]$ (mg mL^{-1} , $R = 0,999$)).

V.2.8. Conditions de croissance bactérienne

Une seule colonie C43 (DE3) E. coli de la plaque de gélose LB est inoculée pendant une nuit dans du bouillon Luria Bertani (LB) à 37 ° C avec un tremblement modéré (180 150 tr / min). Sur une dilution de 50 fois, l'incubation est prolongée jusqu'à ce que l'OD₆₀₀ atteigne 0,6 - 1.

V.2.9. Viabilité des cellules bactériennes

Après la libération électrochimique d'AM, la survie de la bactérie est mesurée en déterminant le titre de bactéries viables capables de se développer. Une série de dilutions de 10 fois des solutions bactériennes dans une solution PBS est repérée dans des aliquotes de 10 μL sur du milieu LB-agar. Le dénombrement visuel du nombre de colonies lors d'une incubation pendant une nuit à 37 °C a permis de lire les concentrations initiales et finales de la souche E. coli dans le cfu mL^{-1} .

V.3. Résultats et discussion

V.3.1. Caractérisation des électrodes K/Au modifiée par rGO et prGO

➤ *Par MEB*

La figure V.2. montre les images MEB de l'oxyde de graphène réduit par l'hydrazine (rGO) et le prGO.

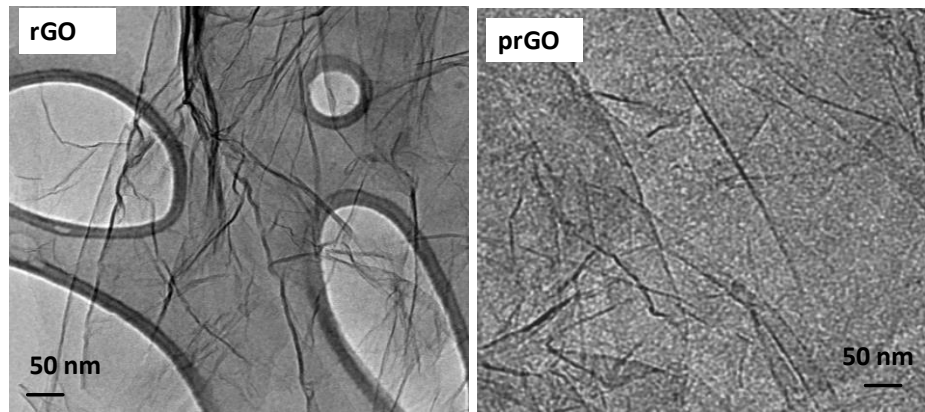


Figure V.2. Microscopie électronique à transmission électronique (TEM) images de (A) oxyde de graphène réduit (rGO), (B) oxyde de graphène réduit poreux (prGO).

Le rGO et le prGO sur le film en caoutchouc sur le film Kapton doré (figure V.3.) entraînent des interfaces électriques flexibles et souples qui peuvent être facilement mises en place sur le corps humain. Le choix du 4,4'-oxydiphénylène-pyromellitimide, enregistré sous la dénomination Kapton, est basé sur sa haute stabilité thermique ($> 300^{\circ}\text{C}$), sa résistance chimique ainsi qu'une excellente souplesse en plus des propriétés adhésives observées.

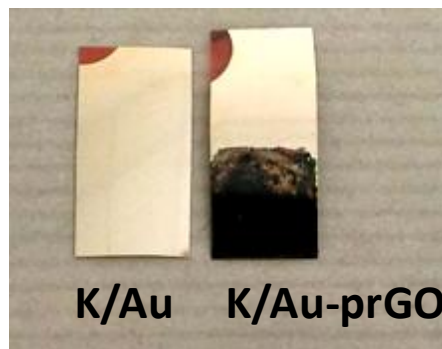


Figure V.3. Photo d'électrode flexible avant et après revêtement avec prGO par la technique goutte par goutte (drop casting).

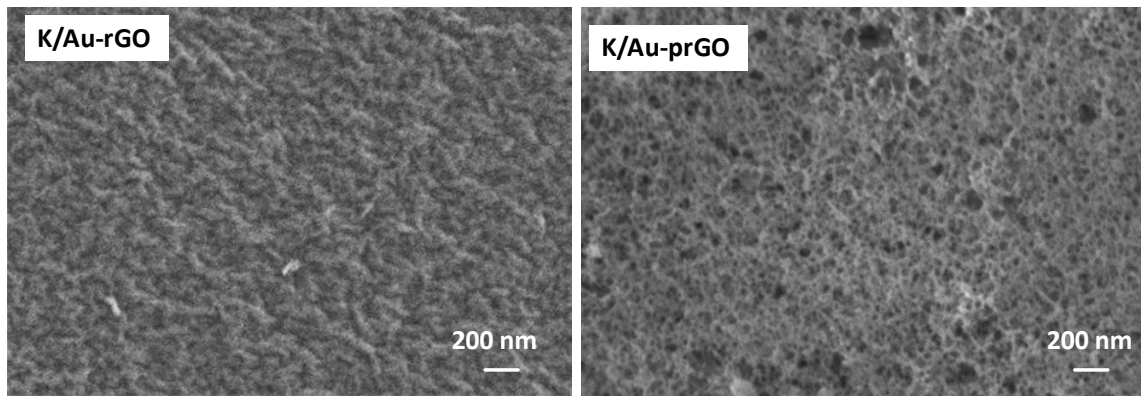


Figure V.4. Images MEB de K / Au-rGO et K / Au-prGO.

➤ *Par méthode électrochimique (voltammétrie cyclique) CV*

La figure V.5. présente les réponses voltamétriques cycliques des électrodes K / Au avant et après revêtement avec rGO ou prGO utilisant $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ en tant que couple redox. Des signaux électrochimiques bien définis sont observés dans les trois cas, avec une augmentation considérable du courant redox pour K / Au recouvert de prGO.

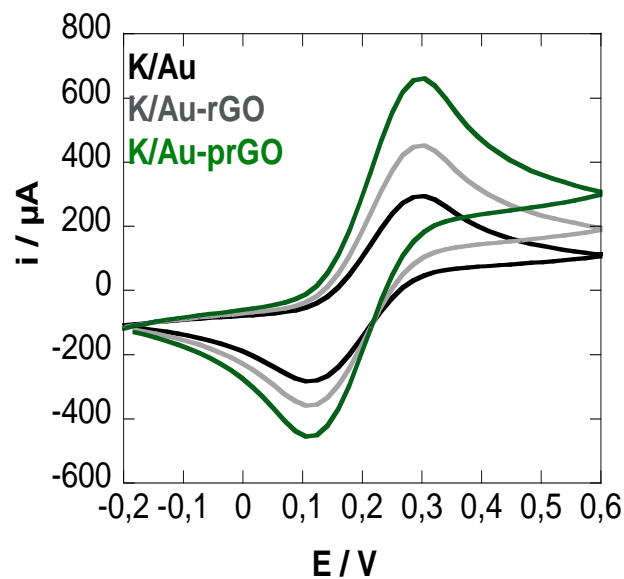


Figure V.5. Voltammogrammes cycliques de K/Au (noir), K/Au- rGO (gris) et K/Au- prGO (vert) en utilisant $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (5 mM) / PBS (0,1 M), taux de balayage = 50 mV s^{-1} .

L'augmentation du courant est en corrélation avec la surface spécifique (Figure V.4.) et les bonnes propriétés électroniques de prGO comme indiqué précédemment. Curieusement, même en flexion, l'électrode ne modifie pas le comportement électrochimique de l'interface électrique.

V.3.2. Chargement et libération électrochimique de l'ODS

V.3.2.1. Chargement de l'ODS sur rGO et prGO

Les deux matrices de rGO et prGO sont chargées avec l'ondansetron (ODS) en utilisant différents rapports en poids. ODS ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) est chargé sur rGO ou sur prGO en sondant une suspension des nanomatériaux respectifs à base de graphène dans de l'eau (pH 7) pendant 4 h. Le réseau pyridine positivement chargé de l'ODS est supposé interagir avec les surfaces de rGO et prGO par des interactions π - π soit empilables soit des interactions et / ou électrostatiques, bien que d'autres contributions telles que les interactions hydrogène et / ou van der Waals ne puissent pas être exclues.

V.3.2.2. Quantification de l'ODS chargé sur le rGO et prGO par utilisation de UV/ Vis

La spectroscopie UV / Vis est utilisée pour la quantification de la ODS résiduelle en solution (figure V.6.), où une relation linéaire entre la bande d'absorption à 312 nm et la concentration d'ODS est déterminée entre 1 et $60 \mu\text{g mL}^{-1}$.

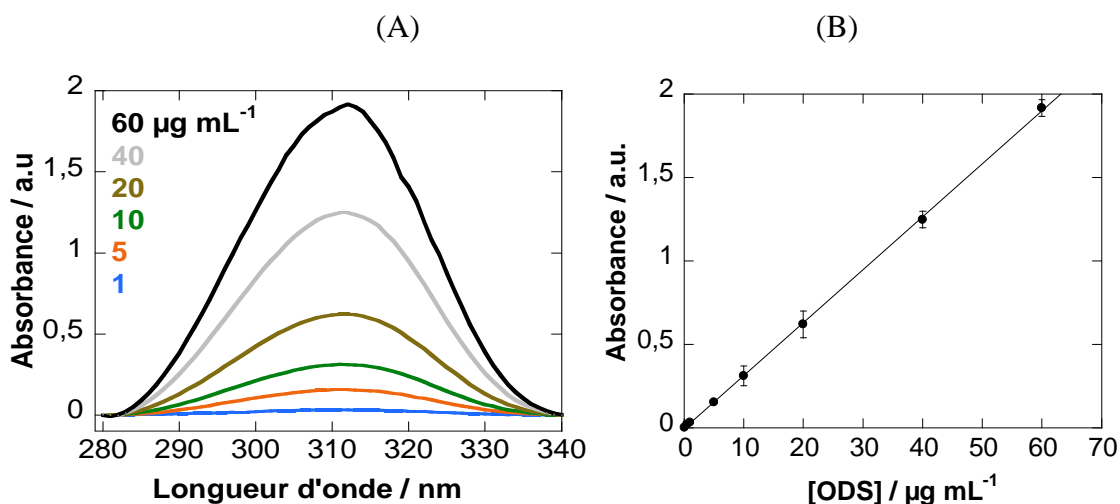


Figure V.6.(A) Spectre UV / Vis de différentes concentrations d'ODS , (B) Courbe d'étalonnage correspondante.

D'après la figure V.7. on a un rapport pondéral rGO ou PRGO / ODS de 0,5 ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$ rGO ou prGO et $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ODS), le prGO a montré une capacité de chargement trois fois plus élevée pour les ODS. Utilisant un rapport pondéral de prGO / ODS = 1/1, une efficacité de chargement de 99% est déterminée.

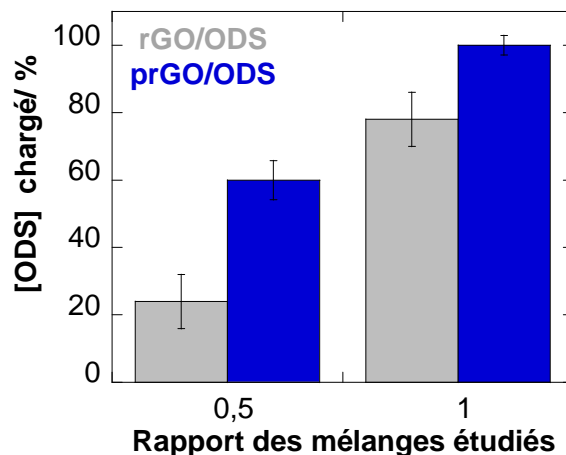


Figure V.7. Capacité de chargement de rGO (gris) et prGO (bleu) par ODS ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) à $\text{pH} = 7$ en modifiant les rapports rGO / ODS et prGO / ODS;

La capacité de chargement de l'ODS sur le prGO dépend du pH, avec un chargement de l'ODS plus élevé au $\text{pH} \geq 7$ (Figure V.8.), probablement en raison de la meilleure solubilité de l'ODS à un pH plus alcalin. Le chargement ODS amélioré sur le prGO nous a incités à utiliser ces nanostructures pour une caractérisation supplémentaire et des études de libération déclenchées électrochimiquement.

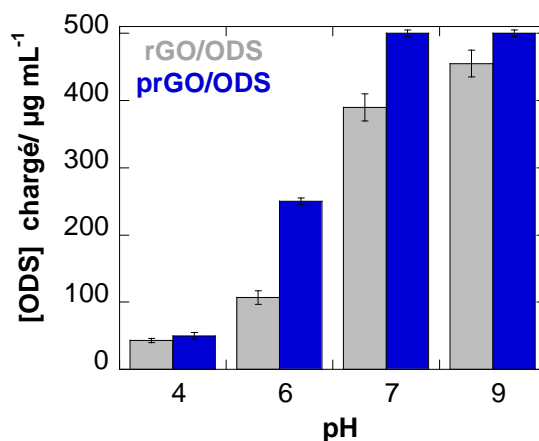


Figure V.8. Influence du pH sur le chargement de l'ODS ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) sur le prGO ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$).

V.3.2.3. Libération électrochimique de l'ODS

➤ Etude de stabilité des électrodes K / Au-PRGO / ODS

Avant de déterminer la quantité de l'ODS libérée lors de l'activation électrochimique, la stabilité des électrodes K / Au-PRGO / ODS est établie. L'immersion des interfaces dans le

PBS pendant 1 jour à pH 7 entraîne une libération de $2 \pm 1\%$ ODS; Par la suite, aucune libération d'ODS n'est observée.

La voltamétrie cyclique (CV) d'une surface de K / Au-prGO / ODS dans le PBS (0,1 M, pH 7,4) (Figure V.8.) indique que l'ODS ne présente pas d'activité électrochimique. Par rapport à K / Au, la bande de réduction d'oxygène à environ -0,4 V est augmentée sur K / Au-prGO / ODS.

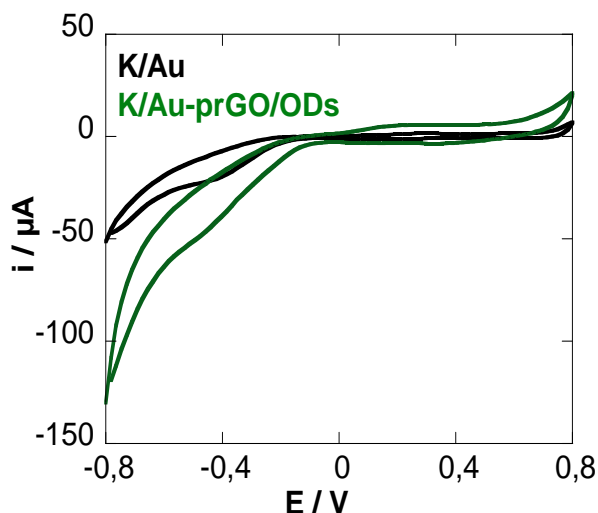


Figure V.9. Voltamétrie cycliques de K / Au (noir), K / Au-prGO / ODS (vert) dans PBS (0,1 M, pH 7,4), taux de balayage = 50 mV s^{-1} .

➤ *Application de différences de tension de courant de -0,8 et +0,8 V*

Pour évaluer les performances de la mise en œuvre électrochimique de l'interface K / Au-prGO / ODS dans des conditions physiologiques (pH = 7,4), des impulsions de tension différentes sont appliquées sur l'interface électrique et la quantité de l'ODS libérée est déterminée à l'aide d'une spectroscopie d'absorption UV / Vis.

La figure V.10. montre le profil de libération de l'ODS lors de l'application de -0,8 ou +0,8 V. Pour la comparaison, le pourcentage d'ODS passivement libéré (sans potentiel appliqué) est inclus dans la Figure 10. L'application d'un potentiel négatif de -0,8 V a entraîné une augmentation de la quantité de l'ODS par rapport à l'application de +0,8 V. Cependant, même dans ces conditions, une quantité considérable d'ODS est libérée de la matrice prGO-ODS.

La plus grande libération de médicament sous un biais potentiel négatif est censée être un pH local et des variations de charge. A un biais potentiel de $-0,8$ V, la réduction de l'oxygène dissous se produit, générant des ions OH^- [15].

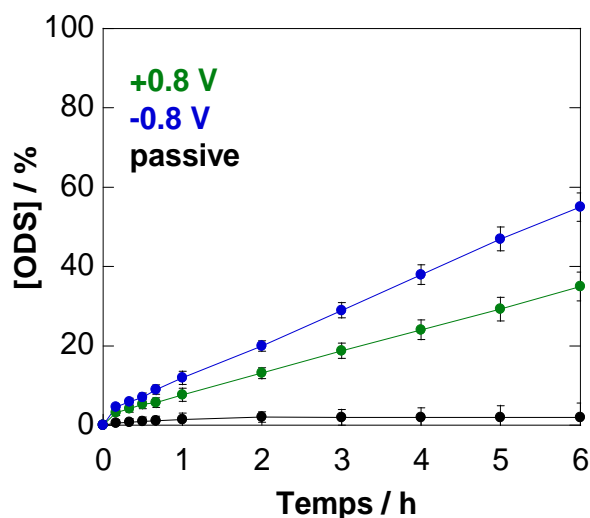


Figure V.10. La libération d'ODS déclenchée électrochimique dans le temps dans PBS (0,1 M, pH 7,4) après application de +0,8 V (vert), -0,8 V (bleu) et sous diffusion passive (aucun potentiel appliqué).

D'autre part, à un virage potentiel de +0,8 V, l'interface chargée positivement pourrait surmonter l'interaction électrostatique entre ODS (pKA d'environ 7,4) [33] et prGO, ce qui entraîne une libération significative de l'ODS avec le temps. Notamment, la libération passive (sans biais potentiel) entraîne une petite fraction de l'ODS libérée, sous-tend la stabilité de l'interface dans les conditions choisies et la nécessité d'un biais électrochimique pour la libération à la demande.

Par rapport à la libération d'insuline déclenchée électrochimiquement à partir de rGO, avec une libération de jusqu'à 70% en 30 minutes, la molécule d'ODS de taille plus petite, la libération est plutôt lente. Il est également contraire à l'administration photothermique d'ODS (chapitre IV) sur des taches cutanées activables par la photothermie: l'irradiation pendant 30 minutes a entraîné une libération de l'ODS de 15%, tandis que la libération électrochimique d'ODS après 30 minutes est comprise entre 5 et 7%. Cependant, l'approche photothermique a abouti à une libération maximale après 30 minutes d'irradiation, la libération d'ODS comme indiqué ici est constante sur une longue période de temps. A partir de la figure 10, le flux d'ODS de l'électrode en solution peut être déterminé à partir de la pente.

Après un laps de temps d'environ 1 h, le flux ODS (J) en solution est déterminé comme $47 \mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$. Un tel flux est très prometteur pour les études transdermiques de suivi où des flux ODS entre $1 \mu\text{g cm}^{-2}\text{h}^{-1}$ et $4 \mu\text{g cm}^{-2}\text{h}^{-1}$ sont signalés [24, 25, 34].

Considérant que la dose orale habituelle d'ODS est comprise entre 16 et 32 mg par jour et que la biodisponibilité orale de ODS est de 60%, pour un système efficace d'administration de l'ODS, environ 10 à 20 mg par jour devraient être livrés dans la circulation sanguine, soit 2,5 - 5 mg chaque 6 h [35]. L'électrode de K / Au-prGO / ODS de 1 cm^2 délivre environ $564 \mu\text{g}$ de ODS en 6 h. Une électrode d'environ $4\text{-}8 \text{ cm}^2$ de taille est théoriquement nécessaire pour fournir le montant journalier requis, c'est une taille raisonnable. Ce qui rend l'architecture aussi pratique, c'est que l'électrode K / Au peut être rechargée avec prGO / ODS (Figure V.11.).

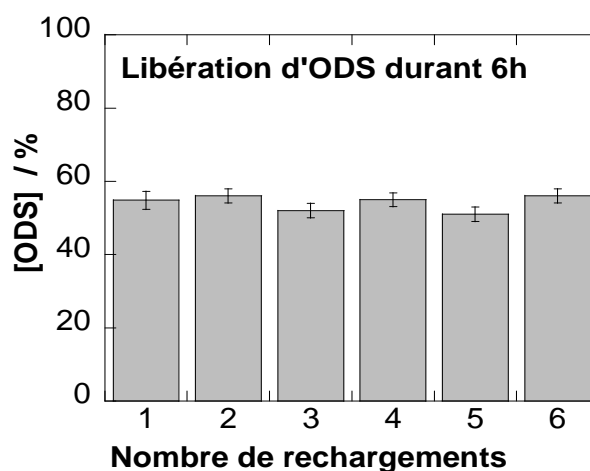


Figure V.11. Quantité de ODS libérée lors du rechargement du K / Au avec prGO / ODS pour plusieurs fois.

V.3.3. Chargement et libération de l'AM à partir d'électrodes modifiées

Les antibiotiques incorporés dans les systèmes de distribution locaux démontrent idéalement une efficacité large et suffisante ainsi qu'une stabilité chimique. Dans cette partie, nous avons choisi l'intégration de l'ampicilline (AM) dans la matrice de libération électrochimique. L'AM fait partie de la famille des aminopénicillines et la présence du cycle aromatique avec les fonctions acide aminé et acide carboxylique rend l'AM le plus susceptible d'interagir avec le prGO grâce à l'empilage $\pi\text{-}\pi$ et / ou des interactions électrostatiques.

V.3.3.1. Chargement de prGO / PEI par l'AM

La préservation du groupe amino lors de l'intégration dans le prGO est importante car cette fonction aide le médicament à pénétrer dans la membrane externe des bactéries Gram-

négatives. La capacité de chargement de prGO/PEI pour AM déterminée, à partir d'une analyse HPLC (Figure V.12.), où une relation linéaire entre 5 et 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ est observée, est cependant plutôt faible (Figure 13). AM a des groupes carboxyliques acides avec un $\text{pK}_a \approx 4-5$, étant ainsi ionisé au pH physiologique.

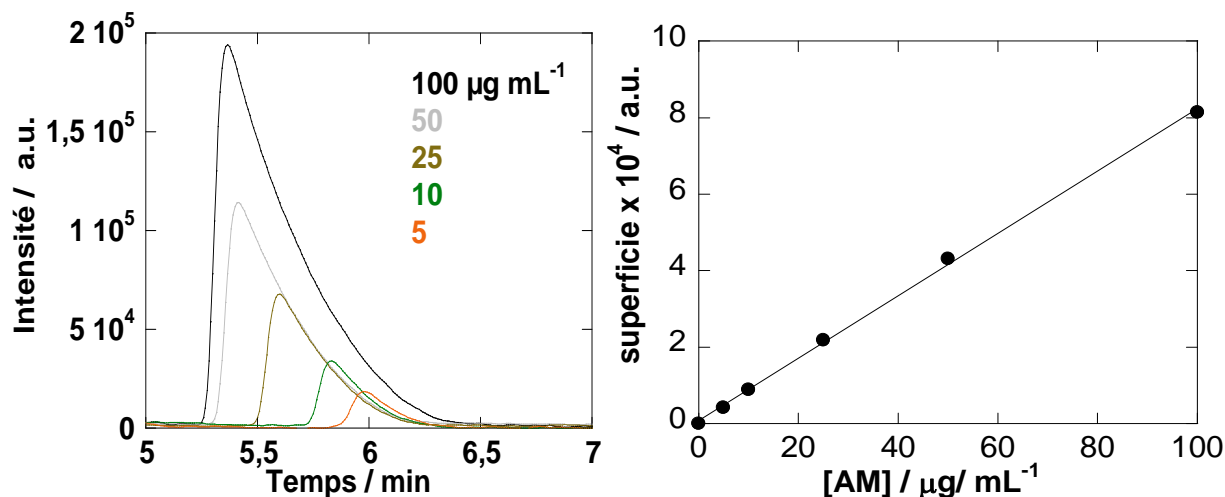


Figure V.12. Courbe HPLC d'ampicilline à différentes concentrations et courbe d'étalonnage correspondante.

La présence du groupe amino basique ($\text{pK}_a \approx 9$) rend AM un zwitterion au pH physiologique, car les groupes amino sont également majoritairement ionisés positivement. Comme prGO a un potentiel zêta de -19 ± 2 mV, il y a eu une répulsion électrostatique dans ce cas. Nous avons donc chargé AM sur prGO précédemment modifié avec du polyethylenimine (PEI) par agitation simple par sonication pendant 2 h à température ambiante. Le potentiel zêta de la matrice formée prGO / PEI est de $+41 \pm 2$ mV en raison de la présence PEI sur ces matrices, la capacité de chargement AM de 100% est obtenue en utilisant un rapport pondéral prGO / AP $\geq 2,5$ ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$ prGO / PEI et $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AM) (Figure V.13.).

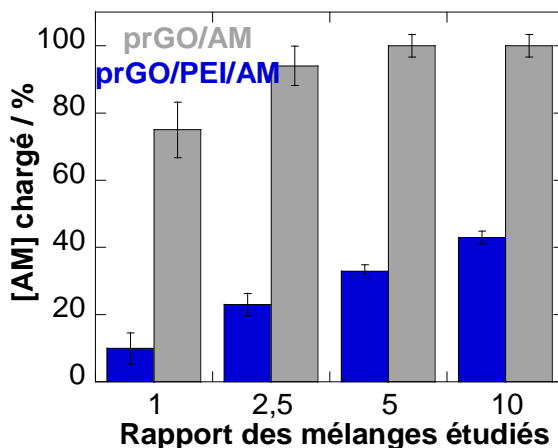


Figure V.13. Capacité de chargement de la matrice prGO (gris) et prGO / PEI avec AM ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) (bleu) lors de la variation des rapports prGO et prGO / PEI-AM.

V.3.3.2. Libération de l'AM à partir de la matrice prGO / PEI / AM

L'addition de PEI à la matrice prGO a également un effet positif sur la stabilité des électrodes modifiées AM (Figure V.14.): jusqu'à 60% de l'AM est libéré de prGO / PEI, dans le cas de prGO / PEI / AM uniquement $2 \pm 1\%$ sont libérés sur une durée de 2 h.

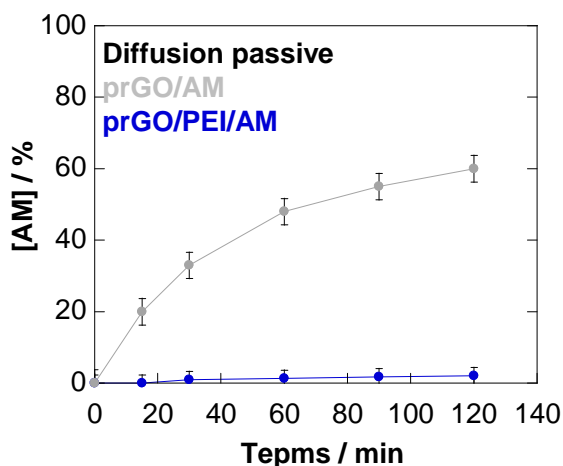


Figure V.14. Stabilité d'une interface électrochimique modifiée par goutte à goutte avec prGO / AM (gris) ou prGO / PEI / AM (bleu) lors de l'immersion pendant 2 h dans PBS ($0,1 \text{ M}$, pH 7.4) sans application d'un potentiel (diffusion passive).

L'application de $-0,8 \text{ V}$ pendant 2 h à l'interface électrique modifiée prGO / PEI / AM ne montre pas de libération AM significative, ce qui est comparable à celui de la sortie passive. L'application de $+0,8 \text{ V}$ montre en revanche une libération de $\approx 24\%$ (équivalent à $24 \mu\text{g mL}^{-1}$) sur une durée de 2 h (Figure V.15.).

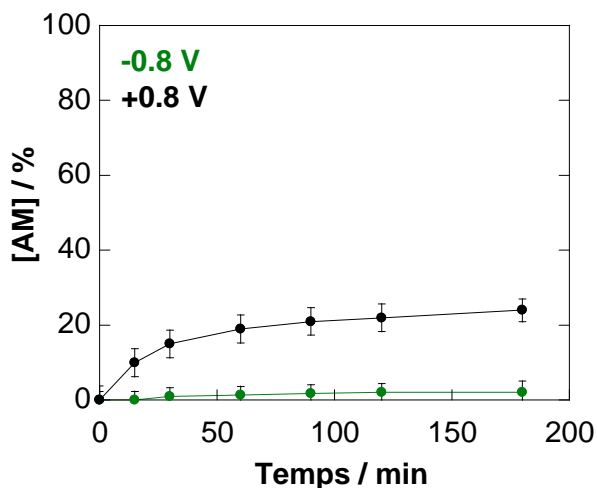


Figure V.15. Libération électrochimique de l'AM dans PBS (0,1 M, pH 7.4) à partir d'une matrice de l'AM à $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ lors de l'application de +0,8 V (vert), -0,8 V (noir).

V.3.3.3. Contrôle de l'activation de l'AM libéré à partir de la matrice prGO/PEI/AM

Les aminopénicillines sont généralement stables à l'état sec, mais en solution ces médicaments ne sont stables que pour de courtes périodes de temps. Après la libération électrochimique de l'AM, la survie de la bactérie a ainsi été mesurée en déterminant le titre de bactéries viables capables de se développer. La concentration minimale inhibitrice de AM à laquelle 50% des isolats de E. coli C43 ont été inhibés est déterminée expérimentalement comme $\text{CMI}_{50} = 4,9 \pm 0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (figure V.16.) était constituée des rapports passés.

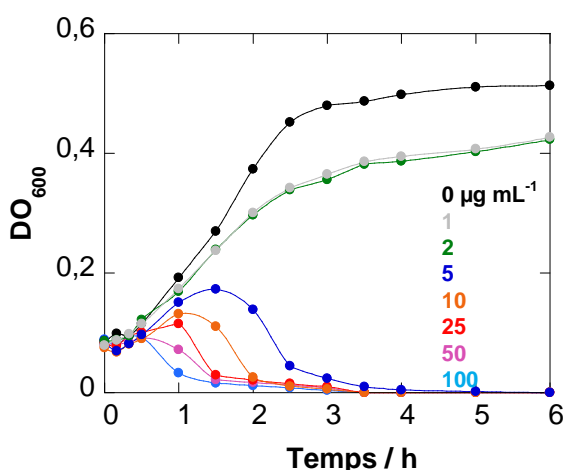


Figure V.16. Croissance planctonique de l'E. coli (inoculum de $1 \times 10^7 \text{ cfu mL}^{-1}$) en l'absence et présence de différentes concentrations d'AM (0 - $100 \mu\text{g mL}^{-1}$),

La figure V.17. montre les valeurs de l' DO_{600} (DO_{600} est la densité optique d'un échantillon mesuré à une longueur d'onde de 600 nm de l' *Escherichia coli* (est une méthode courante pour estimer la concentration de cellules bactériennes ou autres dans un liquide) déterminées après incubation d'*E. coli* pendant 2 h avec différents échantillons d'AM en utilisant $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ AM comme témoin négatif (inférieur à la valeur CMI_{50}) et $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ d'AM comme témoin positif (valeur CMI_{50}). Conformément au profil de libération électrochimique, environ $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ sont relâchés dans les premières 15 minutes, au-dessous de la valeur CMI_{50} , tandis qu'après 1 h, les $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ nécessaires sont libérés de la matrice.

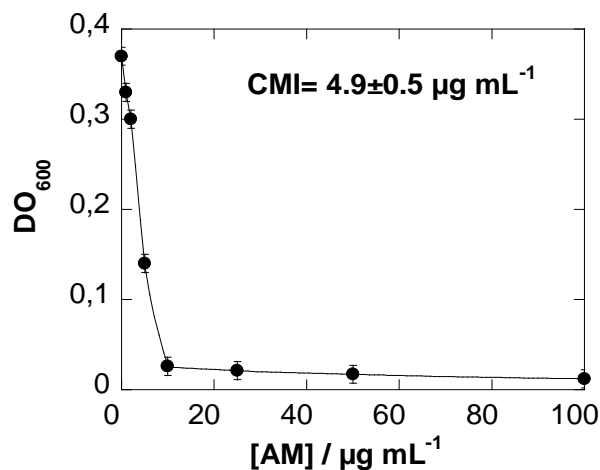


Figure V.17. Changement d' DO_{600} à 2 h (extrait de la Figure V.16B).

La figure V.18. montre une comparaison de l'action de l'AM sur les bactéries. Dans ce teste on a fait une comparaison de l'activation de l'AM pour la dose contrôle négatif $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ et le contrôle positif $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ avec l'AM libéré électrochimiquement à différents intervalles de temps lorsqu'ils sont incubés avec *E. coli* ($1 \times 10^8 \text{ cfu-mL}^{-1}$) pendant 2 h. On remarque que l'élimination des bactéries est presque totale pour le contrôle positif et l'administration de l'AM est à plus que de 15 minutes.

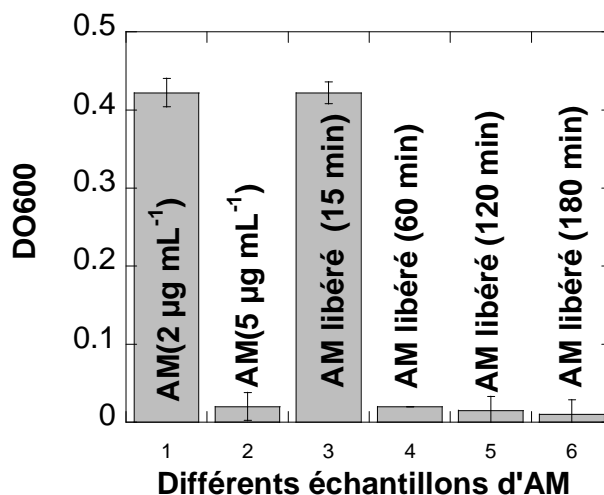


Figure V.18. Comparaison de l'action de l'AM gratuit (2 µg mL⁻¹, contrôle négatif), AM (5 µg mL⁻¹, contrôle positif) et AM libéré électrochimiquement à différents intervalles de temps lorsqu'ils sont incubés avec *E. coli* (1 x 10⁸ cfu-mL⁻¹) pendant 2 h.

Conclusion

En résumé, de nouvelles interfaces électrochimiques à base d'oxyde de graphène à porosité réduite ont été développées pour une administration efficace et à la demande de produits thérapeutiques. Nous avons démontré que l'adaptabilité de cette approche par le chargement de la matrice avec deux médicaments différents d'intérêt thérapeutique; Ondanestron (une nausée et des vomissements induits par la chimiothérapie) et l'ampicilline (un antibiotique à large bande contre les agents pathogènes gram positifs et négatifs). La polarisation de l'interface électrique à -0,8 V a entraîné un flux constant de 47 µg cm⁻² h⁻¹ d'ODS de l'interface en solution. Avec une dose thérapeutique requise de 415 - 830 µg h⁻¹ d'ODS dans la circulation sanguine, une électrode à une dimension de 10 cm² serait nécessaire. Dans le cas de l'ampicilline, le prGO chargé d'EPI était une matrice de chargement idéale, où, lors de l'application de concentrations de + 0,8 V bien au-dessus de la concentration minimale inhibitrice de l'AM pour *E. coli*, on pourrait libérer dans un intervalle de temps de 3 h. Nous croyons que cette approche peut être appliquée à tout médicament d'intérêt et contribuer à différentes thérapies biomédicales. Des expériences sur une éventuelle administration transdermique d'ODS et d'AM à l'aide de l'ODS libéré électrochimiquement sont actuellement en cours. Cela pourrait ouvrir de nouvelles techniques pour le développement de l'administration transdermique des médicaments à la demande assistée par électrochimie.

Références bibliographiques

1. R. Gurny, E. Doelker and N. A. Peppas, *Biomaterials*, 3, 27-32p (1982).
2. J. Salonen, L. Laitinen, A. M. Kaukonen, J. Tuura, M. Bjorkqvist, T. Heikkila, K. Vähä-Heikkilä, J. Hirvonen and V. P. Lehto, *J. Control Release*, 108, 362–374 p (2005).
3. S. Tang, B. Tian, Q. F. Ke, Z. A. Zhu and Y. P. Guo, *RSC Adv.*, 4, 41500-410509p (2014).
4. M. Xu, M. Dan Feng, R. Dai, H. Wu, D. Zhao and G. Zheng, *Nanoscale*, 3, 3329-3333p (2011).
5. P. Horcajada, T. Chalati, C. Serre, B. Gillet, C. Sebric, T. Baati, J. F. Eubank, D. Heurtaux, P. Clayette, C. Kreuz, J.-S. Chang, Y. K. Hwang, V. Marsaud, P.-N. Bories, L. Cynober, S. Gil, G. Férey, P. Couvreur and R. Gref, *Nat. Mater.*, 9, 172-178p (2010).
6. L. Jiang and Z. Fan, *Nanoscale*, 6, 1922-1945p (2014).
7. F. Chekin, S. K. Singh, A. Vasilescu, V. M. Dhavale, S. Kurungot, R. Boukherroub and S. Szunerits, *ACS Sens.*, 1, 1462–1470p (2016).
8. S. Han, D. Wu, S. Li, F. Zhang and X. Feng, *Adv. Mater.*, 26, 849-864p (2014).
9. G. Ning, Z. Fan, G. Wang, J. Gao, W. Qian and F. Wei, *Chem. Commun.*, 47, 5976-5978p (2011).
10. L. Ren, K. N. Hui, K. S. Hui, Y. Liu, X. Qi, J. Zhong, Y. Du and J. Yang, *Sci. Rep.*, 5, 14229p (2015).
11. S. K. Singh, V. M. Dhavale, R. Boukherroub, S. Kurungot and S. Szunerits, *App. Mater. Today*, 8, 141-149p (2017).
12. H. Maaoui, S. K. Singh, F. Teodorescu, Y. Coffinier, A. Barras, R. Chtourou, S. Kurungot, S. Szunerits and R. Boukherroub, *Electrochim. Acta*, 224, 346-354p (2017).
13. S. Szunerits, F. Teodorescu and R. Boukherroub, *Eur. Poly. J.*, 83, 467-477p (2016).
14. X. Luo and X. T. Cui, *Electrochem. Commun.*, 11, 402-404p (2009).
15. F. Teodorescu, L. Rolland, V. Ramarao, A. Abderrahmani, D. Mandler, R. Boukherroub and S. Szunerits, *Chem. Commun.*, 51, 14167-14170p (2015).
16. J. G. Hardy, D. J. Mouser, N. Arroyo-Curras, S. Geissler, J. K. Chow, L. Nguy, J. M. Kim and C. E. Schmidt, *J. Mater. Chem. B*, 2, 6809-6822 p (2014).
17. C. L. Weaver, J. M. LaRosa, X. Luo and X. T. Cui, *ACS Nano*, 8, 1834-1843p (2014).
18. L. Wu, J. Wang, N. Gao, J. Ren, A. Zhao and X. Qu, *Nano Res.*, 8, 2400-2414p (2015).

19. M. P. Rogers and L. Blackburn, *Clinical J. Oncology Nursing*, 14, 500-504p (2010).
20. A. S. Can, M. S. Erdal, S. Gungor and Y. Ozsoy, *Molecules*, 18, 5455-5471p (2013).
21. R. M. Al Abood, S. Talegaonkar, M. Tariq and F. J. Ahmad, *Colloids. Surf. B*, 101, 143-151 p (2013).
22. H. S. Gwak, I. S. Oh and I. K. Chun, *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, 30, 187-194p (2004).
23. K. Swain, S. Pattnaik, S. Chandra Sahu, K. Kumar Patnaik and S. Mallick, *J. Drug Targeting*, 18, 106-114p (2010),.
24. F. Teodorescu, G. Quéniat, C. Foulon, M. Lecoeur, A. Barras, S. Boulahneche, M. S. Medjram, T. Hubert, A. Abderrahmani, Boukherroub and S. Szunerits, *J. Control. Release*, 245, 137-146p (2017).
25. H. S. Mahadjan, B. V. Tatiya and P. P. Nerkar, *Power Technol.*, 221, 168-176p (2012).
26. L.-L. Li, J.-H. Xu, G.-B. Qi, X. Zhao, F. Yu and H. Wang, *ACS Nano*, 8, 4975–4983p (2014).
27. Z. Lu, J. Zhang, Z. Yu, Q. Liu, K. Liu, M. Li and D. Wang, *New J. Chem.*, 41, 432-436p (2017) .
28. X. Shi, H. Wu, Y. Li, X. Wei and Y. Du, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 101A, 1373–1378p (2013).
29. O. S. Kluin, H. C. van der Mei, H. J. Busscher and D. Neut, *Biomaterials*, 30, 4738-4742p (2009).
30. L. Chu, H. Gao, T. Cheng, Y. Zhang, J. Liu, F. Huang, C. Yang, L. Sji and J. Liu, *Chem. Commun.*, 52, 6265-6268p (2016).
31. P. Gao, X. Nie, M. Zou, Y. Shi and G. Cheng, *J. Antibiotics*, 64, 625-634p (2011).
32. T. Palaniselvam, K. Kashyap, S. N. Bhange, J.-B. Baek and S. Kurungot, *Adv. Funt. Mater.*, 26, 2150–2162p (2016).
33. G. Cevc, G. Blume, A. Schatzlein and D. Gebauer, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 18, 349-378 (1996).
34. R. C. Mashru, V. B. Sutariya, M. G. Sankalia and J. M. Sankalia, *Pharm. Dev. Technol.*, 10, 241-247 (2005).
35. H. S. Gwak, I. S. Oh and I. K. Chun, *Drug Develop. Ind. Pharmacy*, 30, 187-194p (2004).

Conclusion générale

Conclusion générale

L'objectif de notre travail de thèse est, d'une part la mise en place d'une nouvelle méthode électrochimique, à base de nanoparticules de graphène, pour une détection précoce et plus efficace des agrégations de protéines, et d'autre part, l'intégration de ces mêmes nanoparticules dans les thérapies biomédicales (consommation des médicaments) afin de remplacer les méthodes classiques à risques.

Dans la première partie de ce travail, nous avons réalisé une nouvelle interface électrochimique basée sur une électrode de carbone vitreux revêtue d'oxyde de graphène poreux (GC / prGO) permettant l'identification précoce et sensible de l'agrégation des protéines en suivant le changement du courant oxydatif des protéines. La nouveauté de ce travail réside dans l'exploration de la capacité des interfaces GC / prGO à capturer différents comportements d'agrégation. Le lysozyme est utilisé comme modèle pour suivre son agrégation par voie électrochimique, conduisant à la formation d'agrégats amyloïdes. La comparaison du pic d'oxydation du lysozyme par voltampérométrie impulsion différentielle (DPV) pour différentes architectures d'électrodes (GC, GC / rG et GC / prGO) a permis de montrer la plus grande sensibilité de l'interface GC / prGO par rapport aux électrodes vitreuses nues et aux électrodes revêtues d'oxyde de graphène réduit non poreux. Des expériences parallèles sont réalisées par fluorescence avec de la thioflavine T, par chromatographie d'exclusion de taille et par microscopie à force atomique (AFM). Ces tests ont, en outre, mis en évidence l'utilité de l'électrode GC / prGO pour visualiser de manière rapide et fiable les changements dans la structure de la protéine. A cet effet, nous recommandons, et en particulier, pour la capacité de mettre en évidence les changements liés aux premières étapes d'agrégation qui pourraient être indicatives du processus d'agrégation, l'électrode GC / prGO en combinaison avec DPV comme un nouvel outil analytique pour les études d'agrégation de produits biopharmaceutiques. La deuxième étape de cette partie, a démontré l'utilité de cette approche pour l'analyse d'une formulation d'insuline humaine injectable à action rapide, Humulin R, utilisée pour le traitement du diabète, ainsi que pour visualiser de manière rapide et fiable les changements dans la structure de la calcitonine.

La deuxième partie de ce travail porte sur la réalisation d'un système d'administration des médicaments par deux voies différentes, Photothermique, et Electrochimique.

La mise au point d'un patch cutané capable de contrôler l'administration transcutanée des produits thérapeutiques, par activation photothermique, fournit une solution unique pour la libération contrôlée de médicaments, sur des périodes à long terme. A cet effet, nous portons sur un patch transdermique flexible de l'ondansétron (ODS), qui sera libéré par déclenchement photothermique. L'ODS est un médicament couramment utilisé pour le traitement des nausées et des vomissements induits par la chimiothérapie et utilisé comme un composé modèle dans cette étude. Pour ce faire, une matrice d'oxyde de graphène réduit (rGO) chargé en ODS est déposée sur une surface de polyimide (Kapton). Il est démontré que les patches Kapton / rGO chargés d'ODS ont une haute performance de délivrance de médicament lors de l'irradiation avec un faisceau laser continu à 980 nm pendant 10 min, en raison d'un effet de chauffage photothermique induit. La capacité de libération transdermique des patches Kapton / rGO chargés d'ODS à travers la peau, est en outre étudiée, en utilisant la peau d'oreille de porcine comme modèle. Nous avons montré que la quantité cumulée et le flux d'ODS qui traversent la peau, dépendent fortement de la densité de puissance laser utilisée. À une irradiation de 5 W cm^{-2} , on a déterminé que le flux d'ODS à travers la peau de porc est de $1,6 \mu\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$. L'utilisation de tween 20 comme exhausteur de peau pourrait augmenter significativement le flux d'ODS à $13,2 \mu\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$. Bien que l'amélioration de la pénétration à travers la peau est comparable à celle obtenue avec d'autres activateurs de pénétration, bien connus (Williams et Barry, 2004), la supériorité et l'intérêt de l'approche proposée sont que le patch Kapton / rGO photoactivable de la peau, peut être chargé avec n'importe quels médicaments et thérapies d'intérêt, rendant notre approche extrêmement polyvalente. L'administration à la demande de médicaments lors d'une irradiation laser locale et la possibilité de recharger l'interface avec le médicament rendent cette nouvelle voie d'administration de médicaments très intéressante.

Le contrôle électrochimique de la libération de médicament est un système de libération à plusieurs avantages. Dans cette partie du travail, nous étudions le développement d'une plateforme activable électrochimiquement, pour l'administration de médicaments à la demande. Il est basé sur des électrodes en film mince d'or souple revêtues de nano-feuillets d'oxyde de graphène réduit poreux (prGO) sur lesquels le médicament a été préalablement intégré. Deux différents médicaments sont étudiés, le chlorhydrate d'ondansétron (ODS), que nous avons utilisé comme composé modèle dans la libération photothermique transdermique, et l'ampicilline (AM), un antibiotique pour prévenir et traiter certain nombre d'infections

bactériennes ; comme les infections des voies respiratoires, les infections des voies urinaires et la méningite.

Dans le cas des ODS, l'application d'un potentiel négatif de $-0,8V$ entraîne une libération prolongée et lente d'ODS avec un flux d'ODS de $47 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \text{h}^{-1}$. Dans le cas de l'ampicilline, nous montrons que prGO modifiée par la polyéthylèneimine (prGO / PEI) est une matrice extrêmement efficace pour son chargement avec l'AM. La capacité de chargement de l'AP de 100% est obtenue en utilisant un rapport pondéral prGO / AM $\geq 2,5$ ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$ prGO / PEI et $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ d'AM). Lors de l'application de $+ 0,8 V$, 24% d'AP sont libérés de l'interface électrique dans un laps de temps de 2 h. La concentration minimale inhibitrice de l'AM, à laquelle 50% [CMI₅₀] des isolats de E. coli C43 ont été inhibés, est déterminée expérimentalement comme $\text{CMI}_{50} = 4,9 \pm 0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. En plus l'AM libéré par voie électrochimique à partir de la matrice prGO / PEI / AM, n'a pas perdu son activité antibactérienne, comme le montrent les résultats des tests antimicrobiens.

En conclusion, les différents résultats obtenus, dans ce travail, illustrent les principaux avantages des approches développées pour les applications biomédicales du graphène.

Articles

Article 1

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/316287251>

On demand electrochemical release of drugs from porous reduced graphene oxide modified flexible electrodes

Article in *Journal of Materials Chemistry B* · January 2017

DOI: 10.1039/C7TB00687J

CITATIONS

3

READS

142

10 authors, including:



Roxana Jijie

Université des Sciences et Technologies de Lille 1

24 PUBLICATIONS **85** CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Alexandre Barras

French National Centre for Scientific Research

79 PUBLICATIONS **1,111** CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Santosh KUMAR Singh

University of Tsukuba

27 PUBLICATIONS **257** CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Julie Bouckaert

Université des Sciences et Technologies de Lille 1

142 PUBLICATIONS **3,176** CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



PEM Fuel Cells for Stationary Applications [View project](#)



Funcionalização de Si, SiC, e partículas de nano - diamantes, para a sua aplicação bio-analítica e entrega da droga [View project](#)



Cite this: DOI: 10.1039/c7tb00687j

On demand electrochemical release of drugs from porous reduced graphene oxide modified flexible electrodes†

Samia Boulahneche,^{ab} Roxana Jijie,^a Alexandre Barras,^a Fereshteh Chekin,^{ac} Santosh K. Singh,^d Julie Bouckaert,^e Mohamed Salah Medjram,^b Sreekumar Kurungot,^{id} Rabah Boukherroub^{id}*^a and Sabine Szunerits^{id}*^a

Despite the advantages of an electrochemical control for drug release, only a handful of electrochemical-based release systems have been developed so far. We report herein on the development of an electrochemically activatable platform for on-demand delivery of drugs. It is based on flexible gold thin film electrodes coated with porous reduced graphene oxide (prGO) nanosheets onto which the drug of interest has been integrated beforehand. Two different drugs are investigated here: ondansetron hydrochloride (ODS), a selective 5-HT₃ receptor antagonist used for preventing nausea and vomiting caused by chemotherapy and radiotherapy, and ampicillin (AMP), an antibiotic to prevent and treat a number of bacterial infections such as respiratory tract infections, urinary tract infections, and meningitis. In the case of ODS, application of a negative potential bias of -0.8 V results in a sustained slow ODS release with an ODS flux of $47 \mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$. In the case of AMP, we show that polyethyleneimine modified prGO (prGO/PEI) is an extremely efficient matrix. Upon the application of $+0.8$ V, 24% of AMP could be released from the electrical interface in a time span of 2 h. The released AMP kept its antibacterial activity as demonstrated by antimicrobial tests. These examples illustrate the major benefits of the developed approach for biomedical applications.

Received 13th March 2017,
Accepted 20th April 2017

DOI: 10.1039/c7tb00687j

rsc.li/materials-b

1. Introduction

The development of a general platform for efficient on-demand delivery of a variety of drugs remains an unachieved task. While a large variety of stimuli carriers for drug delivery at the nano and microscale have been designed and tested, for each drug, special formulations have to be designed taking into consideration the physico-chemical properties of the therapeutics. The development of a loading matrix allowing the integration of a variety of active principles would consequently be of high interest.

Considerable efforts have been directed in recent years towards the use of porous structures as drug loading matrices due to their high surface area, tunable pore size and well-defined surface architectures.^{1–5} Porous graphene based nanostructures, such as porous reduced graphene oxide (prGO), withstand high mechanical strength and also show superior electrochemical properties when compared with rGO.^{6,7} While prGO architectures have been widely used for the fabrication of high-performance energy storage devices^{8–11} and for sensing,^{7,12} their benefits for the loading and release of drugs have not been focused upon yet. As the resident porosity increases the specific surface area, higher drug loading is expected to be achieved on such nano-structured materials.

In this work, we demonstrate the use of porous reduced graphene oxide (prGO) for drug loading. Electrochemical stimulate has become a particularly appealing method for the on demand delivery of therapeutics^{13–18} and will be used here as a release strategy. Undoubtedly, prGO nanostructures are ideal platforms for the loading and electrochemically triggered release of drugs. Their high surface area together with an abundance of localized π -electrons at the surface of the nanosheets enables π - π interactions with the aromatic part of drugs, allowing high loading capacitance; and the conducting properties make them

^a Univ. Lille, CNRS, Centrale Lille, ISEN, Univ. Valenciennes, UMR 8520, IEMN, F-59000 Lille, France. E-mail: rabah.boukherroub@univ-lille1.fr, sabine.szunerits@univ-lille1.fr

^b Laboratoire de Génie Chimique et Environnement Skikda (LGCES), Université de 20 août, 1955-Skikda, Algeria

^c Department of Chemistry, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran

^d Physical and Materials Chemistry Division, CSIR-National Chemical Laboratory, Dr Homi Bhabha Road, Pune 411008, India

^e Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UGSF), UMR 8576 du CNRS et Université Lille, 50 Av. de Halley, 59658 Villeneuve d'Ascq, France

^f Academy of Scientific and Innovative Research, Anusandhan Bhawan, 2 RafiMarg, New Delhi 110 001, India

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c7tb00687j

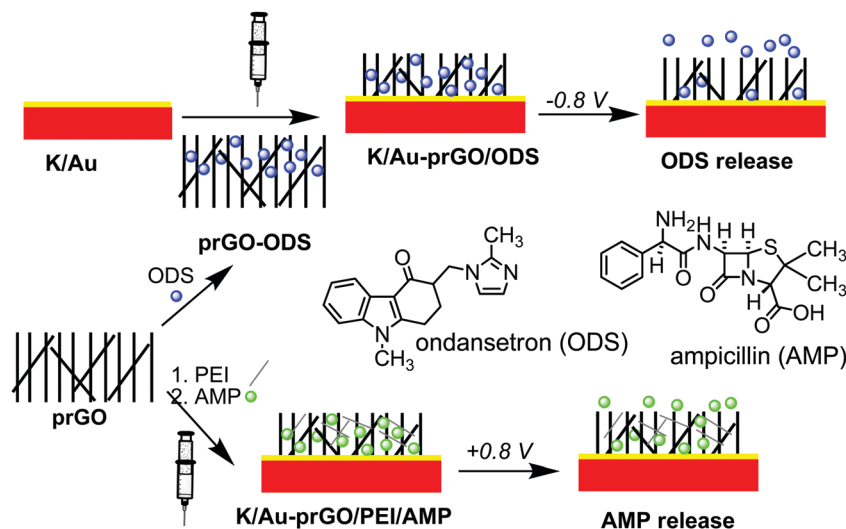


Fig. 1 Schematic illustration of the fabrication of flexible Kapton/Au-based interfaces modified with porous reduced graphene oxide (prGO) loaded with ondansetron (ODS), and polyethyleneimine (PEI) modified prGO loaded with ampicillin (AMP) for electrochemical triggered on demand release.

ideal for electrochemical applications. Drop-casting a drug loaded prGO matrix onto electrodes made of gold coated Kapton (K/Au) (Fig. 1) results in flexible interfaces, which can be electrochemically addressed. Indeed, despite all the advantages that electrochemistry offers, such as low-cost, excellent control over applied potential or current, miniaturization *etc.*, only a handful of electrochemical-based release systems have been shown to release drugs of therapeutic relevant concentrations.

Two different drugs were tested for loading onto prGO and subsequent electrochemical release: ondansetron (ODS) and ampicillin (AMP). ODS, a serotonin subtype 3 (5-HT₃) receptor antagonist, is commonly used in the treatment of chemotherapy-induced nausea vomiting. Chemotherapy-induced nausea vomiting is, next to others, one of the most painful side effects of chemotherapy, causing significant discomfort and anxiety. A study by Rogers and Blackburn shows that about 70% of patients receiving chemotherapy will experience high nausea levels and are inclined to give up treatment.¹⁹ Even though ODS is validated as a good candidate for patients receiving highly emetogenic agents, its use has been limited in people having difficulties in swallowing after chemotherapy. Besides oral delivery, numerous alternative delivery systems have been investigated, including transdermal^{20–24} and nasal administration.²⁵ We have recently developed a flexible transdermal patch for the photothermal triggered release of ODS. We have demonstrated that these ODS loaded patches have a high drug delivery performance upon irradiation with a continuous laser beam at 980 nm due to an induced photothermal heating effect.²⁴

The other drug investigated is the antibiotic AMP, as treatment of bacterial infections is still one of the most challenging tasks in the biomedical field. With the overuse of antibiotics and the resulting growing number of multidrug-resistant bacteria, the development of on demand antibiotic delivery systems is a practical strategy for reducing the generation of antibiotic resistance and increasing the lifespan of newly developed antibiotics.^{26–28} Biodegradable polymers have been considered

and investigated for the past decade as antibiotic delivery carriers for the local treatment of infections.^{26,29–31} In these systems, matrix degradation and erosion result in the release of encaged antibiotics with often low antibiotic release rates. We show here not only that a polyethyleneimine (PEI) modified prGO matrix has excellent loading capacity for AMP, but most importantly that upon application of $+0.8\text{ V}$, AMP release up to 24% can be reached in only 2 h. More importantly, the fact that the electrochemically released antibiotic did not lose its activity for the destruction of pathogens was in addition validated by studying the bacterial viability of *E. coli* pathogens.

2. Experimental section

2.1. Materials

Ondansetron (ODS) hydrochloride, hydrogen peroxide (H₂O₂), sodium hydroxide (NaOH), hydrazine monohydrate, potassium hexacyanoferrate(II) (K₄Fe(CN)₆), and branched polyethyleneimine (PEI, $M_w \sim 25\,000$) were purchased from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany) and used as received.

Graphene oxide (GO) powder was purchased from Graphenea, Spain and ampicillin (AMP) from Fisher Scientific.

Kapton[®] HN polyimide foils with a thickness of 125 μm were obtained from DuPont (Circleville, OH, USA).

2.2. Synthesis of reduced graphene oxide (rGO)

Reduced graphene oxide (rGO) was prepared from a GO precursor using hydrazine reduction. Briefly, to 5 mL GO aqueous suspension (0.5 mg mL⁻¹) was added hydrazine hydrate (0.50 mL, 32.1 mM) and heated in an oil bath at 100 °C for 24 h over which the reduced GO gradually precipitated out of the solution. The product was isolated by filtration over a PVDF membrane with a 0.45 μm pore size, washed copiously with water (5 \times 20 mL) and methanol (5 \times 20 mL) and dried in an oven at 100 °C overnight.

2.3. Synthesis of porous reduced graphene oxide (prGO)

The synthesis of prGO was based on previous work by some of us.³² rGO powder (100 mg) was dispersed in H₂O₂ (100 mL; 30%), ultrasonicated for 30 min and the mixture was refluxed for 12 h at 60 °C. The obtained solution was filtered and the recovered prGO powder was dialysed to remove H₂O₂ and to separate it from small sized graphene quantum dots.

2.4. Loading of rGO or prGO with drugs

2.4.1. Ondansetron (ODS). rGO or prGO (0.5–1 mg mL⁻¹) was sonicated with ondansetron (500 µg mL⁻¹) for 2 h while stirring. All samples were centrifuged at 13500 rpm for 30 min. The concentration of ODS loaded onto the rGO or prGO matrix was determined using UV/vis spectroscopy at 312 nm.

2.4.2. Ampicillin (AMP). prGO and prGO/PEI matrices were loaded with ampicillin (AMP) by mixing them with 10 µL of AMP solution (10 mg mL⁻¹) and stirring the suspensions for 2 h at room temperature. The prGO/PEI matrix was obtained first by mixing the two substances at a volume ratio of 1/1 (0.1–1 mg mL⁻¹) and stirring for 30 min at room temperature. All samples were centrifuged at 13500 rpm for 30 min. The concentration of AMP loaded onto the prGO/PEI matrix was determined using HPLC analysis.

2.5. Modification of gold coated Kapton foils with rGO/ODS, prGO/ODS, prGO/AMP or prGO/PEI/AMP

Kapton foils (10 × 10 mm²) were first cleaned with acetone in an ultrasonic water bath for 30 min, followed with isopropanol for 10 min and then dried under a nitrogen flow. Gold coated Kapton films were prepared by thermal evaporation of 5 nm of titanium and 50 nm of gold onto cleaned Kapton interfaces. Titanium was used as an adhesion layer between the gold surface and Kapton. Drop-casting of rGO/ODS, prGO/ODS, prGO/AMP or prGO/PEI/AMP onto Kapton/Au (three times) resulted in the K/Au-rGO/ODS, K/Au-prGO/ODS, K/Au-prGO/AMP and K/Au-prGO/PEI/AMP flexible electrodes used in this work.

2.6. Instrumentation

2.6.1 Scanning electron microscopy (SEM). SEM images were obtained using an electron microscope ULTRA 55 (Zeiss, France) equipped with a thermal field emission emitter and three different detectors (an EsB detector with a filter grid, a high efficiency In-lens SE detector and an Everhart-Thornley Secondary Electron Detector).

2.6.2 Transmission electron microscopy (TEM). High resolution transmission electron microscopy (HR-TEM) analysis of the prepared samples was carried out using a FEI, TECNAI G2 F20 instrument operated at an accelerated voltage of 300 kV (Cs = 0.6 mm, resolution 1.7 Å). For the TEM analysis the sample was prepared by drop coating 10 µL of the dispersed solution of 1 mg material in 5 mL isopropyl alcohol over carbon coated 200 mesh Cu grids. The catalyst drop coated Cu grid was dried and the prepared sample was used for imaging purposes.

2.6.3 UV/Vis measurements. Absorption spectra were recorded using a Perkin Elmer Lambda UV-Vis 950 spectrophotometer in a 1 cm quartz cuvette. The wavelength range was 200–1100 nm.

2.6.4 Zeta-potential measurements. Zeta-potential measurements were performed using a Zeta-sizer Nano-ZS (Malvern Instruments Inc. Worcestershire, UK). Samples were diluted to 10 µg mL⁻¹ and measured in Milli-Q water at a pH of 7.0.

2.6.5 Electrochemical measurements. Electrochemical measurements were performed with a potentiostat/galvanostat (Autolab, The Netherlands). A conventional three-electrode configuration was employed using a silver wire, a platinum mesh as a reference and an auxiliary electrode, respectively.

2.7. UV method for quantification of ODS

The concentration of ODS loaded onto rGO or prGO films and released from the K/Au-rGO/ODS or K/Au-prGO/ODS electrodes was determined using UV-vis spectroscopy. First a calibration curve of a series of ODS solutions of different concentrations was established. In the case of determination of ODS loaded onto rGO or prGO, the concentration of ODS remaining in the supernatant solution used for loading was measured, allowing the determination of the ODS concentration in rGO or prGO film according to:

$$[\text{ODS}]_{\text{G}} = [\text{ODS}]_{\text{initial}} - [\text{ODS}]_{\text{supernatant}}$$

with $[\text{ODS}]_{\text{G}}$ = concentration of ODS on the rGO or prGO matrix (µg mL⁻¹)

with $[\text{ODS}]_{\text{initial}}$ = initial concentration of ODS in solution (500 µg mL⁻¹)

with $[\text{ODS}]_{\text{supernatant}}$ = concentration of ODS in the supernatant (µg mL⁻¹)

In the case of release, the concentration of ODS in the electrolyte solution was determined directly using UV/Vis spectroscopy.

2.8. High-performance liquid chromatography (HPLC) for quantification of AMP loading

The concentration of AMP loaded onto prGO/PEI was determined using an HPLC system (Shimadzu, Tokyo, Japan) equipped with a 5 µm C₄ QS Uptisphere[®] 300 Å, 250 mm × 4.6 mm column (Interchim, Montluçon, France) heated to 40 °C. The mobile phase consisted of a mixture of eluent A (trifluoroacetic acid 0.1% in water) and eluent B (trifluoroacetic acid 0.1% in acetonitrile) at a flow rate of 1 mL min⁻¹. The samples were injected at a volume of 40 µL and the detection wavelength was 227 nm. First a calibration curve of a series of AMP solutions of different concentrations was generated. The concentration of AMP remaining in the supernatant solution used for loading was measured, allowing the determination of the AMP concentration in the prGO/PEI film as described for ODS.

2.9. Electrochemical release

2.9.1. Ondansetron (ODS). Release experiments were performed in 1 mL PBS (0.1 M, pH 7.4). The quantity of ODS released into the electrolyte solution was determined by UV-vis spectroscopy at 312 nm, using a calibration curve with an ODS concentration ranging from 1 to 60 µg mL⁻¹.

2.9.2. Ampicillin (AMP). Release experiments were performed in 1 mL PBS (0.1 M, pH 7.4). The quantity of AMP released into

the electrolyte solution was determined by UV-Vis analysis (see the ESI,† Fig. S1A), using a calibration curve with an AMP concentration ranging from 5 to 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (see the ESI,† Fig. S2, $y(\text{area}) = 1.11 + 0.589 \times [\text{AMP}] (\mu\text{g mL}^{-1}, R = 0.999)$).

2.10. Bacterial growth conditions

A single C43 (DE3) *E. coli* colony from an LB agar plate was inoculated overnight in Luria Bertani (LB) broth at 37 °C with moderate shaking (180 rpm). Upon 50-fold dilution, incubation was prolonged until OD_{600} had reached 0.6–1.

2.11. Bacteria cell viability

Following electrochemical release of AMP, survival of the bacteria was measured by determining the titer of viable bacteria able to grow. A 10-fold dilution series of the bacterial solutions in phosphate buffer saline was spotted in 10 μL aliquots on

LB-agar medium. Visual counting of the number of colonies upon overnight incubation at 37 °C allowed reading out of the initial and final concentrations of the *E. coli* strain in cfu mL^{-1} .

3. Results and discussion

3.1. Loading of ODS onto rGO and prGO

Fig. 2A displays TEM images of hydrazine reduced graphene oxide (rGO) and the resulting rGO that was further treated with hydrogen peroxide (H_2O_2) at elevated temperature. The generation of oxidizing free radicals (OH^\bullet , O^\bullet , HO_2^\bullet) leads to the formation of an increasing number of epoxy groups on rGO, which upon hydrolysis to hydroxyl groups result in a subsequent breaking of C–C, as evidenced in the TEM images. While rGO displays transparent continuous nanosheets, uniformly distributed nanopores (4–6 nm in diameter) are observed after H_2O_2 treatment.

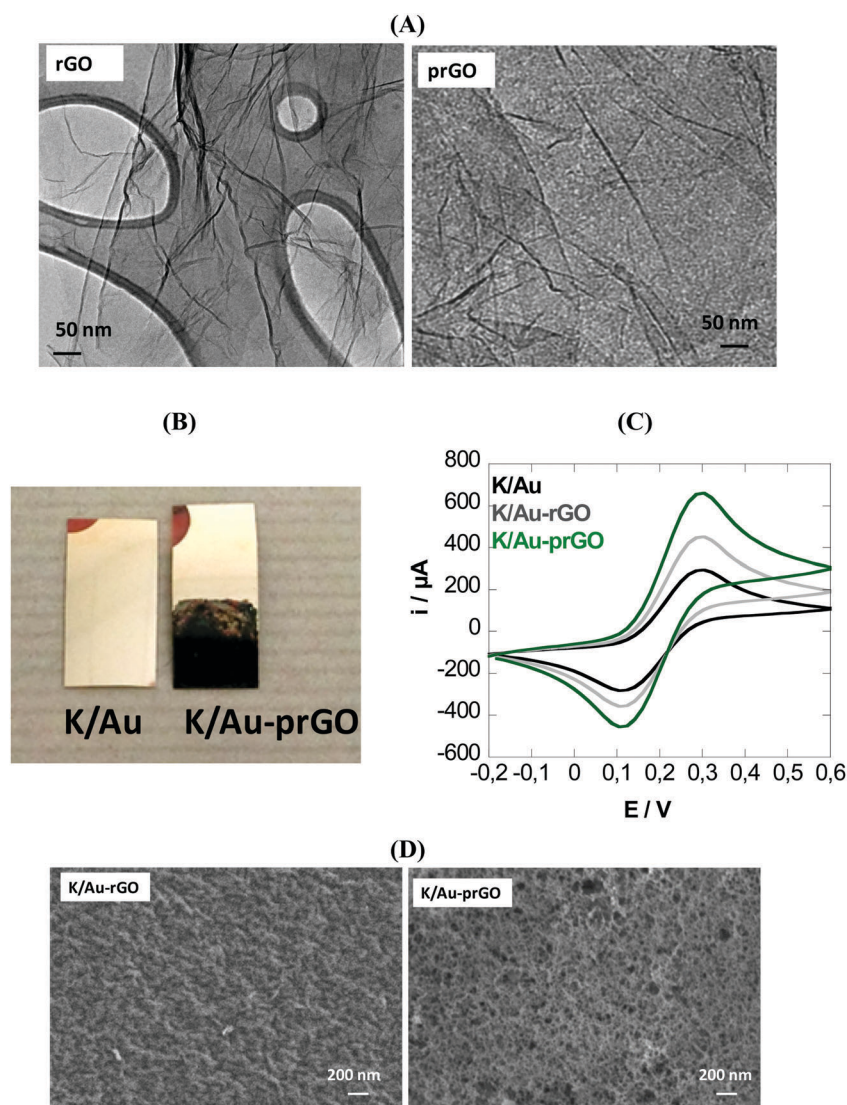


Fig. 2 (A) Transmission electron microscopy (TEM) images of reduced graphene oxide (rGO) and porous reduced graphene oxide (prGO); (B) photographs of the K/Au flexible electrode before and after coating with prGO by drop casting; (C) cyclic voltammograms of K/Au (black), K/Au-rGO (grey) and K/Au-prGO (green) using $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (5 mM)/PBS (0.1 M), scan rate = 50 mV s^{-1} ; (D) SEM images of K/Au-rGO and K/Au-prGO.

Drop-casting rGO and prGO onto gold coated Kapton film (Fig. 2B) results in bendable and flexible electrical interfaces that can be easily implemented onto the human body. The choice of 4,4'-oxydiphenylene-pyromellitimide, registered under the name Kapton, was based on its high thermal stability ($>300\text{ }^{\circ}\text{C}$) and chemical resistance, as well as excellent flexibility and adhesive properties. Fig. 2C exhibits the cyclic voltammetric responses of K/Au electrodes before and after coating with rGO or prGO using $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ as the redox couple. Well defined electrochemical signals were observed in all three cases, with a considerable increase in redox current for K/Au coated with prGO. The increased current correlated with an increased surface area (Fig. 2D) and good electronic properties of prGO as reported previously by us.⁷ Interestingly, even bending the electrode did not change the electrochemical behavior of the electrical interface.

Both matrices, rGO and prGO, were loaded with ondansetron (ODS) using different weight ratios. ODS ($500\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) was loaded onto rGO or prGO by sonicating a suspension of the respective graphene based nanomaterial in water (pH 7.4) for 4 h. The positively charged pyridine network of ODS is believed to interact with rGO and prGO through π - π stacking and/or electrostatic interactions, although other contributions such as hydrogen bonding and/or van der Waals interactions cannot be excluded. UV/Vis spectroscopy was used for the quantification of the remaining ODS in solution (Fig. 3A), where a linear relationship between the absorption band at 312 nm and ODS concentration was determined between 1 – $60\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. As seen in Fig. 3B, at a rGO/ODS or prGO/ODS weight ratio of 0.5

($500\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ rGO or prGO and $250\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ of ODS), prGO showed a three times higher loading capacity for ODS. Using a weight ratio of prGO/ODS = 1/1, a loading efficiency of 99% was determined. The loading capacity of ODS onto prGO is pH dependent, with a higher ODS loading at a pH of ≥ 7 (Fig. 3C), most likely due to the better solubility of ODS at a more alkaline pH. The improved ODS loading on prGO prompted us to use these nanostructures for further characterization and electrochemically triggered release studies.

3.2. Electrochemical triggered release of ODS

To evaluate the electrochemical release performance of the K/Au–prGO/ODS interface under physiological conditions (pH = 7.4), different voltage pulses were applied to the electrical interface and the amount of ODS released was determined using UV/Vis absorption spectroscopy. The cyclic voltammetry (CV) in PBS (0.1 M, pH 7.4) of a K/Au–prGO/ODS (Fig. 4A) indicates that ODS has no electrochemical activity. In comparison to K/Au, the oxygen reduction band at around -0.4 V is increased on K/Au–prGO/ODS. Before determining the amount of ODS released during electrochemical activation, the stability of the K/Au–prGO/ODS electrodes was established (Fig. 4B). Immersion of the interfaces for 6 h at a pH of 7 without the application of a potential resulted in only $2 \pm 1\%$ ODS release, indicating that passive release results in a very low amount of free ODS. Application of a negative potential of -0.8 V vs. SCE resulted in a somewhat higher amount of ODS released when compared with the application of $+0.8\text{ V vs. SCE}$. However, even under these

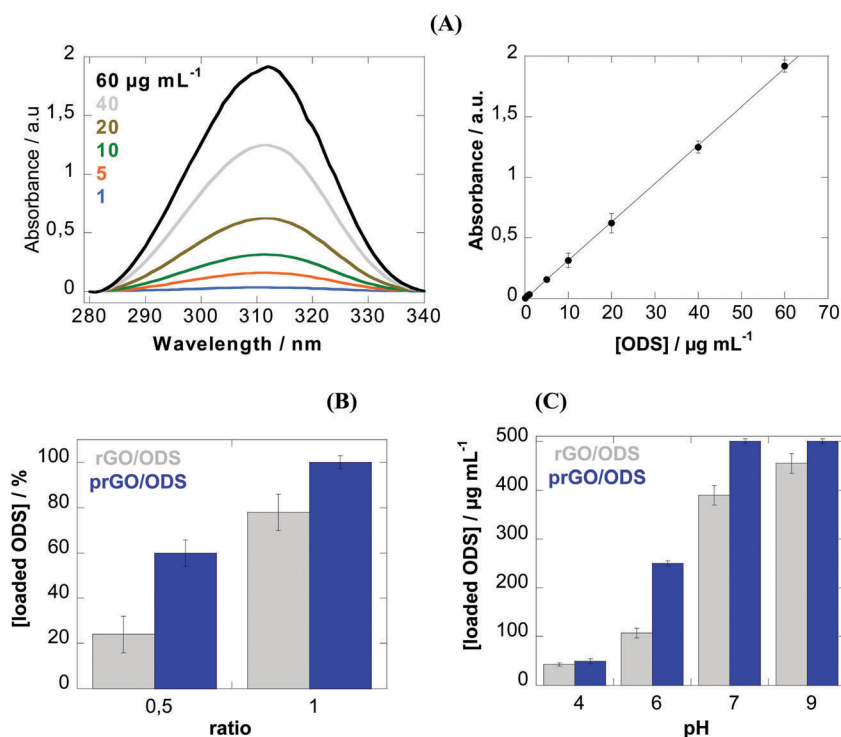


Fig. 3 (A) UV/Vis spectra of different concentrations of ODS and the corresponding calibration curve; (B) loading capacity of rGO (grey) and prGO (blue) with ODS ($500\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) at pH 7 upon varying the rGO/ODS and prGO/ODS ratios; (C) influence of pH on ODS loading ($500\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) (pH was adjusted by the addition of HCl and NaOH to PBS solutions).

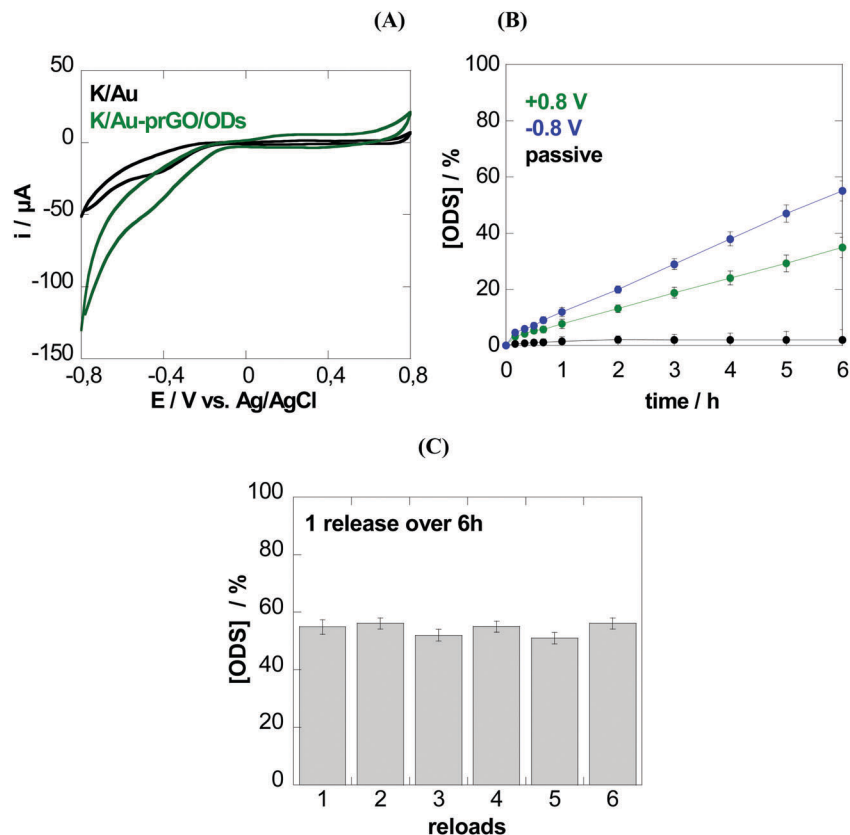


Fig. 4 (A) Cyclic voltammograms of K/Au (black) and K/Au-prGO/ODs (green) in PBS (0.1 M, pH 7.4), scan rate = 50 mV s^{-1} ; (B) electrochemical triggered ODS release over time into PBS (0.1 M, pH 7.4) upon the application of +0.8 V (green) or -0.8 V (blue), and under passive diffusion (no potential applied); (C) amount of ODS released upon reloading K/Au with prGO/ODs several times.

conditions, a considerable amount of ODS was released from the prGO-ODS matrix. The larger drug release under negative potential bias is believed to be due to local pH and charge variations. At a potential bias of -0.8 V , reduction of dissolved oxygen occurs, generating OH^- ions.¹⁵ The resulting lower pH close to the electrode surface might favor the release of ODS from the prGO matrix. Indeed, release into oxygen-free solutions for 1 h results in only 3% ODS release compared with 12% in aerated solutions. Furthermore, performing ODS release into PBS solutions at a pH of 9 results in a higher ODS release overall (Fig. 4C).

On the other hand, at a potential bias of $+0.8 \text{ V}$, the positively charged interface might overcome electrostatic interaction between ODS ($\text{p}K_{\text{a}}$ of ~ 7.4)³³ and prGO, leading to a significant release of ODS with time. Notably, passive release (no potential bias) results in a small fraction of ODS released, underlying the stability of the interface under the chosen conditions and the need of an electrochemical bias for on demand release.

Compared with the electrochemically triggered release of insulin from rGO, with up to 70% release in 30 min, the release of the smaller ODS molecule is rather slow. It is also in contrast to the recently reported photothermal release of ODS on photothermally activatable skin patches:²⁴ irradiation for 30 min resulted in a release of 15% ODS, while electrochemical release of ODS after 30 min was between 5 and 7%. However, while the

photothermal approach resulted in a release maximum after 30 min irradiation, the release of ODS as shown here is constant over a long period of time. From Fig. 4B, the flux of ODS from the electrode into solution can be determined from the slope. After a lag time of about 1 h, the ODS flux (J) into solution is determined as $47 \mu\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$. Such a flux is highly promising for follow up transdermal studies where ODS fluxes between $1 \mu\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ and $4 \mu\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ are reported.^{24,25,34}

Considering that the usual oral dose of ODS is between 16 and 32 mg a day and the oral bioavailability of ODS is 60%, for an effective ODS delivery system, about 10–20 mg a day should be delivered into the blood circulation, *i.e.* 2.5–5 mg every 6 h.³⁵ A K/Au-prGO/ODS electrode of 1 cm^2 delivers about $282 \mu\text{g}$ ODS in 6 h. An electrode of around 10 cm^2 in size is theoretically needed to deliver the daily amount required. What makes the architecture also of practical interest is that the K/Au electrode can be recharged with prGO/ODS and subsequently used for ODS release for six cycles without any loss of its performance (Fig. 4C).

3.3. Loading and release of AMP from prGO/PEI/AMP modified electrodes

Antibiotics incorporated into local delivery systems ideally demonstrate broad and sufficient efficacy as well as chemical stability. We opted here for the integration of ampicillin (AMP) into the electrochemical release matrix. AMP is part of the

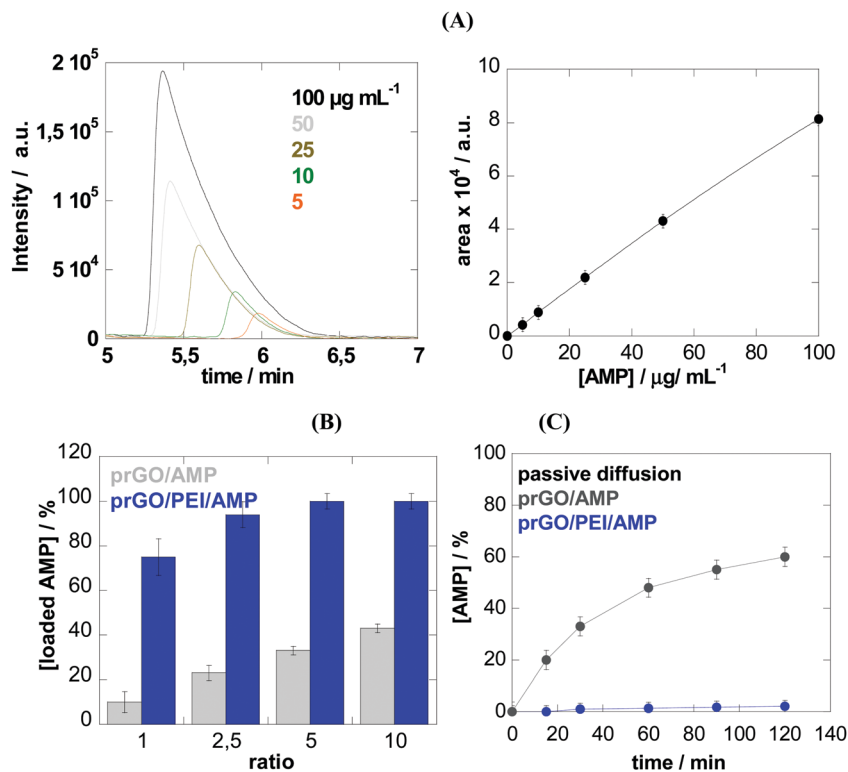


Fig. 5 (A) HPLC curve of ampicillin (AMP) at different concentrations and the corresponding calibration curve; (B) loading capacity of prGO (grey) and prGO/PEI (blue) matrix with AMP ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) upon varying the ratio of prGO and prGO/PEI with AMP; (C) stability of electrochemical interfaces modified by drop-casting of prGO/AMP (grey) or prGO/PEI/AMP (blue) upon immersion for 2 h into PBS (0.1 M, pH 7.4) without application of a potential (passive diffusion).

aminopenicillin family and the presence of the aromatic ring together with amino and carboxylic acid functions makes AMP most likely to interact with prGO through π - π stacking and/or electrostatic interactions. The preservation of the amino group upon integration into prGO is important as this function helps the drug to penetrate the outer membrane of Gram-negative bacteria. The loading capacity of prGO for AMP as determined from HPLC analysis (Fig. 5A), where a linear relationship between 5–100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ is observed, is however rather low (Fig. 5B). AMP has acid carboxylic groups with a $\text{p}K_{\text{a}} \approx 4$ –5, being thus ionized at physiological pH. The presence of the basic amino group ($\text{p}K_{\text{a}} \approx 9$) makes AMP a zwitterion at physiological pH, as amino groups are also predominately positively ionized. As prGO has a zeta potential of -19 ± 2 mV, electrostatic repulsion might prevail in this case. We consequently loaded AMP onto prGO previously modified with polyethyleneimine (PEI) by simple stirring for 2 h at room temperature. The zeta potential of the formed prGO/PEI matrix was $+41 \pm 2$ mV due to the presence of PEI. On these matrices, an AMP loading capacity of 100% was achieved using a prGO/AMP weight ratio of ≥ 2.5 ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$ prGO/PEI and $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ of AMP) (Fig. 5B).

The addition of PEI to the prGO matrix also had a positive effect on the stability of the AMP modified electrodes (Fig. 5C): while up to 60% of AMP was released from prGO/AMP, in the case of prGO/PEI/AMP only $2 \pm 1\%$ was released over a time span of 2 h.

The application of -0.8 V vs. SCE for 2 h to the prGO/PEI/AMP modified electrical interface showed no significant AMP release as determined by UV/Vis spectroscopy (see the ESI,† Fig. S1), the amount being comparable to that of passive release (Fig. 5C). This was in contrast with ODS, where the application of -0.8 V vs. SCE resulted in a significant ODS release over time (Fig. 4B). The higher solubility of ODS under alkaline conditions, generated locally upon the application of a potential bias of -0.8 V due to the generation of OH^- ions, is believed to be the underlying potential controlled release mechanism in the case of ODS. This does not apply to AMP. Furthermore, the high pH buffering capacity of PEI is believed to play an additional important role to limit AMP release under the application of a negative potential. On the other hand, biasing the prGO/PEI/AMP at $+0.8$ V vs. SCE exhibits a release of $\approx 24\%$ (equivalent to $24 \mu\text{g mL}^{-1}$) over a 2 h time span (Fig. 6A). The positively charged interface seems to be favorable to zwitterions such as AMP to be detached from the electrode surface.

While aminopenicillins are generally stable in the dry state, the drugs are stable only for short periods of time in solution. Following electrochemical release of AMP, survival of the bacteria was thus measured by determining the titer of viable bacteria able to grow. The minimum inhibitory concentration of AMP at which 50% of *E. coli* C43 isolates were inhibited was experimentally determined as $\text{MIC}_{50} = 4.9 \pm 0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Fig. 6B), consistent with previous reports. Fig. 6C shows the

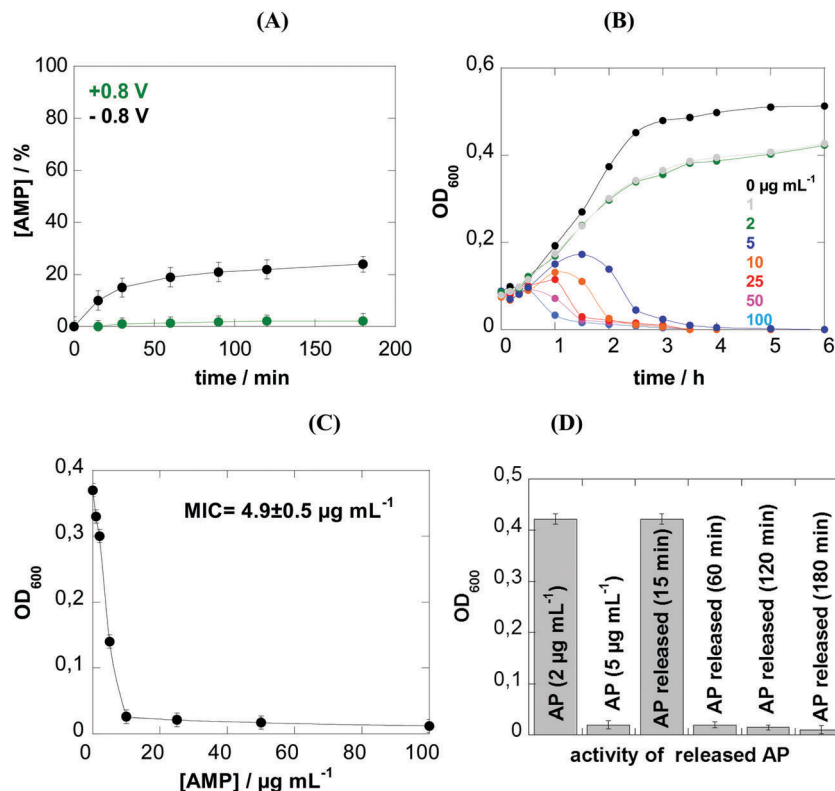


Fig. 6 (A) Electrochemical triggered AMP release from K/Au-prGO/PEI/AMP with $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ incorporated AMP over time into PBS (0.1 M, pH 7.4) upon application of +0.8 V (green) or -0.8 V (blue); (B) planktonic growth of *E. coli* (inoculum of $1 \times 10^8 \text{ cfu mL}^{-1}$) in the absence and presence of different concentrations of AMP (0– $100 \mu\text{g mL}^{-1}$); (C) change of OD_{600} at 2 h (extracted from (B)); (D) comparison of the action of free AMP ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$, negative control), AMP ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$, positive control) and electrochemically released AMP at different time intervals when incubated with *E. coli* ($1 \times 10^8 \text{ cfu mL}^{-1}$) for 2 h.

OD_{600} values determined after incubation of *E. coli* for 2 h with different AMP samples using $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ AMP as a negative control (below MIC_{50} value) and $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ AMP as a positive control (MIC_{50} value). In accordance with the electrochemical release profile, about $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ were released in the first 15 min, below the MIC_{50} value, while after 1 h the critical $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ AMP was released from the matrix.

4. Conclusion

In summary, novel porous reduced graphene oxide based electrochemical interfaces for the efficient and on-demand delivery of therapeutics have been developed. We demonstrated the adaptability of this approach by loading the matrix with two different drugs of therapeutic interest: ondansetron, a drug-limiting chemotherapy-induced nausea and vomiting, and ampicillin, a broad-band antibiotic against Gram-positive and -negative pathogens. Biasing the electrical interface at -0.8 V resulted in a constant ODS flux of $47 \mu\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ from the interface into the solution. To deliver the therapeutic ODS dose of $415\text{--}830 \mu\text{g h}^{-1}$ in the blood circulation, a 10 cm^2 large electrode would be required. While feasible to construct, such a system is rather large, and several electrodes rather than one big one should be applied in a real case therapy. The addition

of skin enhancer molecules such as Tween might also be favorable for an increased ODS release over time, making the approach of higher interest for therapeutic means.

In the case of ampicillin, PEI modified prGO was found to be a better suited loading matrix, where upon application of +0.8 V, concentrations far above the minimum inhibitory concentration of AMP for *E. coli* could be released in a time span of 3 h. In this case, the size of the interface is already well adapted for real therapy. We believe that the approach developed in this study can be applied to any active principle/drug of interest and contribute to different biomedical therapies. Experiments on possible transdermal ODS and AMP delivery using electrochemically released ODS are currently under way. These might open up new avenues for the development of electrochemical assisted transdermal delivery of drugs on demand.

Acknowledgements

Financial support from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the University Lille 1, the Hauts-de-France region, the CPER "Photonics for Society", the Agence National de la Recherche (ANR) and the EU union through FLAG-ERA JTC 2015-Graptivity, and the Marie Skłodowska-Curie action (H2020-MSCA-RISE-2015, PANG-690836) are acknowledged.

Samia Boulahneche thanks the Algerian Government for a PhD scholarship.

References

- 1 R. Gurny, E. Doelker and N. A. Peppas, *Biomaterials*, 1981, **3**, 27–32.
- 2 J. Salonen, L. Laitinen, A. M. Kaukonen, J. Tuura, M. Bjorkqvist, T. Heikkilä, K. Vähä-Heikkilä, J. Hirvonen and V. P. Lehto, *J. Controlled Release*, 2005, **108**, 362–374.
- 3 S. Tang, B. Tian, Q. F. Ke, Z. A. Zhu and Y. P. Guo, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 41500–41509.
- 4 M. Xu, M. Dan Feng, R. Dai, H. Wu, D. Zhao and G. Zheng, *Nanoscale*, 2011, **3**, 3329–3333.
- 5 P. Horcajada, T. Chalati, C. Serre, B. Gillet, C. Sebrie, T. Baati, J. F. Eubank, D. Heurtaux, P. Clayette, C. Kreuz, J.-S. Chang, Y. K. Hwang, V. Marsaud, P.-N. Bories, L. Cynober, S. Gil, G. Férey, P. Couvreur and R. Gref, *Nat. Mater.*, 2010, **9**, 172–178.
- 6 L. Jiang and Z. Fan, *Nanoscale*, 2014, **6**, 1922.
- 7 F. Chekin, S. K. Singh, A. Vasilescu, V. M. Dhavale, S. Kurungot, R. Boukherroub and S. Szunerits, *ACS Sens.*, 2016, **1**, 1462–1470.
- 8 S. Han, D. Wu, S. Li and F. Zhang, *Adv. Mater.*, 2014, **26**, 849–864.
- 9 G. Ning, Z. Fan, G. Wang, J. Gao, W. Qian and F. Wei, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 5976.
- 10 L. Ren, K. N. Hui, K. S. Huio, Y. Liu, X. Qi, J. Zhong, Y. Du and J. Yang, *Sci. Rep.*, 2015, **5**, 14229.
- 11 S. K. Singh, V. M. Dhavale, R. Boukherroub, S. Kurungot and S. Szunerits, *Applied Materials Today*, 2016, DOI: 10.1016/j.apmt.2016.10.002.
- 12 H. Maaoui, S. K. Singh, F. Teodorescu, Y. Coffinier, A. Barras, R. Chtourou, S. Kurungot, S. Szunerits and R. Boukherroub, *Electrochim. Acta*, 2017, **224**, 346–354.
- 13 S. Szunerits, F. Teodorescu and R. Boukherroub, *Eur. Polym. J.*, 2016, **83**, 467–477.
- 14 X. Luo and X. T. Cui, *Electrochem. Commun.*, 2009, **11**, 402–404.
- 15 F. Teodorescu, L. Rolland, V. Ramarao, A. Abderrahmani, D. Mandler, R. Boukherroub and S. Szunerits, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 14167–14170.
- 16 J. G. Hardy, D. J. Mouser, N. Arroyo-Curras, S. Geissler, J. K. Chow, L. Nguy, J. M. Kim and C. E. Schmidt, *J. Mater. Chem. B*, 2014, **2**, 6809.
- 17 C. L. Weaver, J. M. LaRosa, X. Luo and X. T. Cui, *ACS Nano*, 2014, **8**, 1834–1843.
- 18 L. Wu, J. Wang, N. Gao, J. Ren, A. Zhao and X. Qu, *Nano Res.*, 2015, **8**, 2400–2414.
- 19 M. P. Rogers and L. Blackburn, *Clinical J. Oncology Nursing*, 2010, **14**, 500–504.
- 20 A. S. Can, M. S. Erdal, S. Gungor and Y. Ozsoy, *Molecules*, 2013, **18**, 5455–5471.
- 21 R. M. Al Abood, S. Talegaonkar, M. Tariq and F. J. Ahmad, *Colloids Surf., B*, 2013, **101**, 143–151.
- 22 H. S. Gwak, I. S. Oh and I. K. Chun, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 2004, **30**, 187–194.
- 23 K. Swain, S. Pattnaik, S. Chandra Sahu, K. Kumar Patnaik and S. Mallick, *J. Drug Targeting*, 2010, **18**, 106–114.
- 24 F. Teodorescu, G. Quéniat, C. Foulon, M. Lecoœur, A. Barras, S. Boulahneche, M. S. Medjram, T. Hubert, A. Abderrahmani, A. Boukherroub and S. Szunerits, *J. Controlled Release*, 2017, **245**, 137–146.
- 25 H. S. Mahadjan, B. V. Tatiya and P. P. Nerkar, *Power Technol.*, 2012, **221**, 168–176.
- 26 L.-L. Li, J.-H. Xu, G.-B. Qi, X. Zhao, F. Yu and H. Wang, *ACS Nano*, 2014, **8**, 4975–4983.
- 27 Z. Lu, J. Zhang, Z. Yu, Q. Liu, K. Liu, M. Li and D. Wang, *New J. Chem.*, 2017, **41**, 432–436.
- 28 X. Shi, H. Wu, Y. Li, X. Wei and Y. Du, *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, 2013, **101**, 1373–1378.
- 29 O. S. Kluin, H. C. van der Mei, H. J. Busscher and D. Neut, *Biomaterials*, 2009, **30**, 4738–4742.
- 30 L. Chu, H. Gao, T. Cheng, Y. Zhang, J. Liu, F. Huang, C. Yang, L. Sji and J. Liu, *Chem. Commun.*, 2016, **52**, 6265.
- 31 P. Gao, X. Nie, M. Zou, Y. Shi and G. Cheng, *J. Antibiot.*, 2011, **64**, 625.
- 32 T. Palaniselvam, K. Kashyap, S. N. Bhange, J.-B. Baek and S. Kurungot, *Adv. Funct. Mater.*, 2016, **26**, 2150–2162.
- 33 G. Cevc, G. Blume, A. Schatzlein and D. Gebauer, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 1996, **18**, 349–378.
- 34 R. C. Mashru, V. B. Sutariya, M. G. Sankalia and J. M. Sankalia, *Pharm. Dev. Technol.*, 2005, **10**, 241–247.
- 35 H. S. Gwak, I. S. Oh and I. K. Chun, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2004, **30**, 187–194.

Article 2



Transdermal skin patch based on reduced graphene oxide: A new approach for photothermal triggered permeation of ondansetron across porcine skin

Florina Teodorescu^a, Gurvan Quéniat^{a,b}, Catherine Foulon^{c,*}, Marie Lecoœur^c, Alexandre Barras^a, Samia Boulahneche^{a,d}, Mohmaed Salah Medjram^d, Thomas Hubert^e, Amar Abderrahmani^b, Rabah Boukherroub^a, Sabine Szunerits^{a,*}

^a Univ. Lille, CNRS, Centrale Lille, ISEN, Univ. Valenciennes, UMR 8520 - IEMN, F-59000 Lille, France

^b University Lille, CNRS, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, European Genomic Institute of Diabetes (EGID) FR 3508, UMR 8199, Génomique Intégrative et Modélisation des Maladies Métaboliques, F-59000 Lille, France

^c Univ. Lille, EA 7365 - GRITA-Groupe de Recherche sur les formes Injectables et les Technologies Associées, F-59000 Lille, France

^d Laboratoire de Génie Chimique et Environnement de Skikda (LGCES), Université 20 Août 1955-Skikda, Algeria

^e University Lille 2, CHU Lille, INSERM, European Genomic Institute of Diabetes (EGID), INSERM, UMR 1190, F-59000 Lille, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 September 2016

Received in revised form 23 October 2016

Accepted 25 November 2016

Available online 30 November 2016

Keywords:

Kapton flexible transdermal patch

Reduced graphene oxide

Photothermal release

Ondansetron

Drugs

ABSTRACT

The development of a skin-mounted patch capable of controlled transcutaneous delivery of therapeutics through thermal activation provides a unique solution for the controlled release of active principles over long-term periods. Here, we report on a flexible transdermal patch for photothermal triggered release of ondansetron (ODS), a commonly used drug for the treatment of chemotherapy-induced nausea and vomiting and used as model compound here. To achieve this, a dispersion of ODS-loaded reduced graphene oxide (rGO-ODS) nano-sheets were deposited onto Kapton to produce a flexible polyimide-based patch. It is demonstrated that ODS loaded Kapton/rGO patches have a high drug delivery performance upon irradiation with a continuous laser beam at 980 nm for 10 min due to an induced photothermal heating effect. The ability of ODS impregnated Kapton/rGO patches as transdermal delivery scaffolds for ODS across the skin is in addition investigated using porcine ear skin as a model. We show that the cumulative quantity and flux of ODS passing the skin are highly depending on the laser power density used. At 5 W cm⁻² irradiation, the ODS flux across pig skin was determined to be 1.6 μg cm⁻² h⁻¹ comparable to other approaches. The use of tween 20 as skin enhancer could significantly increase the ODS flux to 13.2 μg cm⁻² h⁻¹. While the skin penetration enhancement is comparable to that obtained using other well-known permeation enhancers, the actual superiority and interest of the proposed approach is that the Kapton/rGO photoactivatable skin patch can be loaded with any drugs and therapeutics of interest, making the approach extremely versatile. The on demand delivery of drugs upon local laser irradiation and the possibility to reload the interface with the drug makes this new drug administration route very appealing.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Recent achievements in materials science and nanotechnology have led to the development of various suited materials as carriers of drugs and therapeutics [1–9]. Particularly, graphene-based materials have gained a great deal of interest in this domain due to their high loading capacity [3,10–16]. For example, the loading ratio (weight ratio of loaded drug to carrier) of graphene oxide (GO) towards doxorubicin hydrochloride, an anticancer drug, could reach up to 200%, much higher than

that of other nanocarriers such as nanoparticles with a loading ratio lower than 100% [13].

Various external stimuli have been employed to initiate drug release from graphene-based matrices, including pH [13,14,17], electrical [18], electrochemical [10,11,19] and light [15,20]. For on-demand release of drugs with high spatial and temporal resolution, light stimulation has shown to be an effective approach. Such photo-controlled drug delivery systems are often based on light induced photoreactions, which trigger drug release from the nanocarriers [6,21,22]. In the case of graphene-based drug-loaded scaffolds, near-infrared (NIR) light triggered photothermal effects are above all used to drive the release of therapeutics [15,20,23]. The effectiveness of graphene as NIR-absorbing photothermal agent compared to other carbon allotropes is enhanced

* Corresponding authors.

E-mail addresses: catherine.foulon@univ-lille2.fr (C. Foulon), sabine.szunerits@univ-lille1.fr (S. Szunerits).

by the rapid light-to-heat conversion of reduced graphene oxide (rGO) under low-power NIR irradiation [24]. The readily manufacturing of NIR laser pointer devices and the transparency of tissue in the NIR region make such delivery approaches amenable to clinical settings [25]. Besides a recent report by Matteini et al., where photothermal films composed of dispersion of rGO nanosheets loaded with doxorubicin in chitosan scaffolds have been proposed as delivery systems [20], photoablation of tumors by cellular uptake of graphene-based nanomaterials is most widely investigated [16,26]. However, photothermal active patches mounted on the skin, capable of controlled transcutaneous delivery of therapeutics through thermal activation, might provide a unique solution for the controlled release of active principles over long-term periods. It could thus represent a promising biomedical technology for the treatment of certain types of diseases such as cancer, diabetes and chronic pain.

In this work, the development of a drug loaded transdermal skin patch, where the embedded therapeutics can be released at demand using a photothermal trigger is presented (Fig. 1). Transdermal therapeutic systems, mostly known under the name of transdermal patches, are systems that deliver effective amount of drugs to the systemic circulation *via* the skin [27–30]. Compared to oral systems, they have the advantage of overcoming first-pass metabolism of drugs in the gut and liver, improved patient compliance and reduced side effects, and have proven to be of great therapeutic utility. However, there are several factors which make the transdermal delivery of various drugs a challenging issue. The unique structural features of the *stratum corneum*, the outermost layer of the skin, only permits lipophilic drugs with small molecular weight (<500 Da) to penetrate *via* passive diffusion [31]. A variety of methods have been tested to enhance the permeability of the *stratum corneum*. The design of chemical formulations, with chemical skin enhancers such as solvents and surfactants, as well as the synthesis of co-drug modified therapeutics to disrupt the structure of the *stratum corneum*, have been proposed [32–34]. On the other hand, physical techniques including mechanical and thermal approaches have been investigated to generate micrometer disruptions in the *stratum corneum* structure. The use of microneedles filled with drugs is one of the painless strategies to pierce the *stratum corneum* and to enhance drug

permeation [10,29,35]. Laser ablation-enhanced transdermal drug delivery using wavelengths of CO₂ and Er:YAG lasers at 10,600 nm and 2940 nm have been investigated to heat the skin to hundreds of degrees for a very short period of time in order to disrupt the *stratum corneum* structure [36,37]. Other studies have shown that heat can be used as an external trigger to increase skin permeability and is expected to enhance in addition blood vessel permeability, thus facilitating transdermal drug delivery [38,39]. Temperature dependent drug release through a hyperthermia effect is also one of the approaches used to trigger efficient drug release from graphene nanomaterials [15,20,23].

We investigate, here, if a transdermal skin patch obtained by impregnation of rGO nanosheets with ondansetron (ODS) as a model drug and deposited onto a flexible polyimide-based interface, Kapton, can deliver therapeutics across the skin at demand using NIR photothermal triggering to initiate drug release from the patch (Fig. 1). NIR light causes little tissue absorption and minimal thermal effect, but can penetrate up to 10 cm into soft tissues [40]. ODS, a selective 5-HT₃ receptor antagonist used in the treatment of nausea and vomiting related to cancer chemotherapy [41] was chosen as model drug. ODS appears to be a well suited transdermal agent as it has a molecular weight of 293 Da, a logP value of 2.07, and a pK_a of about 7.4 [28,42]. As passive transdermal delivery of ODS is very low, skin enhancers are normally added to pharmaceutical ODS formulations to enable *in vitro* skin permeation [43–45]. The interest in ODS motivated us to use this drug for the loading of the developed transdermal skin patch and to investigate the efficacy for ODS delivery through the skin upon NIR irradiation of the patch. With a pK_a of 7.6, thus being positively charged at *stratum corneum* pH (between 4.5 and 6.8), it is hoped furthermore that the interaction with negatively charged cell junctions in the *stratum corneum* will result in enhanced percutaneous penetration activity.

2. Experimental section

2.1. Materials

Hydrogen peroxide (H₂O₂), sulfuric acid (H₂SO₄), sodium hydroxide (NaOH), dimethylsulfoxide (DMSO), hydrazine hydrate, acetonitrile

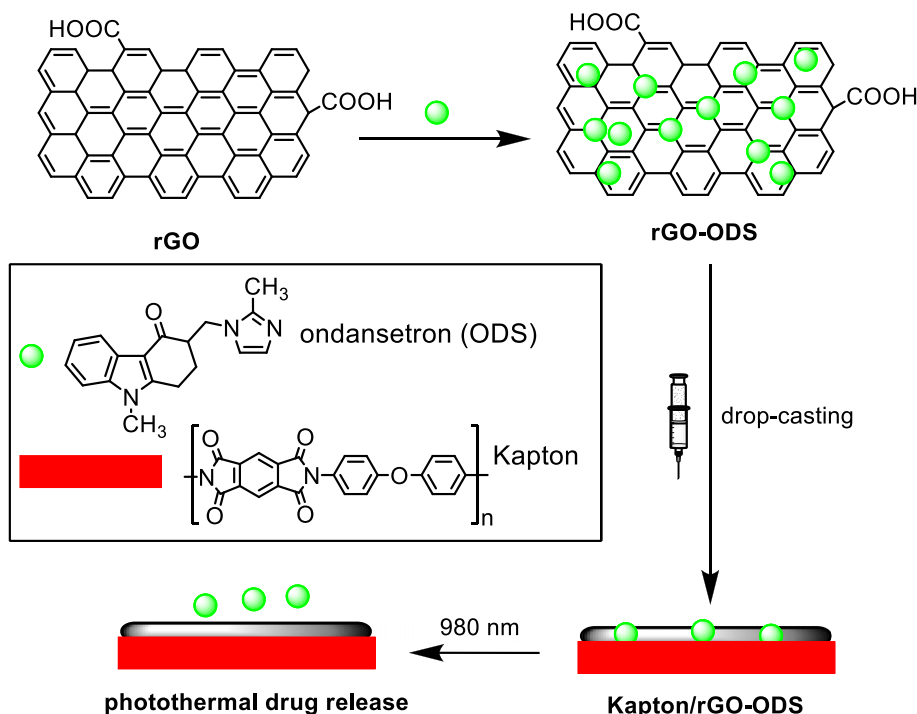


Fig. 1. Schematic illustration of the fabrication of a flexible photoactive skin-patch based on ODS-loaded rGO deposited onto Kapton.

(CH₃CN) and Tween 20 were purchased from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany) and used as received. Ondansetron (ODS) and graphene oxide (GO) were purchased from Biotrend (Zurich, Switzerland) and Graphenea (Spain), respectively. Kapton® HN Polyimide foils with a thickness of 125 µm were obtained from DuPont (Circleville, OH, USA).

2.2. Synthesis of reduced graphene oxide (rGO)

Graphene oxide (GO) was synthesized from graphite powder by a modified Hummers' method [46]. 5 mg of the synthesized GO were dispersed in 1 mL of water and exfoliated through ultrasonication for 3 h. This aqueous suspension of GO was used as a stock suspension in subsequent experiments. The reduction of GO to reduced graphene oxide (rGO) was performed by adding hydrazine hydrate (0.50 mL, 32.1 mM) to 5 mL GO aqueous suspension (0.5 mg mL⁻¹) in a round bottom flask and heated in an oil bath at 100 °C for 24 h. During this time, the reduced GO gradually precipitates out of the solution. The product was isolated by filtration over a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane with a 0.45 µm pore size, washed copiously with water (5 × 20 mL) and methanol (5 × 20 mL), and dried in an oven at 60 °C for 6 h [47].

2.3. Loading of rGO with ondansetron (ODS)

rGO (1–5 mg mL⁻¹) was sonicated with ondansetron (500 µg mL⁻¹) for 2 h under stirring. All samples were centrifugated at 13,500 rpm for 30 min. The concentration of ODS loaded onto the rGO matrix was determined using UV/Vis spectrometry (see Fig. 3A). A calibration curve (inset Fig. 3A) was established at 310 nm using a series of ODS solutions of different concentrations. The concentration of ODS remaining in the supernatant solution used for loading of rGO was first determined using the calibration curve. The ODS concentration in the patch was calculated according to equation

$$[\text{ODS}]_{\text{rGO}} = [\text{ODS}]_{\text{initial}} - [\text{ODS}]_{\text{supernatant}} \quad (1)$$

with $[\text{ODS}]_{\text{rGO}}$ = concentration of ODS on the rGO matrix (µg mL⁻¹)
 with $[\text{ODS}]_{\text{initial}}$ = initial concentration of ODS in solution (500 µg mL⁻¹)
 with $[\text{ODS}]_{\text{supernatant}}$ = concentration of ODS in supernatant (µg mL⁻¹)

2.4. Preparation of Kapton/rGO-ODS flexible skin patch

Kapton foils (10 × 10 mm²) were cleaned with acetone in an ultrasonic water bath for 30 min, followed with isopropanol for 10 min and then dried under a nitrogen flow. The cleaned Kapton foils were modified with rGO-ODS by drop-casting (100 µL) three times, followed by drying at room temperature for several hours.

2.5. Characterization of the ondansetron loaded Kapton/rGO

2.5.1. Scanning electron microscopy (SEM)

SEM images were obtained using an electron microscope ULTRA 55 (Zeiss, France) equipped with a thermal field emission emitter and three different detectors (EsB detector with filter grid, high efficiency In-lens SE detector and Everhart-Thornley Secondary Electron Detector).

2.5.2. UV/Vis measurements

Absorption spectra were recorded using a Perkin Elmer Lambda UV/Vis 950 spectrophotometer in a 1-cm quartz cuvette. The wavelength range was 200–1100 nm.

2.5.3. Zeta potential measurements

The zeta potential was determined using dynamic light scattering principle (Malvern Zetasizer, NanoZS). The values of zeta potential of rGO (50 µg mL⁻¹) and their mixtures with ODS in water at various pH (4, 6, 7 and 9) were recorded.

2.5.4. Contact angle measurements

Water contact angles were measured using 2 µL of deionized water. A remote-computer controlled goniometer system (DIGIDROP by GBX, France) was used for measuring the contact angles. The accuracy is ± 1°. All measurements were performed in ambient atmosphere at room temperature.

2.6. HPLC/UV method for quantification of ondansetron permeation through skin

Chromatographic analyses were performed using a Waters system (Milfors, MA, USA) equipped with a gradient quaternary 600E metering pump, an online degasser apparatus, a 717 plus autosampler and a 996 photodiode array detector. Data were collected and processed on a computer running with Empower software (version 2) from Waters. Separations were carried out on a reversed-phase Kinetex C18 (100 × 4.60 mm *i.d.*, 2.6 µm) column (Phenomenex, Le Pecq, France) preceded by a guard C18 column (1 × 4.60 mm). Isocratic elution was performed at 1 mL min⁻¹ with a mobile phase consisting of H₂O/acetonitrile (80/20 - v/v) mixture, containing 0.1% formic acid. The column was thermostated at 25 °C. Samples were filtered through a 0.45 µm regenerated cellulose membrane prior to loading the column (injection volume: 20 µL). Detection was performed at 310 nm. This method permits the analysis of ODS in <6 min with a linear range between 0.1 and 100 µg L⁻¹, according to a linear regression (R² > 0.999).

2.7. Photothermal release of ODS into solution

Release experiments were performed into 1 mL deionized water. The skin patch was irradiated with a continuous mode laser (Gbox model, Fournier Medical Solution) with an output light at 980 nm at various power densities (1–10 W cm⁻²) for various time intervals (1–60 min). Thermal images were captured by an Infrared Camera (Thermovision A40) and treated using ThermaCam Researcher Pro 2.9 software. The quantity of drug released was determined by assessment of ondansetron concentration in the supernatant after irradiation, by UV spectrometry method, at 310 nm, using a calibration curve with ODS concentration ranging from 1 to 100 µg mL⁻¹.

2.8. Skin permeation experiments

Skin permeation studies were performed using fresh porcine ear skin purchased in a local slaughterhouse. After thorough rinsing the pig ear with distilled water, the cartilage and the adipose tissue layer were removed with the aid of a surgical scalpel. The skin was gently shaved and cut into 1.8 cm² circular pieces. After measurement of its thickness using a digimatic micrometer (Mitutoyo, France), the skin was used immediately thereafter for diffusion experiments.

ODS skin diffusion experiments were carried out using static Franz diffusion cells (SES GmbH, Analyse System, Bechenheim, Germany) exhibiting an effective area of 0.64 cm². After filling the receptor compartment with degassed PBS (1 ×, pH 7.4), the solution was maintained at 32 °C and stirred with a magnetic stirring bar at around 500 rpm. The porcine skin was carefully clamped between the donor and the receptor compartment (3.1 mL). Pre-incubation in the receptor compartment medium for 1 h was performed before the ODS modified skin patch was applied to the skin previously wetted with 100 µL of water to insure contact between the patch and the skin. The diffusion experiment was started and followed for 6 h. The ODS modified skin patch was irradiated with a continuous wave laser at 980 nm for 10 min using different

power densities (0–10 W cm⁻²), just after the patch application. At determined time intervals (1 h), 250 µL aliquots of diffused solution were removed from the receptor compartment and analysed by HPLC. After each sampling, an equal volume of fresh diffusion medium was added to the receptor compartment to maintain a constant volume. All experiments were performed in triplicates.

The release and permeation profiles were determined by plotting the cumulative amount of ODS in the receptor compartment (Q_{exp}) (Eq. (2)) against time.

$$Q_{exp} = c_n \times V + \sum_{i=1}^{n-1} V_s \times c_i \quad (2)$$

with Q_{exp} = cumulative amount of ODS diffused through the skin (µg)

c_n = concentration of ODS (µg mL⁻¹) determined at the nth sampling interval

V = volume of the acceptor phase (receptor compartment) (mL)

The ODS flux (J) was determined according to Eq. (3):

$$J = A/S \quad (3)$$

with J = flux of ODS through the skin (µg cm⁻² h⁻¹)

A = linear slope of the cumulative amount versus time curves in equilibrium conditions (µg h⁻¹)

S = surface of the membrane of the Franz cell (0.64 cm²)

2.9. Effect of surfactant Tween 20 on skin permeation of ODS

The effect of Tween 20 on the permeation efficiency of ODS through pig skin was evaluated in two ways. In the first approach, Tween 20 was integrated into the rGO/ODS mixture by sonicating rGO (1 mg mL⁻¹) with ondansetron (500 µg mL⁻¹) and Tween 20 (500 µg mL⁻¹) for 2 h under stirring. The samples were centrifugated at 13,500 rpm for 30 min, washed with water and drop casted (100 µL, three times) onto cleaned Kapton foils, followed by drying at room temperature for several hours.

The other experimental set up consisted in applying the ODS modified skin patch to the skin previously wetted with 200 µL of a mixture of water/tween 20 (85/15 w:w %). The diffusion experiments were performed as explained in 2.8.

2.10. Evaluation of ODS trapped in the skin

To estimate the amount of ODS trapped in the skin, the skin was added into water/ice mixture for 10 min and sonicated in the presence of ZnO₂ beads (4 mm in diameter), before being centrifuged for 30 min at 13500 rpm using an ultracentrifuge (Mini Scan Fuge ORIGIO). The liquid phase was collected and filtrated through a 0.1 µm Nylon filter (Whatman Puradisc 13 mm) and the amount of ODS determined by HPLC/UV.

2.11. Skin staining and histology

Immediately after the laser release studies, the porcine skin was cleaned in water, dissected and placed in paraformaldehyde (4% v/v) for 24 h in order to fix the tissue. The samples were paraffined, sectioned and stained with the Masson's trichrome dye.

3. Results and discussion

3.1. Design and characteristics of rGO/Kapton flexible photoactive skin patches

The fabrication of a flexible photoactive skin patch is based on drop-casting a suspension of drug-loaded rGO onto 1 cm² large films of poly(4,4'-oxydiphenylene-pyromellitimide), registered under the name Kapton (Fig. 1).

The choice of Kapton as a patch material is based on some of its interesting physico-chemical properties. Highly aromatic polyimide resins such as Kapton have high thermal stability (>300 °C), a high glass transition temperature ($T_g > 200$ °C), proven chemical resistance as well as excellent flexibility and adhesive properties [48–50]. The optical absorption of GO, rGO, rGO/Kapton is depicted in Fig. 2A. The absorbance intensity at 980 nm was found to be boosted in the Kapton film. The SEM image of a rGO/Kapton matrix (Fig. 2B) shows that the entire interface is coated with a thin film of wrinkling paper-like structures as expected for rGO. The rGO/Kapton patches are stable in air for several months.

3.2. Photothermal properties of the skin patch

As the aim of the work is the development of a skin patch that can be activated by a continuous-wave NIR to provide on-demand drug delivery over an extended period of time due to an induced temperature change, the photothermal heating ability of the patch was determined. The use of NIR light in the range of 700–1100 nm is necessary, as the absorption of NIR photons of the skin is minimal in this spectral region. The wavelength of 980 nm is widely used in the construction of biomedical lasers and thus was used throughout the work. While this wavelength falls within the vibration onset of water molecules with consequently higher absorption cross section, absorption by water molecules at 980 nm is not causing problems in most cases [51,52], and might be beneficial for the photothermal delivery across the skin. One of the main advantages using 980 nm excitation rather than 810 nm is associated with deeper tissue penetration and a low level degradation of biomolecules and cellular photo-damage. The photothermal heating ability of Kapton, and rGO/Kapton was determined under NIR irradiation (Fig. 2C). Even though Kapton has a strong absorption at 980 nm, it shows no photothermal heating ability even under high laser power irradiation of 4 W cm⁻². Upon coating with rGO, temperatures up to 88 °C are reached within 10 min. To evaluate if Kapton has any synergistic effect on the final temperature, the photothermal heating curves of glass and glass modified by drop casting with rGO are recorded (Fig. 2C). Glass alone does not heat as expected. The glass/rGO interface exhibits a somewhat smaller final solution temperature of 81 °C compared to the 88 °C achieved using rGO/Kapton, indicating a rather small impact of Kapton on the photothermal properties of the patch.

3.3. Loading of skin patch with ondansetron (ODS)

ODS was integrated into rGO by sonicating a suspension of rGO (1–5 mg mL⁻¹) in water (pH 7) with 500 µg mL⁻¹ of ODS for 4 h. The loading mechanism is believed to occur through π-π stacking and/or charge interactions between rGO and the positively charged pyridine network of ODS, although other contributions such hydrogen bonding and/or van der Waals interactions cannot be excluded. The loading capacity of rGO for ODS was evaluated by measuring the concentration of ODS in solution before and after loading using UV/Vis spectrometric measurements at 310 nm. At this wavelength, ODS displays a well-defined absorption band which scales linearly with its concentration in solution (Fig. 3A). As can be seen from Fig. 3B, ODS loading increased upon increasing the ratio of [rGO]/[ODS]. A loading efficiency of 98% was reached for a rGO/ODS ratio of 4 (Fig. 3C). Further increase of the [rGO]/[ODS] ratio to 6 did not result in any increase of ODS loading at pH 7. The loading capacity of rGO was found to be pH dependent, with higher ODS loading at pH ≥ 7 (Fig. 3D). With a pKa of 7.6, under pH 7.6 ODS is mainly in a cationic form (99.97%, 97.5% and 80% at pH 4, 6 and 7, respectively) whereas at pH 9 it is mainly neutral (96.2%). As π-π stacking interactions are pH independent, the higher ODS loading under basic conditions might be due to a better solubility of ODS.

The photothermal heating curves as a function of laser power of a patch formed by drop-casting a rGO-ODS (ratio of 4) onto Kapton are

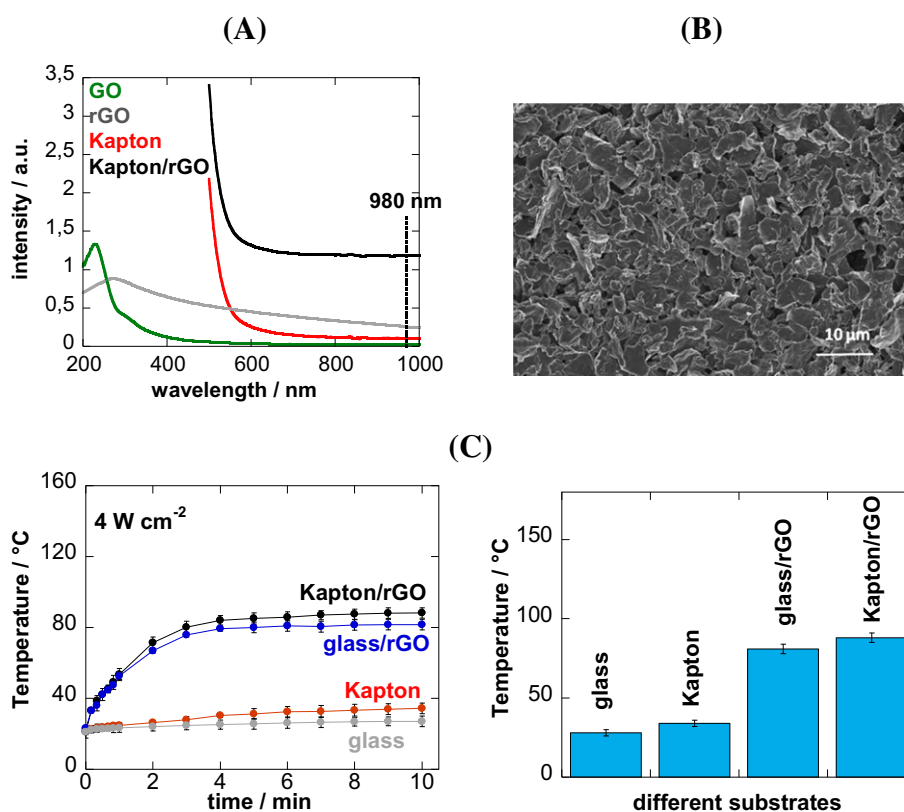


Fig. 2. (A) UV/Vis absorption spectra of an aqueous solution of GO (2 mg mL^{-1} , green), quartz interfaces coated with rGO thin films by drop-casting (2 mg mL^{-1} , three times, grey), Kapton film (red) and Kapton coated by drop casting with rGO (2 mg mL^{-1} , three times black) (2 mg mL^{-1}); (B) SEM image of rGO loaded Kapton patch; (C) Comparison of photothermal heating capacity of glass (grey), Kapton (red), glass/rGO (blue) and Kapton/rGO (black) of water under NIR illumination (980 nm) for 10 min at 4 W cm^{-2} together with final temperature in form of a bar diagram.

seen in Fig. 3E, F. The presence of ODS does not impact the solution temperature as the same temperatures were reached at 4 W cm^{-2} for Kapton/rGO-ODS (Fig. 3E) and Kapton/rGO (Fig. 2C). Depending on the laser power density used, the solution temperature can be tuned between 20 and 155 °C . This wide temperature range achieved allows investigation of the effect of temperature on skin disruption and on drug delivery. In the case of laser ablation-enhanced transdermal drug delivery, the skin gets heated to hundreds of degrees for very short time periods (μs - ms), which perforates or removes the *stratum corneum* (SC): temperatures between 100 and 150 °C results in disordering of the SC lipid structures; temperatures between 150 and 200 °C disrupt the SC keratin network structures, while temperatures above 300 °C result in a decomposition and vaporization of keratin to create micropores in the SC, which leads to increased skin permeability [53]. Pulsed CO_2 and Er:YAG lasers are required, because their emitting mid-infrared wavelength matches the absorption wavelength of water molecules, resulting in strong light absorption and skin heating [36,54]. NIR light alone, as used here, is however not sufficient to remove the *stratum corneum*.

3.4. Release of ondansetron (ODS) from ODS Kapton/rGO patches

Before determining the amount of ODS released during photothermal activation, the long term stability of the ODS loaded Kapton/rGO patch was established. Around $5 \pm 2\%$ of ODS desorbs from the patch after 1 day immersion in a solution of pH 7, indicating a stable interface over time. Fig. 4A displays the amount of photochemically released ODS upon illumination of the patch at 980 nm for 10 min with a continuous laser at different laser powers. The proportion of ODS released increases with increasing the laser power density. At 0.7 W cm^{-1} , only a small fraction of ODS was released. A temperature of 50 °C (Fig. 3F) seems not sufficient to change the affinity between ODS and rGO. At a laser power of 3 W cm^{-1} , corresponding to 89 °C , the ODS proportion

released after 10 min reached a maximal value. Despite increasing the laser power density to 10 W cm^{-1} did not increase further ODS release (Fig. 4A). An important feature of the patch is its reusability. Reloading of ODS onto the patch after photothermal release could be performed with the same efficiency for at least 6 cycles (Fig. 4B), making the patch of particular interest for the development of on-demand delivery platforms. The ODS loaded patch also provides sustained drug release upon NIR trigger. Fig. 4C exhibits the total amount of ODS released from the patch over 9 days when activated once a day for 10 min by laser illumination at 980 nm (3 W cm^{-2}). While in the first day 15% ($75 \mu\text{g mL}^{-1}$), on the second day 14% ($70 \mu\text{g mL}^{-1}$) and the third day 10% ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) of ODS were released from the matrix, thereafter the amount is kept constant at 8.8% ($44 \mu\text{g mL}^{-1}$). This experiment demonstrates that the photoactivated Kapton/rGO interface facilitates the release of multiple drug doses at demand using the same patch, without being recharged. Under the chosen conditions the patch can be indeed used for a least a week safely.

It has been previously demonstrated that photo-thermal ablation using pulsed rather than continuous laser light produces instant heating, which ceases at the end of each light pulse, resulting in much less temperature increase in the skin and favorable release [55]. In addition, the release profile of ODS under laser pulses of 100 ms , with a dead time of 500 ms , has been examined (Fig. 4D). Under laser light pulses activation, only a fraction of ODS was released when compared to that under continuous illumination (Fig. 4A). As the temperatures obtained using pulsed illumination were much lower than those under continuous one, it seems that the temperature plays a major role in the release.

3.5. Transdermal ODS delivery through pig skin

To determine the impact of NIR laser irradiation on the skin penetration ability and profile of ODS from Kapton/rGO-ODS patch reservoir,

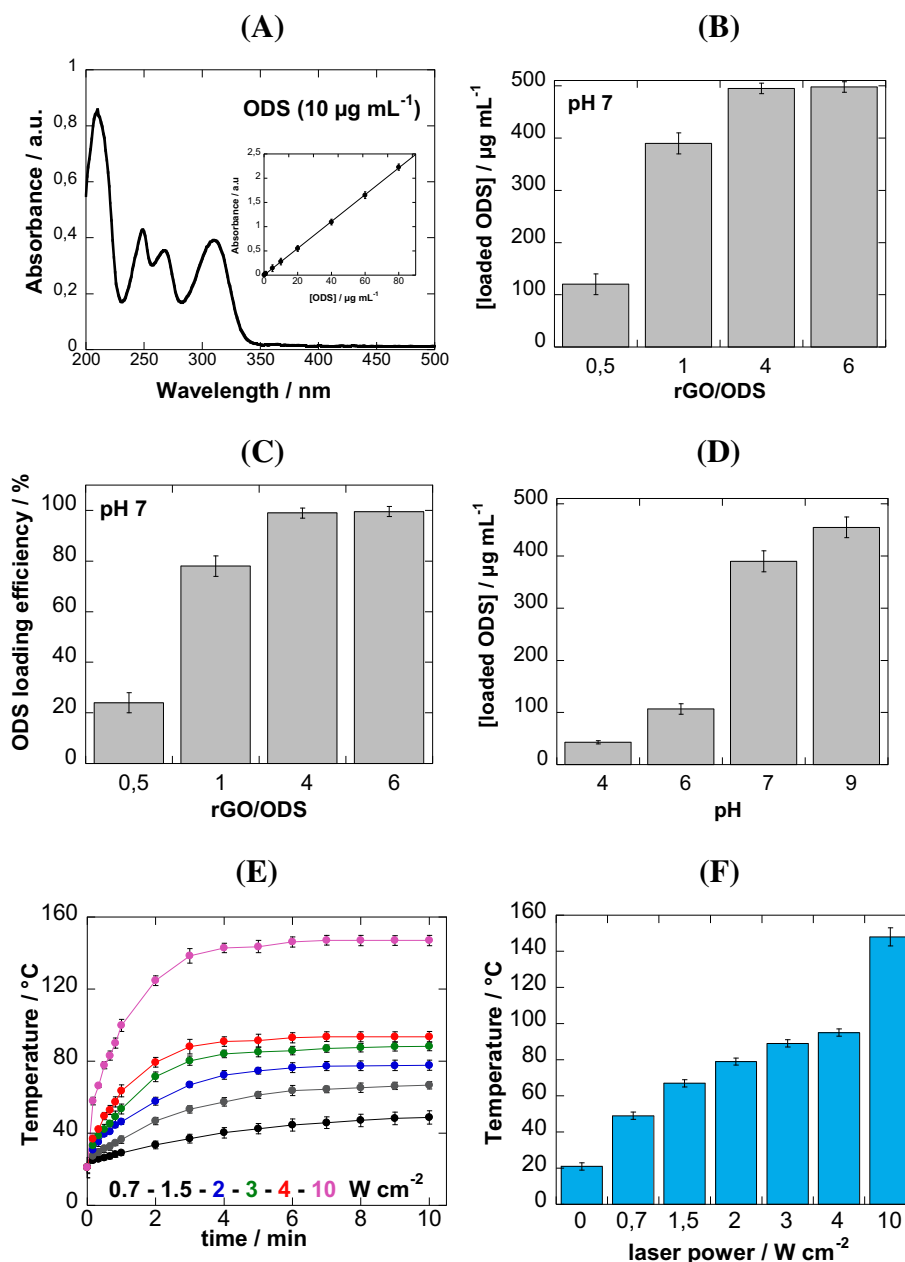


Fig. 3. ODS loading on the skin patch: (A) UV/Vis spectrum of ODS solution (inset: calibration curve); (B) ODS ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) loading capacity of rGO as a function of rGO content at pH 7; (C) ODS loading efficiency; (D) Influence of pH on ODS loading ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) onto rGO (2 mg mL^{-1}); (E) Photothermal heating curves of water using a Kapton/rGO patch under NIR illumination (980 nm) at different laser power densities using a continuous wave laser; (F) Change in water solution temperature (1 mL) during illumination of Kapton-rGO patch at 980 nm for 10 min as a function of laser power density.

the transdermal flux of ODS through skin was investigated using a Franz diffusion cells set-up. Skin permeation studies were performed using porcine ear skin since its *stratum corneum* is very similar to that of human *stratum corneum* [56]. The thickness of the skin was determined as being $1.6 \pm 0.4 \text{ mm}$. As dry skin provides a significant barrier to drug diffusion, the pig skin was wetted before the deposition of the Kapton/rGO patch. The Kapton/rGO-ODS patch was irradiated for 10 min at 980 nm at different laser power densities between 0 and 10 W cm^{-2} and the passage of ODS through the skin was followed over 6 h and quantified using HPLC/UV (see SI Fig. S1) where a linear relationship between peak area and ODS concentration between 0.1 and $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ is obtained, with a limit of detection of $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

As can be seen from Fig. 5A, no passive transdermal diffusion of ODS was observed. This was validated both by depositing (1) ODS loaded Kapton/rGO patches onto the pig skin without laser stimulation or (2)

when $200 \mu\text{L}$ of an ODS solution ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) were deposited on the skin. This is in line with reported data by others [43,44].

In vitro release profiles of ODS upon laser irradiation indicate a laser power density correlated with increase in the quantity of ODS crossing the skin (Fig. 5A). After a lag time of about 1 h, transdermal ODS delivery is observed when laser power densities of 2 and 5 W cm^{-2} were used, with a more efficient penetration of ODS at the higher laser power density. While a constant increase of ODS permeation is seen in the case of 2 W cm^{-2} , in the case of 5 W cm^{-2} ODS penetration is more effective in the first 3 h, then stagnates with a reuptake at longer penetration times.

This enhancement is correlated to the temperature increase at the vicinity of the skin from $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (0.7 W cm^{-2}) to $41 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (2 W cm^{-2}) and finally $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (5 W cm^{-2}). Indeed, controlled heat application can significantly enhance local skin perfusion and drug uptake from patches with correlate with an increased ODS transdermal delivery [57]. Surprisingly,

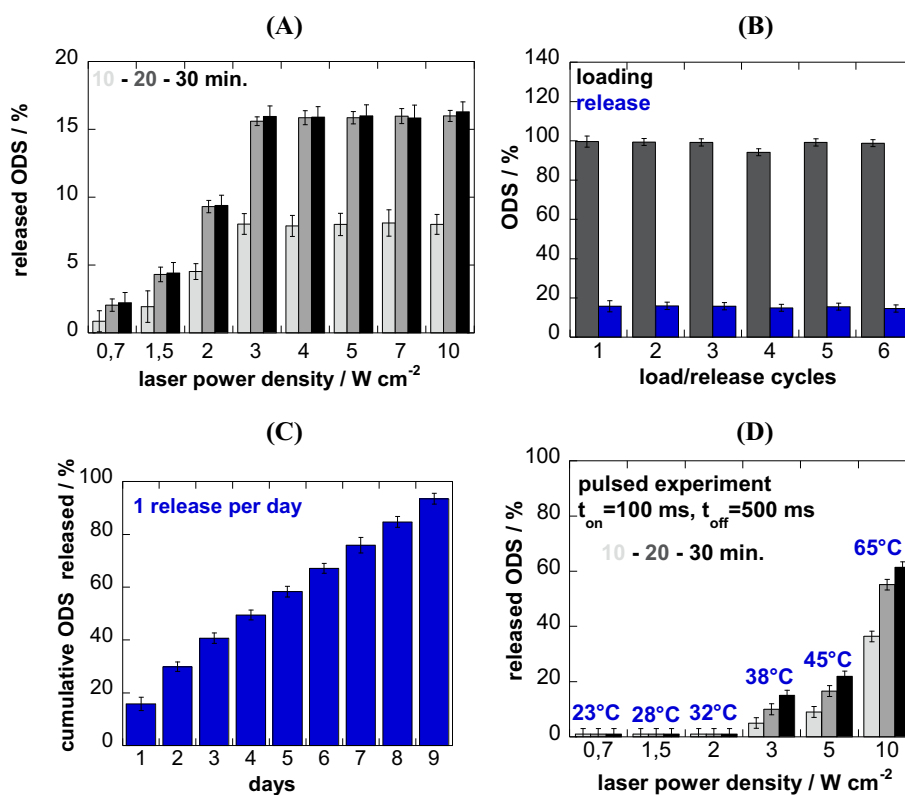


Fig. 4. ODS release: (A) Concentration of photothermally released ODS into water (pH 7) from Kapton/rGO patch (formed by mixing $500\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ODS with $1\ \text{mg mL}^{-1}$ rGO) using a continuous wave laser at 980 nm, $0.7\text{--}10\ W\ \text{cm}^{-2}$ with illumination time of 10 min; (B) Reloading (at pH 7 with $500\ \mu\text{g mL}^{-1}$) and release of ODS (980 nm, 10 min, $3\ W\ \text{cm}^{-2}$) from patch for 6 cycles; (C) Cumulative fractional release of ODS over 9 days upon activation once a day for 10 min (980 nm, $3\ W\ \text{cm}^{-2}$); (D) Concentration of photothermally released ODS into water (pH 7) from Kapton/rGO patch upon pulsed light irradiation at 980 nm and $3\ W\ \text{cm}^{-2}$.

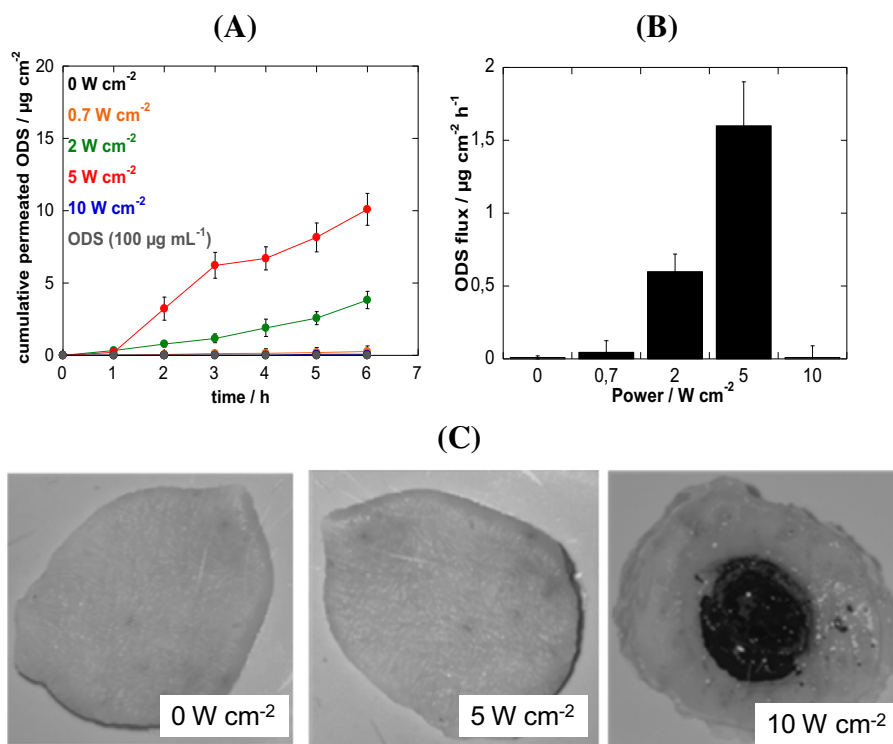


Fig. 5. (A) *In vitro* permeation profiles of ODS (cumulative amount permeated vs time) through porcine skin from Kapton/rGO-ODS patches formed by mixing $500\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ODS with $1\ \text{mg mL}^{-1}$ rGO upon light irradiation for 10 min using a continuous wave laser at 980 nm at different laser power densities; ($0.7\text{--}10\ W\ \text{cm}^{-2}$); (B) Flux of ODS determined from panel A; (C,D) Photographs of pig skin before and after laser irradiation at 5 and $10\ W\ \text{cm}^{-2}$ for 10 min.

application of a laser power density of 10 W cm^{-2} , which leads to even higher local temperature of $\approx 89^\circ\text{C}$, shows no ODS passage over time. Such temperatures should result in a disorder of the lipid structures of the *stratum corneum* and probably in the disruption of the keratin network structures of *stratum corneum*, promoting drug penetration through the skin [36]. Different to laser ablation, in our case, the heat pulse is longer and heat propagation deeper into the tissue is expected, which might prevent ODS penetration, once damaged. Fig. 5C shows photographic images of the pig skin before and after laser irradiation at 5 and 10 W cm^{-2} . It can be noticed, that while no significant burns are seen until laser power densities of 5 W cm^{-2} , the pig skin was strongly burned at 10 W cm^{-2} .

The results of the laser irradiation of ODS Kapton/rGO patches using power densities of 5 W cm^{-2} were thus investigated in more details. To determine if the rest of the ODS, which has not passed the skin, is retained in the skin rather than passed through, the amount of skin trapped ODS left was determined. Indeed, from the $495 \mu\text{g}$ ODS initially loaded on the Kapton/rGO patch, after 6 h, $70 \pm 10 \mu\text{g}$ was found to be trapped in the skin. In total, $79.6 \mu\text{g}$ ODS (16%) has thus far been released from the skin patch upon illumination at 5 W cm^{-2} , which is in accordance with results obtained in water (Fig. 4B).

From Fig. 5A, the ODS flux (J) across pig skin at 5 W cm^{-2} irradiation was determined to be $J = 3.1 \mu\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ for the first 3 h and then to decrease to $J = 1.6 \mu\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ thereafter (Fig. 5B). These values are comparable to that reported by Mashru et al. at pH 7.4 with an ODS flux of $J = 2.52 \mu\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ [58]. The results are also in line with the permeation parameters of ODS through exercised hairless mouse skin with a flux of $J = 4.04 \mu\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ reported by Gwak et al. using binary diethylene glycol monoethyl ether (DGME)/propylene glycol manocaprylate (PGMC) vehicles with a DGME/PGMC ratio of 1/100 [45].

Considering that the usual oral dose of ODS is between 16 and 32 mg a day and the oral bioavailability of ODS is 60%, for an effective transdermal delivery system, about 10–20 mg a day should be delivered via the skin into the blood circulation, i.e. 2.5–5 mg each 6 h [45]. Considering that a 25 cm^2 patch could be used, an ODS delivery of about $480 \mu\text{g}$ every 6 h can be reached, which would necessitate currently the use of several patches.

3.6. Histological analysis of laser-irradiated pig skin

The impact of the laser-irradiation on the skin structure was in addition taken into account by performing some histological investigations immediately after the laser activation experiments. Masson's trichrome dye was used for staining as it is commonly used in order to distinguish

cells from a specific tissue from cells of other connective tissues by distinguishable colorations of each tissue. Using this dye, keratin and muscle fibers are colored red, collagen and bone blue or green, cytoplasm red or pink, and cell nuclei are brown to black. As can be seen in Fig. 6, no significant histological changes were observed up to a laser power density of 2 W cm^{-2} . In the case of 5 W cm^{-2} , which resulted in a large enhanced ODS permeation, modification of the skin epidermis structure is noticed. A total disruption of the *stratum corneum* is observed, which is in line with the possibility of transdermal ODS delivery. The collagen cell structure changes to a keratin like (scar tissue).

3.7. Effect of addition of penetration enhancer on the ODS flux

The addition of penetration enhancers to transdermal delivery systems is known to improve drug penetration through the skin either by altering the skin barrier or by modifying the thermodynamic activity of penetrates [32]. We opted for the use of surfactant Tween 20, a known efficient skin enhancer used for ODS transdermal delivery [44]. Fig. 7A shows the *in vitro* permeation profiles of ODS through porcine skin using either a skin patch where Tween 20 had been integrated into the rGO/ODS formulation and when the porcine skin was simply wetted with $200 \mu\text{L}$ of a solution of Tween 20 (15 wt.% in water) before the Kapton/rGO-ODS patch was placed onto the skin. Integration of Tween 20 into the skin patch (Kapton/rGO-ODS-tween 20) results in about 2.8 times higher permeated ODS, with an ODS flux of $4.49 \mu\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$. However, the ODS flux was significantly enhanced to $13.2 \pm 1.5 \mu\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ when Tween 20 was directly deposited onto the pig skin and not integrated into the patch formulation. With a skin patch of 25 cm^2 about $2 \pm 0.2 \text{ mg}$ of ODS are delivered every 6 h, a therapeutically correct dose.

4. Conclusion

In summary, we have developed a new strategy for the transdermal delivery of drugs using a composite patch based on Kapton modified with reduced graphene oxide (rGO). Ondansetron (ODS), a common drug to limit chemotherapy induced nausea and vomiting was used as a model drug to validate the concept. While ODS has a very good oral bioavailability, good water solubility and low molecular weight, its low permeability does not allow passive transdermal delivery. We could show that the use of ODS loaded Kapton/rGO patch upon laser-irradiation at 980 nm for 10 min results in an enhanced skin penetration without the use of permeation enhancers. The release strategy is based on a photothermally induced temperature increase, which modulates

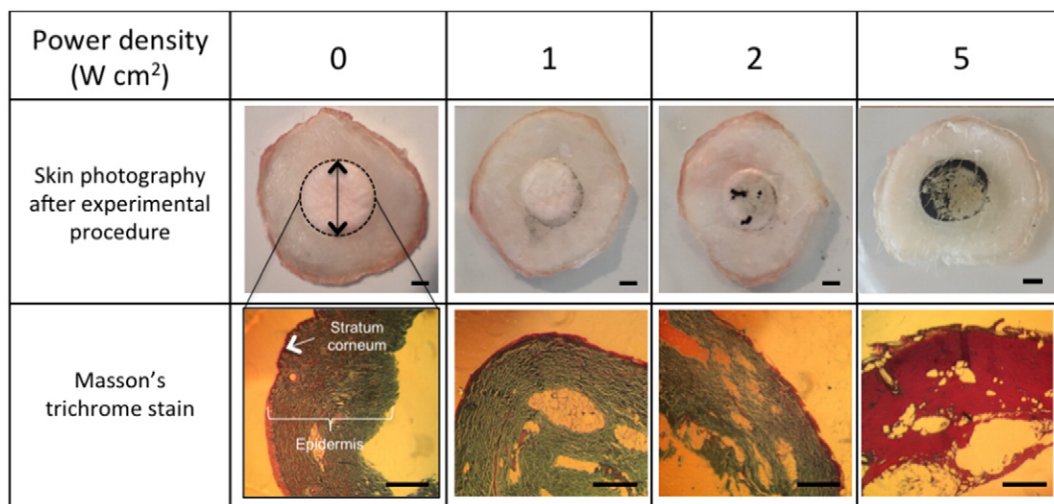


Fig. 6. Representative photographs and histology of pig ear skin after treatment with different laser power densities at 980 nm for 10 min. Scale bar = 0.5 mm.; the black spots on the skin are due to rGO.

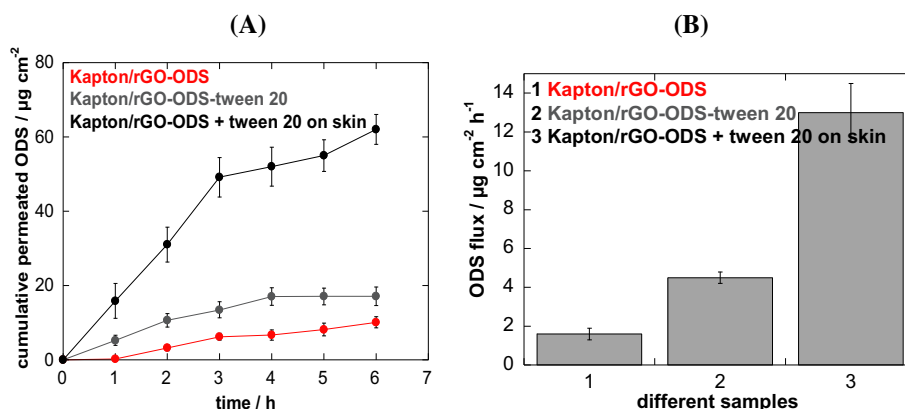


Fig. 7. *In vitro* permeation profiles of cumulative permeated ODS through porcine skin upon light irradiation for 10 min using a continuous wave laser at 980 nm at 5 W cm⁻² from Kapton/rGO-ODS (red; formed by mixing 500 µg mL⁻¹ ODS with 1 mg mL⁻¹ rGO), Kapton/rGO-ODS-tween 20 impregnated patches (grey; formed by mixing 500 µg mL⁻¹ ODS with 500 µg mL⁻¹ tween 20 and 1 mg mL⁻¹ rGO) and from Kapton/rGO-ODS by wetting the skin with tween 20 (200 µL, 15 wt.% in water); (B) Flux of ODS determined.

the affinity of ODS to rGO, and results in a controlled ODS release from the patch. Using porcine ear skin as a model the cumulative quantity of ODS passing the skin and the ODS flux are highly dependent on the laser power density used. At 5 W cm⁻² irradiation, the ODS flux across pig skin was determined to be 1.6 µg cm⁻² h⁻¹. The transdermal ODS dose delivered is smaller than the expected dose necessary for a therapeutic effect. However, the ODS flux could be increased to 13.2 µg cm⁻² h⁻¹ when Tween 20 was used for skin wetting. With a skin patch of 25 cm², a delivery of about 2 mg every 6 h [45] can thus be reached.

These results showing the potential of photothermal transdermal delivery using appropriate skin patches are encouraging and might open up new avenues for the development of NIR assisted transdermal delivery of different drugs using photothermal nanostructures. An intrinsic advantage for the proposed approach is that rGO is not delivered at the same time as the drug under consideration, minimizing regulatory issues as well as safety and toxicity issues. The fabrication costs of these skin patches are low as rGO can be produced on large scale industrially and as only small quantities of rGO (1 mg/mL) is needed for the fabrication of a patch. Furthermore, these patches can be easily recharged with ODS or any drug of interest by simple immersing Kapton/rGO into the respective solution. We believe that all these criteria make this photoactivable patch at demand an interesting alternative to other ODS formulations.

Acknowledgements

R.B. and S.S. gratefully acknowledge financial support from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Lille1 University, the CPER "Photonics for Society", and the Hauts-de-France Region. S.S. thanks the Institut Universitaire de France (IUF) for financial support. Support from the European Union through H2020-MSCA-RISE-2015 (No. 690836, PANG) is also acknowledged.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.11.029>.

References

- [1] M. Bikram, J.L. West, Thermo-responsive systems for controlled drug delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.* 10 (2008) 1077–1091.
- [2] L. Deng, J. Ren, J. Li, J. Leng, Y. Qu, C. Lin, D. Shi, Magnetically responsive star-block copolymeric micelles for controlled drug delivery and enhanced thermo-chemotherapy, *Nanoscale* 7 (2015) 9655–9663.
- [3] S. Goenka, V. Sant, S. Sant, Graphene-based nanomaterial for drug delivery and tissue engineering, *J. Control. Release* 173 (2014) 75–88.
- [4] J.S. Im, B.C. Bai, Y.-S. Lee, The effect of carbon nanotubes on drug delivery in an electro-sensitive transdermal drug delivery system, *Biomaterials* 31 (2010) 1414–1419.
- [5] D.A. La Van, T. McGuire, R. Langer, Small-scale systems for in vivo drug delivery, *Nat. Biotechnol.* 21 (2003) 1184.
- [6] S. Mura, J. Nicolas, P. Couvreur, Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery, *Nat. Mater.* 12 (2013) 991–1003.
- [7] D. Peer, J.M. Karp, S. Hong, O.C. Farokhzad, R. Margalit, R. Langer, Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy, *Nat. Nanotechnol.* 2 (2007) 751.
- [8] C.L. Stevenson, J.T. Santini, R. Langer, Reservoir-based drug delivery systems using microtechnology, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012).
- [9] W. He, X. Guo, M. Zhang, Transdermal permeation enhancement of *N*-trimethyl chitosan for testosterone, *Int. J. Pharm.* 356 (2008) 82–87.
- [10] H. Lee, T.K. Choi, Y.B. Lee, H.R. Cho, R. Ghaffari, L. Wang, H.J. Choi, T.D. Chung, N. Lu, T. Hyeon, S.H. Choi, D.-H. Kim, A graphene-base electrochemical device with thermoresponsive microneedles for diabetes monitoring and therapy, *Nat. Nanotechnol.* (2016).
- [11] F. Teodorescu, L. Rolland, V. Ramarao, A. Abderrahmani, D. Mandler, R. Boukherroub, S. Szunerits, Electrochemically triggered release of human insulin from an insulin-impregnated reduced graphene oxide modified electrode, *Chem. Commun.* 51 (2015) 14167–14170.
- [12] J. Hong, N.J. Shah, A.C. Drake, P.C. DeMurth, J.B. Lee, J. Chen, P.T. Hammond, Graphene multilayers as gates for multi-week sequential release of proteins from surfaces, *ACS Nano* 6 (2012) 81–88.
- [13] X. Yang, X. Zhang, Z. Liu, Y. Ma, Y. Huang, Y. Chen, High-efficiency loading and controlled release of doxorubicin hydrochloride on graphene oxide, *J. Phys. Chem. C* 112 (2008) 17554–17558.
- [14] K. Turcheniuk, A. Mororina, P. Subramanian, A. Barras, V. Zaitsev, V. Kuncser, A. Leca, A. Martoriat, K. Cailliau, J.-F. Bodart, R. Boukherroub, S. Szunerits, Insulin loaded iron magnetic nanoparticles-graphene oxide composites: synthesis, characterization and application for diabetes treatment, *RSC Adv.* 4 (2014) 865–875.
- [15] H. Kim, W.J. Kim, Photothermally controlled gene delivery by reduced graphene oxide-polyethylenimine nanocomposite, *Small* 10 (2014) 117–126.
- [16] Z. Liu, J.T. Robinson, X. Sun, H. Dai, PEGylated nanographene oxide for delivery of water-insoluble cancer drugs, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 10876–10877.
- [17] L. Zhang, J. Xia, Q. Zhao, L. Liu, Z. Zhang, Functional graphene oxide as a nanocarrier for controlled loading and targeted delivery of mixed anticancer drugs, *Small* 6 (2010) 537–544.
- [18] C.L. Weaver, J.M. LaRosa, X. Luo, X.T. Cui, Electrically controlled drug delivery from graphene oxide nanocomposite films, *ACS Nano* 8 (2014) 1834–1843.
- [19] N.M. Kenna, P. Calvert, A. Morrin, G.G. Wallace, S.E. Moulton, Electro-stimulated release from a reduced graphene oxide composite hydrogel, *J. Mater. Chem. B* 3 (2015) 2530.
- [20] P. Matteini, F. Tatini, L. Cavigli, S. Ottaviano, G. Ghini, R. Pini, Graphene as a photothermal switch for controlled drug release, *Nanoscale* 6 (2014) 7947.
- [21] Z. Yan, D. Zhao, X. Yi, R. Zhuo, F. Li, Steric protected and illumination-activated tumor targeting accessory for endowing drug-delivery system with tumor selectivity, *Adv. Funct. Mater.* 24 (2014) 1799–1807.
- [22] D. Wang, S. Wu, Red-light responsive supramolecular valves for photocontrolled drug release from mesoporous nanoparticle, *Langmuir* 32 (2016) 632–636.
- [23] Y.-W. Wang, Y.-Y. Fu, Q. Peng, S.-S. Guo, G. Liu, J. Li, H.-H. Yang, G.-N. Chen, Dye-enhanced graphene oxide for photothermal therapy and photoacoustic imaging, *J. Mater. Chem. B* 1 (2013) 5762–5767.
- [24] Z.M. Markovic, L.M. Harhaji-Trajkovic, B.M. Todorovic-Markovic, D.P. Kepoc, K.M. Arsić, S.P. Jovanovic, A.C. Pantovic, M.D. Dramacina, V.S. Trajkovic, *Biomaterials* 32 (2011) 1121.
- [25] B.P. Timko, M. Arruebo, S.A. Shankrappa, J.B. McAlvin, O.S. Okonkwo, B. Mizrahi, C.F. Stefanescu, L. Gomez, J. Zhu, A. Zhu, J. Santamaria, R. Langer, D.S. Kohane, Near-

- infrared (actuators for remotely controlled drug delivery), *PNAS* 111 (2014) 1349–1354.
- [26] E. Akhavan, E. Ghaderi, Graphene nanomesh promises extremely efficient in vivo photothermal therapy, *Small* 9 (2013) 3593.
- [27] T. Tagnner, R. Marks, Delivering drugs by the transdermal route: review and comments, *Skin Res. Technol.* 14 (2008) 249–260.
- [28] G. Cevc, G. Blume, A. Schatzlein, D. Gebauer, The skin: a pathway for systematic treatment with patches and lipid-based carriers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 18 (1996) 349–378.
- [29] D.P. Wermeling, S.L. Banks, D.A. Hudson, H.S. Gill, J. Gupta, M.R. Prausnitz, A.L. Stinchcomb, Microneedles permit transdermal delivery of a skin-impermeant medication to humans, *PNAS* 105 (2008) 2058–2063.
- [30] M.R. Prausnitz, S. Mittagotri, R. Langer, *Nat. Rev. Drug Discov.* 3 (2004) 115–124.
- [31] T. Hampton, Breaking barriers in transdermal drug delivery, *J. Am. Med. Assoc.* 293 (2005) 2083.
- [32] A.C. Williams, B.W. Barry, Penetration enhancers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (2004) 603–618.
- [33] H.K. Vaddi, et al., Human skin penetration of branched chain 3-O-alkyl ester and carbonate prodrugs of naltrexone, *Pharm. Res.* 22 (2005) 758–765.
- [34] Y. Chen, Y. Shen, X. Gui, C. Zhang, W. Yang, M. Ma, S. Liu, M. Zhang, L.P. Wen, Transdermal protein delivery by coadministered peptides identified via phage display, *Nat. Biotechnol.* 24 (2006) 455–460.
- [35] S. Yang, F. Wu, J. Liu, G. Fan, W. Welsh, H. Zhu, T. Jin, Phase-transition microneedle patches for efficient and accurate transdermal delivery of insulin, *Adv. Mater.* 25 (2015) 4633–4641.
- [36] Y. Li, L. Guo, W. Lu, Laser ablation-enhanced transdermal drug delivery, *Photon Lasers Med.* 2 (2013) 315–322.
- [37] M.R. Prausnitz, R. Langer, Transdermal drug delivery, *Nat. Biotechnol.* 26 (2008) 1261–1268.
- [38] J. Vanakoski, T. Seppala, Heat exposure and drugs. A review of the effects of hyperthermia and pharmacokinetics, *Clin. Pharmacokinet.* 34 (1998) 311–322.
- [39] K.K. Peersen, M.L. Rousing, C. Jensen, L. Arendt-Nielsen, P. Gazerani, Effect of local controlled heat on transdermal delivery of nicotine, *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* 3 (2011) 236–242.
- [40] B.P. Timko, D.S. Kohane, Prospects for near-infrared technology in remotely triggered drug delivery, *Expert Opin.* 11 (2014) 1681–1685.
- [41] R. Patel, S. Naik, J. Patel, A. Baria, *Arch. Pharm. Sci. Res.* 1 (2009) 212.
- [42] B. Godin, E. Touthou, Transdermal skin delivery: predictions for human from in vivo, ex vivo and animal models, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 1152–1161.
- [43] A.S. Can, M.S. Erdal, S. Gungor, Y. Ozsoy, Optimization and characterisation of chitosan films for transdermal delivery of ondansetron, *Molecules* 18 (2013) 5455–5471.
- [44] R.M. Al Abood, S. Talegaonkar, M. Tariq, F.J. Ahmad, Microemulsion as a tool for the transdermal delivery of ondansetron for the treatment of chemotherapy induced nausea and vomiting, *Colloids Surf. B* 101 (2013) 143–151.
- [45] H.S. Gwak, I.S. Oh, I.K. Chun, Transdermal delivery of ondansetron hydrochloride: effects of vehicles and penetration enhancers, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 30 (2004) 187–194.
- [46] O. Fellahi, M.R. Das, Y. Coffinier, S. Szunerits, T. Hadjersi, M. Maamache, R. Boukherroub, Silicon nanowire arrays-induced graphene oxide reduction under UV irradiation, *Nanoscale* 3 (2011) 4662–4669.
- [47] S. Stankovich, D.A. Dikin, R.D. Piner, K.A. Kohlhaas, A. Kleinhammes, Y. Jia, Y. Wu, S.T. Nguyen, R.S. Ruoff, Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide, *Carbon* 45 (2007) 1558.
- [48] P. A. Sensor Applications of Polyimides, *InTech*, 2012 199–214 (Chapter 10).
- [49] D. Wilson, H.D. Stenzenberger, P.M. Hergenrother, Polyimides, Chapman & Hall, London, 1990.
- [50] D. Sui, Y. Huang, L. Hung, J. Liang, Y. Ma, Y. Chen, Flexible and transparent electrothermal film heaters based on graphene materials, *Small* 7 (2011) 3186–3192.
- [51] Y.M. Bae, Y.I. Park, S.H. Nam, J.H. Kim, K. Lee, H.M. Kim, B. Yoo, J.S. Choi, K.T. Lee, T. Hyeon, Y.D. Suh, Endocytosis, intracellular transport, and exocytosis of lanthanide-doped upconverting nanoparticles in single living cells, *Biomaterials* 33 (2012) 9080–9086.
- [52] S.H. Nam, Y.M. Bae, B.J. Park, J.H. Kim, H.M. Kim, J.S. Choi, K.T. Lee, T. Hyeon, Y.D. Suh, Long-term real-time tracking of lanthanide ion doped upconverting nanoparticles in living cells, *Angew. Chem. Int. Ed.* 50 (2011) 6093–6097.
- [53] W.R. Lee, S.C. Shen, K.H. Wang, C.H. Hu, J.Y. Fang, The effect of laser treatment on skin to enhance an control transdermal delivery of 5-fluorouracil, *J. Pharm. Sci.* 91 (2002) 1613–1626.
- [54] R. Kaufmann, C. Beier, Laser skin ablation: an update on aesthetic and medical indications, *Med. Laser Appl* 19 (2004) 212–222.
- [55] S. Ramadan, L. Guo, Y. Li, B. Yan, W. Lu, Hollow copper sulfide nanoparticle-mediated transdermal drug delivery, *Small* 8 (2012) 3143–3150.
- [56] K. Guth, M. Schäfer-Korting, E. Fabian, R. Landsiedel, B. van Ravenzwaay, Suitability of skin integrity tests for dermal absorption studies in vitro, *Toxicology* 29 (2015) 113–123.
- [57] K.K. Petersen, M.L. Rousing, C. Jensen, L. Arendt-Nielsen, P. Gazerani, Effect of local controlled heat on transdermal delivery of nicotine, *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* 3 (2011) 236–242.
- [58] R.C. Mashru, V.B. Sutariya, M.G. Sankalia, J.M. Sankalia, Effect on pH on in vitro permeation of ondansetron hydrochloride across porcine buccal mucosa, *Pharm. Dev. Technol.* 10 (2005) 241–247.

